


	DIN EN ISO 10993-10	
ICS 11.100.20	Ersatz für DIN EN ISO 10993-10:2014-10	
<p>Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 10: Prüfungen auf Hautsensibilisierung (ISO 10993-10:2021); Deutsche Fassung EN ISO 10993-10:2023</p> <p>Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for skin sensitization (ISO 10993-10:2021); German version EN ISO 10993-10:2023</p> <p>Évaluation biologique des dispositifs médicaux – Partie 10: Essais de sensibilisation cutanée (ISO 10993-10:2021); Version allemande EN ISO 10993-10:2023</p>		
Gesamtumfang 67 Seiten		
DIN-Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO)		

DIN EN ISO 10993-10:2023-04

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10993-10:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 194 „Biological and clinical evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 206 „Biologische und klinische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 027-07-12 AA „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ im DIN-Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-2	siehe	DIN EN ISO 10993-2
ISO 10993-5	siehe	DIN EN ISO 10993-5
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12
ISO 10993-18	siehe	DIN EN ISO 10993-18
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 10993-10:2014-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) das Dokument enthält jetzt nur eine Beschreibung der Prüfungen zur Hautsensibilisierung;
- b) Anhang C über alternative Prüfverfahren für die Hautsensibilisierung wurde aktualisiert;
- c) die Prüfung auf Irritation ist nun in ISO 10993-23 beschrieben;
- d) der informative Anhang ZA über den Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung [EU] 2017/745 wurde hinzugefügt.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 10993-10: 1996-02, 2003-02, 2007-06, 2009-08, 2010-12, 2014-10

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10993-1, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*

DIN EN ISO 10993-2, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 2: Tierschutzbestimmungen*

DIN EN ISO 10993-5, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität*

DIN EN ISO 10993-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*

DIN EN ISO 10993-18, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen für Medizinprodukte im Rahmen eines Risikomanagementsystems*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

DIN EN ISO 10993-10:2023-04

– Leerseite –

EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE

EN ISO 10993-10

Februar 2023

ICS 11.100.20

Ersetzt EN ISO 10993-10:2010

Deutsche Fassung

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten —
Teil 10: Prüfungen auf Hautsensibilisierung
(ISO 10993-10:2021)

Biological evaluation of medical devices —
Part 10: Tests for skin sensitization
(ISO 10993-10:2021)

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —
Partie 10: Essais de sensibilisation cutanée
(ISO 10993-10:2021)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. September 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

© 2023 CEN Alle Rechte der Verwertung, gleich in welcher Form und in welchem Verfahren, sind weltweit den nationalen Mitgliedern von CEN vorbehalten.

Ref. Nr. EN ISO 10993-10:2023 D

DIN EN ISO 10993-10:2023-04
EN ISO 10993-10:2023 (D)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745	6
Vorwort	9
Einleitung	10
1 Anwendungsbereich	11
2 Normative Verweisungen	11
3 Begriffe	11
4 Allgemeine Grundsätze — Stufenweises Vorgehen	13
5 Überlegungen vor der Prüfung	14
5.1 Allgemeines	14
5.2 Arten von Materialien	14
5.2.1 Erste Überlegungen	14
5.2.2 Keramik, Metalle und Legierungen	14
5.2.3 Polymere	14
5.2.4 Materialien biologischer Herkunft	14
5.3 Informationen über die chemische Zusammensetzung	15
5.3.1 Allgemeines	15
5.3.2 Vorhandene Datenquellen	15
6 Prüfungen auf Hautsensibilisierung	15
6.1 Auswahl von Prüfverfahren	15
6.2 Lokaler Lymphknotentest an der Maus	16
6.2.1 Kurzbeschreibung	16
6.2.2 Vorbereitung der Prüfmuster	16
6.2.3 Tiere und Haltung	17
6.2.4 Prüfverfahren	17
6.2.5 Behandlungsgruppen	18
6.2.6 Bestimmung der Zellproliferation und Gewebevorbereitung	19
6.2.7 Ergebnisse und Auswertung	19
6.2.8 Prüfbericht	20
6.3 Versuche am Meerschweinchen zum Nachweis von Hautsensibilisierung	20
6.3.1 Kurzbeschreibung	20
6.3.2 Wahl der Konzentrationen des Prüfmusters	20
6.3.3 Induktion	20
6.3.4 Provokation	21
6.4 Wichtige Faktoren, die das Prüfergebnis beeinflussen	21
6.5 Maximierungstest am Meerschweinchen	22
6.5.1 Kurzbeschreibung	22
6.5.2 Vorbereitung der Prüfmuster	22
6.5.3 Tiere und Haltung	22
6.5.4 Prüfverfahren	22
6.5.5 Beobachtung der Tiere	25
6.5.6 Auswertung der Ergebnisse	26
6.5.7 Prüfbericht	26
6.6 Prüfung mit Okklusivläppchen (Bühler-Test)	26
6.6.1 Kurzbeschreibung	26
6.6.2 Vorbereitung der Prüfmuster	26
6.6.3 Tiere und Haltung	27
6.6.4 Prüfverfahren	27
6.6.5 Beobachtung der Tiere	28

6.6.6	Auswertung der Ergebnisse	28
6.6.7	Prüfbericht	29
7	Schlüsselfaktoren bei der Auswertung von Prüfergebnissen	29
Anhang A	(normativ) Vorbereitung von Materialien zur Prüfung auf Hautsensibilisierung	30
A.1	Allgemeines	30
A.2	Materialien für Exposition im direkten Kontakt	30
A.2.1	Feste Prüfmateri alien	30
A.2.2	Flüssige Prüfmateri alien	30
A.3	Extrakte von Prüfmateri alien	30
A.4	Lösemittel	31
A.5	Sterile Prüfmateri alien	31
Anhang B	(informativ) Verfahren zur Herstellung von Extrakten aus polymeren Prüfmateri alien	32
B.1	Allgemeines	32
B.2	Herstellungsverfahren	32
B.2.1	Vorextraktion	32
B.2.2	Endextraktion	32
B.3	Maximierungstest am Meerschweinchen	34
B.3.1	Allgemeines	34
B.3.2	Provokationsphase	34
Anhang C	(informativ) Tierversuchsfreie Verfahren der Prüfung auf Hautsensibilisierung	35
C.1	Einleitung	35
C.1.1	Hintergrund zu alternativen Verfahren der Prüfung auf Hautsensibilisierung	35
C.1.2	Adverse outcome pathway der OECD in Bezug auf die Hautsensibilisierung	35
C.1.3	Integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze	36
C.2	<i>In-vitro</i> -Versuche für die Prüfung auf Hautsensibilisierung	38
C.2.1	Allgemeines	38
C.2.2	Prüfverfahren	38
C.3	Diskussion	48
C.3.1	Von der OECD validierte Tests	48
C.3.2	Genomische Versuche	49
C.3.3	Andere Versuche	49
C.3.4	Allgemeine Betrachtungen zur Validierung von <i>In-vitro</i> -Verfahren für die Prüfung von Medizinprodukten	49
C.4	Schlussfolgerungen	50
Anhang D	(informativ) Hintergrundinformation zu Sensibilisierungsprüfungen auf Hautsensibilisierung	51
Literaturhinweise	54

Bilder

Bild 1 — Lage der intrakutanen Injektionsstellen	24
--	----

Tabellen

Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und Anhang I der Verordnung (EU) 2017/745 [Abl. L 117] und zu System- bzw. Prozessanforderungen, einschließlich derjenigen, die sich auf Qualitätsmanagementsysteme, Risikomanagement, Systeme zur Überwachung nach dem Inverkehrbringen, klinische Prüfungen, die klinische Bewertung oder die klinische Nachbeobachtung nach dem Inverkehrbringen beziehen	7
Tabelle ZA.2 — Anwendbare Normen, die die Konformitätsvermutung, wie in diesem Anhang ZA beschrieben, zu begründen	8
Tabelle 1 — Skala nach Magnusson und Kligman	23
Tabelle C.1 — Fallstudien des OECD-Richtliniendokuments 256:2017, Anhang I [124]	37

DIN EN ISO 10993-10:2023-04
EN ISO 10993-10:2023 (D)

Tabelle C.2 — DPRA	38
Tabelle C.3 — KeratinoSens™	39
Tabelle C.4 — LuSens	40
Tabelle C.5 — SENS-IS	41
Tabelle C.6 — IL-18-RhE-Test	42
Tabelle C.7 — EpiSensA	42
Tabelle C.8 — SenCeeTox®	43
Tabelle C.9 — h-CLAT	44
Tabelle C.10 — U-SENS™	45
Tabelle C.11 — IL-8-Luc-Test	46
Tabelle C.12 — GARD™	47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10993-10:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 194 „Biological and clinical evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 206 „Biologische und klinische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2023 und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2023 und zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wird EN ISO 10993-10:2010 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrags erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Verordnung/Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 10993-10:2021 wurde von CEN als EN ISO 10993-10:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Anhang ZA
(informativ)**Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den
grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der
abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745**

Diese Europäische Norm wurde im Rahmen des von der Europäischen Kommission erteilten Normungsauftrages M/575 erarbeitet, um ein freiwilliges Mittel zur Erfüllung der grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der Verordnung (EU) 2017/745 vom 5. April 2017 über Medizinprodukte [Abl. L 117] und der System- bzw. Prozessanforderungen, einschließlich derjenigen, die sich auf Qualitätsmanagementsysteme, Risikomanagement, Systeme zur Überwachung nach dem Inverkehrbringen, klinische Prüfungen, die klinische Bewertung oder die klinische Nachbeobachtung nach dem Inverkehrbringen beziehen, bereitzustellen.

Sobald diese Norm im Amtsblatt der Europäischen Union im Sinne dieser Verordnung in Bezug genommen worden ist, berechtigt die Übereinstimmung mit den in Tabelle ZA.1 aufgeführten normativen Abschnitten dieser Norm und die Anwendung der Ausgabe der normativ in Bezug genommenen Normen in Tabelle ZA.2 innerhalb der Grenzen des Anwendungsbereiches dieser Norm zur Vermutung der Konformität mit den entsprechenden grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen dieser Verordnung und der zugehörigen EFTA-Vorschriften.

Sofern eine Definition in dieser Norm von einer Definition desselben Begriffs in der Verordnung (EU) 2017/745 abweicht, müssen die Unterschiede im vorliegenden Anhang Z angegeben werden. Wird diese Norm zur Unterstützung der in der Verordnung (EU) 2017/745 festgelegten Anforderungen verwendet, haben die Definitionen in der vorgenannten Verordnung Vorrang.

Handelt es sich bei der Europäischen Norm um eine Übernahme einer Internationalen Norm, kann der Anwendungsbereich dieser Norm vom Anwendungsbereich der Europäischen Verordnung, die sie unterstützt, abweichen. Da der Anwendungsbereich der anwendbaren regulatorischen Anforderungen von Land zu Land und von Region zu Region unterschiedlich ist, kann die Norm die europäischen regulatorischen Anforderungen nur in dem Umfang des Anwendungsbereichs der Verordnung (EU) 2017/745 über Medizinprodukte unterstützen.

ANMERKUNG 1 Wenn in einem Abschnitt dieser Norm auf den Risikomanagement-Prozess Bezug genommen wird, muss der Risikomanagement-Prozess in Übereinstimmung mit der Verordnung (EU) 2017/745 stehen. Dies bedeutet, dass, gemäß dem Wortlaut der entsprechenden grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderung, Risiken „so weit wie möglich verringert“, „auf das niedrigstmögliche Maß verringert“, „so weit wie möglich und angemessen verringert“, „beseitigt oder so weit wie möglich verringert“, „eliminiert oder so weit wie möglich verringert“ „beseitigt oder so weit wie möglich minimiert“ oder „minimiert“ werden müssen.

ANMERKUNG 2 Die Politik des Herstellers zur Festlegung des **akzeptablen Risikos** muss in Übereinstimmung mit den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 und 22 der Richtlinie stehen.

ANMERKUNG 3 Wenn eine grundlegende Sicherheits- und Leistungsanforderung nicht in der Tabelle ZA.1 erscheint, bedeutet dies, dass sie nicht in dieser Europäischen Norm abgedeckt ist.

Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und Anhang I der Verordnung (EU) 2017/745 [Abl. L 117] und zu System- bzw. Prozessanforderungen, einschließlich derjenigen, die sich auf Qualitätsmanagementsysteme, Risikomanagement, Systeme zur Überwachung nach dem Inverkehrbringen, klinische Prüfungen, die klinische Bewertung oder die klinische Nachbeobachtung nach dem Inverkehrbringen beziehen

Allgemeine Sicherheits- und Leistungsanforderungen der Richtlinie 2017/745/EG	Abschnitt(e)/Unterabschnitt(e) dieser EN	Erläuterungen/Anmerkungen
10.1 [(a) und (b)]	4, 5, 6 und 7	ER 10.1 [(a) und (b)] wird nur teilweise von diesem Dokument abgedeckt, da die Norm keine Anforderungen an Auslegung und Herstellung enthält. Allerdings liefert diese Norm ein Hilfsmittel, um die Hautsensibilisierung durch Substanzen zu beurteilen, die bei der Herstellung von Medizinprodukten verwendet werden. Andere Formen der Toxizität und die Entflammbarkeit werden nicht abgedeckt.
10.2	4, 5, 6 und 7	ER 10.2 wird nur teilweise von diesem Dokument abgedeckt, da die Norm keine Anforderungen an Auslegung, Herstellung und Verpackung enthält. Allerdings liefert diese Norm ein Hilfsmittel, um die Hautsensibilisierung durch Schadstoffe und Rückstände in Medizinprodukten zu beurteilen.
10.4.1 (erster Absatz)	4, 5, 6 und 7	ER 10.4.1 (erster Absatz) wird nur teilweise von diesem Dokument abgedeckt, da die Norm keine Anforderungen an Auslegung und Herstellung enthält. Allerdings liefert diese Norm ein Hilfsmittel, um die Hautsensibilisierung durch Substanzen zu beurteilen, die aus Medizinprodukten austreten. Andere Formen der Toxizität werden nicht abgedeckt.

ANMERKUNG Dieser Teil von EN ISO 10993 bezieht sich auf ISO 10993-1, die wiederum auf ISO 14971 verweist. In Europa sollte davon ausgegangen werden, dass sich die Verweisung auf ISO 14971 auf EN ISO 14971:2020 bezieht.

Allgemeine Anmerkung: Die Konformitätsvermutung hängt davon ab, dass auch einschlägige Teile der Normenreihe ISO 10993 eingehalten werden.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04
EN ISO 10993-10:2023 (D)

Tabelle ZA.2 — Anwendbare Normen, die die Konformitätsvermutung, wie in diesem Anhang ZA beschrieben, zu begründen

Spalte 1 Verweisung in Abschnitt 2	Spalte 2 Ausgabe Internationale Norm	Spalte 3 Titel	Spalte 4 Entsprechende Ausgabe der Europäischen Norm
ISO 10993-1	ISO 10993-1:2018	<i>Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process</i>	EN ISO 10993-1:2020
ISO 10993-2	ISO 10993-2:2006	<i>Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements</i>	EN ISO 10993-2:2006
ISO 10993-12	ISO 10993-12:2021	<i>Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials</i>	EN ISO 10993-12:2021
ISO 10993-18	ISO 10993-18:2020	<i>Biological evaluation of medical devices – Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process</i>	EN ISO 10993-18:2020

Die in Spalte 1 der Tabelle ZA.2 aufgeführten Dokumente werden in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes normativ zitiert, d. h. sie sind für seine Anwendung erforderlich. Das Erreichen der Konformitätsvermutung unterliegt der Anwendung der in Spalte 4 aufgeführten Normenausgabe oder, wenn keine Europäische Norm existiert, der in Spalte 2 der Tabelle ZA.2 angegebenen Ausgabe der Internationalen Norm.

WARNHINWEIS 1 — Die Konformitätsvermutung bleibt nur bestehen, so lange die Fundstelle dieser Europäischen Norm in der im Amtsblatt der Europäischen Union veröffentlichten Liste erhalten bleibt. Anwender dieser Norm sollten regelmäßig die im Amtsblatt der Europäischen Union zuletzt veröffentlichte Liste einsehen.

WARNHINWEIS 2 — Für Produkte, die in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen, können weitere Rechtsvorschriften der EU anwendbar sein.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterteilungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 194, *Biological and clinical evaluation of medical devices*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 206, *Biologische und klinische Beurteilung von Medizinprodukten*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese vierte Ausgabe ersetzt die dritte Ausgabe (ISO 10993-10:2010), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- dieses Dokument enthält jetzt nur noch eine Beschreibung von Hautsensibilisierungsprüfungen;
- Anhang C zu tierversuchsfreien Verfahren der Prüfung auf Hautsensibilisierung (vorher Anhang D) wurde aktualisiert;
- die Prüfung auf Irritation ist jetzt in ISO 10993-23 beschrieben.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 10993 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

Einleitung

Dieses Dokument dient zur Einschätzung möglicher Gefährdungen durch den Kontakt mit aus Medizinprodukten austretenden chemischen Substanzen, die eine Hautsensibilisierung hervorrufen können.

Einige in Medizinprodukten verwendete Materialien sind überprüft worden, und ihr Sensibilisierungspotential für Haut wurde dokumentiert. Insbesondere für Dentalwerkstoffe wurden sensibilisierende Eigenschaften angegeben — siehe Literaturhinweis [51]. Andere Materialien und ihre chemischen Bestandteile sind nicht geprüft worden und können bei Kontakt mit menschlichem Gewebe nachteilige Wirkungen hervorrufen. Der Hersteller ist daher verpflichtet, jedes Produkt vor der Marktfreigabe hinsichtlich seiner möglichen nachteiligen Wirkungen (Nebenwirkungen) zu beurteilen.

Traditionell werden Versuche an Kleintieren als Hilfsmittel zur Vorhersagbarkeit der Reaktion des Menschen durchgeführt, bevor am Menschen geprüft wird (Hintergrundinformationen sind in Anhang D angeführt). Seit 2015 wurden mehrere *In-chemico*- und *In-vitro*-Prüfungen validiert und Prüfrichtlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, en: organization for economic co-operation and development) veröffentlicht, um das Hautsensibilisierungspotential von Chemikalien zu beurteilen [75], [79], [104]. Ein Überblick über verfügbare alternative Hautsensibilisierungsprüfungen für reine Chemikalien ist in Anhang C angeführt. Diese Prüfverfahren, die jeweils zur Behandlung eines bestimmten Schlüsselvorgangs entwickelt wurden, reichen möglicherweise allein nicht aus, um auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien zu schließen, und sollten im Rahmen integrierter Ansätze, wie z. B. integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze (IATA, en: integrated approaches to testing and assessment), betrachtet werden, wobei diese mit anderen ergänzenden Informationen kombiniert werden. Es ist zu beachten, dass die *In-vitro*- und *In-chemico*-Prüfungen auf Hautsensibilisierung (in Anhang C) bisher nur für reine Chemikalien und nicht für Medizinprodukte validiert wurden. Um zu bestätigen, dass diese für die Prüfung des Hautsensibilisierungspotentials von Medizinprodukten geeignet sind, müssen deren Tests bewertet und validiert werden.

In geeigneten Fällen wird die vorherige Anwendung von *In-vitro*-Verfahren als Screening vor dem Tierversuch empfohlen. Um die Anzahl der verwendeten Tiere zu verringern, zeigt dieses Dokument ein stufenweises Vorgehen mit Überprüfung und Analyse der Prüfergebnisse in jedem Versuchsstadium auf. Es ist beabsichtigt, dass für die Einreichung von Zulassungsanträgen Hautsensibilisierungsstudien unter Anwendung von GLP oder ISO/IEC 17025 durchgeführt werden, soweit für das jeweilige Land zutreffend und die Vorschriften in Bezug auf den Tierschutz eingehalten werden. Statistische Datenanalysen werden empfohlen und, wann immer dies angebracht ist, verwendet. Dieses Dokument enthält wichtige Instrumente für die Entwicklung sicherer Produkte und ist für die Anwendung durch Experten vorgesehen, die durch Schulung und Erfahrung entsprechend qualifiziert und in der Lage sind, dessen Anforderungen zu interpretieren und die Ergebnisse der Beurteilung für jedes Medizinprodukt unter Berücksichtigung aller Faktoren, die für das Medizinprodukt relevant sind, seines bestimmungsgemäßen Gebrauchs und des aktuellen Kenntnisstandes über das Medizinprodukt aus der wissenschaftlichen Literatur und bisheriger klinischer Erfahrung, zu bewerten.

Dieses Dokument beruht auf einer Vielzahl von Normen und Leitfäden, einschließlich OECD-Richtlinien, Pharmakopöe der USA und der Europäischen Pharmakopöe. Es ist als Basisdokument für die Wahl und Durchführung von Prüfungen vorgesehen, die die Beurteilung von Reaktionen in Form von Hautsensibilisierung ermöglichen, die für die Sicherheit von medizinischen Materialien und Medizinprodukten von Bedeutung sind.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt das Verfahren für die Beurteilung von Medizinprodukten und ihren Bestandteilen hinsichtlich ihres Potentials, eine Hautsensibilisierung auszulösen, fest.

Dieses Dokument enthält:

- Einzelheiten zur Durchführung von *In-vivo*-Hautsensibilisierungsprüfungen;
- Schlüsselfaktoren für die Interpretation der Ergebnisse.

ANMERKUNG Anhang A enthält Anweisungen für die spezielle Vorbereitung von Materialien im Zusammenhang mit den vorstehend angeführten Prüfungen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*

ISO 10993-2, *Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements*

ISO 10993-12, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*

ISO 10993-18, *Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 10993-1 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Plattform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp/ui>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Allergen

sensibilisierende Substanz

Substanz oder Material, die/das eine spezifische Hypersensibilität (Überempfindlichkeit) nach wiederholtem Kontakt mit der Substanz oder dem Material auslösen kann

3.2

allergische Kontaktdermatitis

klinische Diagnose auf der Grundlage einer beobachteten immunologisch vermittelten Hautreaktion auf eine Substanz

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 **EN ISO 10993-10:2023 (D)**

3.3

Blindprobe

Extraktionsträgersubstanz ohne *Prüfmaterial* (3.15), die in einem Gefäß aufbewahrt wird, das mit dem Gefäß identisch ist, in dem sich das Prüfmaterial befindet, und die den gleichen Bedingungen ausgesetzt ist wie das Prüfmaterial während seiner Extraktion

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Blindprobe dient der Bewertung einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse durch das Extraktionsgefäß, die Trägersubstanz und den Extraktionsprozess.

3.4

Provokation

Prozess nach der Induktionsphase, bei dem die immunologischen Auswirkungen nachfolgender Expositionen eines einzelnen Lebewesens gegenüber dem induzierenden Material untersucht werden

3.5

Auslösen einer Reaktion

immunologische Reaktion auf die Exposition gegenüber einer sensibilisierenden Substanz bei einem zuvor sensibilisierten einzelnen Lebewesen

3.6

Erythem

Rötung der Haut oder Schleimhaut

3.7

Extrakt

Flüssigkeit, die man bei der Extraktion des *Prüfmusters* (3.16) oder der Kontrolle erhält

[QUELLE: ISO 10993-12:2021, 3.6]

3.8

Induktion

Prozess, der zur Erzeugung eines neuen, verbesserten Zustands der immunologischen Aktivität eines einzelnen Lebewesens nach einer ersten Exposition gegenüber einem spezifischen Material führt

3.9

reizende Substanz

Wirkstoff, der eine *Irritation* (3.10) hervorruft

3.10

Irritation

örtliche unspezifische entzündliche Reaktion auf eine einmalige, wiederholte oder andauernde Einwirkung einer Substanz/eines Materials

Anmerkung 1 zum Begriff: Hautirritation ist eine reversible Reaktion und wird hauptsächlich durch Symptome wie ein örtliches *Erythem* (3.6) (Rötung), Schwellung, Juckreiz, Abschälen, Aufspringen und Schuppenbildung der Haut charakterisiert.

3.11

Negativkontrolle

gut beschriebene/s Material oder Substanz, das/die nach der Bewertung mit einem spezifischen Prüfverfahren die Eignung des Verfahrens nachweist, eine reproduzierbare, angemessen negative, nicht-reaktive oder minimale Reaktion im Prüfsystem zu ergeben

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Praxis umfassen Negativkontrollen *Blindproben* (3.3), *Trägersubstanzen* (3.17)/Lösungsmittel und Referenzmaterialien.

[QUELLE: ISO 10993-12:2021, 3.10 — modifiziert, Anmerkung 1 zum Begriff wurde ersetzt.]

3.12**Ödem**

Schwellung infolge anomaler Flüssigkeitsinfiltration in die Gewebe

3.13**Positivkontrolle**

gut beschriebene(s) Material oder Substanz, das/die, wenn nach einem bestimmten Verfahren bewertet, die Eignung des Prüfsystems zur Erzielung einer reproduzierbaren, in geeignetem Maße positiven oder reaktiven Rückantwort im Prüfsystem nachweist

3.14**Hautsensibilisierung**

durch T-Zellen vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, die durch reaktive Chemikalien mit niedriger relativer Molekülmasse (Allergene) induziert wird, bestehend aus zwei Phasen, Induktion und Auslösen einer Reaktion

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Menschen können die Reaktionen durch Juckreiz, *Erytheme* (3.6), *Ödeme* (3.12), Knötchen, Bläschen, Hautblasen oder eine Kombination davon gekennzeichnet sein. Bei anderen Spezies können sich die Reaktionen unterscheiden und es können nur Erytheme und Ödeme zu sehen sein.

3.15**Prüfmaterial**

Material, Produkt, Anteil oder Bestandteil eines Produkts, das/der als Probe für die biologische oder chemische Prüfung entnommen wird

3.16**Prüfmuster**

Material, Produkt, Anteil oder Bestandteil eines Produkts, *Extrakt* (3.7) oder Anteil davon, das/der der biologischen oder chemischen Prüfung oder Beurteilung unterzogen wird

3.17**Trägersubstanz**

Flüssigkeit zum Befeuchten, Verdünnen, Suspendieren, *Extrahieren* (3.7) oder Lösen der Prüfsubstanz/des Prüfmaterials

4 Allgemeine Grundsätze — Stufenweises Vorgehen

Die zur Verfügung stehenden Verfahren zur Prüfung auf Sensibilisierung wurden spezifisch entwickelt, um das Potential einer Substanz zur Hautsensibilisierung nachzuweisen. Eine Voraussage für sonstige Typen unerwünschter Wirkungen ist durch diese Prüfungen im Allgemeinen nicht möglich.

Dieses Dokument fordert ein stufenweises Vorgehen, da jedes Stadium zu der Schlussfolgerung führen kann, dass eine weitere Prüfung auf Hautsensibilisierung nicht erforderlich ist:

- a) Bewertung von Literatur und Informationen der Lieferanten, einschließlich chemischer und physikalischer Eigenschaften und Informationen über das Hautsensibilisierungspotential aller Bestandteile des Medizinprodukts sowie strukturell nahe stehender Chemikalien und Materialien; in Bezug auf Einzelheiten siehe ISO 10993-1. Durchführung einer Risikobeurteilung auf der Grundlage bestehender Informationen, um zu bestimmen, ob das Risiko einer Hautsensibilisierung vertretbar ist oder ob eine weitere Prüfung erforderlich ist;
- b) zusätzliche Charakterisierung und Risikobeurteilung, falls notwendig, des Materials eines Produkts, die eine chemische Charakterisierung und Analyse des Prüfmusters nach den allgemeinen Grundsätzen, wie in ISO 10993-18 beschrieben, einschließen;
- c) *In-vitro*-Prüfungen müssen nach ISO 10993-2 *In-vivo*-Prüfungen gegenüber bevorzugt berücksichtigt und letztere ersetzt werden, sobald neue *In-vitro*-Prüfungen wissenschaftlich validiert und in vernünftiger Weise und praktisch verfügbar sind;

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

ANMERKUNG Es gibt derzeit eine Reihe von international validierten und anerkannten *In-vitro*-Prüfungen zum Nachweis des Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien; diese *In-vitro*-Prüfungen sind jedoch noch nicht für Medizinprodukte validiert. An einigen dieser Prüfungen wird derzeit gearbeitet, um sie für die Verwendung mit Medizinprodukten zu qualifizieren.

- d) *In-vivo*-Tierversuche sind nur geeignet, wenn es nicht möglich ist, unter Nutzung der nach den in a), b) und c) dargelegten Verfahrensweisen erhaltenen Informationen die Prüfmaterialien zu charakterisieren und eine Risikobeurteilung vorzunehmen.

5 Überlegungen vor der Prüfung

5.1 Allgemeines

Es ist wichtig zu betonen, dass Überlegungen vor der Prüfung zu dem Schluss führen können, dass die Prüfung auf Hautsensibilisierung nicht notwendig ist.

Es gelten die Anforderungen in ISO 10993-1:2018, Abschnitt 5, und die Folgenden.

Nicht sterile Proben dürfen *in vivo* nur durch topische Untersuchung untersucht werden, da die Möglichkeit einer mikrobiellen Kontamination des Prüfmusters die abschließende Versuchsauswertung stören kann. In Fällen, bei denen die Sterilität eines Prüfmusters nicht sichergestellt werden kann, die Probe jedoch noch als frei von mikrobieller Kontamination angesehen wird, kann eine intrakutane Verabreichung gerechtfertigt sein.

5.2 Arten von Materialien

5.2.1 Erste Überlegungen

Es muss in Betracht gezogen werden, dass während der Herstellung und der Montage von Medizinprodukten zusätzliche chemische Bestandteile als Verarbeitungshilfsmittel verwendet werden dürfen, z. B. Schmiermittel oder Formtrennmittel. Zusätzlich zu den chemischen Bestandteilen des Ausgangsmaterials und den Verarbeitungshilfsmitteln können in einem Endprodukt auch Rückstände von Klebstoffen oder Lösemitteln aus dem Zusammenbau wie auch Rückstände von Sterilisationsmitteln oder beim Sterilisationsverfahren entstehende Reaktionsprodukte vorhanden sein. Ob diese Bestandteile ein Risiko darstellen, hängt von den Merkmalen der Endprodukte hinsichtlich Auslaugung oder Abbauvorgängen ab. Die chemischen Bestandteile, die ein Hautsensibilisierungspotential aufweisen, müssen ermittelt werden.

5.2.2 Keramik, Metalle und Legierungen

Diese Materialien sind normalerweise im Hinblick auf die Anzahl chemischer Bestandteile weniger komplex als Polymere und Materialien biologischer Herkunft.

5.2.3 Polymere

Die chemische Zusammensetzung dieser Materialien ist normalerweise komplexer als die der in 5.2.2 angegebenen Materialien. Es kann eine Anzahl von Reaktionsprodukten/Verunreinigungen/Zusatzstoffen/Katalysatorrückständen vorhanden sein, und der Grad oder das Ausmaß der Polymerisation unterschiedlich sein.

5.2.4 Materialien biologischer Herkunft

Diese Materialien sind von sich aus in ihrer Zusammensetzung komplex. Sie enthalten oft auch Rückstände aus der Verarbeitung, zum Beispiel Vernetzer und antimikrobiell wirkende Substanzen. Biologische Materialien können von Probe zu Probe uneinheitlich sein.

Die Verfahren in diesem Dokument sind nicht für die Prüfung von Materialien biologischer Herkunft ausgelegt und können deshalb weniger geeignet sein. Zum Beispiel berücksichtigen die Prüfungen in diesem Dokument nicht die Kreuzsensibilisierung zwischen einzelnen Spezies.

5.3 Informationen über die chemische Zusammensetzung

5.3.1 Allgemeines

Es müssen sämtliche qualitative Daten über die chemischen Bestandteile des Materials ermittelt werden. Quantitative Daten über die chemische Zusammensetzung müssen ebenfalls erfasst werden. Falls quantitative Daten nicht erfasst werden, muss die Begründung gerechtfertigt und dokumentiert werden.

5.3.2 Vorhandene Datenquellen

Qualitative und quantitative Informationen über die Zusammensetzung müssen, falls möglich, über den Lieferanten des Ausgangsmaterials beschafft werden.

Bei Polymeren ist oft der Zugang zu firmeneigenen Angaben erforderlich; es sollten Regelungen zur Übermittlung und Verwendung solcher vertraulicher Informationen getroffen werden.

Die qualitativen Angaben über alle weiteren Zusatzstoffe bei der Verarbeitung (z. B. Formtrennmittel) müssen ebenfalls von den entsprechenden Gliedern der Herstellungskette erhalten werden, einschließlich Firmen, die Materialien weiterverarbeiten und Hersteller einzelner Bestandteile.

Wenn die Informationen über die Zusammensetzung unvollständig sind, wird empfohlen, eine Literaturrecherche über die wahrscheinliche Beschaffenheit des Ausgangsmaterials und jeglicher Additive durchzuführen, um dadurch die Auswahl des geeignetsten Verfahrens für die Analyse des betreffenden Materials zu erleichtern.

Die chemische Zusammensetzung von Endprodukten muss nach ISO 10993-18 bestimmt werden.

ANMERKUNG Die Zusammensetzung von Keramik, Metallen und Legierungen kann nach internationalen Normen von ISO oder ASTM und/oder vom Anwender bestimmt werden. Um jedoch vollständige qualitative und quantitative Einzelheiten über die Zusammensetzung zu gewinnen, kann es erforderlich sein, diese beim Lieferanten oder Hersteller des Ausgangsmaterials und auch bei Herstellern von Bestandteilen anzufordern, um sicherzustellen, dass auch die Identität von Verarbeitungshilfsmitteln festgestellt wird. Eine weitere Datenquelle sind bei den Aufsichtsbehörden zugängliche Materialstammdateien.

6 Prüfungen auf Hautsensibilisierung

6.1 Auswahl von Prüfverfahren

Zur Ermittlung von hautsensibilisierenden Substanzen wurden unter Verwendung einer Kombination verschiedener Versuche alternative *In-vitro*- und *In-chemico*-Ansätze für reine Chemikalien entwickelt. Mehrere dieser Verfahren wurden in die OECD-Prüfrichtlinien [TG 442C [75], TG 442D [79] und TG 442E [104]] oder in das Prüfrichtlinien-Programm der OECD [121] aufgenommen (siehe Anhang C).

Zusammen erfassen die in diesen Prüfrichtlinien beschriebenen Versuche die drei Schlüsselvorgänge des nunmehr ermittelten „Pfad zu nachteiligen Auswirkungen“ (AOP, en: adverse outcome pathway) bei der Hautsensibilisierung, der das auslösende molekulare Ereignis (Proteinbindung), das Auslösen einer Entzündung und die Aktivierung von dendritischen Zellen umfasst. Diese Prüfverfahren, die zur Behandlung eines bestimmten Schlüsselvorgangs entwickelt wurden, reichen möglicherweise allein nicht aus, um auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien zu schließen, und sollten im Rahmen integrierter Ansätze, wie z. B. IATA, betrachtet werden, wobei diese mit anderen ergänzenden Informationen kombiniert werden.

Nach ISO 10993-2 müssen derartige integrierte Ansätze bei der Beurteilung eines Hautsensibilisierungspotentials von reinen Chemikalien berücksichtigt werden. Ob diese Ansätze auch auf Medizinprodukte oder Extrakte von Medizinprodukten anwendbar sind, ist noch nicht bekannt. Ein Überblick über verfügbare alternative Hautsensibilisierungsprüfungen für reine Chemikalien ist in Anhang C dargestellt.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

Derzeit stehen drei Tierversuche zur Verfügung, die das Potential von Chemikalien, eine Hautsensibilisierung hervorzurufen, bestimmen. Das umfasst zwei Versuche an Meerschweinchen und einen Versuch an Mäusen. Die beiden Versuche an Meerschweinchen sind der Maximierungstest am Meerschweinchen (GPMT, en: guinea-pig maximization test) und die Prüfung mit Okklusivläppchen (Bühler-Test). Von diesen beiden Versuchen ist der Maximierungstest das empfindlichste Verfahren. Siehe Literaturhinweis [9]. Der Okklusivpatchtest ist für Produkte zur äußeren Anwendung geeignet.

Der lokale Lymphknotentest (LLNA, en: local lymph node assay) an Mäusen wurde 2010 international als eine OECD-Prüfrichtlinie [33] zur Prüfung einzelner Chemikalien als alleinige Alternative zu Versuchen an Meerschweinchen angenommen und ist jetzt der bevorzugte *In-vivo*-Versuch für Chemikalien. Siehe Literaturhinweise [19] und [32]. In einigen Fällen können Versuche an Meerschweinchen zur Beurteilung des Sensibilisierungspotentials von bestimmten Prüfmustern notwendig sein. Das kann bei bestimmten Metallen der Fall sein (siehe Literaturhinweis [44]), die falsch negative Befunde im LLNA ergeben können, oder bei hautreizenden Stoffen, die falsch positive Befunde ergeben können, sowie bei Substanzen mit hoher relativer Molekülmasse, die die Haut nicht durchdringen, oder bei Substanzen, die in den empfohlenen Trägersubstanzen nicht löslich sind.

ANMERKUNG Alle drei Tierversuche wurden zum Nachweis des Potentials von Chemikalien entwickelt, eine Hautsensibilisierung, d. h. eine Kontaktdermatitis, eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV), hervorzurufen.

In Anbetracht der in ISO 10993-2 dargelegten Tierschutzbestimmungen muss der LLNA in Erwägung gezogen werden, wenn ein *In-vivo*-Versuch durchgeführt wird. Zusätzliche zu den tierschutzbezogenen Betrachtungen hat der LLNA den Vorteil, dass er objektive quantitative Daten liefert.

6.2 Lokaler Lymphknotentest an der Maus

6.2.1 Kurzbeschreibung

Nach der äußeren Behandlung des Dorsums des Ohrs mit einem Prüfmuster wird das Ausmaß der Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation (Ohren) gemessen. Der Schwellenwert für die Bezeichnung eines Prüfmaterials als sensibilisierende Substanz ist eine Reaktion bezüglich der Zellproliferation, die mindestens dem Dreifachen der Reaktion auf die Kontrollen entspricht.

Der LLNA muss bei der Verwendung von Substanzen unter Anwendung eines Dosis-Wirkungs-Ansatzes durchgeführt werden. Bei Endprodukten/Medizinprodukten kann es hinreichend sein, nur den unverdünnten Extrakt zu prüfen.

ANMERKUNG Die Literaturhinweise [15] bis [44] enthalten repräsentative Publikationen zum LLNA. Die Laboratorien, die diesen Versuch durchführen, werden angeregt, diese und andere zutreffende und verfügbare Publikationen durchzusehen.

6.2.2 Vorbereitung der Prüfmuster

Das Prüfmuster muss eine Flüssigkeit, Suspension, ein Gel oder eine Paste sein, die/das auf die Ohren der Maus aufgebracht werden kann. Nach Möglichkeit muss eine Reihe von Dosen (Verdünnungen) untersucht werden. Andernfalls sollte die höchste Konzentration einer hergestellten Lösung oder Suspension der Chemikalie oder eines Extraktes verwendet werden. Wenn im LLNA bei einem Extrakt eine starke Reaktion festgestellt wird, ist möglicherweise eine Folgestudie notwendig, in der mehrerer Dosen bewertet werden, um die mögliche Hautsensibilisierungspotenz des Extrakts zu bewerten. Systemische Toxizität und übermäßige lokale Hautreizung können die Prüfergebnisse verfälschen und daher sollten diese Reaktionen vermieden werden. Unter bestimmten Umständen kann ein Vorversuch notwendig sein.

Eine üblicherweise für Substanzen/Chemikalien verwendete Trägersubstanz ist ein Aceton/Olivenöl-Gemisch (AOO) im Verhältnis 4 : 1. Flüssige Proben, die hydrophil sind und/oder nicht angemessen auf der Haut des Ohres haften, sollten so modifiziert werden, dass sie an der Prüfstelle haften. Das kann durch Zugabe eines Verdickungsmittels, wie z. B. Carboxymethylcellulose oder Hydroxyethylcellulose (mit einer Dichte von 0,5 %),

oder durch eine grenzflächenaktive Substanz, wie z. B. Pluronic® L92¹ mit einem Volumenanteil von 1 %, erreicht werden. Bei wasserlöslichen Chemikalien ist Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) der grenzflächenaktiven Substanz Pluronic® L92 zu bevorzugen. Siehe Literaturhinweis [34]. Alternativ können andere Extraktionsflüssigkeiten als angegeben verwendet werden. Siehe Literaturhinweis [33]. Die Auswirkung der Zugaben zu den Extraktionsmedien und/oder Änderungen der Zusammensetzung der Trägersubstanz müssen validiert und dokumentiert werden. Das kann durch Versuche mit schwach bis mäßig hautsensibilisierenden Substanzen, wie sie gewöhnlich als Positivkontrollen verwendet werden, erfolgen. Zusätzlich kann eine Aufstockung des Prüfmusters mit einer Positivkontrolle durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass der LLNA nach wie vor in der Lage ist, das Vorliegen potentieller hautsensibilisierender Substanzen im hergestellten Extrakt nachzuweisen. Weitere grundlegende Aspekte der Extraktion eines Prüfgegenstandes sind in ISO 10993-12 festgelegt.

Für jede tägliche Applikation muss ein gesonderter Extrakt hergestellt werden.

ANMERKUNG Für polymere Materialien ist in Anhang B ein wahlfreies Extraktionsverfahren angeführt.

6.2.3 Tiere und Haltung

Es müssen gesunde, nicht trächtige weibliche Mäuse vom CBA/Ca-, CBA/J- oder BALB/c-Stamm verwendet werden, sofern nicht ein anderer Stamm validiert wurde. Siehe Literaturhinweise [33], [41] und [42]. Verschiedene Mausstämme wurden als annehmbar ausgewiesen (DBA/2, B6C3F1). Siehe Literaturhinweis [35]. Die Mäuse müssen 7 Wochen bis 12 Wochen alt sein; die Mäuse von jeder Studie müssen gleichen Alters sein (innerhalb eines Altersbereichs von einer Woche).

Haltung und Auswahl der Tiere müssen nach ISO 10993-2 erfolgen. Die routinemäßig im Laboratorium eingewöhnten Mäuse müssen individuell gekennzeichnet sein. Bei bestimmten Prüfmustern kann möglicherweise eine Einzelhaltung erforderlich sein. Dies muss begründet und dokumentiert werden.

Die Tiere müssen eindeutig durch Verfahren gekennzeichnet werden, die keine Ohrlöcher oder Ohrmarken einschließen.

Bei Gruppenhaltung sollten Kreuzkontamination und unerwünschte orale Aufnahme berücksichtigt werden.

6.2.4 Prüfverfahren

Bei Chemikalien wird der LLNA üblicherweise nach dem Dosis-Wirkungs-Prinzip durchgeführt. Bei festen Medizinprodukten müssen die zu untersuchenden Proben Extrakte sein. In diesen Fällen steht nur eine Dosis zum Prüfen zur Verfügung. Im Allgemeinen kann der Extrakt unverdünnt untersucht werden. Wenn der Extrakt jedoch stark toxische Bestandteile enthält, kann das im LLNA aufgrund der Toxizität zu einem negativen Ergebnis führen. Deshalb werden bei der Untersuchung von zytotoxischen Extrakten (siehe ISO 10993-5) die Durchführung des LLNA nach dem Dosis-Wirkungs-Prinzip und die Verdünnung des Extrakts empfohlen. Wenn im LLNA eine starke Reaktion festgestellt wird, kann zusätzlich eine Folgeprüfung bezüglich des Wirkungsbereichs durchgeführt werden, um die mögliche Sensibilisierungspotenz des Extrakts zu bewerten.

Um die Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit sicherzustellen, muss eine Prüfung einer Positivkontrollsubstanz für die Hautsensibilisierung vom Prüflaboratorium einbezogen werden, um das Prüfsystem zu validieren und eine Positivreaktion nachzuweisen. Als Positivkontrollen müssen gut bekannte, schwache bis mäßige Kontaktallergene, z. B. Mercaptobenzothiazol, Hexylzimtaldehyd und Benzocain, verwendet werden. Die angeführten Beispiele sind möglicherweise nicht für jede zur Probenvorbereitung verwendete Trägersubstanz geeignet (z. B. wässrige Trägersubstanz); in diesen Fällen kann eine andere Positivkontrolle gewählt werden. ASTM F2148 weist darauf hin, dass in derartigen Fällen Formalin und 2,4-Dinitrochlorbenzen (DNCB) als Positivkontrollen verwendet werden sollten. Dies muss begründet und dokumentiert werden.

1 Pluronic® L92 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, kann es Situationen geben, in denen nur periodische Prüfungen (d. h. in Abständen von ≤ 6 Monaten) der Prüfsubstanz für die Positivkontrolle angemessen sein können. Das ist der Fall bei Laboratorien, die den LLNA regelmäßig durchführen (d. h. Durchführung des LLNA mit einer Häufigkeit von mindestens einmal je Monat) und über einen etablierten Bestand an historischen Daten zu Positivkontrollen verfügen, der die Fähigkeit des Labors nachweist, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit den Positivkontrollen in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (d. h. in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.

Das Körpergewicht der einzelnen Tiere muss zu Beginn und am Ende der Studie aufgezeichnet werden. Zum Nachweis einer potentiellen Toxizität des Prüfmusters muss während der Studie eine klinische Beobachtung durchgeführt und aufgezeichnet werden.

Die Verwendung einer Positivkontrolle nur alle 6 Monate kann Auswirkungen auf die in den vorhergehenden 6 Monaten erhaltenen Ergebnisse haben, wenn diese Positivkontrolle ein negatives Ergebnis zeigt. Literaturhinweis [33] gibt an, dass das periodische Prüfen (z. B. in Intervallen ≤ 6 Monaten) der positiven Kontrollsubstanz in Laboratorien beobachtet werden kann, die den LLNA regelmäßig durchführen (z. B. Durchführung des LLNA in einer Frequenz von nicht weniger als einmal im Monat) und die Erfahrung und eine dokumentierte Fertigkeit in der Beschaffung gleichmäßiger Ergebnisse mit Positivkontrollen haben. Es ist wichtig zu realisieren, dass die Entscheidung, nur periodische Positivkontrollen an Stelle von gleichzeitigen Positivkontrollen einzuschließen, Auswirkungen auf die Eignung und Annehmbarkeit eines negativen Studienergebnisses haben kann, das ohne eine gleichzeitige Positivkontrolle innerhalb der Intervalle zwischen jeder periodischen Positivkontrollstudie generiert wurde. Wenn z. B. ein falsch negatives Ergebnis während der periodischen Positivkontrollprüfung erhalten wird, können alle negativen Ergebnisse der Prüfsubstanz, die innerhalb des Intervalls zwischen der letzten akzeptierten und der nicht akzeptierten periodischen Positivkontrollprüfung erhalten wurden, in Frage gestellt werden. Um aufzuzeigen, dass die vorherigen negativen Ergebnisse der Prüfsubstanz akzeptabel sind, kann von einem Labor erwartet werden, dass es alle negativen Prüfungen wiederholt, was zusätzliche Kosten und einen vermehrten Gebrauch von Tieren erfordert.

6.2.5 Behandlungsgruppen

Wenn der LLNA durchgeführt wird, müssen die Daten von mindestens fünf Mäusen je Gruppe für die Beurteilung zur Verfügung stehen. Die Lymphknotenreaktionen dürfen entweder durch Einzelmessung oder durch Messung von gepoolten Lymphknotenproben bestimmt werden. Für die statistische Analyse ist die Einzelmessung zu bevorzugen.

Wenn nur eine Einzeldosis für die Bewertung zur Verfügung steht, zum Beispiel ein Extrakt, müssen mindestens fünf Mäuse für jede Gruppe verwendet werden, wenn die Einzelreaktionen gemessen werden.

Die Behandlungsgruppen müssen wie folgt zugeordnet werden:

- Blindprobe für jede eingesetzte Trägersubstanzart (siehe Anhang A);
- gegebenenfalls eine Positivkontrolle für jede eingesetzte Trägersubstanz;
- Prüfgruppen für jede eingesetzte Extraktionsflüssigkeit.

Wenn eine einzelne Chemikalie oder Substanz geprüft wird, muss der LLNA nach dem Dosis-Wirkungs-Prinzip durchgeführt werden. Bei anderen Arten von Prüfmustern, wie z. B. Extrakten, ist eine Dosis-Wirkungs-Bewertung möglicherweise nicht durchführbar. Wenn nur eine Prüfgruppe verwendet wird, muss das begründet und dokumentiert werden.

ANMERKUNG Wenn hinreichend Daten gesammelt wurden, um die Beständigkeit des Wirkungsbereichs der Positivkontrolle nachzuweisen, kann eine Einzeldosis einbezogen werden, um die Empfindlichkeit des Versuchs nachzuweisen. Siehe Literaturhinweis [32].

Die entsprechende Probe muss an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf die Rückseite beider Ohren der ausgewählten Mäuse aufgetragen werden, wobei die Dosis 25 µl/Tag beträgt. Die Ohren sind jeden Tag auf Anzeichen von Irritation zu untersuchen, die möglicherweise die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen. Siehe Literaturhinweise [23], [27] und [29].

6.2.6 Bestimmung der Zellproliferation und Gewebepvorbereitung

Die proliferierenden Zellen in den drainierenden Lymphknoten können entweder mit einer radioaktiven oder fluoreszierenden Markierung gekennzeichnet werden. Häufig verwendete radioaktive Markierungen sind ³H-Methylthymidin und ¹²⁵I-Ioddesoxyuridin, während als fluoreszierende Markierung Fluoresceindesoxyuridin verwendet werden kann.

(72 ± 2) h nach der letzten Behandlung ist das Gewicht der einzelnen Mäuse aufzuzeichnen und die Markierung für die Zellproliferation intravenös zu verabreichen. 0,25 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate buffered saline) mit 740 kBq (20 µCi) Einheiten der Radioaktivität von ³H-Methylthymidin werden über die Schwanzvenen in sämtliche Versuchs- und Kontrollmäuse injiziert. Bei ¹²⁵I-Ioddesoxyuridin werden 0,25 ml PBS mit 74 kBq (2 µCi) der Markierung und bei Fluoresceindesoxyuridin 0,25 ml mit einer Konzentration der Markierung von 10⁻⁵ mol/l in die Schwanzvene injiziert. Siehe Literaturhinweis [33].

Andere alternative Verfahren, die keine radioaktive Markierung erfordern, sind verfügbar und sollten in Betracht gezogen werden [z. B. Verfahren zur Bestimmung von Adenosintriphosphat (ATP) (DA-Verfahren) (OECD TG 442A) [122], Verfahren zur Bestimmung von Bromdesoxyuridin BrdU (ELISA- oder FCM-Verfahren) (OECD TG 442B) [123]].

ANMERKUNG 1 Zu weiterführenden Informationen siehe Literaturhinweise [33], [36], [42], [43] und [49].

Die Mäuse werden (5 ± 0,75) h nach der Verabreichung der Markierungslösung nach ISO 10993-2 auf humane Weise getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten werden entfernt. Es muss darauf geachtet werden, dass eine Kreuzkontamination der Gewebeproben vermieden wird. Die Lymphknoten von jeder Gruppe dürfen gepoolt werden oder die Lymphknoten von jedem Tier dürfen paarweise gepoolt werden. Daten von jedem einzelnen Tier werden bevorzugt, da sie die Variabilität zwischen jedem Tier in der Gruppe liefern. Einzelzellpräparate werden durch vorsichtiges Pressen der Lymphknoten durch ein Edelstahl- oder Nylonsieb mit einer Maschenweite von 200 µm über einem Behälter hergestellt. Das Filtersieb wird mit gekühlter PBS in den Behälter gespült, um Zellen vom Siebfilter zu entfernen. Der Behälter enthält jetzt das Zellpräparat. Die Zellpräparate werden zweimal durch Zentrifugieren gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Zellen werden mit 5%iger Trichloressigsäure (TCA) bei (4 ± 2) °C für (18 ± 1) h ausgefällt. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt werden die Pellets in 1 ml TCA resuspendiert und in Szintillationsfläschchen überführt, die 10 ml Szintillationsflüssigkeit für die ³H-Bestimmung enthalten, oder zur ¹²⁵I-Bestimmung direkt in einen Gamma-Zähler überführt. Siehe Literaturhinweise [21], [35] und [36].

ANMERKUNG 2 Alternativ kann die Markierung und Bestimmung der Zellproliferation *ex vivo* durchgeführt werden. Siehe Literaturhinweise [37] und [38].

6.2.7 Ergebnisse und Auswertung

Der Grad der Radioaktivität in den Lymphknotenzellen wird in Zählpulse je Minute je Maus (cpm/Maus) gemessen. Die Zählpulse je Minute (cpm) werden in Zerfallsereignisse je Minute (dpm) umgewandelt. Der Mittelwert und die Standardabweichung von dpm werden für mindestens drei Zählpulse für jedes Tier oder jede Gruppe von Mäusen berechnet. Von jedem Ergebnis wird der Hintergrundwert subtrahiert.

Bei Anwendung des Einzeltierversfahrens werden weiterhin der Mittelwert und die Standardabweichung der dpm für jede Gruppe von fünf Mäusen berechnet. Der Stimulationsindex (SI) wird bestimmt, indem der Mittelwert von dpm aus dem Versuch durch die dpm der Blindprobe dividiert wird. Bei einem SI von drei oder mehr (≥ 3,0) muss ein Prüfmuster als sensibilisierende Substanz bezeichnet werden. Siehe Literaturhinweis [16].

Positivkontrollproben müssen zu einem SI führen, der größer als oder gleich 3,0 ist.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

Für eine gültige Studie muss die Positivkontrolle entweder gleichzeitig oder innerhalb der vorausgegangenen sechs Monate durchgeführt worden sein. Siehe Literaturhinweis [33].

6.2.8 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss Folgendes enthalten:

- a) eine Beschreibung des Prüfmateri als (der Prüfmateri alen) oder Produkts;
- b) den Verwendungszweck des Prüfmusters oder -materials;
- c) die angewendete Internationale Norm (einschließlich ihres Ausgabejahres);
- d) eine detaillierte Beschreibung des zur Vorbereitung des Prüfmusters, Prüfmateri als oder Medizinprodukts angewandten Verfahrens;
- e) eine Beschreibung der Versuchstiere;
- f) das Verfahren der Applikation auf die Ohren;
- g) Beschreibung des Verfahrens zur Bestimmung der Zellproliferation;
- h) sämtliche Abweichungen vom Verfahren;
- i) Aufzeichnungen der Beobachtungen, einschließlich klinischer Beobachtungen und der Überwachung des Körpergewichts;
- j) eine Beurteilung der Ergebnisse, einschließlich der Positivkontrolle;
- k) das Datum der Prüfung.

6.3 Versuche am Meerschweinchen zum Nachweis von Hautsensibilisierung

6.3.1 Kurzbeschreibung

Die beiden derzeit angewendeten Prüfungen am Meerschweinchen zum Nachweis der sensibilisierenden Wirkung von Chemikalien und Medizinprodukten sind der Bühler-Test und der GPMT. Beide Prüfungen umfassen eine Induktions- und Provokationsphase, wodurch alle Stadien einer Allergie (Überempfindlichkeitsreaktion) einbezogen werden.

6.3.2 Wahl der Konzentrationen des Prüfmusters

Zurzeit vorhandene Anleitungen zur Prüfung von Einzelsubstanzen auf ihr sensibilisierendes Potential empfehlen die Anwendung nur einer einzigen Prüfkonzentration.

ANMERKUNG Für polymere Materialien ist in Anhang B ein wahlfreies Extraktionsverfahren angeführt.

6.3.3 Induktion

Die Sensibilisierungsrate hängt in hohem Maße von der Induktionsdosis ab, die beim Meerschweinchen möglichst eine leicht bis mäßig reizende Wirkung aufweisen muss. Falls die Reizschwelle nicht erreicht wird, muss die höchstmögliche Konzentration verwendet werden. Sie darf jedoch die Gesundheit der Tiere nicht beeinträchtigen. Die Induktionsdosis wird bei den Prüfungen am Meerschweinchen üblicherweise auf der Grundlage von Vorversuchen, wie sie für die einzelnen Prüfungen am Meerschweinchen beschrieben werden (siehe 6.5.4.2), gewählt. Unverdünnte Extrakte mit den üblichen Lösemitteln brauchen nicht in einem Vorversuch geprüft zu werden.

6.3.4 Provokation

Auch die Konzentration für die Provokation in den Prüfungen am Meerschweinchen hat Vorversuche an Tieren, die nicht vorher gegenüber dem Prüfmaterial exponiert waren, zur Grundlage. Die bei der Auswertung der Vorversuche bestimmte höchste Dosis, die keine reizende Wirkung aufweist, muss verwendet werden. Für den Provokationsvorgang wird die Anwendung von mehr als einer Konzentration angeraten, um die Auswertung der Ergebnisse zu erleichtern.

6.4 Wichtige Faktoren, die das Prüfergebnis beeinflussen

Die biochemischen und physikalischen Eigenschaften des Prüfmusters können die Wahl der Prüfung beeinflussen, da bei dem Maximierungstest intrakutane Injektionen erforderlich sind. Wenn das Prüfmuster nicht intrakutan injiziert werden kann, muss ein alternatives Verfahren angewendet werden (z. B. topische Applikation). Die Extraktlösungen müssen unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden. Nicht sterile Proben dürfen nur durch topische Untersuchung untersucht werden, da die Möglichkeit einer mikrobiellen Kontamination des Prüfmusters die abschließende Versuchsauswertung stören kann. In Fällen, bei denen die Sterilität eines Prüfmusters nicht sichergestellt werden kann, die Probe jedoch noch als nicht kontaminiert angesehen wird, kann eine intrakutane Verabreichung gerechtfertigt sein.

Die biologische Verfügbarkeit des Prüfmaterials wird durch die Wahl der Trägersubstanz beeinflusst. Obwohl es keine Trägersubstanz gibt, die für alle Prüfmaterialien optimal ist, sollte eine Trägersubstanz gewählt werden, die durch Lösung und Eindringen der Prüfsubstanz die Exposition optimiert. Die Konzentration des Prüfmaterials sollte die höchstmögliche sein, die die Auswertung der Ergebnisse nicht beeinträchtigt. Die meisten Forscher bevorzugen das Prüfmuster in Form einer Lösung, da Dispersionen dazu neigen, Sedimente zu bilden, was eine genaue Dosierung erschwert. Beispiele für Trägersubstanzen zur intrakutanen Injektion sind Kochsalzlösung, Propylenglycol und Pflanzenöle.

Abweichungen zwischen den Ergebnissen unterschiedlicher Laboratorien können mehrere Quellen haben. Folgende Faktoren sind bei der Durchführung der Prüfung wichtig:

- Umgebungsbedingungen der Prüfung;
- Prüfstelle am Tier;
- Verfahren der Fellentfernung (Scheren/Rasieren oder chemische Enthaarung);
- Konstruktionsweise des Läppchens;
- Menge des Prüfmaterials;
- Qualität des Luftabschlusses;
- Expositionszeit und die Befundablesung am Tier.

Die Reaktionsfähigkeit der Tiere schwankt auch in Abhängigkeit von den genetischen Faktoren und der Haltung.

Der Vergleich der Anzahl der Prüftiere mit einer positiven Reaktion bei der Provokation mit den entsprechenden Kontrolltieren ist von grundlegender Bedeutung für die Anzeige eines positiven Prüfergebnisses, obgleich die Schwere der Reaktionen bei der Beurteilung helfen wird. Grenzreaktionen bei der Provokation werden am besten durch erneute Provokation geklärt. Es hat sich gezeigt, dass die Histopathologie keine Hilfe bei der Bewertung der Prüfergebnisse darstellt.

Um die Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit sicherzustellen, muss eine Prüfung einer Positiv-Kontrollsubstanz für die Hautsensibilisierung vom Prüflaboratorium einbezogen werden, um das Prüfsystem zu validieren und eine Positivreaktion nachzuweisen. Positivkontrollen sollten vorzugsweise schwache bis mäßige Kontaktallergene sein (z. B. Mercaptobenzothiazol, Hexylzimtaldehyd und Benzocain). Wenn über einen Zeit-

DIN EN ISO 10993-10:2023-04

EN ISO 10993-10:2023 (D)

raum von sechs Monaten oder länger die Beständigkeit nachgewiesen wurde, braucht jedoch nicht in jeden Versuch eine Positivkontrolle einbezogen zu werden, sondern sie darf in regelmäßigen Abständen, die nicht mehr als sechs Monate betragen dürfen, geprüft werden. Bei Versuchen an Meerschweinchen werden üblicherweise zehn Tiere für die Positivkontrolle verwendet. Es dürfen weniger Meerschweinchen verwendet werden, wenn ein Versuch mit einer Positiv-Kontrollsubstanz häufiger als alle sechs Monate durchgeführt wird. Mindestens fünf Versuchstiere mit einer positiven Substanz und fünf Kontrolltiere sollten verwendet werden. Siehe Literaturhinweis [1].

ANMERKUNG Um eine positive Reaktion zu erhalten, können Verdünnungen von mäßig bis starken hautsensibilisierenden Substanzen (z. B. Formaldehyd und DNCB) verwendet werden. Das stellt jedoch nicht sicher, dass der Versuch auch die Reaktion einer schwachen sensibilisierenden Substanz in den Extrakten eines Medizinproduktes nachweisen kann.

6.5 Maximierungstest am Meerschweinchen

6.5.1 Kurzbeschreibung

Beurteilung der Fähigkeit des geprüften Materials, eine Hautsensibilisierung beim Meerschweinchen hervorzurufen, wobei die in dem Maximierungstest am Meerschweinchen für Einzelsubstanzen angewendete Technik verwendet wird.

6.5.2 Vorbereitung der Prüfmuster

Das Prüfmuster muss nach den Festlegungen in Anhang A vorbereitet werden. Die Konzentration des Prüfmusters muss die höchstmögliche sein, die die Auswertung der Ergebnisse nicht beeinträchtigt (siehe 6.5.4.2).

ANMERKUNG Für polymere Materialien ist in Anhang B ein wahlfreies Extraktionsverfahren angeführt.

6.5.3 Tiere und Haltung

Es müssen gesunde junge erwachsene Albinomeerschweinchen beiderlei Geschlechts aus einem einzigen ausgezüchteten Stamm, mit einem Gewicht zwischen 300 g und 500 g bei Untersuchungsbeginn, verwendet werden. Wenn weibliche Tiere verwendet werden, dürfen sie weder bereits geworfen haben noch trächtig sein.

Die Tiere müssen nach den Festlegungen in ISO 10993-2 eingewöhnt und gepflegt werden. Falls notwendig, sollten zur Bestimmung der optimalen Prüfkonzentrationen an einer Gruppe von Tieren Vorversuche durchgeführt werden (siehe 6.5.4.2).

Wenn das Prüfmaterial ein Pulver oder eine Flüssigkeit ist, muss mindestens eine Gruppe von 10 Tieren mit dem Prüfmuster behandelt werden, wobei mindestens fünf Tiere als Kontrollgruppe dienen müssen. Wenn ein Vorversuch notwendig ist, muss er an zusätzlichen Tieren durchgeführt werden.

Zur Prüfung von Extrakten muss mindestens eine Gruppe von 10 Tieren mit jedem Extrakt behandelt werden, und mindestens fünf Tiere müssen als Kontrollgruppe für das Lösemittel dienen. Wenn ein Vorversuch notwendig ist, muss er an zusätzlichen Tieren durchgeführt werden.

Wenn bei Verwendung von 10 Prüftieren und fünf Kontrolltieren die Prüfung vollständig negative Ergebnisse erzeugt, ist es unwahrscheinlich, dass bei einer Prüfung von weiteren 10 plus fünf Tieren ein positives Ergebnis erzielt wird. Werden jedoch doppeldeutige Ergebnisse erzielt, muss eine Wiederholung der Provokation (siehe 6.5.6) durchgeführt werden. Wenn die doppeldeutigen Ergebnisse bestehen bleiben, wird eine neue Studie mit mindestens 20 Prüftieren und 10 Kontrolltieren durchgeführt.

6.5.4 Prüfverfahren

6.5.4.1 Vorbereitung

Vor allen Schritten des Prüfverfahrens wird das Fell an allen zu behandelnden Stellen geschoren und rasiert.

6.5.4.2 Vorversuche

Die Vorversuche dienen dazu, die im Hauptversuch nach 6.5.4.3 zu verwendenden Konzentrationen des Prüfmusters zu bestimmen.

Unverdünnte Extrakte mit den üblichen Lösemitteln (z. B. Kochsalzlösung oder Pflanzenöl) brauchen nicht in einem Vorversuch geprüft zu werden.

Für die topische Applikation wird geeignetes Filterpapier oder ein Verbandmullläppchen (4 cm² bis 8 cm²) oder eine Kammer mit dem Prüfmuster gesättigt und das Läppchen unter einem Okklusivverband auf die geschorene Hautoberfläche aufgebracht, der durch einen Verband und/oder (Wundschutz-)Body um den Rumpf des Tieres gesichert wird.

Beim Umwickeln eines Tieres zum Sichern des Okklusivverbandes sollte darauf geachtet werden, dass das Tier normal atmen kann. Es ist ein elastischer Verband zu bevorzugen, der von gut geschultem Personal angelegt werden sollte.

Topisch wird eine Verdünnungsreihe des Prüfmusters bei mindestens zwei Tieren im Flankenbereich aufgebracht. Nach 24 h sind die Okklusivverbände und die Prüfläppchen zu entfernen und die Applikationsstellen hinsichtlich Erythem und Ödem nach der in Tabelle 1 angegebenen Gradeinteilung nach Magnusson und Kligman zu bewerten. Es kann auch angemessen sein, eine Verdünnung des Erzeugnisses durch intrakutane Injektion zu untersuchen, wenn ungewöhnliche Lösemittel verwendet werden.

Für die topische Induktionsphase im Hauptversuch ist die höchste Konzentration auszuwählen, die ein leichtes bis mäßiges Erythem erzeugt, aber das Tier in Übereinstimmung mit ISO 10993-2 in keiner anderen Art und Weise beeinträchtigt. Es sollte beachtet werden, dass für Extrakte von Medizinprodukten möglicherweise kein Irritationsschwellenwert erhalten wird. In diesen Fällen muss die höchstmögliche Konzentration verwendet werden, z. B. der unverdünnte Extrakt. Bei Endprodukten/Medizinprodukten kann es hinreichend sein, nur den unverdünnten Extrakt zu prüfen.

Für die Provokationsphase im Hauptversuch wird die höchste Konzentration verwendet, die kein Erythem erzeugt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 — Skala nach Magnusson und Kligman

Reaktion auf den Patchtest	Gradeinteilung
Keine sichtbare Veränderung	0
Leichtes oder fleckförmiges Erythem	1
Mäßiges und zusammenfließendes Erythem	2
Intensives Erythem und/oder Schwellung	3

Zu beachten ist die Vorbehandlung aller Tiere mit Injektionen des kompletten Freundschens Adjuvans (FCA, en: Freund's complete adjuvant).

6.5.4.3 Hauptversuch

6.5.4.3.1 Intrakutane Induktionsphase

Bei jedem Tier ist mit jeder der folgenden Substanzen je ein Doppel intrakutaner Injektionen von 0,1 ml im geschorenen Bereich zwischen den Schulterblättern an den in Bild 1 gezeigten Injektionsstellen (z. B. die Stellen A, B und C) durchzuführen.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

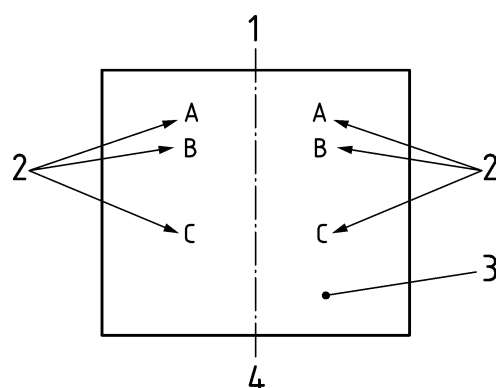
- Stelle A: Eine stabile Emulsion von 50 : 50 (V/V) komplettem Freundschem Adjuvans mit dem gewählten Lösemittel. Es ist physiologische Kochsalzlösung (BP, USP oder gleichwertige Qualität) oder Extraktionsmedium/Lösemittel zu verwenden.
- Stelle B: Das Prüfmuster (unverdünnter Extrakt); den Kontrolltieren ist lediglich das Extraktionsmedium/Lösemittel zu injizieren.
- Stelle C: Das Prüfmuster in der an Stelle B verwendeten Konzentration, emulgiert in einer stabilen Emulsion von 50 : 50 (V/V) von komplettem Freundschem Adjuvans mit dem Lösemittel/Extraktionsmedium (der an Stelle A verwendeten Lösung); den Kontrolltieren ist eine Emulsion der Blindflüssigkeit mit dem Adjuvans zu injizieren.

6.5.4.3.2 Topische Induktionsphase

(7 ± 1) d nach der intrakutanen Induktionsphase wird das Prüfmuster topisch bei jedem Tier auf den Bereich zwischen den Schulterblättern aufgebracht; es wird ein Lämpchen von etwa 8 cm^2 Größe verwendet (Filterpapier oder Verbandmull), so dass alle Injektionsstellen überdeckt werden (siehe Bild 1). Es wird die im Vorversuch durch topische Applikation (falls erfolgt, siehe 6.5.4.2) ausgewählte Konzentration verwendet. Falls die nach 6.5.4.3.1 erreichbare Höchstkonzentration keine Irritation hervorruft, wird der Bereich mit 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, en: sodium dodecyl sulfate;) vorbehandelt; dies wird (24 ± 2) h vor Aufbringen des Lämpchens in die Haut einmassiert. Überschüssiges SDS sollte vor dem Aufbringen der Lämpchen für die topische Induktionsphase entfernt werden, da das überschüssige SDS die Absorption des Extrakts beeinträchtigen kann. Die Lämpchen werden mit einem Okklusivverband gesichert. Die Verbände und Lämpchen werden nach (48 ± 2) h entfernt.

Frisch hergestellte Extrakte werden bevorzugt. Wenn ein Extrakt länger als (24 ± 2) h gelagert wird, sollte die Stabilität des Extrakts unter Lagerbedingungen überprüft werden.

Die Kontrolltiere werden auf ähnliche Weise, aber lediglich mit der Blindflüssigkeit behandelt.



Legende

- 1 kraniale Seite
- 2 intrakutane Injektionen von 0,1 ml (siehe 6.5.4.3.1)
- 3 geschorener Bereich zwischen den Schulterblättern
- 4 kaudale Seite
- A, B, C Injektionsstellen

Bild 1 — Lage der intrakutanen Injektionsstellen

6.5.4.3.3 Provokationsphase

Für die Prüfung in der Provokationsphase muss die nachstehend beschriebene Verfahrensweise eingehalten werden:

- a) Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen (14 ± 1) d nach Abschluss der topischen Induktionsphase einer Provokation unterzogen werden.
- b) Bei unverdünnten Prüfextrakten unter Verwendung von Standardlösemitteln (z. B. Kochsalzlösung oder Pflanzenöl):
 - 1) müssen sowohl Versuchs- als auch Kontrolltiere sowohl mit Prüf- als auch Kontrollextrakten behandelt werden, oder
 - 2) die Kontrolltiere müssen mit unverdünnter Trägersubstanz behandelt werden und die Versuchstiere mit unverdünntem Prüfextrakt.

Für die Provokationsphase wird die Verwendung der höchsten Konzentration des Prüfmusters, die keine reizende Wirkung aufweist, empfohlen. Bei der Prüfung mit Extrakten von Medizinprodukten wird in der Regel kein Vorversuch zur Bestimmung der höchsten Konzentration der Extrakte, die keine reizende Wirkung aufweist, durchgeführt. In 6.5.4.2 ist angeführt, dass unverdünnte Extrakte mit den üblichen Lösemitteln nicht in einem Vorversuch geprüft zu werden brauchen.

Die Anwendung von Option b), 1) ermöglicht die Feststellung, ob eine bei den Versuchstieren beobachtete Hautreaktion eher auf eine Irritation als auf eine Sensibilisierung zurückzuführen ist. Nach Option b), 1) werden sowohl Versuchs- als auch Kontrolltiere sowohl mit Prüf- als auch Kontrollextrakten behandelt. Wenn bei den Kontrolltieren Hautreaktionen auf die Prüfextrakte beobachtet werden, können die Reaktionen eher auf eine Irritation als auf eine Sensibilisierung zurückzuführen sein, da die Kontrolltiere den Prüfextrakten zuvor nicht ausgesetzt waren.

Nach Option b), 2) werden die Kontrolltiere nicht mit dem Prüfextrakt und die Versuchstiere nicht mit dem Kontrollextrakt behandelt. Falls Hautreaktionen bei Versuchstieren beobachtet werden, bei denen kein Vorversuch zur Bestimmung der höchsten Konzentration der Extrakte, die keine reizende Wirkung aufweist, durchgeführt wurde, können zusätzliche Versuche erforderlich sein, um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen.

- c) Wenn Nicht-Standardlösemittel verwendet werden, müssen alle Versuchs- und Kontrolltiere sowohl mit den Prüf- als auch Kontrollextrakten behandelt werden.
- d) Die Extrakte müssen durch topische Applikation auf rasierte Stellen, die während der Induktionsphase nicht behandelt wurden, wie die obere Flanke jedes Tieres, unter Verwendung geeigneter Lämpchen oder Kammern verabreicht werden, die mit dem Prüfmuster in der Konzentration getränkt werden, die in 6.5.4.3.1 für die Stelle B ausgewählt wurde. Falls die in 6.5.4.3.1 für Stelle B gewählte Konzentration nicht die höchste Konzentration ist, die keine reizende Wirkung aufweist, muss die im Vorversuch (siehe 6.5.4.2) ermittelte Konzentration, die keine reizende Wirkung aufweist, verwendet werden. Das für die Sättigung der Lämpchen/Kammern verwendete Extraktvolumen muss festgelegt und begründet werden.
- e) Die Lämpchen/Kammern müssen mit einem Okklusivverband gesichert werden.
- f) Die Verbände und Lämpchen müssen nach (24 ± 2) h entfernt werden.

6.5.5 Beobachtung der Tiere

Das Erscheinungsbild der Provokationsstellen an der Haut wird bei den Prüf- und Kontrolltieren (24 ± 2) h und (48 ± 2) h nach Abnahme der Verbände untersucht. Die Verwendung von natürlichem oder vollspektralem Licht wird dringend empfohlen, um die Hautreaktionen sichtbar zu machen. Die Hautreaktionen hinsichtlich Erythem und Ödem sind für jede Provokationsstelle und jeden Untersuchungszeitpunkt zu beschreiben und nach der in Tabelle 1 angegebenen Gradeinteilung nach Magnusson und Kligman einzustufen. Es wird dringend empfohlen, dass die Ablesungen ohne Kenntnis der Vorbehandlung erfolgen, um eine Voreingenommenheit bei der Auswertung der Ergebnisse auf ein Mindestmaß herabzusetzen.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04

EN ISO 10993-10:2023 (D)

Scheren und Rasieren sollten vor jedem Schritt im Prüfverfahren erfolgen (siehe 6.5.4.1). Ein erneutes Rasieren ist jedoch möglicherweise nach der Provokation oder erneuten Provokation nicht erforderlich, wenn ein Tier am Tag zuvor rasiert wurde.

6.5.6 Auswertung der Ergebnisse

Reaktionsgrade nach Magnusson und Kligman von 1 oder höher in der Prüfgruppe zeigen im Allgemeinen eine Sensibilisierung an, vorausgesetzt, dass bei Kontrolltieren Grade unterhalb von 1 zu beobachten sind. Werden bei Kontrolltieren Reaktionsgrade von 1 oder höher festgestellt, wird angenommen, dass die Reaktionen der Prüftiere, die die stärkste bei den Kontrolltieren gefundene Reaktion überschreiten, auf Sensibilisierung zurückzuführen sind. Bei doppeldeutigen Reaktionen wird empfohlen, die Ergebnisse aus der Erstprovokation durch eine erneute Provokation zu bestätigen. Das Prüfergebnis wird als die Häufigkeit der Positivergebnisse bei der Provokation von Prüf- und Kontrolltieren dargestellt.

Gelegentlich zeigt in der Prüfgruppe eine größere Anzahl von Tieren eine Reaktion als in der Kontrollgruppe, obgleich die Intensität der Reaktion nicht stärker ist als die, die die Kontrolltiere aufweisen. In diesen Fällen kann eine erneute Provokation erforderlich sein, um die Reaktion klar festzustellen. Eine erneute Provokation muss ein bis zwei Wochen nach der ersten Provokation durchgeführt werden. Das zu verwendende Verfahren ist das der Erstprovokation, die Provokation erfolgt an einer nicht vorbehandelten Seite des Tieres.

6.5.7 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss Folgendes enthalten:

- a) eine Beschreibung des Prüfmaterials (der Prüfmaterialien) oder Produkts;
- b) den Verwendungszweck des Prüfmusters oder -materials;
- c) die angewendete Internationale Norm (einschließlich ihres Ausgabejahres);
- d) eine detaillierte Beschreibung des zur Vorbereitung des Prüfmusters, Prüfmaterials oder Medizinprodukts angewandten Verfahrens;
- e) eine Beschreibung der Versuchstiere;
- f) das Verfahren der Aufbringung auf die Prüfstellen;
- g) sämtliche Abweichungen vom Verfahren;
- h) die Art und Weise der Markierung der Prüfstellen und der Durchführung der Befundablesungen;
- i) Aufzeichnungen der Beobachtungen;
- j) die Beurteilung der Ergebnisse;
- k) das Datum der Prüfung.

6.6 Prüfung mit Okklusivläppchen (Bühler-Test)

6.6.1 Kurzbeschreibung

Beurteilung der Fähigkeit des geprüften Materials, eine Hautsensibilisierung beim Meerschweinchen hervorzurufen.

6.6.2 Vorbereitung der Prüfmuster

Das Prüfmuster muss nach den Festlegungen in Anhang A vorbereitet werden. Die Konzentration des Prüfmusters muss die höchstmögliche sein, die die Auswertung der Ergebnisse nicht beeinträchtigt (siehe 6.6.4.2).

Wenn es Form und Größe zulassen, können Medizinprodukte zur äußeren Anwendung (wie z. B. Elektroden) ohne jede Vorbereitung aufgebracht werden.

6.6.3 Tiere und Haltung

Es müssen gesunde junge erwachsene Albinomeerschweinchen beiderlei Geschlechts aus einem einzigen ausgezuchteten Stamm, mit einem Gewicht zwischen 300 g und 500 g bei Untersuchungsbeginn, verwendet werden. Wenn weibliche Tiere verwendet werden, dürfen sie weder bereits geworfen haben noch trächtig sein.

Die Tiere müssen nach den Festlegungen in ISO 10993-2 eingewöhnt und gepflegt werden. Zur Bestimmung der Konzentrationen des Prüfmusters sollten an einer Gruppe von Tieren Vorversuche durchgeführt werden (siehe 6.5.4.2).

Zur Prüfung von Pulvern oder Flüssigkeiten muss mindestens eine Gruppe von 10 Tieren mit dem Prüfmaterial behandelt werden, wobei mindestens fünf Tiere als Kontrollgruppe dienen müssen. Wenn ein Vorversuch notwendig ist, muss er an zusätzlichen Tieren durchgeführt werden.

Zur Prüfung von Extrakten muss mindestens eine Gruppe von 10 Tieren mit jedem Extrakt behandelt werden, und mindestens fünf Tiere müssen als Kontrollgruppe für jedes Lösemittel dienen. Wenn ein Vorversuch notwendig ist, muss er an zusätzlichen Tieren durchgeführt werden.

Wenn bei Verwendung von 10 Prüftieren und fünf Kontrolltieren die Prüfung vollständig negative Ergebnisse ergibt, ist es unwahrscheinlich, dass bei einer Prüfung von weiteren 10 plus fünf Tieren ein positives Ergebnis erzielt wird. Werden jedoch doppeldeutige Ergebnisse erzielt, muss eine Wiederholung der Provokation (siehe 6.5.6) durchgeführt werden. Wenn die doppeldeutigen Ergebnisse bestehen bleiben, wird eine neue Studie mit mindestens 20 Prüftieren und 10 Kontrolltieren durchgeführt.

6.6.4 Prüfverfahren

6.6.4.1 Vorbereitung

Vor allen Schritten des Prüfverfahrens ist das Fell an allen zu prüfenden Stellen gründlich zu scheren oder zu rasieren.

6.6.4.2 Vorversuche

Die Vorversuche dienen dazu, die im Hauptversuch nach 6.6.4.3 zu verwendenden Konzentrationen des Prüfmusters zu bestimmen.

Medizinprodukte zur topischen Anwendung und unverdünnte Extrakte mit den üblichen Lösemitteln brauchen nicht in Vorversuchen geprüft zu werden.

Für alle topischen Applikationen wird ein Läppchen (Filterpapier oder Verbandmull) geeigneter Größe mit dem Prüfmaterial oder Extrakt gesättigt und auf die geschorene Hautoberfläche aufgebracht; darüber wird für $(6 \pm 0,5)$ h ein Okklusivverband angebracht. Bei jedem Tier könnte die Anwendung von Mitteln zur Bewegungsbeschränkung notwendig sein, um den Abschluss an allen Prüfstellen sicherzustellen. Wenn ein Verband verwendet wird, sollte dessen Angemessenheit bei jedem Versuch beurteilt werden. Die Applikationsstellen sind (24 ± 2) h und (48 ± 2) h nach dem Entfernen der Läppchen hinsichtlich Erythem und Ödem nach der in Tabelle 1 angegebenen Gradeinteilung nach Magnusson und Kligman zu bewerten.

Topisch werden vier Konzentrationen des Prüfmusters bei mindestens zwei Tieren mit geeigneten Prüfläppchen im Flankenbereich aufgebracht. Nach $(6 \pm 0,5)$ h sind die Okklusivverbände und die Prüfläppchen zu entfernen. Die Applikationsstellen sind (24 ± 2) h und (48 ± 2) h nach dem Entfernen der Läppchen hinsichtlich Erythem und Ödem nach der in Tabelle 1 angegebenen Gradeinteilung nach Magnusson und Kligman zu bewerten.

Auszuwählen ist:

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- a) für die Induktionsphase im Hauptversuch die höchste Konzentration, die nicht mehr als ein leichtes Erythem erzeugt, aber das Tier nicht auf andere Weise beeinträchtigt;
- b) für die Provokationsphase im Hauptversuch die höchste Konzentration, die kein Erythem erzeugt.

6.6.4.3 Hauptversuch

6.6.4.3.1 Induktionsphase

Das Prüfmuster wird topisch auf den geschorenen linken oberen Rückenbereich jedes Tiers aufgebracht; dazu werden geeignete Prüfläppchen verwendet, die mit dem Prüfmuster in der nach 6.6.4.2 a) ausgewählten Konzentration getränkt sind. Die Mittel zur Bewegungseinschränkung, falls vorhanden, sowie die Okklusivverbände und Prüfläppchen werden nach $(6 \pm 0,5)$ h entfernt. Dieses Verfahren wird an drei Tagen innerhalb einer Woche für eine Dauer von drei Wochen durchgeführt. Die Kontrolltiere werden auf ähnliche Weise, aber lediglich mit der Blindflüssigkeit behandelt.

6.6.4.3.2 Provokationsphase

(14 ± 1) d nach der letzten Behandlung im Rahmen der Induktionsphase werden alle Prüf- und Kontrolltiere der Provokation mit dem Prüfmuster unterzogen. Das Prüfmuster wird durch eine einzige topische Applikation auf einen geschorenen unbehandelten Bereich von jedem Tier aufgebracht; verwendet werden geeignete Prüfläppchen, die mit dem Prüfmuster in der nach 6.6.4.2 b) ausgewählten Konzentration getränkt sind. Die Mittel zur Bewegungseinschränkung, Okklusivverbände und Prüfläppchen werden nach $(6 \pm 0,5)$ h entfernt.

6.6.5 Beobachtung der Tiere

Falls notwendig, werden (24 ± 2) h nach dem Beginn der Erstprovokation bzw. der erneuten Provokation entweder

- a) alle Tiere mit einem handelsüblichen Enthaarungsmittel enthaart, indem das Mittel nach den Anweisungen des Herstellers auf die Prüfstelle und die angrenzenden Gebiete aufgebracht wird, oder
- b) alle Tiere an den Prüfstellen und den angrenzenden Gebieten rasiert.

Der enthaarte Bereich ist sorgfältig mit warmem Wasser zu waschen, und die Tiere sind mit einem Handtuch abzutrocknen, bevor sie in die Käfige zurückgebracht werden. (24 ± 2) h nach Entfernung der Provokationsläppchen und frühestens 2 h nach Entfernung der Behaarung sind die Prüfstellen nach Tabelle 1 einzustufen. Die Gradeinteilung ist (48 ± 2) h nach Entfernung des Provokationsläppchens zu wiederholen. Die Verwendung von natürlichem oder vollspektralem Licht wird dringend empfohlen, um die Hautreaktionen sichtbar zu machen. Es wird dringend empfohlen, dass die Ablesungen ohne Kenntnis der Vorbehandlung erfolgen, um eine Voreingenommenheit bei der Auswertung der Ergebnisse auf ein Mindestmaß herabzusetzen.

6.6.6 Auswertung der Ergebnisse

Es muss die in Tabelle 1 angegebene Gradeinteilungsskala nach Magnusson und Kligman angewendet werden.

Reaktionsgrade von 1 oder höher in der Prüfgruppe zeigen im Allgemeinen eine Sensibilisierung an, vorausgesetzt, dass bei Kontrolltieren Grade unterhalb von 1 zu beobachten sind. Werden bei Kontrolltieren Reaktionsgrade von 1 oder höher festgestellt, wird angenommen, dass die Reaktionen der Prüftiere, die die stärkste bei den Kontrolltieren gefundene Reaktion überschreiten, auf Sensibilisierung zurückzuführen sind. Zur Bestätigung der Ergebnisse aus der Erstprovokation wird eine wiederholte Provokation empfohlen. Das Prüfergebnis wird als die Häufigkeit der Positivergebnisse bei der Provokation von Prüf- und Kontrolltieren dargestellt.

Gelegentlich zeigt in der Prüfgruppe eine größere Anzahl von Tieren eine Reaktion als in der Kontrollgruppe, obgleich die Intensität der Reaktion nicht stärker ist als die, die die Kontrolltiere aufweisen. In diesen Fällen kann eine erneute Provokation erforderlich sein, um die Reaktion klar festzustellen. Eine erneute Provokation muss ein bis zwei Wochen nach der ersten Provokation durchgeführt werden. Das zu verwendende Verfahren ist das der Erstprovokation, die Provokation erfolgt an einem ungeprüften Bereich an der Flanke des Tieres.

Unter diesen Umständen wird eine neue Negativkontrollgruppe empfohlen.

6.6.7 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss Folgendes enthalten:

- a) eine Beschreibung des Prüfmaterials (der Prüfmaterialien) oder Produkts;
- b) die verwendete internationale Norm (einschließlich des Ausgabejahres);
- c) den Verwendungszweck des Prüfmaterials (der Prüfmaterialien) oder des Produkts;
- d) eine detaillierte Beschreibung des zur Vorbereitung der Prüfmuster oder -materialien angewandten Verfahrens;
- e) eine Beschreibung der Versuchstiere;
- f) das Verfahren der Aufbringung auf die Prüfstellen;
- g) sämtliche Abweichungen vom Verfahren;
- h) die Art und Weise der Markierung der Prüfstellen und der Durchführung der Befundablesungen;
- i) Aufzeichnungen der Beobachtungen;
- j) eine Beurteilung der Ergebnisse einschließlich statistischer Verfahren;
- k) das Datum der Prüfung.

7 Schlüsselfaktoren bei der Auswertung von Prüfergebnissen

Die in diesem Dokument enthaltenen Prüfungen stellen wichtige Werkzeuge für die Entwicklung sicherer Produkte dar und müssen in Übereinstimmung mit geeigneten Qualitätssicherungsmaßnahmen (z. B. ISO/IEC 17025 oder GLP) durchgeführt sowie von geschultem Personal ausgewertet werden. Es muss der Nachweis erbracht werden, dass die Personen, die die Prüfungen planen, durchführen und auswerten, durch Schulung und Erfahrung für die übernommenen Aufgaben angemessen qualifiziert sind.

Der Nachweis einer Hautsensibilisierung mit einem beliebigen Verfahren schließt das Prüfmaterial oder das Produkt nicht notwendigerweise von der Anwendung aus, weil die Menge des Prüfmaterials im Prüfverfahren im Vergleich zu den tatsächlichen Anwendungsbedingungen übermäßig groß sein kann. Ein nachteiliger Befund bei der Anwendung eines der beschriebenen Verfahren zeigt die Erfordernis weiterer Untersuchungen an, die eine Risikobeurteilung für die vorgesehene Exposition des Menschen ermöglichen können.

Die für eine Vorhersage verwendeten Prüfergebnisse, die mittels der in diesem Dokument beschriebenen Verfahren gewonnen wurden, können nicht für sich allein stehen und müssen zusammen mit anderen Informationen ausgewertet werden, um das Risiko einer Überempfindlichkeitsreaktion oder anderer Formen von Immuntoxizität zu beurteilen. Ein negatives Prüfergebnis schließt nicht die Möglichkeit aus, dass ein Produkt allergische Hautreaktionen auslösen kann. Die Ergebnisse sollten mit weiteren Informationsquellen verglichen werden, wie z. B.:

- Daten aus Beschwerden der Industrie und der Anwender;
- Erfahrungen mit Produkten, die ähnliche Bestandteile enthalten;
- diagnostische Prüfergebnisse in dermatologischen Kliniken;
- retrospektive epidemiologische Daten.

Anhang A

(normativ)

Vorbereitung von Materialien zur Prüfung auf Hautsensibilisierung

A.1 Allgemeines

Bei der Durchführung der Prüfungen auf Hautsensibilisierung und der Bewertung ihrer Daten müssen Art, Intensitätsgrad, Häufigkeit, Dauer und Bedingungen der Anwendung des Medizinprodukts am Menschen berücksichtigt werden. Einer der für diese Prüfungen entscheidenden Parameter ist die Vorbereitung des Prüfmaterials.

A.2 Materialien für Exposition im direkten Kontakt

A.2.1 Feste Prüfmaterialien

Feste Materialien in einer geeigneten physikalischen Zustandsform (z. B. Folien, Dünnschichtfolien) müssen in unveränderter Form geprüft werden. Von festem Prüfmaterial sind Prüfstücke von 2,5 cm × 2,5 cm mit einer der Normalverwendung angenäherten Dicke, aber nicht stärker als 0,5 cm, herzustellen. Geeignete Negativkontrollen sind auf die gleiche Weise herzustellen. Die Negativkontrolle muss dem Prüfmaterial physikalisch stark ähneln und sollte nicht reizerzeugend sein. Verbandmull darf als Ersatzstoff verwendet werden, wenn kein passenderes Kontrollmaterial gefunden werden kann.

Der Feststoff kann zur Erzielung eines guten Kontakts mit den Geweben pulverisiert werden, wobei eine Fremdverschmutzung während des Vorgangs sorgfältig auszuschließen ist; er darf dazu auch mit Wasser oder einem geeigneten nicht reizenden Lösemittel ausreichend befeuchtet werden. Falls Keramikwerkstoffe pulverisiert werden müssen, ist daran zu denken, dass deren physikalisch-chemische Eigenschaften bei der Überführung in den Pulverzustand verändert werden können, wobei möglicherweise ausgeprägte Wirkungen hinsichtlich der biologischen Aktivität entstehen können.

Pulver (z. B. superabsorbierende Stoffe) müssen durch direkte Aufbringung oder als mit einem geeigneten Lösemittel hergestellte Paste geprüft werden. Parallel zu dem befeuchteten, verdünnten oder suspendierten Prüfmaterial muss eine Kontrolle mit demselben Lösemittel bewertet werden.

ANMERKUNG Entweder die Größe der Oberfläche oder die Teilchengröße oder beide sind wichtige Faktoren bei biologischen Reaktionen, wie z. B. der Phagozytose, die bei Entzündungs- und Immunreaktionen eine wichtige Rolle spielt.

A.2.2 Flüssige Prüfmaterialien

Flüssigkeiten müssen durch direkte Aufbringung oder, wenn nicht praktikabel, als mit einem geeigneten Lösemittel verdünnte Lösung geprüft werden. Parallel zur verdünnten Prüfflüssigkeit muss eine Kontrolle mit demselben Lösemittel bewertet werden.

A.3 Extrakte von Prüfmaterialien

Ein festes Prüfmaterial kann geprüft werden, indem der Feststoff extrahiert wird. Zu prüfende Extrakte müssen nach der Festlegung in ISO 10993-12 hergestellt werden; dabei sind polare, nicht polare und/oder in geeigneten Fällen zusätzliche Lösemittel zu verwenden. Eine Begründung für die Angemessenheit des Extraktionsverfahrens muss gegeben werden.

Parallel zum Extrakt des Prüfmaterials muss eine Blindprobe unter Verwendung des extrahierenden Lösemittels bewertet werden.

ANMERKUNG Für polymere Materialien ist in Anhang B ein wahlfreies Extraktionsverfahren beschrieben.

A.4 Lösemittel

Falls das Prüfmaterial extrahiert, verdünnt, suspendiert oder befeuchtet werden muss, ist ein geeignetes nicht reizendes und nicht sensibilisierendes Lösemittel zu verwenden. ISO 10993-12 stellt eine Aufstellung geeigneter Lösemittel zur Verfügung.

A.5 Sterile Prüfmaterialien

Wenn das Endprodukt durch den Handel steril geliefert wird, muss das Prüfmaterial vor der Prüfung nach dem gleichen Verfahren sterilisiert werden. Mit Ethylenoxid sterilisierte Produkte führen zu verfahrenstechnischen Schwierigkeiten, da Ethylenoxid und dessen Reaktionsprodukte in den in diesem Dokument beschriebenen Prüfungen eine biologische Reaktion hervorrufen können.

Um im Fall einer Irritationsreaktion zwischen den Wirkungen des Prüfmaterials und denen von Ethylenoxidrückständen differenzieren zu können, muss den Bewertungen dieser Reaktion auf das Produkt vor und nach der Sterilisation mit Ethylenoxid Bedeutung beigemessen werden.

Anhang B

(informativ)

Verfahren zur Herstellung von Extrakten aus polymeren Prüfmaterialien

B.1 Allgemeines

Der vorliegende Anhang stellt eine Anleitung zur Herstellung von Extrakten eines polymeren Prüfmateri als zur Verwendung im GPMT zur Verfügung. Die Extrakterstellung wurde ursprünglich in Literaturhinweis [3] beschrieben und zusätzliche Informationen sind in ISO 10993-12:2021, D.2, „Bei der erschöpfenden Extraktion von Medizinprodukten aus Polymeren für die biologische Prüfung zu beachtende Gesichtspunkte“ enthalten.

B.2 Herstellungsverfahren

B.2.1 Vorextraktion

Ein vorausgehendes Extraktionsverfahren wird an dem Prüfmuster zur Bestimmung des geeignetsten Extraktionsprozesses für die Anwendung im GPMT durchgeführt.

Methanol und Aceton sind empfohlene Lösemittel für die Extraktion. Das Prüfmuster wird (wenn möglich) in kleine Stücke geschnitten und in zwei getrennte Kolben gegeben. Das 10- bis 20-fache Volumen (d. h. 10 ml bis 20 ml Lösemittel je Gramm Prüfmuster) von jedem Lösemittel wird in jeden Kolben hinzugefügt und die Kolben werden bei Raumtemperatur zur Extraktion geschüttelt. Die Extraktion durch Schütteln erfolgt dreimal [z. B. für (4 ± 1) h, (8 ± 1) h oder (24 ± 2) h] innerhalb eines Zeitraums von 24 h bis 72 h, wobei jedes Mal das gleiche Volumen an frischem Lösemittel verwendet wird. Der Extrakt von jeder Extraktionsdauer wird gesammelt und gepoolt. Anschließend wird das Lösemittel durch Verdampfen entfernt, um einen Rückstand zu erhalten.

Das geeignetste Lösemittel für die Prüfung wird auf der Grundlage der erhaltenen Masse des Rückstands bestimmt. Die prozentuale Ausbeute des Rückstands sollte bestimmt werden. Das Lösemittel, das zur größten Menge an Rückstand führt, wird als Extraktions-Lösemittel für den Hautsensibilisierungsversuch gewählt.

Die Löslichkeit des Rückstands wird durch Zugabe von Olivenöl, Aceton, Methanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) bestimmt. Die Lösung, die den größten Anteil des Rückstands löst, wird im GPMT als Trägersubstanz für die Prüfung verwendet.

ANMERKUNG Wenn das Prüfmuster in Aceton oder Methanol gelöst oder abgebaut wird oder wenn keine angemessene Menge an Rückstand erhalten werden kann, kann *n*-Hexan oder ein Gemisch aus Cyclohexan und 2-Propanol im Verhältnis 1 : 1 als Extraktionslösemittel verwendet werden.

B.2.2 Endextraktion

B.2.2.1 Allgemeines

Es gibt zwei Verfahren zur Herstellung der Prüflösung aus dem organischen Lösemittlextrakt.

Verfahren 1 ist anwendbar, wenn die Menge des durch Lösemittlextraktion eines Prüfmusters erhaltenen Rückstands und die Masse des Prüfmusters verhältnismäßig groß sind, da hinreichende Mengen an Rückstand erhalten wurden. Außerdem wird Verfahren 1 besonders zur Bewertung des Risikos von Medizinprodukten empfohlen, die mehrmals verwendet werden. Siehe Literaturhinweis [14].

Verfahren 2 ist anwendbar, wenn die Menge des durch Lösemittlextraktion eines Prüfmusters erhaltenen Rückstands oder die Masse des Prüfmusters verhältnismäßig gering ist. Beispiele für Letzteres sind Kontaktlinsen und Intraokularlinsen.

Sowohl beim Verfahren 1 als auch beim Verfahren 2 wird parallel zur Extraktion des Prüfmusters eine Menge an Lösemittel, die gleich dem während der Extraktion des Prüfmusters verwendeten Gesamtvolumen ist, dem gleichen Einengungsverfahren unterzogen wie die Prüfextrakte. Diese Lösemittel-Blindprobe wird bei jeder Phase der Prüfung als Negativkontrolle verwendet.

B.2.2.2 Vorbereitung des Prüfmusters nach Verfahren 1

Beim Verfahren 1 erfolgt die Extraktion, indem das Prüfmuster mit einem 10- bis 20-fachen Volumen des geeigneten Lösemittels (bestimmt im Extraktionsvorversuch) bedeckt und bei Raumtemperatur vermischt (geschüttelt) wird. Das Lösemittel wird in einem anderen Kolben gesammelt. Das Lösemittel wird dreimal gewechselt [z. B. nach einer Extraktionsdauer von (4 ± 1) h, (8 ± 1) h oder (24 ± 2) h] und bei Raumtemperatur innerhalb eines Zeitraums von 24 h bis 72 h, in Abhängigkeit vom Auslaugen und der Stabilität der aus dem Prüfmateriale extrahierten Substanzen, wiederholt geschüttelt.

Durch Verdampfen des gesammelten Lösemittels wird ein Rückstand erhalten. Es wird ein Rotationsverdampfer bei der geringstmöglichen Temperatur angewendet, der ein kontrolliertes Eindampfen bei Unterdruck ermöglicht.

Der Rückstand wird in einer geeigneten Trägersubstanz (Olivenöl/Aceton/Ethanol/DMSO) gelöst, die bei der Prüfung der Löslichkeit im Rahmen des Extraktionsvorversuchs ermittelt wurde, um eine Prüflösung mit einem Massenanteil von 10 % für die intrakutane Induktionsphase und eine Prüflösung mit einem Massenanteil von 20 % für die intrakutane Induktionsphase und die topische Induktionsphase im GPMT herzustellen. Für die Provokationsphase im GPMT wird eine Lösung mit einem Massenanteil von 10 % in der Trägersubstanz hergestellt. Die 10%ige Lösung wird weiter mit der Trägersubstanz verdünnt, um eine 1%ige, 0,1%ige, 0,01%ige und 0,001%ige Prüflösung zu erhalten.

B.2.2.3 Vorbereitung des Prüfmusters nach Verfahren 2

Beim Verfahren 2 erfolgt die Extraktion, indem das Prüfmuster mit einem 10- bis 20-fachen Volumen des geeigneten Lösemittels (wie im Extraktionsvorversuch bestimmt) bedeckt und bei Raumtemperatur für (24 ± 2) h geschüttelt wird. Das Lösemittel wird in einem Kolben gesammelt. Das Extraktionsverfahren wird innerhalb eines Zeitraums von 24 h bis 72 h dreimal wiederholt, wobei jedes Mal das gleiche Volumen an frischem Lösemittel verwendet wird. Die Extrakte werden in einem Kolben gepoolt und das Lösemittel wird verdampft.

Für die intrakutane Induktionsphase werden die erhaltenen Extrakte verdampft, bis die verbliebene Menge des Extrakts in Milliliter gleich der Hälfte der ursprünglichen Menge der verwendeten Probe in Gramm oder etwas geringer ist (d. h., wenn 10 g Prüfmuster extrahiert wurden, dann wird der kombinierte Lösemittel-extrakt auf etwa 5 ml eingedampft) oder das Lösemittel wird vollständig verdampft, um einen Rückstand zu erhalten. Wenn ein Rückstand erhalten wurde, wird dieser in der geeigneten Trägersubstanz (wie im Extraktionsvorversuch bestimmt) gelöst, so dass ein Volumen von 5 ml erhalten wird. Diese Lösung wird als 200%ige Prüflösung angesehen.

Durch Verdünnen der 200%igen Prüflösung mit der Trägersubstanz wird außerdem eine 100%ige Prüflösung hergestellt.

Für die topische Induktionsphase wird die 100%ige Prüflösung verwendet. Sowohl für die intrakutane als auch für die topische Induktionsphase wird die Trägersubstanz in der 200%igen und der 100%igen Prüflösung durch Olivenöl ersetzt, indem die Prüflösung mit einem gleichen Volumen an Olivenöl kombiniert wird und die Trägersubstanz unter einem Stickstoffstrom verdampft wird.

Für die Provokationsphase werden die 100%ige, 50%ige, 25%ige, 12,5%ige und 6,25%ige Prüflösung verwendet. Die 100%ige Prüflösung wird mit der Trägersubstanz verdünnt, um die 50%ige, 25%ige, 12,5%ige und 6,25%ige Prüflösung zu erhalten. Die Trägersubstanz in den Prüflösungen wird bei der Provokationsphase nicht durch Olivenöl ersetzt.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

B.3 Maximierungstest am Meerschweinchen

B.3.1 Allgemeines

Der GPMT sollte nach der Beschreibung in 6.5 durchgeführt werden, mit Ausnahme der Provokationsphase, die nachstehend beschrieben ist. Die Provokationsphase unter Anwendung des Lösemittlextraktionsverfahrens sollte ohne Okklusivverband durchgeführt werden.

B.3.2 Provokationsphase

2 Wochen nach der Applikation der Okklusivläppchen der topischen Induktionsphase werden sämtliche Versuchs- und Kontrolltiere mit dem Prüfmuster provoziert.

Beim Verfahren 1 werden aliquote Anteile von 0,1 ml der 10%igen (% Massenanteil), 1%igen und 0,1%igen Prüflösung topisch auf die rechte Flanke jedes Versuchstiers und Negativkontrolltiers aufgebracht. Zusätzlich werden aliquote Anteile von 0,1 ml der 0,01%igen und 0,001%igen Prüflösung und der Negativkontroll-Trägersubstanz topisch auf die linke Flanke jedes Versuchstiers und Negativkontrolltiers aufgebracht.

Beim Verfahren 2 werden aliquote Anteile von 0,1 ml der 100%igen, 50%igen und 25%igen Prüflösung topisch auf die rechte Flanke jedes Versuchstiers und Negativkontrolltiers aufgebracht. Zusätzlich werden aliquote Anteile von 0,1 ml der 12,5%igen und 6,25%igen Prüflösung und der Negativkontroll-Trägersubstanz topisch auf die linke Flanke jedes Versuchstiers und Negativkontrolltiers aufgebracht.

Sowohl beim Verfahren 1 als auch beim Verfahren 2 werden die Positivkontrolltiere mit einem aliquoten Anteil von 0,1 ml von 0,1%igem DNCB in Ethanol auf der rechten Flanke und von Ethanol auf der linken Flanke behandelt.

ANMERKUNG Die okklusive Provokation kann auf ähnliche Weise erfolgen.

Anhang C (informativ)

Tierversuchsfreie Verfahren der Prüfung auf Hautsensibilisierung

C.1 Einleitung

C.1.1 Hintergrund zu alternativen Verfahren der Prüfung auf Hautsensibilisierung

Die Anstrengungen, die Verwendung von Tieren in Toxizitätsprüfungen zu verringern oder zu ersetzen, haben zur Entwicklung vieler neuer tierversuchsfreier Verfahren geführt. Während sie zur Prüfung von Chemikalien angenommen sind, hat das Interesse an der Anwendung dieser neuen Verfahren zur Beurteilung der Sicherheit von Arzneimitteln und Medizinprodukten in den letzten Jahren zugenommen. Bezüglich der Hautsensibilisierung werden häufig *In-vivo*-Prüfverfahren mit Tieren oder Menschen angewendet, da sie die Beobachtung der nachteiligen Auswirkung (d. h. allergische Kontaktdermatitis) am lebenden Objekt ermöglichen. Da sich jedoch ein besseres Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen des Hautsensibilisierungsprozesses entwickelt hat, wurden tierversuchsfreie Prüfungen zur Beurteilung des Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien oder Materialien entwickelt [57]. Diese Prüfungen können in drei Kategorien eingeteilt werden:

- *In-chemico*-Prüfungen — Studie oder Verfahren, die/das sich auf die intrinsische Reaktivität eines Materials bezieht und eher physikalisch-chemische Messungen als biologische Prüfungen umfasst;
- *In-silico*-Prüfungen — Studie oder Verfahren, die/das unter Verwendung einer Computersimulation durchgeführt wird (wie z. B. ein ComputermodeLL eines Moleküls oder einer Zelle, das genau dessen/deren Verhalten simuliert, oder eine Bewertung einer quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR, en: quantitative structure–activity relationship));
- *In-vitro*-Prüfungen – Studie oder Verfahren, die/das außerhalb eines lebenden Organismus und unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wird (z. B. Zellkulturen in einer Schale).

Bis heute ist keine der validierten Prüfungen in diesen Kategorien in der Lage, das präzise und komplizierte Netzwerk von Mechanismen auf molekularer, zellulärer und Organebene, die in lebenden Organismen wirken, vollständig zu reproduzieren. Folglich ist jede Prüfung, wenn sie einzeln betrachtet wird, nicht in der Lage, die Ereignisse, die die nachteilige Auswirkung auslösen, vollständig zu replizieren. Vielmehr beruht die Vorhersage der Hautsensibilisierungspotenz einer Chemikalie beim Menschen auf mechanistischen Ansätzen, die mehrere einzelne Prüfungen in Versuchsstrategien kombinieren [66],[70].

C.1.2 Adverse outcome pathway der OECD in Bezug auf die Hautsensibilisierung

Die OECD hat die sequentielle Kette von miteinander verbundenen Ereignissen auf molekularer, zellulärer, Gewebe- und Organebene, die zu der hautsensibilisierenden Wirkung führen, beschrieben [5]. Diese Reihe von Ereignissen wurde so strukturiert, dass ein detailliertes und einheitliches Bild des Pfades, der zu der im gesamten Organismus (Tier oder Mensch) beobachteten nachteiligen Auswirkung führt, entwickelt und erzeugt wird. Diese Reihe von Ereignissen wird als AOP bezeichnet. Der AOP verknüpft auf lineare Weise vorhandenes Wissen entlang einer oder mehrerer Reihen von kausal zusammenhängenden Schlüsselvorgängen (KE, en: key event) zwischen zwei Punkten — einem auslösenden molekularen Ereignis (MIE, en: molecular initiating event) und der nachteiligen Auswirkung (AO, en: adverse outcome) [56]. AOP sind das zentrale Element einer toxikologischen Wissensdatenbank, die erstellt wurde, um die Risikobeurteilung von Chemikalien auf der Grundlage mechanistischer Überlegungen zu unterstützen.

Der AOP für die Hautsensibilisierung beginnt nach der Exposition gegenüber und der Absorption einer sensibilisierenden Substanz. Nachdem der Wirkstoff die Hornhaut (Stratum corneum) der Haut durchdrungen hat, findet eine Reihe von Ereignissen auf molekularer, zellulärer und Organebene statt, die zum unerwünschten Endpunkt einer allergischen Kontaktdermatitis oder Kontaktüberempfindlichkeit führen. Die vier Schlüsselvorgänge im AOP für die Hautsensibilisierung sind folgende:

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- Schlüsselvorgang 1 — kovalente Bindung an Hautproteine: das auslösende molekulare Ereignis nach dem Durchdringen des Stratum corneum ist die irreversible Bildung des Hapten-Protein-Komplexes. Im Tier ist dieser Vorgang mit der Erzeugung einer spezifischen Antwort der T-Gedächtniszellen verbunden.
- Schlüsselvorgang 2 — Reaktion von Keratinozyten: dieser Schlüsselvorgang geht mit der Aktivierung von biochemischen Wegen in den Keratinozyten einher und umfasst mit Entzündungsmediatoren verbundene Reaktionen sowie Änderungen der Genexpression in Verbindung mit Zellsignalketten, wie z. B. das antioxidative/elektrophile Reaktionselement (ARE, en: Antioxidant/Electrophile Response Element).
- Schlüsselvorgang 3 — Aktivierung von dendritischen Zellen: die detaillierten biochemischen Ereignisse nach der Bildung des Hapten-Protein-Komplexes sind nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die beteiligten Wege entzündungsbedingt sind, wie z. B. der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg und der Antwortweg bei oxidativem Stress, die insbesondere in Keratinozyten und dendritischen Zellen auftreten. Wirkungen auf zellulärer und Gewebeebene sind ebenfalls nicht vollständig bekannt, umfassen jedoch epidermale Reaktionen, die Folgendes einschließen:
 - 1) Immunerkennung von chemischen Allergenen durch Keratinozyten, spezialisierte epidermale dendritische Zellen (d. h. Langerhans'sche Zellen) und dermale dendritische Zellen;
 - 2) Antworten in Form einer Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, wie z. B. Adhäsions-Molekülen, Chemokinen und Cytokinen, wie z. B. IL-1 β oder IL-12p70, werden üblicherweise als Nachweis der Reifung von dendritischen Zellen angesehen.
- Schlüsselvorgang 4 — T-Zellproliferation: auf der Organebene (Lymphknoten und Haut) die Reaktionen
 - 1) Migration von dendritischen Zellen zum Lymphknoten, wo das Antigen durch Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) an naiven T-Lymphozyten (T-Zellen) präsentiert wird,
 - 2) Differenzierung und Proliferation von T-Zellen als allergenspezifische T-Effektor- und T-Gedächtniszellen.

Die endgültige physiologische Reaktion ist der Erwerb der Empfindlichkeit. Die wichtigste Reaktion des Organismus ist die dermale Entzündung nach der Provokation durch die Substanz in der Auslösephase. Diese Reaktion ist mit der Stimulation spezifischer T-Gedächtniszellen verbunden, die in der Induktionsphase erzeugt werden. Die Gesamtwirkung auf Säugetiere ist eine allergische Kontaktdermatitis beim Menschen oder deren Äquivalent bei Nagetieren – eine Kontaktüberempfindlichkeit [65].

C.1.3 Integrierte Prüfungs- und Bewertungsansätze

IATA sind pragmatische, wissenschaftsbasierte Ansätze zur Charakterisierung chemischer Gefährdungen, die sich auf eine integrierte Analyse vorhandener Informationen in Verbindung mit der Generierung neuer Informationen unter Anwendung von Untersuchungsstrategien stützen. Um das Hautsensibilisierungspotential von Chemikalien beim Menschen vorherzusagen, werden alternative tierversuchsfreie Verfahren entweder in Kombination oder mit vorhandenen relevanten Informationen verwendet, um den biologischen Endpunkt vollständig zu charakterisieren. Der Endpunkt der Sensibilisierung kann durch die Anwendung eines integrierten Ansatzes bestimmt werden, bei dem alle vorhandenen und zuverlässigen Informationen zu einer Chemikalie oder einem Material mit Daten aus biochemischen (*in chemio*), rechnerischen (*in silico*) und/oder zellbasierten (*in vitro*) Verfahren kombiniert werden, um die Toxizität des Materials oder der Chemikalie angemessen vorherzusagen. Manchmal erfordert der integrierte Ansatz möglicherweise die Generierung zusätzlicher Daten unter Anwendung von tierversuchsfreien Ansätzen, um die vollständige Akzeptanz als Prädiktor für einen bestimmten Toxizitätsendpunkt zu erlangen.

Zu Beispielen für *In-vitro*-Versuche zur Hautsensibilisierung gehören KeratinoSensTM, LuSens, U-SENSTM, der Aktivierungstest mit humanen Zelllinien (h-CLAT, en: human Cell Line Activation Test) und der IL-8 Luc Test. Der Direkt-Peptidreaktivitätstest (DPRA, en: direct peptide reactivity assay) ist ein Beispiel für einen *In-chemico*-Versuch zur Hautsensibilisierung. Indes sind QSAR Toolbox und die Plattform Times Metabolism Simulator zur Vorhersage von Hautsensibilisierung (TIMES SS, en: Times Metabolism Simulator

platform used for predicting Skin Sensitization) Beispiele für *In-silico*-Verfahren zur Berechnung der Hautsensibilisierung [56], [67]. Mehrere dieser Verfahren können in einem IATA kombiniert werden, um das Hautsensibilisierungspotential von Chemikalien oder Materialien zu bewerten.

Um die Bewertung von IATA bei der regulatorischen Entscheidungsfindung zu vereinheitlichen, hat die OECD eine Richtlinie entwickelt, um Grundsätze und Vorlagen für die Berichterstattung über definierte Ansätze (DA) und einzelne Informationsquellen bereitzustellen [57], [67]. Ein DA besteht aus einem festen Verfahren zur Auswertung der Daten (DIP, en: data interpretation procedure), das auf Daten angewendet wird, die mit einem festgelegten Satz von Informationsquellen erzeugt wurden, um ein Ergebnis abzuleiten, das entweder allein oder zusammen mit anderen Informationsquellen innerhalb eines IATA verwendet werden kann, um eine bestimmte regulatorische Anforderung zu erfüllen.

Um die behördliche Anerkennung von IATA hinsichtlich des Hautsensibilisierungspotentials zu erhalten, umfassen integrierte Ansätze definierte Ansätze (DA), bei denen für jeden DA die in Kombination zu verwendenden relevanten Informationen und spezifischen tierversuchsfreien Verfahren klar abgegrenzt sind und ein Verfahren zur Auswertung der Daten aus diesen bestimmten Verfahren bereitgestellt wird. Somit sind DA regelbasierte Strategien, die ein Sachverständigenurteil überflüssig machen, sobald ein spezifischer Ansatz beschrieben, validiert, festgesetzt und anerkannt wurde [61].

Im OECD-Richtliniendokument 256:2017, Anhang I [124] (siehe Tabelle C.1) sind 12 veranschaulichende Fallstudien von DA hinsichtlich der Hautsensibilisierung dargestellt. Einige von ihnen werden derzeit von der OECD für eine künftige Prüfrichtlinie „Defined Approaches for Skin Sensitization“ (Definierte Ansätze hinsichtlich der Hautsensibilisierung) in Betracht gezogen.

Tabelle C.1 — Fallstudien des OECD-Richtliniendokuments 256:2017, Anhang I [124]

Fallstudie		Zweck
I	An adverse outcome pathway-based “2 out of 3” integrated testing strategy approach to skin hazard identification (BASF)	Feststellung einer Gefährdung
II	Sequential testing strategy (STS) for hazard identification of skin sensitizers (RIVM)	Feststellung einer Gefährdung
III	A non-testing Pipeline approach for skin sensitization (G. Patlewicz)	Feststellung einer Gefährdung
IV	Stacking meta-model for skin sensitization hazard identification (L'Oréal)	Feststellung einer Gefährdung
V	Integrated decision strategy for skin sensitization hazard (ICCVAM)	Feststellung einer Gefährdung
VI	Consensus of classification trees for skin sensitization hazard prediction (EC- JRC)	Feststellung einer Gefährdung
VII	Sensitizer potency prediction based on Key event 1 + 2: Combination of kinetic peptide reactivity data and KeratinoSens® data (Givaudan)	Vorhersage der Potenz
VIII	The artificial neural network model for predicting LLNA EC3 (Shiseido)	Vorhersage der Potenz
IX	Bayesian network DIP (BN-ITS-3) for hazard and potency identification of skin sensitizers (P&G)	Vorhersage der Potenz
X	STS for sensitizing potency classification based on in chemico and <i>in vitro</i> data (Kao Corporation)	Vorhersage der Potenz
XI	Integrated testing strategy (ITS) for sensitizing potency classification based on in silico, in chemico, and <i>in vitro</i> data (Kao Corporation)	Vorhersage der Potenz
XII	DIP for skin allergy risk assessment (SARA) (Unilever)	Vorhersage der Potenz

C.2 *In-vitro*-Versuche für die Prüfung auf Hautsensibilisierung

C.2.1 Allgemeines

C.2 enthält Zusammenfassungen von *In-vitro*-Versuchen zur Hautsensibilisierung, die in neuste Berichte und internationale Bewertungsstudien aufgenommen wurden [58], [59], [65], [68].

C.2.2 Prüfverfahren

C.2.2.1 DPRA

Der DPRA ist ein *in-chemico*-Verfahren, bei dem die Reaktivität einer Prüfchemikalie durch deren Abreicherung von synthetischen cystein- oder lysinhaltigen Peptiden quantitativ bestimmt wird. Die prozentualen Abreicherungswerte werden berechnet und mit einem Vorhersagemodell wird die Chemikalie als sensibilisierende oder nicht hautsensibilisierende Substanz eingestuft. Siehe Tabelle C.2.

Tabelle C.2 — DPRA

Schlüsselvorgang 1: Auslösendes molekulares Ereignis in Form einer kovalenten Proteinbindung	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442C [75]
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 80 %, Empfindlichkeit 80 %, Spezifität 77 %
Versuchssystem	Die in einem synthetischen Peptid verbleibende Konzentration von Cystein oder Lysin wird nach einer Inkubation mit der Prüfchemikalie für 24 h bei 22,5 °C bis 30 °C bestimmt. Zur Unterstützung des Nachweises enthalten die synthetischen Peptide Phenylalanin. Die Peptidkonzentrationen werden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Gradientenelution und UV-Detektion bei 220 nm gemessen.
Kurzbeschreibung der Prüfung	Die prozentualen Peptid-Abreicherungswerte für Cystein und Lysin werden bestimmt und in einem Vorhersagemodell eingesetzt, das die Prüfchemikalie einer von vier Reaktivitätsklassen zuordnet, wodurch diese als sensibilisierende oder nicht hautsensibilisierende Substanzen eingestuft wird.
Ausgabe	Die relativen Peptidkonzentrationen werden mittels HPLC und Detektion bei 220 nm gemessen.
Expositionszeit	24 h
Anwendbarkeit	Nicht anwendbar zur Prüfung von Metallverbindungen, da diese möglicherweise über andere Mechanismen als die kovalente Bindung mit Proteinen reagieren. Die Prüfchemikalie muss in einem geeigneten Lösemittel in einer Konzentration von 100 mM vollständig gelöst sein. Die Prüfung von Mischungen ist möglich, wenn deren Bestandteile bekannt sind.
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. DPRA funktioniert mit Acetonitril, Wasser, Isopropanol und Aceton. Er funktioniert jedoch möglicherweise nicht mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl. Da im Versuch einen Überschuss an Chemikalie im Vergleich zu den im Versuch verwendeten Peptiden eingesetzt wird, ist es unwahrscheinlich, dass der Versuch zum Nachweis von hautsensibilisierenden Substanzen in Extrakten von Medizinprodukten geeignet ist.
Siehe Literaturhinweise [74] bis [76].	

C.2.2.2 KeratinoSens™²

Im KeratinoSens™-Test wird eine immortalisierte, adhären te Zelllinie aus menschlichen Keratinozyten verwendet, die ein Luciferase-Reportergen enthält, das durch das antioxidative Reaktionselement (ARE, en: antioxidant response element) des menschlichen AKR1C2-Gens kontrolliert wird, von dem bekannt ist, dass es durch hautsensibilisierende Substanzen hochreguliert wird. Siehe Tabelle C.3.

Tabelle C.3 — KeratinoSens™

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442D [79]
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 77 %, Empfindlichkeit 78 %, Spezifität 79 %
Versuchssystem	Transgene KeratinoSens™-Zelllinie: immortalisierte, adhären te Zelllinie, abgeleitet aus menschlichen Keratinozyten, die stabil ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des ARE des menschlichen AKR1C2-Gens aufweisen
Kurzbeschreibung der Prüfung	Die KeratinoSens™-Zelllinie enthält das Luciferase-Gen unter der Transkriptionskontrolle eines konstitutiven Promotors, verschmolzen mit dem ARE. Das Luciferase-Signal zeigt die Aktivierung der endogenen Nrf2-abhängigen Gene durch elektrophile hautsensibilisierende Substanzen an. Die Induktion des Luciferase-Gens wird quantitativ durch Messung der durch lichterzeugenden Luciferase-Substrate erzeugten Lumineszenz bestimmt. Prüfchemikalien werden als hautsensibilisierende Substanzen angesehen, wenn sie eine statistisch signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität (d. h. einen Anstieg um 50 %) induzieren, und zwar unterhalb einer Konzentration, die keine signifikante Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen bewirkt.
Ausgabe	Quantitative Messung (durch Lumineszenzdetektion) der Induktion des Luciferase-Genes
Expositionszeit	48 h
Anwendbarkeit	Der KeratinoSens™-Test ist auf Prüfchemikalien anwendbar, die eine Vielzahl an organischen funktionellen Gruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzen und physikalisch-chemischen Eigenschaften umfassen. Außerdem gilt der Test für lösliche Chemikalien oder solche Chemikalien, die stabile Dispersionen (d. h. Suspensionen oder Kolloide) im Expositionsmedium bilden.
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. KeratinoSens™ funktioniert mit DMSO und wässrigen Lösemitteln, jedoch möglicherweise nicht mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, weil deren log P-Werte 15,0 überschreiten.
Siehe Literaturhinweise [77] bis [80].	

2 KeratinoSens ist das Warenzeichen des Produkts, geliefert von Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kempthal. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04
EN ISO 10993-10:2023 (D)

C.2.2.3 LuSens

Im LuSens-Test wird eine immortalisierte Zelllinie aus menschlichen Keratinozyten verwendet, die ein Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des antioxidativen Reaktionselements (ARE) des Gens Chinon-Oxireduktase 1 (NQO1) von Ratten enthält, von dem bekannt ist, dass es durch hautsensibilisierende Substanzen hochreguliert wird. Siehe Tabelle C.4.

Tabelle C.4 — LuSens

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442D
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 74 %, Empfindlichkeit 74 %, Spezifität 74 %
Versuchssystem	Transgene LuSens-Zelllinie: immortalisierte, adhärente Zelllinie, abgeleitet aus menschlichen Keratinozyten, die stabil ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des ARE des NQO1-Gens aus Ratten aufweisen.
Kurzbeschreibung der Prüfung	Die transgene LuSens-Zelllinie enthält ein Luciferase-Reportergen unter der Transkriptionskontrolle eines Promotors, verschmolzen mit dem ARE. Das Luciferase-Signal spiegelt die Aktivierung von endogenen Nrf2-abhängigen Genen durch elektrophile Substanzen wider. Die Induktion des Luciferase-Gens wird quantitativ durch Lumineszenzmessung der lichterzeugenden Luciferase-Substrate bestimmt, als ein Indikator der Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 in Zellen nach der Exposition gegenüber elektrophilen hautsensibilisierenden Substanzen.
Ausgabe	Quantitative Messung (durch Lumineszenzdetektion) der Induktion des Luciferase-Genes
Expositionszeit	48 h
Anwendbarkeit	Der LuSens-Test ist auf Prüfchemikalien anwendbar, die eine Vielzahl an organischen funktionellen Gruppen, Reaktionsmechanismen, Hautsensibilisierungspotenzen und physikalisch-chemischen Eigenschaften umfassen. Außerdem gilt der Test für lösliche Chemikalien oder solche Chemikalien, die stabile Dispersionen (d. h. Suspensionen oder Kolloide) im Expositionsmedium bilden.
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. LuSens funktioniert mit DMSO und wässrigen Lösemitteln, jedoch möglicherweise nicht mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, weil deren log P-Werte 15,0 überschreiten.
Siehe Literaturhinweise [81] bis [84].	

C.2.2.4 SENS-IS

Der SENS-IS-Test ist ein *In-vitro*-Modell, das für Chemikalien und Mischungen entwickelt wurde und mit dem KE2 durch Beurteilung von Genexpressionsprofilen in Modellen der menschlichen Haut (Episkin® RhE oder SkinEthic™ RHE³) gemessen wird. SENS-IS ermöglicht die Einstufung von hautsensibilisierenden Substanzen in Potenzklassifizierung [84]. Der SENS-IS-Test wurde in einer von der Industrie geführten Studie [86], [87] validiert und wird derzeit vom EURL-ECVAM bewertet. Siehe Tabelle C.5.

3 Episkin® RhE und SkinEthic™ RHE (EPISKIN) sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.

Tabelle C.5 — SENS-IS

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	Projekt 4.107: Neue TG: „Toxicogenomic analysis on 3D reconstituted epidermis for measuring skin sensitization potency – the SENS-IS assay“.
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 96,6 %, Empfindlichkeit 97,7 %, Spezifität 95,2 % [86], [87]
Versuchssystem	Modelle rekonstruierter humaner Epidermis (RhE) Episkin® RhE oder SkinEthic™ RHE (EPISKIN).
Kurzbeschreibung der Prüfung	Die Genexpression von zwei Gruppen von Genen wird gemessen: eine Gruppe (REDOX-Gruppe) umfasst eine Auswahl von 17 Genen, die ein antioxidatives Reaktionselement in ihrem Promotor haben und die Redox-Schutzsignale überwachen, die durch die Wechselwirkung von hautsensibilisierenden Substanzen, die an cysteinhaltige Aminosäuren des Keap1-NRF2-Komplexes binden, induziert werden [89]. Die zweite Gruppe (SENS-IS-Gruppe) umfasst eine Auswahl von 21 Genen, die an Entzündung, Warnsignalen und Zellmigration beteiligt sind, um die komplexe Kaskade von Ereignissen zu behandeln, die zur Aktivierung von DC durch eine sensibilisierende Chemikalie führt.
Ausgabe	Quantitative Analyse der Expression von 64 Genen, gemessen durch quantitative Umkehrtranskriptions-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).
Expositionszeit	15 min Exposition; die Gewebe werden anschließend gespült und 6 h weiter inkubiert
Anwendbarkeit	Im SENS-IS-Test werden 3D-RhE-Gewebe verwendet, um besser den Schritt der Durchdringung der Haut von Produkten mit unterschiedlicher Löslichkeit oder unterschiedlichem physikalischem Zustand zu berücksichtigen. Mit SENS-IS können nicht nur reine Chemikalien quantitativ bestimmt werden, sondern auch natürliche Produkte, Mischungen und Endprodukte [90], [91].
Anwendung auf Medizinprodukte	Der SENS-IS-Test funktioniert mit polaren (Kochsalzlösung) und unpolaren (Sesamöl) Extraktionsflüssigkeiten und kann möglicherweise zur Prüfung von Extraktionsträgersubstanzen für Medizinprodukte eingesetzt werden. In einer Machbarkeitsstudie (Proof-of-Concept-Studie) zur Bewertung der Hautsensibilisierung in Bezug auf Extrakte von Medizinprodukten wurden fünf bekannte, in Silikon medizinischer Reinheit eingeschlossene sensibilisierende Substanzen und Negativkontrollen analysiert. Alle Prüfgegenstände wurden in einem polaren (Kochsalzlösung) und unpolaren (Sesamöl) Lösemittel extrahiert und richtig als sensibilisierende bzw. nicht sensibilisierende Substanzen identifiziert [88].
Siehe Literaturhinweise [85] bis [91].	

C.2.2.5 IL-18-RhE-Test

Zur Bewertung der Hautsensibilisierung durch Messung der basalen Freisetzung von IL-18 nach Aufbringen einer Chemikalie auf die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche der RhE, siehe Tabelle C.6.

Tabelle C.6 — IL-18-RhE-Test

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	Derzeit keine
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Geprüft an einem begrenzten Satz (< 10) von Verbindungen für die verschiedenen Modelle. Andres et al. [92] berechneten die Leistung an einem Satz von 19 Chemikalien. In der Arbeit werden fünf Vorhersagemodelle diskutiert, die unterschiedliche Leistungsfähigkeiten ergeben.
Versuchssystem	Modelle rekonstruierter humaner Epidermis SkinEthic™ RHE (EPISKIN), VUmc-EE, EpiCS® ^a (CellSystems) und EpiDerm™ (MatTek Corp.) ^b [92] [93] [94] [95]
Kurzbeschreibung der Prüfung	Am Ende der chemischen Exposition werden die Epidermen der Prüfung der Lebensfähigkeit der Zellen unterzogen und die Erhaltungsmedien wurden für die IL-18-ELISA-Prüfung aufgearbeitet.
Ausgabe	Quantitative Bestimmung von IL-18 durch ELISA im Kulturmedium der RhE; parallel wird die Lebensfähigkeit der Zellen durch den MTT-Versuch gemessen.
Expositionszeit	24 h
Anwendbarkeit	Der Test ist bei der Prüfung von löslichen Kontaktallergenen und kationischen Metallen hinsichtlich des Sensibilisierungspotentials anwendbar [94].
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. Da in diesem Test RhE-Gewebe verwendet werden, könnte er möglicherweise mit polaren und unpolaren Extrakten von Medizinprodukten funktionieren.
^a VUmc-EE, EpiCS® (CellSystems) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. ^b EpiDerm™ EPI-200 (MatTek Corp.) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.	

C.2.2.6 EpiSensa⁴

Im Versuch zur epidermalen Sensibilisierung (Epidermal Sensitization Assay) „EpiSensa“ werden RhE-Gewebemodelle verwendet. Der Versuch beruht auf der Induktion von Markergenen, die mit Reaktionen von Keratinozyten auf Entzündung und Zytoprotektion (Zellschutz) bei der Auslösung einer Hautsensibilisierung zusammenhängen. Siehe Tabelle C.7.

Tabelle C.7 — EpiSensa

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	Derzeit keine
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 90 %, Empfindlichkeit 94 %, Spezifität 78 % [96]
Versuchssystem	Modelle rekonstituierter menschlicher Epidermis, LabCyte EPI-MODEL 24 (Japanese Tissue Engineering Co., Ltd.) ^a und Epiderm™ EPI-200 (MatTek Corp.)

4 EpiSensa ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

Tabelle C.7 (fortgesetzt)

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
Kurzbeschreibung der Prüfung	Dieser Versuch beruht auf der Induktion von mehreren Markergenen (ATF3, IL-8, DNAJB4 und GCLM), die mit zwei Reaktionen von Keratinozyten (entzündliche oder zellschützende) bei der Auslösung einer Hautsensibilisierung zusammenhängen. Die mechanistische Relevanz der Markergene wurde durch das Konzentrieren auf Schlüsselmoleküle, die die Reaktionen von Keratinozyten <i>in vitro</i> regulieren (P2X ₇ für entzündliche und Nrf2 für zellschützende Reaktionen), bestätigt. Das durch 2,4-Dinitrochlorbenzen in menschlichen Keratinozyten induzierte Hochregulieren von ATF3 und IL-8 oder DNAJB4 und GCLM wird durch einen P2X ₇ -spezifischen Antagonisten KN-62 bzw. durch Nrf2 siRNA signifikant unterdrückt, was die mechanistische Relevanz der Markergene unterstützt.
Ausgabe	Quantitative Analyse der Expression von vier Markergenen, gemessen durch quantitative Umkehrtranskriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).
Expositionszeit	6 h Exposition
Anwendbarkeit	EpiSensa kann eine mechanismenbasierte Sensibilisierungsprüfung sein, die auf ein breites Spektrum von Chemikalien anwendbar ist, einschließlich lipophiler Chemikalien und Prä-/Prohaptenen [97].
Anwendung auf Medizinprodukte	Keine Daten. Da in diesem Test RhE-Gewebe verwendet werden, könnte er möglicherweise mit polaren und unpolaren Extrakten von Medizinprodukten funktionieren.
^a LabCyte EPI-MODEL 24 (Japanese Tissue Engineering Co., Ltd.) ist ein Beispiel für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.	

C.2.2.7 SenCeeTox^{®5}

Beim SenCeeTox[®]-Test wird die Expression von 11 mit der Hautsensibilisierung zusammenhängenden Genen in Keratinozyten von 3D-RhE-Geweben gemessen. Erhöhte Genexpression plus Reaktivität und Zytotoxizität bestimmen das Hautsensibilisierungspotential. Siehe Tabelle C.8.

Tabelle C.8 — SenCeeTox[®]

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
OECD-Richtlinie	Derzeit keine
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 84 %, Empfindlichkeit 81 %, Spezifität 92 % [99]
Versuchssystem	Versuche mit rekonstruierter humaner Epidermis EpiDerm TM EPI-200 (MatTek Corp.) und SkinEthic TM RhE (EPISKIN)
Kurzbeschreibung der Prüfung	Die Expression von acht Nrf2/ARE-, einem AhR/XRE- und zwei Nrf1/MRE-kontrollierten Genen wird durch quantitative Umkehrtranskriptions-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) gemessen. Die x-fache Induktion bei jeder Expositionskonzentration wird mit Daten zur Reaktivität und Zytotoxizität kombiniert, um das Sensibilisierungspotential zu bestimmen.

5 SenCeeTox[®] sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch ISO.

Tabelle C.8 (fortgesetzt)

Schlüsselvorgang 2: Aktivierung von epidermalen Keratinozyten	
Ausgabe	Quantitative Analyse der Expression von 11 Genen, gemessen durch qRT-PCR. Chemische Reaktivität und zytotoxisches Potential werden ebenfalls bestimmt. Die Ergebnisse dieser einzelnen Versuche werden unter Anwendung eines Algorithmus analysiert, der sämtliche Daten von allen Versuchen zur Vorhersage des Hautsensibilisierungspotentials einbezieht.
Expositionszeit	24 h
Anwendbarkeit	Der SenCeeTox-Test darf angewendet werden, um sowohl chemische als auch metallische hautsensibilisierende Substanzen unterschiedlicher Potenz zu bewerten [98].
Anwendung auf Medizinprodukte	Der SenCeeTox-Test funktioniert mit polaren (Kochsalzlösung) und unpolaren (Sesamöl) Extraktionsflüssigkeiten und kann möglicherweise zur Prüfung von Extrakten von Medizinprodukten eingesetzt werden. In den Literaturhinweisen [98] und [100] wurde berichtet, dass der SenCeeTox®-Test in der Lage war, Lösungen bestimmter, medizinproduktbezogener chemischer und metallischer hautsensibilisierender Substanzen oder hautsensibilisierender Substanzen, die unter Verwendung polarer und unpolarer Lösemittel, wie z. B. Kochsalzlösung und Sesamöl, aus Silikon medizinischer Reinheit extrahiert wurden, genau zu identifizieren.

C.2.2.8 h-CLAT

Im h-CLAT werden die Änderungen der Expression von Zelloberflächenmarkern in Zusammenhang mit dem Prozess der Aktivierung von Monozyten und dendritischen Zellen nach Exposition gegenüber hautsensibilisierenden Substanzen quantitativ bestimmt. Die Expressionswerte der Oberflächenmarker werden zur Identifizierung von sensibilisierenden und nicht sensibilisierenden Substanzen verwendet. Siehe Tabelle C.9.

Tabelle C.9 — h-CLAT

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442E
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 85 %, Empfindlichkeit 93 %, Spezifität 66 %
Versuchssystem	hCLAT-Zelllinie: humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1
Kurzbeschreibung der Prüfung	Beim h-CLAT-Test werden die Änderungen der Expression der Zelloberflächenmarker CD86 und CD54 auf THP-1-Zellen nach einer 24-stündigen Exposition gegenüber der Prüfchemikalie gemessen. Diese Oberflächenmoleküle sind typische Marker für die Aktivierung der monozytischen THP-1 und können die Aktivierung dendritischer Zellen nachahmen, die eine wichtige Rolle beim T-Zellen-Priming spielt. Die Änderungen der Expression von Oberflächenmarkern werden mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie gemessen. Die relative Fluoreszenz der Oberflächenmarker im Vergleich zu den Kontroll-Trägersubstanzen wird bestimmt und verwendet, um zwischen hautsensibilisierenden und nicht sensibilisierenden Substanzen zu unterscheiden [104].

Tabelle C.9 (fortgesetzt)

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
Ausgabe	Expressionswerte der Zelloberflächenmarker CD86 und CD54, gemessen mittels Durchflusszytometrie nach der Zellfärbung mit mit Fluorochrom markierten Antikörpern.
Expositionszeit	24 h Exposition
Anwendbarkeit	Der h-CLAT-Test ist anwendbar auf Prüfchemikalien, die in einem geeigneten Lösemittel löslich sind oder die eine stabile Dispersion in einer geeigneten Trägersubstanz bilden. Prüfchemikalien mit log P-Werten von mehr als 3,5 neigen dazu, zu falsch negativen Ergebnissen zu führen [104], [105].
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. Der h-CLAT funktioniert mit Kochsalzlösung und DMSO als Lösemittel, jedoch wahrscheinlich nicht mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, weil deren log P-Werte 15,0 überschreiten.

C.2.2.9 U-SENS^{TM6}

Das Verfahren des U937-Aktivierungstests mit Zelllinien (U-SENSTM) ist ein *In-vitro*-Versuch, bei dem die Änderungen der Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 mittels Durchflusszytometrie an einer humanen histiozytären Lymphom-Zelllinie, U937-Zellen, quantitativ bestimmt werden. Siehe Tabelle C.10.

Tabelle C.10 — U-SENSTM

U-SENS TM — Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442E
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 86 %, Empfindlichkeit 91 %, Spezifität 65 %
Versuchssystem	U-SENS TM -Zelllinie: U937, humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie
Kurzbeschreibung der Prüfung	CD86 ist dafür bekannt, ein costimulierendes Molekül zu sein, das eine monozytische Aktivierung nachahmen kann, die eine entscheidende Rolle beim T-Zellen-Priming spielt. Die Änderungen der Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 werden mittels Durchflusszytometrie nach einer Zellfärbung, üblicherweise mit mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierten Antikörpern, gemessen. Gleichzeitig wird auch eine Zytotoxizitätsmessung durchgeführt (z. B. durch die Verwendung von PI), um zu beurteilen, ob die Hochregulierung der Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 unterhalb zytotoxischer Konzentrationen auftritt. Der Stimulationsindex (SI) des Zelloberflächenmarkers CD86 im Vergleich zur Lösemittel-/Trägersubstanzkontrolle wird berechnet und im Vorhersagemodell verwendet, um die Unterscheidung zwischen hautsensibilisierenden und nicht sensibilisierenden Substanzen zu unterstützen. [104]

6 U-SENS ist das Warenzeichen des Produkts, geliefert von L'Oréal, 41 rue Marthe, Clichy, 92110. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

DIN EN ISO 10993-10:2023-04
EN ISO 10993-10:2023 (D)

Tabelle C.10 (fortgesetzt)

U-SENS™ — Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
Ausgabe	Die Änderungen der Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 werden mittels Durchflusszytometrie nach einer Zellfärbung, üblicherweise mit mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierten Antikörpern, gemessen.
Expositionszeit	(45 ± 3) h Exposition
Anwendbarkeit	Anwendbar auf Prüfchemikalien, die löslich sind oder eine stabile Dispersion (d. h. ein Kolloid oder eine Suspension, in denen die Prüfchemikalie sich nicht absetzt oder von dem Lösemittel/der Trägersubstanz in verschiedene Phasen trennt) in einem geeigneten Lösemittel/einer geeigneten Trägersubstanz bilden [104].
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. Der U-SENS funktioniert mit Kochsalzlösung und DMSO als Lösemittel, jedoch wahrscheinlich nicht mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, weil deren log P-Werte 15,0 überschreiten.

C.2.2.10 IL-8-Luc-Test

Bei dem Interleukin-8-Reportergen-Test (IL-8-Luc-Test) wird eine von THP-1 abgeleiteten IL-8-Reporter-Zelllinie (THP-G8-Zellen) verwendet, die die quantitative Messung der Induktion des Luciferase-Gens durch Lumineszenzerkennung unter Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des IL-8 und GAPDH in Zellen nach Exposition gegenüber hautsensibilisierenden Chemikalien ermöglicht. Siehe Tabelle C.11.

Tabelle C.11 — IL-8-Luc-Test

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
OECD-Richtlinie	OECD TG 442E
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 86 %, Empfindlichkeit 96 %, Spezifität 41 %
Versuchssystem	IL-8-Luc-Zelllinie: von THP-1 abgeleitete IL-8-Reporter-Zelllinie (THP-G8)
Kurzbeschreibung der Prüfung	Der IL-8-Luc-Test nutzt eine von THP-1 abgeleitete IL-8-Reporter-Zelllinie, THP-G8, die die Luciferase-Gene „stable luciferase orange (SLO)“ und „stable luciferase red (SLR)“ unter der Kontrolle der IL-8- bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Promotoren beherbergt (1). Das ermöglicht die quantitative Messung der Luciferase-Geninduktion durch Lumineszenzerkennung unter Verwendung von bekannten lichterzeugenden Luciferase-Substraten als Indikator für die Aktivität des IL-8 und GAPDH in Zellen nach Exposition gegenüber hautsensibilisierenden Chemikalien [104].
Ausgabe	Änderungen der Expression von IL-8, einem mit der Aktivierung von dendritischen Zellen verbundenen Zytokin
Expositionszeit	16 h Exposition

Tabelle C.11 (fortgesetzt)

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von epidermalen dendritischen Zellen	
Anwendbarkeit	Obwohl der IL-8-Luc-Test X-VIVO™ 15 als Lösemittel verwendet, bewertete er Chemikalien mit einem <i>n</i> -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{ow} > 3,5$ und diejenigen mit einer Wasserlöslichkeit von etwa 100 µg/ml korrekt. Negative Ergebnisse für Prüfchemikalien, die nicht bei 20 mg/ml gelöst werden, können jedoch zu falsch negativen Ergebnissen führen, da diese nicht in X-VIVO™ 15 löslich sind. Deshalb sollten negative Ergebnisse für diese Chemikalien nicht berücksichtigt werden. Bei der Validierungsstudie wurde eine hohe Falsch-Negativ-Rate für Anhydride festgestellt. Darüber hinaus können Prohaptene (Substanzen, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern) und Prähaptene (Stoffe, die durch Luftoxidation aktiviert werden) aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselfähigkeit der Zelllinie (8) und der Versuchsbedingungen zu falsch negativen Ergebnissen führen. Der IL-8-Luc-Test kann Chemikalien als sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanzen einstufen, ermöglicht derzeit jedoch keine Potenzbewertungen [105].
Anwendung auf Medizinprodukte	Es liegen keine Daten vor. Das X-VIVO™ 15-Kulturmedium, DMSO oder Wasser wird als Lösemittel verwendet, um die Prüfchemikalien zu lösen. Es ist nicht bekannt, ob der Test mit unpolaren Lösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, funktioniert.

C.2.2.11 Genomic allergen rapid detection™⁷ (Genomischer Allergen-Schnellnachweis)

Genomic allergen rapid detection™ (GARD™) ist ein zellbasierter Versuch, der die angeborene Erkennung von Fremdsubstanzen durch dendritische Zellen nutzt, gemessen durch multivariates Auslesen von genomischen Biomarkern. Nach der Zellstimulation werden die Chemikalien auf der Grundlage der induzierten Transkriptionsprofile als Hautsensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanzen eingestuft. Siehe Tabelle C.12. Der GARD-Assay wurde in einer von der Industrie durchgeführten Studie [118] validiert und wird derzeit von EURL-ECVAM evaluiert; der ESAC hat eine positive wissenschaftliche Stellungnahme zu GARD™ skin abgegeben.

Tabelle C.12 — GARD™

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von dendritischen Zellen	
OECD-Richtlinie	Projekt 4.106: Neue TG: GARD™skin-Test: Ein <i>In-vitro</i> -Verfahren zur Identifizierung von hautsensibilisierenden Substanzen auf der Grundlage einer genomischen Auswertung der Auswirkung von Chemikalien auf Zellen, die menschlichen dendritischen Zellen ähnlich sind (AOP-Schlüsselvorgang 3) [121].
Leistungsverhalten (Ja/Nein-Antwort)	Genauigkeit 94 %, Empfindlichkeit 93 %, Spezifität 96 % [118] ANMERKUNG Der GARD™skin-Versuch kann mit GARD™potency ergänzt werden, um eine Einstufung als schwach oder stark sensibilisierende Substanz nach der EU-Verordnung über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (CLP) zu erhalten.

7 GARD ist das Warenzeichen des Produkts, geliefert von SenzaGen AB, Medicon Village (406), 22381 Lund, Schweden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Tabelle C.12 (fortgesetzt)

Schlüsselvorgang 3: Aktivierung von dendritischen Zellen	
Versuchssystem	Die GARD™skin-Zelllinie, SenzaCells™ (SenzaGen), stammt aus dem menschlichen Knochenmark und weist ähnliche Eigenschaften wie dendritische Zellen auf.
Kurzbeschreibung der Prüfung	GARD™skin misst die Genexpression von 200 Genen, die in SenzaCells™ als Reaktion auf eine chemische Exposition induziert werden. Die 200 Gene, die als GARD-Vorhersagesignatur (GPS, en: GARD prediction signature) bezeichnet werden, umfassen Biomarker für die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen (KE3), mehrere Warnsignalwege und Mustererkennungsrezeptoren (KE2) sowie Antigen-präsentierende Moleküle und Zellproliferationswege (KE4) [116], [117].
Ausgabe	Die GPS umfasst mechanistisch relevante Gene, die am Sensibilisierungsprozess beteiligt sind, z. B. die Hochregulierung von costimulierenden Molekülen und die Induktion von zellulärem und oxidativem Stress [115]. Die Genexpression der 200 Gene in der GPS wird unter Anwendung eines Nanostring®a-Analysesystems gemessen. Die sich ergebende Genexpression wird durch Mustererkennung unter Anwendung eines maschinellen Lernalgorithmus analysiert, der auf einem festen Satz von Referenzproben beruht [114]. Jede Probe wird als hautsensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz eingestuft, ohne dass ein subjektives Urteil erforderlich ist.
Expositionszeit	24 h Exposition
Anwendbarkeit	GARD™skin ist vielfältig anwendbar über einen breiten chemischen Strukturraum (chemical space), der eine Vielzahl von organischen funktionellen Gruppen und Endanwendungen umfasst, einschließlich Prä-/Prohaptenen und Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit [113], [116].
Anwendung auf Medizinprodukte	Der GARD™-Versuch funktioniert mit polaren (Kochsalzlösung) und unpolaren (Sesamöl und Olivenöl) Extraktionsträgersubstanzen und kann möglicherweise zur Prüfung von Extrakten von Medizinprodukten eingesetzt werden. In einer Machbarkeitsstudie (Proof-of-Concept-Studie) zur Bewertung der Hautsensibilisierung in Bezug auf Extrakte von Medizinprodukten wurden vier bekannte, in Silikon und Polyurethan medizinischer Reinheit eingeschlossene hautsensibilisierende Substanzen und Negativkontrollen analysiert. Alle Prüfgegenstände wurden in einem polaren (Kochsalzlösung) und unpolaren (Öl) Lösemittel extrahiert und richtig als sensibilisierende bzw. nicht sensibilisierende Substanzen identifiziert [119].
a Nanostring® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO oder IEC.	

C.3 Diskussion

C.3.1 Von der OECD validierte Tests

Die sechs von der OECD 442-Prüfrichtlinie validierten *In-vitro*-Versuche zur Identifizierung chemischer hautsensibilisierender Substanzen [75], [79], [104], die die Schlüsselvorgänge 1, 2 und 3 behandeln, scheinen einen potentiellen Nutzen für den Nachweis chemischer sensibilisierender Substanzen in Extrakten von Medizinprodukten zu haben. Das sind der DPRA, KeratinoSens™, LuSens, h-CLAT, U-SENS™, und IL-8 Luc -Test. Da DPRA jedoch einen Überschuss der Chemikalien zum Nachweis der Peptidreaktivität nutzt, kann dieser möglicherweise nicht in der Lage sein, geringe Mengen an sensibilisierenden Substanzen in verdünnten Extrakten von

Medizinprodukten zu identifizieren. Diese Versuche wurden mit reinen Prüfsubstanzen und nicht mit chemischen Mischungen validiert. Aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselfähigkeit der Zelllinien in einigen *In-vitro*-Versuchen können Prohaptene (d. h. Substanzen, die eine enzymatische Aktivierung erfordern, z. B. über P450-Enzyme) auch zu falsch negativen Ergebnissen führen [82], [104]. Letztendlich reichen diese Prüfverfahren, die in Bezug auf einen bestimmten Schlüsselvorgang entwickelt wurden, möglicherweise allein nicht aus, um allein auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien zu schließen, und sollten im Rahmen integrierter Ansätze, wie z. B. IATA, betrachtet werden, wobei diese mit anderen ergänzenden Informationen kombiniert werden.

Unter Berücksichtigung des spezifischen Kontexts von Biokompatibilitätsprüfungen für Medizinprodukte, die zur Bewertung von Endprodukten oder Materialien entweder wie sie sind oder nach der Extraktion in polaren und unpolaren Lösemitteln verwendet werden, muss die Anwendbarkeit der OECD-Versuche bestätigt werden. Viele von ihnen weisen möglicherweise bestimmte Einschränkungen bei unpolaren Extraktionslösemitteln von Medizinprodukten, wie z. B. Sesam-, Baumwollsaat- oder Olivenöl, auf. Abgesehen von der Problematik von Gemischen und Lösemittelunverträglichkeiten sind einige von der OECD validierte Versuche möglicherweise nicht in der Lage, potentielle hautsensibilisierende Substanzen in Extrakten von Medizinprodukten nachzuweisen, da sie häufig in extrem niedrigen Konzentrationen vorliegen.

C.3.2 Genomische Versuche

Die in C.2.2 aufgeführten genomischen Versuche, die die Schlüsselvorgänge 2 und 3 behandeln, sind SenCee-Tox[®], SENS-IS, EpiSensA und GARD[™]. Bei den ersten drei werden RhE-Gewebe verwendet, während der vierte auf einer firmeneigenen Zelllinie beruht. Sie sind alle etwas unterschiedlich, aber das gemeinsame Merkmal ist ihre Verwendung von Markergenen zur Identifizierung von hautsensibilisierenden Substanzen. Außerdem haben alle Versuche, mit Ausnahme von EpiSensA, erfolgreich Pilotprojekte abgeschlossen, bei denen polare und unpolare Lösemittelextrakte von mit hautsensibilisierenden Substanzen aufgestockten Polymeren für Medizinprodukte verwendet wurden. Die Genauigkeit, die zu dem begrenzten Satz von Proben für die Pilotprojekte angeführt wurde, war vergleichbar mit der oder besser als die Genauigkeit der von der OECD validierten Versuche. Zwei dieser Versuche, SENS-IS, und GARD[™], werden derzeit im Rahmen von Abschnitt 4 des Prüfrichtlinien-Programms der OECD [121] (Projekte in Bezug auf Prüfung der Richtlinien zu gesundheitlichen Auswirkungen) überprüft.

Aufgrund ihrer Genauigkeit, ihrer Fähigkeit, mit polaren und unpolaren Lösemitteln zu arbeiten, und ihres Potentials als eigenständige Verfahren für die Prüfung von Medizinprodukten auf Hautsensibilisierung, können diese Versuche leistungsfähige Verfahren zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotentials von Medizinprodukten sein. Ihre Fähigkeit, kationische metallische sensibilisierende Substanzen zu erkennen, muss jedoch noch bestätigt werden.

C.3.3 Andere Versuche

Der verbleibende Versuch, der den Schlüsselvorgang 2 behandelt, ist der IL-18-RhE-Test. Bei diesem Versuch werden die Freisetzung von IL-18 und die Lebensfähigkeit der Zellen gemessen. Prüfdaten für den IL-18-RhE-Test sind begrenzt. Da in diesem Test RhE-Gewebe verwendet werden, kann er möglicherweise mit polaren und unpolaren Lösemitteln für Medizinprodukte funktionieren. Da dieser Versuch weder von der OECD validiert noch in eine der bedeutenden Vergleichsstudien von *In-vitro*-Versuchen zur Hautsensibilisierung aufgenommen wurde, sollte seine Verwendung bei der Prüfung von Medizinprodukten noch bestätigt werden.

C.3.4 Allgemeine Betrachtungen zur Validierung von *In-vitro*-Verfahren für die Prüfung von Medizinprodukten

Derzeit gibt es sechs validierte *In-chemico*- und *In-vitro*-Versuche (DPRA, Keratinosens, LuSens, h-Clat, U-Sens, IL-8-Luc-Test) in den OECD-Prüfrichtlinien für Bestimmung des Hautsensibilisierungspotentials von Chemikalien und zwei weitere (GARD[™], SENS-IS) [75], [79], [104] wurden in das Prüfrichtlinien-Programm der OECD [121] aufgenommen. Die Aufnahme einer dieser *In-vitro*-Prüfungen auf Hautsensibilisierung für die Prüfung von Medizinprodukten sollte durch die Validierungsdaten unterstützt werden, die die Gleichwertigkeit/Überlegenheit des *In-vitro*-Verfahrens im Vergleich zu den derzeitigen *In-vivo*-Verfahren bestätigen, die zur Bewer-

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

zung des Hautsensibilisierungspotentials von Medizinprodukten/Extrakten von Medizinprodukten verwendet werden.

Ein derartiger Validierungsprozess muss so ausgelegt sein, dass Leistungsvergleiche zwischen den in Frage kommenden Versuchen möglich sind und deren Verwendung als eigenständiges Verfahren oder in Kombination mit einer Versuchsstrategie untersucht werden kann.

Die folgenden allgemeinen Punkte müssen bei der Gestaltung derartiger Validierungsstudien berücksichtigt werden:

- Entscheidung, ob hautsensibilisierende Referenzmaterialien oder Extrakte von nicht sensibilisierender Materialien verwendet werden, denen sensibilisierende Substanzen in bekannten Konzentrationen zugesetzt werden;
- Ermittlung repräsentativer Klassen von hautsensibilisierenden Chemikalien, die in Medizinprodukten vorhanden sein können;
- Auswahl einer Liste von Referenzchemikalien zum Aufbau einer Validierungsdatenbank, die physikalisch-chemische Eigenschaften, historische Daten aus Versuchsverfahren am Tier und am Menschen sowie *In-vitro*- und *In-chemico*-Daten aus validierten OECD-Versuchen enthält;
- Ermittlung von Negativ- und Positivkontrollmaterialien, die bei der Validierung zu verwenden sind;
- Festlegung der Mindestwerte für die Zuverlässigkeit (Vergleichpräzision innerhalb eines Labors und zwischen Laboren) und Genauigkeit (Empfindlichkeit, Spezifität) im Vergleich zu Versuchsverfahren am Tier und am Menschen zur Validierung eines *In-vitro*-Versuchs;
- Ermittlung aller chemischen oder physikalischen Eigenschaften der Materialien von Medizinprodukten, die zu Beeinträchtigungen der Prüfung, zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen könnten;
- Festlegung des Anwendungsbereichs der betrachteten *In-vitro*-Versuche, z. B. für Materialien, die für die Extraktion geeignet sind, und Materialien, die nicht für die Extraktion geeignet sind, (z. B. Flüssigkeiten, Gele, Pasten, Gase, Dämpfe, Aerosole, Kondensate, Nanomaterialien).

C.4 Schlussfolgerungen

Etwa 20 % der Chemikalien im Welthandel sind sensibilisierende Substanzen [72]. Doch historisch gesehen liefert nur etwa 1 % der Extrakte von Medizinprodukten positive Ergebnisse bei Hautsensibilisierungsprüfungen an Tieren [94]. Diese Tatsachen sowie die Verfügbarkeit von hochentwickelten *In-vitro*-Versuchen zur Hautsensibilisierung haben Experten zu der Annahme veranlasst, dass ein Paradigmenwechsel hin zur Akzeptanz von *In-vitro*-Versuchen für die Prüfung von Medizinprodukten unvermeidlich ist [73]. Dazu sind jedoch sorgfältig durchdachte Evaluierungs-/Validierungsstudien der vielversprechendsten *In-vitro*-Versuche zur Hautsensibilisierung oder Kombinationen von Versuchen notwendig.

Anhang D (informativ)

Hintergrundinformation zu Sensibilisierungsprüfungen auf Hautsensibilisierung

Eine Sensibilisierung tritt beim Menschen nach einmaliger oder wiederholter epikutaner Exposition auf, und sie wird durch Komponenten des Immunsystems eingeleitet und ausgelöst. Zunächst muss das Hapten (die chemische Substanz) in die Haut eindringen. Es reagiert dann mit Hautproteinen und bildet einen immunogenen Komplex (Antigen). Langerhans-Zellen an der Grenze von Oberhaut und Lederhaut (Epidermis/Cutis) bieten das Antigen spezifischen Lymphozyten an, die dann aktiviert werden und die Immunreaktionen einleiten. Ein kleiner Prozentsatz dieser Lymphozyten sind langlebige Gedächtniszellen und dienen während der Provokationsphase als die primären Aktivatoren. So können spätere erneute Expositionen zu nachteiligen Reaktionen führen, die durch Lymphokine vermittelt werden, die von den aktivierten Lymphozyten und anderen Entzündungszellen, die vom Bereich der Schädigung angezogen werden, freigesetzt werden.

Im Jahre 1895 verwendete Jadassohn die Lappchenprüfung, um eine Kontaktallergie gegen Quecksilber bei einem klinischen Patienten aufzudecken. Diese neuartige Vorgehensweise lieferte die wissenschaftliche Grundlage für nachfolgende Untersuchungen, die auf die Diagnose und Vorhersage von Kontaktallergien beim Menschen und bei Tieren abzielten. Die Entwicklung von prospektiven bzw. Voraussageprüfungen zur Beurteilung des Sensibilisierungspotentials chemischer Substanzen war eine Folge der Pionierarbeit von Landsteiner und Chase [11]; diese begründeten auf solide Weise die Verwendung des Meerschweinchens zum Studium der Hautsensibilisierung.

In Jahre 1969 untersuchten Magnusson und Kligman [12] viele der Variablen der Prüfung am Meerschweinchen und stellten das Verfahren GPMT vor; seine Grundlage sind intrakutane Injektionen (mit und ohne komplettes Freundesches Adjuvans (en: Freund's complete adjuvant)), gefolgt von topischer Applikation des Prüfmaterials auf denselben Bereich. Das Originalverfahren erfordert die Vorbehandlung der Prüfstelle, wenn das Prüfmaterial keine Irritation hervorruft. Nach der Definition weist das Verfahren angeblich schwach hautsensibilisierende Substanzen nach, weil „schwach“ auch ein Nichtvorhandensein positiv reagierender Individuen einschloss. Es handelt sich um eine empfindliche Prüfung, die flächendeckend angewendet worden ist. Die Anwendung des kompletten Freundeschen Adjuvans erhöht die Empfindlichkeit des Prüfverfahrens, und so kann in einigen Fällen das sensibilisierende Potential der zu untersuchenden Verbindung überschätzt werden.

Im Jahre 1965 empfahl Buehler [7] die Verwendung des geschlossenen Patchtest, um die Okklusion als ein Verfahren zur Optimierung der Exposition und zur Simulation der beim Menschen angewandten Untersuchungstechniken [Patchtest zur wiederholten Provokation beim Menschen (HRIPT, en: Human Repeat Insult Patch Test)] zu erreichen. Es wurde darauf hingewiesen, dass das Okklusivlappchenverfahren empfindlich ist und dass es mäßig bis stark hautsensibilisierende Substanzen sicher voraussagen könne; damit würde vermieden, Menschen voraussehbaren nachteiligen Reaktionen im HRIPT auszusetzen. Die vorgelegten Daten bewiesen die Überlegenheit des Okklusionsverfahrens gegenüber intrakutanen Injektionen und topischer Applikation offenen Typs. Eine Stimulierung des Immunsystems durch Adjuvantien wurde nicht angewendet. Dieses Verfahren ist als eine Untersuchungstechnik erprobt, die ausreichend empfindlich ist, um sogar schwach hautsensibilisierende Substanzen nachzuweisen, und hat sich als ausreichend flexibel gezeigt, um im Prozess der Risikobeurteilung eingesetzt werden zu können. Im Vergleich mit dem GPMT ist das Okklusivlappchenverfahren (Bühler-Test) jedoch weniger empfindlich. Siehe Literaturhinweis [9].

Das Okklusivlappchenverfahren in den USA und der GPMT in Europa waren die zur Sicherheitsbewertung meistverwendeten Prüfungen. Das Ergebnis der Sensibilisierungsversuche am Meerschweinchen hängt von vielen mit dem Tier zusammenhängenden und technischen Faktoren ab, durch die sich die Abweichungen bei den Prüfergebnissen zwischen den Laboratorien erklären lassen. Dazu gehören z. B. der Tierstamm, Geschlecht und Alter der Tiere, Umgebungsbedingungen der Prüfung, Prüfstelle am Tier, Verfahren der Fellentfernung (Scheren/Rasieren oder chemische Enthaarung), Konstruktionsweise des Lappchens, Menge des Prüfmaterials, Qualität des Luftabschlusses, Expositionszeit und die Befundablesung der Gewebereaktionen. Zahlreiche andere Untersuchungen sind angewandt und erforscht worden, und jede hat ihre Befürworter. Es gibt gegen-

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

wärtig mehrere Verfahrensweisen, die für Zwecke der Gesetzgebung als annehmbar anerkannt sind, vorausgesetzt, dass das Verfahren durch den Forscher ordnungsgemäß dokumentiert und validiert ist. In allen Fällen sollten die Verfahren entsprechend den Originalangaben durchgeführt werden. Eine Aufstellung weiterer Prüfungen ist nachstehend angeführt.

Literaturhinweis [8] gibt einen aktualisierten Überblick über Hautsensibilisierungsprüfungen.

- a) Prüfung mit komplettem Freundeschem Adjuvans;
- b) aufgespaltene Adjuvans-Prüfung;
- c) offene Epikutanprüfung;
- d) Optimierungsprüfung nach Maurer;
- e) Fußballenprüfung beim Meerschweinchen;
- f) kumulative Kontaktsteigerungsprüfung;
- g) Hautkratzprüfung (Ritzungsprüfung) (mit Adjuvans und Prüfläppchen);
- h) Mäuseohrenödempfung.

Zur Feststellung von Gefahren durch Chemikalien wird jetzt der LLNA dem GPMT und dem Bühler-Test mit Okklusivläppchen vorgezogen. Der LLNA wurde 2010 von der OECD als eigenständiges Alternativverfahren zu den etablierten Versuchen an Meerschweinchen und als Verbesserung für den Tierschutz anerkannt. Siehe Literaturhinweis [33]. Der LLNA wurde für die Bestimmung der sensibilisierenden Wirkung von Chemikalien validiert. Siehe Literaturhinweise [39] und [40].

Die wissenschaftliche Grundlage der Prüfung ist die Messung des Einbaus von ^3H -Methylthymidin in Lymphozyten von drainierenden Lymphknoten von Mäusen, deren Haut topisch mit dem Prüfmuster behandelt wurde, als Maß für die sensibilisierende Wirkung. Bei dieser Prüfung gibt es keine Provokationsphase. Der toxikologische Endpunkt in dieser Prüfung ist ein Stimulationsindex, bei dem der Quotient des ^3H -Methylthymidin-Einbaus in Lymphknoten behandelter Tiere zu dem Einbau in Lymphknoten von Kontrolltieren gebildet wird. Eine Prüfung wird als positiv gewertet, wenn der Stimulationsindex den Wert 3 überschreitet ($I_s > 3$). Eine Beurteilung des LLNA in einem und zwischen mehreren Laboratorien hat reproduzierbare Dosis-Wirkungs-Beziehungen innerhalb eines einzelnen und zwischen den unterschiedlichen Laboratorien gezeigt. Siehe Literaturhinweise [16], [17], [21], [25], [26], [28] und [32]. Jedoch wurde von Schwierigkeiten berichtet, mit dem LLNA zwischen hautreizenden und sensibilisierenden Stoffen zu unterscheiden. Siehe Literaturhinweise [18], [25] und [28]. Deshalb können im LLNA bei der Prüfung von hautreizenden Stoffen falsch positive Ergebnisse auftreten, und die sensibilisierenden Eigenschaften von Stoffen, die sowohl hautreizende als auch sensibilisierende Eigenschaften besitzen, werden möglicherweise überschätzt. Siehe Literaturhinweis [16]. Der LLNA hat gegenüber der Prüfung am Meerschweinchen jedoch mehrere Vorteile: eine kürzere Prüfdauer, ein objektiverer Endpunkt, ein geringerer Verbrauch an Prüfmaterial, und Injektionen mit komplettem Freundeschem Adjuvans sind nicht erforderlich. Die praktische Durchführung kann durch Analyse von Markern für die Zellaktivierung und durch Durchflusszytometrie verbessert werden. Siehe Literaturhinweise [23] und [24]. Ob diese Verfahren innerhalb einer Standardvorschrift für den LLNA zur routinemäßigen toxikologischen Untersuchung umgesetzt werden können, ist nicht bekannt. Andererseits ist die Auswahl der Trägersubstanzen im LLNA überschaubar; in den meisten Studien wurde eine Mischung aus Aceton und Olivenöl verwendet. Eine neuere Studie zeigt die Variabilität der Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Trägersubstanzen auf. Siehe Literaturhinweis [27]. Außerdem ist es mit dem LLNA nicht möglich, die Provokationsphase oder Muster von Kreuzreaktionen zu untersuchen, weil die Tiere nach der Induktionsphase getötet werden, um die Lymphknoten zu entnehmen.

Der Kniekehlen-Lymphknotentest (PLNA, en: popliteal lymph node assay), bei dem die Substanz subkutan in den Fußballen eingebracht wird (siehe Literaturhinweise [19], [22] und [31]), ist ein alternativer Lymphknotentest. Bei diesem Versuch dürfen neben der direkten Messung der Lymphknotenaktivierung auch Repor-

terantigene dazu verwendet werden, die Immunmodulation durch die zu untersuchende chemische Substanz weiter zu klären. Siehe Literaturhinweis [15].

Der Prozess der Risikobeurteilung sollte nicht auf einem einzigen Modell oder Ansatz beruhen, sondern durchdacht durchgeführt werden, um dem Anwender ein Höchstmaß an Sicherheit zu bieten. Im Allgemeinen umfasst dies sowohl Versuchsverfahren am Tier oder tierversuchsfreie Verfahren als auch Untersuchungsmodelle am Menschen. So lange, bis die wissenschaftliche Begründung dokumentiert und/oder validiert ist, sollte Flexibilität in der Wahl der Modelle und Vorgehensweisen herrschen.

Ordnungsgemäß ausgeführte und negativ ausfallende Prüfungen am Meerschweinchen können im Allgemeinen definitiv sein, wenn die Prüfkonzentration gegenüber den Anwendungsbedingungen einen ausreichend hohen Sicherheitsfaktor aufweist. Es sollte jedoch vermieden werden, Prüfmateriale lediglich auf der Grundlage der Häufigkeit und/oder Schwere der Reaktionen ohne gebührende Berücksichtigung der letztendlichen Produktnutzung einzustufen.

Das Risiko, d. h. die Häufigkeit und Schwere einer allergischen Reaktion auf das Produkt, wird hauptsächlich durch folgende vier Faktoren bestimmt: die Sensibilisierungspotenz des chemischen Allergens, seine im Produkt vorhandene Menge, Bioverfügbarkeit und die Expositionsbedingungen. Die relative Sensibilisierungspotenz chemischer Substanzen kann als die minimale Induktionskonzentration angegeben werden, die erforderlich ist, um einen gegebenen Grad der Sensibilisierung zu induzieren: Je niedriger diese Konzentration ist, umso wirksamer ist die sensibilisierende Substanz. Siehe Literaturhinweise [6] und [30]. Es wurde gezeigt, dass eine signifikant hohe Häufigkeit allergischer Kontaktdermatitis bei Anwendern gefunden wurde, wenn die Konzentration des Allergenrückstands im Produkt dessen minimale Induktionskonzentration überstieg, die durch den GPMT bestimmt wurde. Siehe Literaturhinweis [14].

Andererseits ist die Prüfung von Gemischen und Produkten mit zur Vorhersage geeigneten Ergebnissen weit weniger validiert und kann nach der Prüfung der Inhaltsstoffe des Produkts durchgeführt werden. Dementsprechend unterliegen die Gestaltung der Prüfung und die Interpretation der Ergebnisse einer Unsicherheit, aber mehrere Beispiele dokumentieren diese Möglichkeit. Bei Tierversuchen mit Acetonextrakten aus einem Sweater, der beim Menschen eine Kontaktdermatitis ausgelöst hatte, wurden Allergene (Phosgenchlorphenylhydrazone) nachgewiesen. Siehe Literaturhinweis [11]. In einem anderen Fall wurden bei Tierversuchen mit Aceton-Chloroform-Extrakten aus Gummistiefeln, die beim Menschen eine Kontaktdermatitis ausgelöst hatten, Mercaptobenzothiazol und Dibenzothiazylidisulfid tatsächlich als die verursachenden Allergene gefunden. Siehe Literaturhinweis [10]. Die Wichtigkeit der Verwendung eines geeigneten organischen Lösemittels wurde eindeutig bewiesen. Die mit dem organischen Lösemittel hergestellten Extrakte induzierten eine Hautsensibilisierung beim Meerschweinchen, während die Extrakte mit Salzlösungen hier versagten.

Literaturhinweis [4] übernimmt das Probenvorbereitungsverfahren mit organischen Lösemitteln mit nachfolgendem Verdampfen des Lösemittels zur Gewinnung des Rückstands und das Verfahren der Risikobeurteilung durch Vergleich der prozentualen Ausbeute des Rückstands aus dem Material mit der Mindestverdünnung in Prozent des Rückstands (Gemischs), die bei Tieren noch eine Hautsensibilisierung auslöste.

In-vitro-Verfahren zur Prüfung der Hautsensibilisierung sind gegenwärtig noch nicht für die Routineanwendung verfügbar, jedoch ist es in Anbetracht neuer Vorschriften in Europa, die die Anwendung von Tierversuchen bei Kosmetika untersagen, wahrscheinlich, dass neuartige Strategien zur Identifizierung hautsensibilisierender Substanzen zur Verfügung stehen werden. Siehe Anhang C.

Literaturhinweise

Allgemeine Literaturhinweise für Hautsensibilisierungsprüfungen

- [1] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) *Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization*, OECD Publications, 1992
- [2] de Silva O., Basketter D.A., Barratt M.D. et al. *Alternative methods for skin sensitization testing*, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19, ATLA, 24, pp. 683-705, 1996
- [3] MHLW Notification by Director, MDED, Yakuseikishin-hatsu 0106 No.1, Jan. 6, 2020. Amendment of Basic Principles of Biological Safety Evaluation Required for Application for Approval to Market Medical Devices
- [4] *Japanese Guidelines of Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices*, 1995

Literaturhinweise für Hautsensibilisierungsprüfungen

- [5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Series on Testing and Assessment, n° 168, Éditions OCDE, Paris, 2014, <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>
- [6] Andersen, K.E., Vølund, A. and Frankild, S., The guinea pig maximization test with a multiple dose design, *Acta Derm. Venereol.*, **75**, pp. 463-469, 1995
- [7] Buehler, E.V., Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig, *Arch. Dermatol.*, **91**, pp. 171-175, 1965
- [8] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, *Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment*, Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000
- [9] Frankild, S., Vølund, A., Wahlberg, J.E. et al., Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy, *Acta Derm. Venereol.*, **80**, pp. 256-262, 2000
- [10] Kaniwa, M.A., Momma, J., Ikarashi, Y. et al., A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups: application to a case of rubber boot dermatitis, *Contact Dermatitis*, **27**, pp. 166-173, 1992
- [11] Kojima, S., Momma, J. and Kaniwa, M.A., Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals, *Contact Dermatitis*, **23**, pp. 129-141, 1990 [veröffentlichtes Erratum erscheint in *Contact Dermatitis*, 23, p. 383]
- [12] Landsteiner, K. and Chase, M.W., Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds, *J. Exp. Med.*, **69**, p. 767, 1939
- [13] Magnusson, B. and Kligman, A.M., The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test, *J. Invest. Dermatol.*, **52**, pp. 268-276, 1969
- [14] Nakamura, A., Momma, J., Sekiguchi, H. et al., A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test, *Contact Dermatitis*, **31**, pp. 72-85, 1994

Literaturhinweise für LLNA

- [15] Albers, R., Broeders, A., Van Der Pijl, A. et al., The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immunomodulation by chemicals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, pp. 102-109, 1997
- [16] Basketter, D.A., Lea, L.J., Cooper, K. et al., Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation, *Food. Chem. Toxicol.*, **37**, pp. 1167-1174, 1999
- [17] Basketter, D.A., Roberts, D.W., Cronin, M. et al., The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations, *Contact Dermatitis*, **27**, pp. 137-142, 1992
- [18] Basketter, D.A., Scholes, E.W. and Kimber, I., The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test, *Food. Chem. Toxicol.*, **32**, pp. 543-547, 1994
- [19] De Bakker, J.M., Kammüller, M.E., Muller, E.S.M. et al., Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen-mitogen-, and graft-versus-host-reaction-induced-responses, *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, **58**, pp. 279-287, 1990
- [20] Dean, J., Twerdok, L.E., Andersen, K.E. et al., *The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds*, NIH publication No. 99-494, Research Triangle Park, 1999, verfügbar unter https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- [21] Dearman, R.J., Basketter, D.A. and Kimber I., Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment, *J. Appl. toxicol.*, **19**, pp. 299-306, 1999
- [22] Descotes, J., Patriarca, C., Vial T. et al., The popliteal lymph node assay in 1996, *Toxicol.*, **119**, pp. 45-49, 1997
- [23] Gerberick, G.F., Gruse, L.W. and Ryan, C.A., Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry, *Methods*, **19**, pp. 48-55, 1999(a)
- [24] Gerberick, G.F., Gruse, L.W., Miller, C.M. et al., Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**, pp. 142-151, 1999(b)
- [25] Ikarashi, Y., Tsuchiya, T. and Nakamura, A., A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens, *Arch. Toxicol.*, **67**, pp. 629-636, 1993
- [26] Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J. et al., An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures, *Toxicol.*, **103**, pp. 63-73, 1995
- [27] Lea, L.J., Warbrick, E.V., Dearman, R.J. et al., The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency or 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay, *Am. J. Contact Dermatitis*, **10**, pp. 213-218, 1999
- [28] Loveless, S.E., Ladics, G.S., Gerberick, G.F. et al., Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial, *Toxicol.*, **108**, pp. 141-52, 1996
- [29] Montelius, J., Wahlkvist, H., Boman, A. et al., Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants, *Acta Derm. Venereol.*, **74**, pp. 22-27, 1994
- [30] Roberts, D.W., Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, *Contact Dermatitis*, **17**, pp. 281-289, 1987
- [31] Vial, T., Carleer, J., Legrain, B. et al., The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study, *Toxicol.*, **122**, pp. 213-218, 1997

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- [32] Warbrick, E.V., Dearman, R.J., Lea, L.J. et al., Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations, *J. Appl. Toxicol.*, **19**, pp. 225-260, 1999
- [33] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), *Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay*, OECD Publications, 2010
- [34] Ryan, C.A., Cruse, L.W., Skinner, R.A. et al., Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay, *Food Chem Toxicol.*, **40**, pp. 1719-1725, 2002
- [35] Woolhiser, M.R., Munson, A.E. and Meade, B.J., Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, *Toxicology* **146**, pp. 221-227, 2000
- [36] Takeyoshi, M., Noda, S., Yamasaki, K. et al., Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay, *J. Appl. Toxicol.*, **26**, pp. 5-9, 2006
- [37] Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H. et al., A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins, *Toxicology*, **146**, pp. 49-59, 2000
- [38] De Jong, W.H., Van Och, F.M.M., Den Hartog Jager, C.F. et al., Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay, *Toxicol. Sc.*, **66**, pp. 226-232, 2002
- [39] Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, pp. 258-273, 2001
- [40] Hanek, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III Data analysis completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, pp. 274-286, 2001
- [41] ASTM F2148-13, *Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)*
- [42] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2018, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>
- [43] Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H. et al., A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **48**, pp. 53-61, 2002
- [44] ICCVAM. 2010. ICCVAM Test Method Evaluation Report on Using the LLNA for Testing Pesticide Formulations, Metals, Substances in Aqueous Solutions, and Other Products. NIH Publication No. 10-7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

Literaturhinweise für *In-vitro*-Prüfungen auf Hautsensibilisierung

- [45] Basketter, D. and Maxwell, G., *In vitro* approaches to the identification and characterization of skin sensitizers, *Cutaneous and Ocular Toxicol.*, **26**, pp. 359-373, 2007
- [46] Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M. et al., Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in vitro*, **20**, pp. 767-773, 2006

- [47] Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M. et al., Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in vitro*, **20**, pp. 774-784, 2006
- [48] Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K. et al., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **13**, pp. 27-35, 2008
- [49] EURL CVAM, European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>
- [50] Gibbs S, Kosten I, Veldhuizen R, Spiekstra S, Corsini E, Roggen E, Rustemeyer T, Feilzer AJ, Kleverlaan CJ. Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology*. **393**, pp. 62-72, 2018
- [51] HAUGEN, E. and HENSTEN-PETTERSEN, A., The sensitizing potential of periodontal dressings. *J. Dent. Res.*, **57**, pp. 950-953. 1978
- [52] Johansson H, Gradin R, Forreryd A, Agemark M, Zeller K, Johansson A, Larne O., van Vlier E., Borrebaeck C. and Lindstedt M. Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study. *ALTEX*, **34**, pp. 515-523. 2017
- [53] Roberts D.W. Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. *Regul Toxicol Pharmacol*, **98**, pp. 155-160. 2018
- [54] Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Auriault C, Aeby P, Groux H. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol In Vitro*, **32**, pp. 248-260, 2016
- [55] Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, **54**, pp. 181-185. 2006

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (Allgemeines)

- [56] Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E. and Villeneuve, D. L. 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**:730-741
- [57] Casati, S. 2017. Contact hypersensitivity: Integrated approaches to testing and assessment. *Current Opinion in Toxicology* **5**:1-5
- [58] Ezendam, J., Braakhuis, H. M., Vandebriel, R. J. 2016. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch Toxicol.* **90**(12):2861-2883
- [59] Hoffmann, S., Kleinstreuer, N., Alépée, N., Allen, D., Api, A. M., Ashikaga, T., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Goebel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Lalko, J. F., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Parakhia, R., van Vliet, E., Zang, Q., Petersohn, D. 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol.* **48**(5):344-358
- [60] Kimber, I., Travis, M. A., Martin, S. F., Dearman, R. J. Immunoregulation of skin sensitization and regulatory T cells. 2012. *Contact Dermatitis* **67**(4):179-83

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- [61] Kleinstreuer, N. C., Hoffmann, S., Alépée, N., Allen, D., Ashikaga, T., Casey, W., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Göbel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Strickland, J., van Vliet, E., Zang, Q., Petersohn, D. 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. *Crit Rev Toxicol.* **48**(5):359-374
- [62] Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. A., Schmidt, M., Goebeler, M. 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* **66**(9):1152-63
- [63] OECD. 2017. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. Series on Testing & Assessment No. 184. ENV/JM/MONO(2013)6. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris. 32 pp. Verfügbar unter: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2013\)6&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en)
- [64] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, n° 255, Éditions OCDE, Paris, 2017, Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1787/9789264274822-en>
- [65] Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol In Vitro* **29**(1):259-70
- [66] Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W. 2016. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* **36**(9):1150-62
- [67] Urbisch, D., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Ramirez, T., Teubner, W., Landsiedel, R. 2016. Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA. *Toxicol In Vitro* **34**:194-203
- [68] Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* **71**(2):337-51
- [69] Van der Veen, J. W., Pronk, T. E., Van Loveren, H., Ezendam, J. 2013. Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. *Toxicol In Vitro* **27**(1):314-322
- [70] Van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., Ezendam, J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* **69**(3):371-9
- [71] Van der Veen, J. W., Vandebriel, R., Van Loveren, H., Ezendam, J. 2011. Keratinocytes, innate immunity and allergic contact dermatitis – opportunities for the development of in vitro assays to predict the sensitizing potential of chemicals. DOI: 10.5772/28337. In: Ro YS (ed) Contact dermatitis. DOI: 10.5772/1167. ISBN: 978-953-307-577-8
- [72] Safford, R.J., 2008. The dermal sensitisation threshold– a TTC approach for allergic contact dermatitis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **51**:195-200
- [73] Myers D.K., Goldberg A.M., Poth A., Wolf M.F., Carraway J., McKim J., Coleman K.P., Hutchinson R., Brown R., Krug H.F., Bahinski A. and Hartung T. 2017. From In Vivo to In Vitro: The Medical Device Testing Paradigm Shift. *ALTEX* **34**(4):479-500

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (DPRA)

- [74] Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* **81**(2):332-43
- [75] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2019, Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>
- [76] Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* **71**(2):337-351

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (KeratinoSens™)

- [77] EURL ECVAM. 2014. Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Verfügbar unter: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- [78] Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. 2013. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* **87**(9):1683-1969
- [79] OECD. 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>
- [80] Thorne N., Inglese J., Auld D.S. 2010. Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* **17**(6):646-657

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (LuSens)

- [81] EURL ECVAM. 2018. The LuSens test method Validation Study Report. Abrufbar unter: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>
- [82] OECD. 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>
- [83] Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. 2014. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol. In Vitro* **28**, 1482-1497
- [84] Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. 2016. Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **32**, 278-286

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (SENS-IS)

- [85] Cottrez F, Boitel E, Auriault C, Aeby P, Groux H. 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol In Vitro* **29** (4):787-802

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- [86] Cottrez F, Boitel E., Pellevoisin C., Alonso A., Seyler S., Groux H. 2016a. Evaluation of the SkinEthic RHE model in the SENS-IS assay for prediction of skin sensitization of chemicals. Society of Toxicology Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA
- [87] Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Auriault C, Aeby P, Groux H. 2016b. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol In Vitro* **32**:248-60
- [88] Cottrez, F., Pellevoisin, C., Coleman, K., Groux, H. 2018. In vitro assessment of medical device extracts potential to produce skin sensitization. *Toxicology Letters* Volume 295, Supplement 1, 10 October, Page S179, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.827>
- [89] Uruno A. and Motohashi, H. 2011. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* **25**(2):153-60
- [90] Cottrez, F., Boitel E., Berrada-Gomez, M.P., Dalhuchyts, H., Bidan, C., Rattier, S., Ferret, P.J., Groux, H. 2020. In Vitro Measurement of Skin Sensitization Hazard of Mixtures and Finished Products: Results Obtained With the SENS-IS Assays. *Toxicol In Vitro* **62**:104644
- [91] Bergal, M., Puginier, M., Gerbeix, C., Groux, H., Roso, A., Cottrez, F., Milius, A. 2020. In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of "difficult to test" cosmetic ingredients. *Toxicol In Vitro* **65**:104781

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (IL-18-RhE-Test)

- [92] Andres, E., Barry, M., Hundt, A., Dini, C., Corsini, E., Gibbs, S., Roggen, E. L., Ferret, P. J. 2017. Preliminary performance data of the RHE/IL-18 assay performed on SkinEthic™ RHE for the identification of contact sensitizers. *Int J Cosmet Sci.* **39**(2):121-132
- [93] Galbiati, V., Papale, A., Marinovich, M., Gibbs, S., Roggen, E.L., & Corsini, E. 2017. Development of an in vitro method to estimate the sensitization induction level of contact allergens. *Toxicology Letters* **271**:1-11
- [94] Gibbs, S., Kosten, I., Veldhuizen, R., Spiekstra, S., Corsini, E., Roggen, E., Rustemeyer, T., Feilzer, A. J., Kleverlaan, C. J. 2018. Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology* **393**:62-72
- [95] Gibbs, S., Corsini, E., Spiekstra, S.W., Galbiati, V., Fuchs, H.W., Degeorge, G., Troese, M.J., Hayden, P.M., Deng, W., & Roggen, E. 2013. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **272**(2):529-41

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (EpiSensA)

- [96] Saito K, Nukada Y, Takenouchi O, Miyazawa M, Sakaguchi H, Nishiyama N. 2013. Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicol In Vitro* **27**(8):2213-24
- [97] Saito K, Takenouchi O, Nukada Y, Miyazawa M, Sakaguchi H. 2017. An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol In Vitro* **40**:11-25

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (SenCeeTox®)

- [98] Coleman, K.P., McNamara, L.R., Grailer, T.P., Willoughby Sr., J.A., Keller, D.J., Patel P, Thomas S., and Dilworth C. 2015. Evaluation of an In Vitro Human Dermal Sensitization Test for Use with Medical Device Extracts. *Applied In Vitro Toxicology* **1**(2): 118-130

- [99] McKim Jr., J.M., Keller III, D.J. and Gorski, J.R. 2010. A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology* **29**(3):171-192
- [100] McKim Jr., J.M., Keller III, D.J. and Gorski, J.R. 2012. An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *Cutaneous and Ocular Toxicology* **31**(4):292-305

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (h-CLAT)

- [101] Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* **20**:767-773
- [102] EC EURL ECVAM. 2015. Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Abrufbar unter: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- [103] Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. 2013. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* **87**:1683-1969
- [104] OECD. 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>
- [105] Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., Sakaguchi, H. 2013. Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* **38**:599-609

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (U-SENS™)

- [106] Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. 2015. Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* **30**:373-382
- [107] EURL ECVAM. (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Abrufbar unter: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- [108] OECD. 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>
- [109] Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. 2015. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* **29**:901-916

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (IL-8 Luc-Test)

- [110] Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., and Aiba, S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization, *Toxicol In Vitro* **29**:1816-30

DIN EN ISO 10993-10:2023-04 EN ISO 10993-10:2023 (D)

- [111] OECD. 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>
- [112] OECD. 2017. Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

Literaturhinweise für *In-vitro*-Versuche zur Prüfung auf Sensibilisierung (GARD™)

- [113] Forreryd, A., Johansson, H., Albrekt, A. S. and Lindstedt, M. 2014. Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. *BMC Genomics* **15**:379
- [114] Forreryd, A., Zeller, K. S., Lindberg, T., Johansson, H., Lindstedt, M. 2016. From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout – Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. *Toxicol In Vitro* **37**:178–188
- [115] Johansson H., Albrekt, A. S., Borrebaeck, C. A. and Lindstedt, M. 2013. The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* **27**(3):1163-9
- [116] Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics*. **12**:399.
- [117] Roberts, D. W. 2018. Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. *Reg. Toxocol. Pharmacol.* **98**:155-160
- [118] Johansson H., Gradin R., Johansson A., Adriaens E., Edwards A., Zuckerstätter V., Jerre A., Burleson F., Gehrke H., Roggen E. 2019. Validation of the GARD™ skin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicological Sciences*, **170** (2): 374–381
- [119] Jenvert RM., Johansson A., Larne O., Aaltonen E., Jerre A., Gradin R. and Johansson H. 2019. *In vitro* skin sensitization testing of Medical Devices using GARD®. *Toxicology Letters*, volume 31, Supplement 1, 10 October, 155.
- [120] ISO 10993-5, *Biological evaluation of medical device — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*
- [121] OECD, 2020. OECD Test Guidelines Programme, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Verfügbar unter: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecd-guidelines-testing-chemicals-related-documents.htm>
- [122] OCDE. 2010, Test No. 442A: Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>
- [123] OCDE. 2018, Test No. 442B: Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>
- [124] OCDE. 2017, Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, OECD Series on Testing and Assessment, n° 256, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264279285-en>

[125] ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*