

Metoder: Sensibilisering

Martinus Løvik

Avdeling for miljøimmunologi, Divisjon for miljømedisin
Nasjonalt folkehelseinstitutt, Oslo
og
Institutt for kreftforskning og molekylær medisin
Det medisinske fakultet
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Trondheim

Tirsdag 27. april 2004 13:15-14:00

Metoder: Sensibilisering

- Biologien - hva snakker vi om? **10'**
- Testene **15'**
- Risikovurdering **5'**
- Forskriften - definisjoner og forutsetninger **10'**
- Spørsmål og diskusjon **5'**

Sensibilisering → Allergi

Toksisk reaksjon: alle er følsomme

Sensibilisering: alle er følsomme, men svært stor individuell variasjon i mottakelighet for noen typer

Allergisk reaksjon: bare de sensibiliserte er følsomme

Allergier - 1

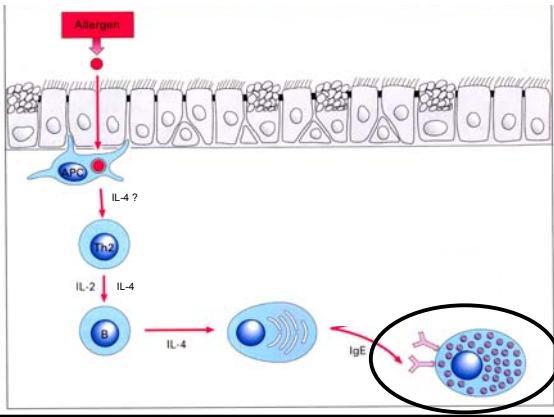
- IgE-mediert allergi ("luftveisallergi")
 - allergisk astma
 - allergisk rhinoconjunctivitt
 - allergisk urticaria/kontakturticaria
 - matallergi

Allergier - 2

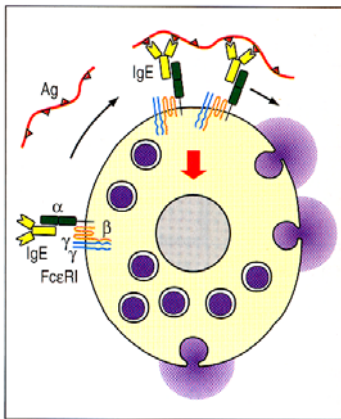
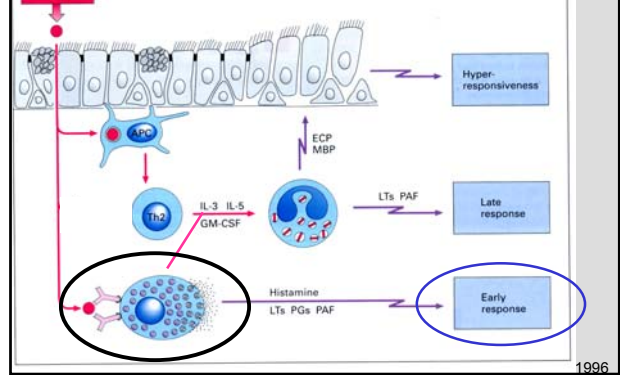
- "Kjemisk allergi" (som ovenfor)
- Ikke-allergisk astma
- Allergisk kontakteksem

IgE-mediert

1. Induction of allergy (sensitization)



2. Provocation - triggering of symptoms



Brydon MJ. Skin Prick testing in Clinical Practice. NAADAS, Norwich, 2000.

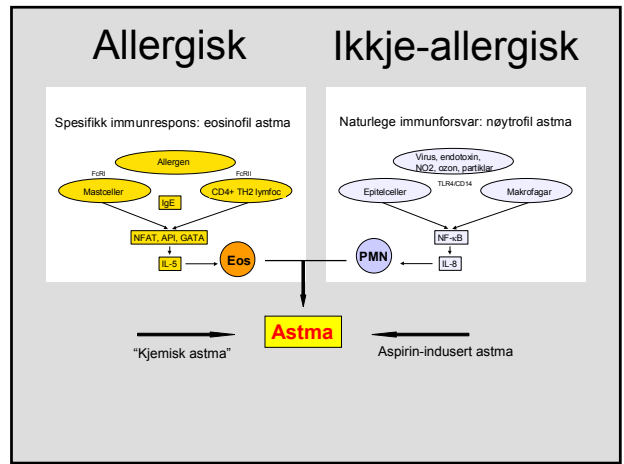
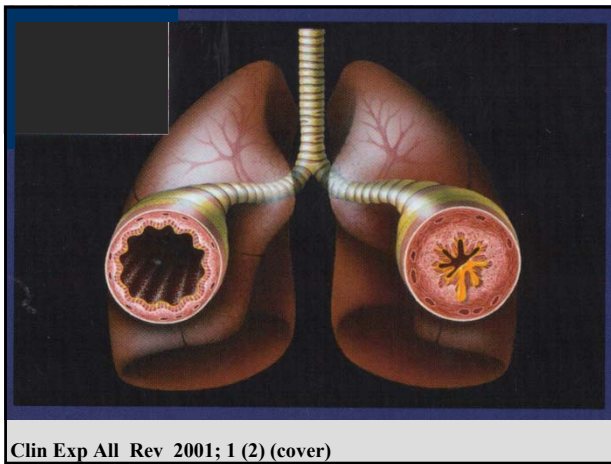


Brydon MJ. Skin Prick testing in Clinical Practice. NAADAS, Norwich, 2000.



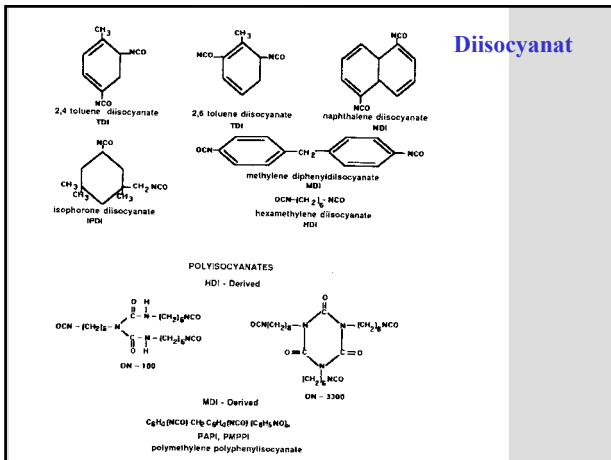
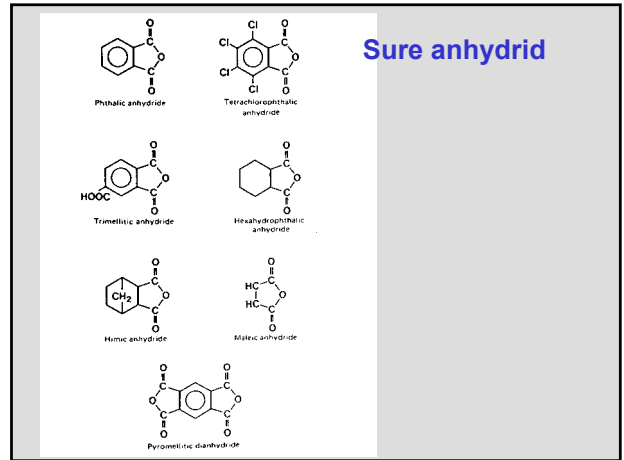
Urticaria

Lachapelle J-M., Tennstedt D, Marot L. Atlas on Dermatology. UCB Pharma, Brüssel/Catholic University of Louvain, 1994



"Kjemisk allergi/astma"

- * er kjemikalie-spesifikk
- * liknar på allergisk astma
- * ukjent mekanisme*
- * haptenisering av protein?
- * atopi ingen eller liten risikofaktor



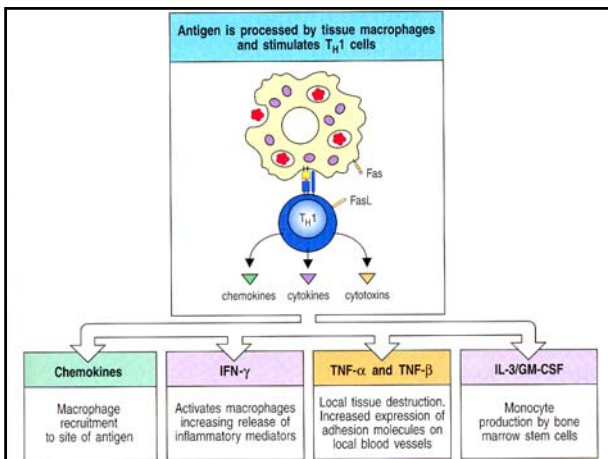
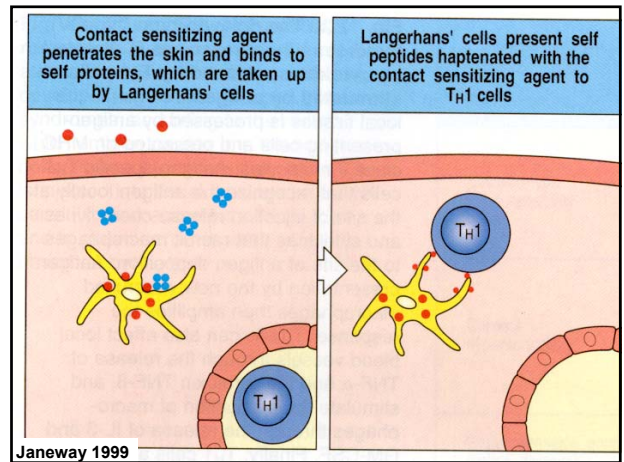
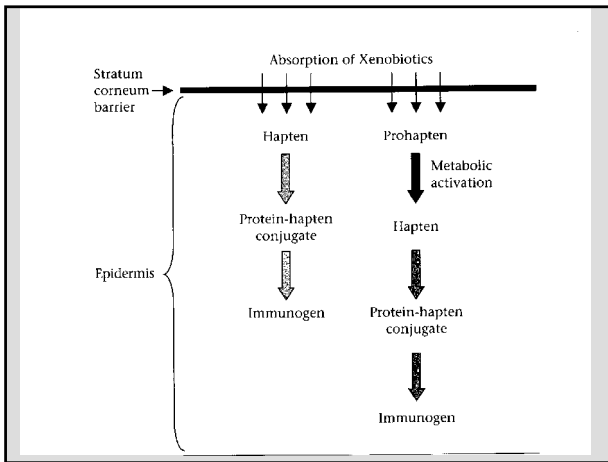
Isocyanat-astma

- ❖ Isocyanat den langt mest studerte stoffgruppa
- ❖ Toluene diisocyanat (TDI):
 - ❖ produksjon av polyuretan, i lim, lakk, måling etc
- ❖ Spesifikt IgE mot TDI-albumin-konjugat er ikkje noe konstant funn

Allergisk kontakteksem

Kontaktallergener - egenskaper

- Lavmolekylære stoffer - "kjemikalier"
- Inkomplette allergener - haptener
- Blir komplette allergener ved å binde seg til kroppens egne proteiner ("haptenisering")
- Hapten + kroppseget protein oppfattes av immunsystemet som et fremmed antigen





Kontaktallergi mot plaster (Holgate & Church)

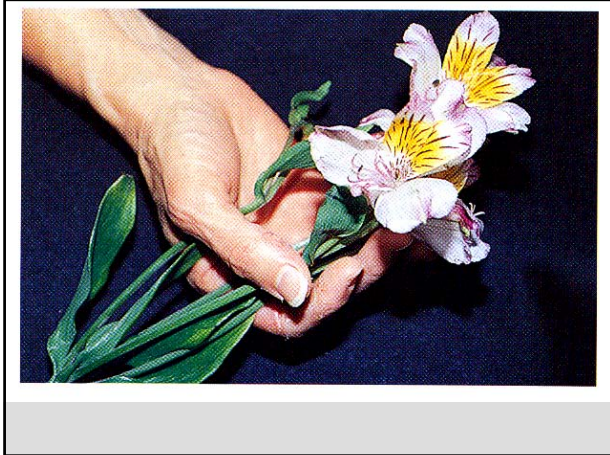


Table 10.4 Specific screening patch tests for metal workers*

Allergen (trade name)	Concentration and vehicle	Function
1-Aza-5-ethyl-3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octane (Bioban CS 1246)†	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
p-Chloro-m-xylene	1% pet	Biocide, coupling agent
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	0.5% pet	Biocide, formaldehyde releaser
Chloracetamide	0.2% pet	Biocide
1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-hexahydrotriazine (Grotan BK)	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
4-Aminoazobenzol (Solvent Yellow 1)	1% pet	Colour
Triclosan (Irgasan DP 300)	2% pet	Biocide
Benzoisothiazole	1% pet	Corrosion inhibitor
Benzophenolmal (Prevental D2)	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
p-tert-butylcatechol	1% pet	Emulsifier, corrosion inhibitor
Triethanolamine	2.5% pet	Emulsifier, emollient
Larolol alcohol (Amerchol L101)	50% pet	Extreme pressure additive, fragrance
Dipentene	2% pet	Biocide
Dichlorophene	0.5% pet	Emulsifier, corrosion inhibitor
Monothalamine	10% pet	Main component of cationic emulsifier
Diethanolamine	2% pet	Corrosion inhibitor
2-Hydroxyethyl-2-nitro-1,3-propanediol (Tris Nitro)†	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
4,4-Dimethylloxazolidine + 3,4,4-trimethylloxazolidine (Bioban CS 1135)	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
4-(2-Nitrobutyl)morpholine + 4,4'-(2-ethyl-2-nitroethylene)-dinorpholine (Bioban P 1487)†	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
Coconut diethanolamide (Comperlan KD)	0.5% pet	Emulsifier, foam stabilizer
3-(n-Octyl-4-isothiazolin-3-one (Kathon 893)	0.025% pet	Biocide
O-Methylisothiazolone (Kathon CG)	0.01% aq	Biocide
Methylene-bis-oxazolidine (Grotan CD)	1% pet	Biocide, formaldehyde releaser
Dibromodicyclobutane (Telamer 38, Euxyl K 400)	0.3% pet	Biocide
1,2-Benzoisothiazolin-3-one (Proxel)	0.1% pet	Biocide

*Common additives to metal-working fluids and their function (metal-working industry/technical fluids patch test series adapted from HERMAL according to advice of the German Contact Allergy Group (DKG) and Information Network of Dermatological Clinics (IVDK).¹¹
 †Use in metal-working fluids forbidden in Germany.¹¹



Lappetesting (Holgate & Church)

Positiv
lappetest
(patchtest)

Mygind et al,
1996

Sensibilisering; tester

- IgE-mediert allergi: ingen validerte tester
- Kjemisk allergi: ingen validerte tester
- Kontaktdermatitt:
 - # Marsvin-tester
 - # Musetest

Sensibilisering; tester

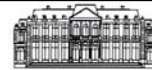
Kontaktdermatitt:

Marsvin:

- # Buehler test
- # Guinea Pig Maximization test

Musetest:

- # LLNA - lokale lymfeknuteassay



OCDE

ORGANISATION DE COOPERATION ET
DE DEVELOPPEMENT ECONOMIQUES

2, rue Andre Pascal, 75775 PARIS CEDEX 16, France
Tel: 33(1) 45 24 82 00, www.oecd.org

OECD Centres Worldwide

OECD Bonn Centre
Tel: 49(228) 959-1215

OECD Washington Center
Tel: 1(202) 785-6232

OECD Mexico Centre
Tel: 52(5) 528-1038

OECD Tokyo Centre
Tel: 81(3) 3586-2016

OECD

ORGANISATION FOR ECONOMIC
CO-OPERATION AND DEVELOPMENT

OECD Guidelines

OECD Guideline No. 406 (1992) Skin Sensitisation

OECD Draft Guideline No. 429 (2001) The Local
Lymph Node Assay

Local Lymph Node Assay (LLNA)

- Grupper à 4 innavlede mus (stamme: CBA)
- Pensles (3 ulike konsentrasjoner) på begge ørers bakside 3 dager på rad med stoffet
- Dag 5: H³ thymidin intravenøst, avliving etter 5 timer, pooling på gruppenivå av retroaurikulare lymfeknuter, DNA-utfelling (TCA) og måling av thymidininkorporering som mål på proliferasjon i cellene

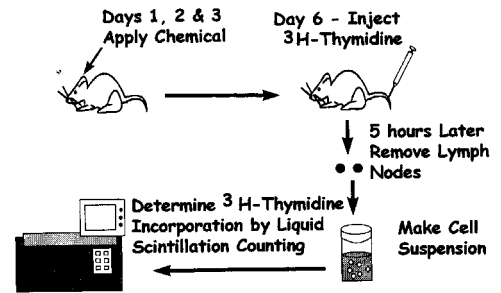
Local Lymph Node Assay (LLNA) - 2

- Positiv test: 3x økning eller mer i proliferasjonen sammenlignet med vehicle control
- Tillater potensgradering (EC₃, konsentrasjonen av stoffet som gir 3x økning i proliferasjonen)
- "Stand-alone" test bare om positiv, negative må testes med marsvintest

Local Lymph Node Assay (LLNA) - 3

- Rask
- Få dyr brukes
- Tar lite plass i dyrestallen
- Lite stoff behøves
- Åpner for mekanismestudier/er mer vitenskapelig/basert på mekanismeforståelse

LOCAL LYMPH NODE ASSAY



Basketter 2004

Table 1: Intralaboratory reproducibility of the LLNA

Chemical	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
DNCB	+	+	+	ND	ND	ND
Hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+	+	ND	ND
Eugenol	+	+	+	+	+	ND
Methyl salicylate	-	-	-	-	ND	ND
Benzocaine	-	-	+/-	-	-	-

ND = No data

Table 3: Comparison of LLNA and guinea pig classifications

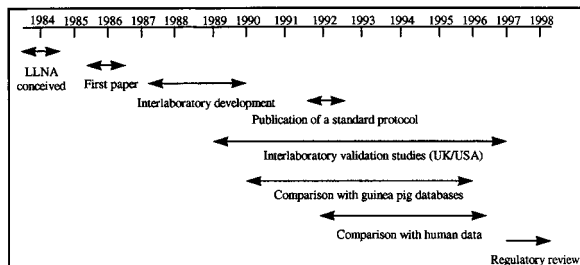
		Guinea Pig Classification*			total
		Guinea Pig Positive	Guinea Pig Negative	unclear	
LLNA Classification	LLNA Positive	86	6	0	92
	LLNA Negative	10	28	0	38
	total	96	34	0	130

table statistics for the shadowed 2 x 2 table

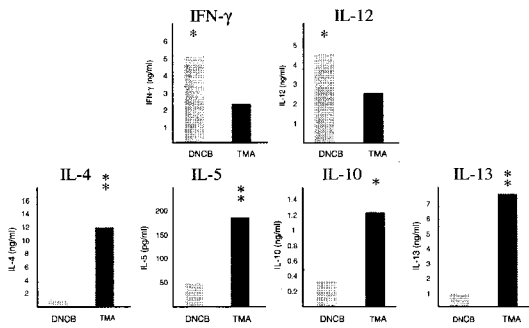
sensitivity:	90%	prevalence:	2.82
specificity:	82%		
positive predictivity:	93%		
negative predictivity:	74%		
accuracy:	88%		
χ^2 :	59.38	(p<0.001)	

*Guinea pig classifications are based on GPMT or Buehler results - some of the results are derived from non-standard GPMT guinea pig tests.

Figure 1. LLNA Timeline



INDUCTION OF DIFFERENTIAL CYTOKINE EXPRESSION
BY CONTACT AND RESPIRATORY ALLERGENS



Ian Kimber, 2004

The Guinea Pig Maximization Test -1

(GPMT - adjuvant test)

- Marsvin, grupper på 20 - 30 (10)
- Induksjon: kombinerer intradermale injeksjoner av stoffet med og uten Freund's komplette adjuvans (FCA) (2x3 injeksj.) med enkelt applikasjon av stoffet på huden 1 uke senere, med okklusjon i 48 timer over stedet der et er injisert
- Challenge: to uker senere, okklusjon 24 t, nytt sted. 24 og 48 timer. Gradering 0-3.

Table 2. Magnusson & Kligman's grading scale for the evaluation of challenge patch test reactions (9)

0	=	no visible change
1	=	discrete or patchy erythema
2	=	moderate and confluent erythema
3	=	intense erythema and swelling

M&K Maximization Test: Induction 1



- 6 intradermal injections of test chemical in combination with Freund's complete adjuvant:
 - 1:1 chemical/FCA
 - 1:1 chemical/vehicle
 - 1:1 FCA/vehicle

WEEK 1

Basketter 2004

M&K Maximization Test: Induction 2



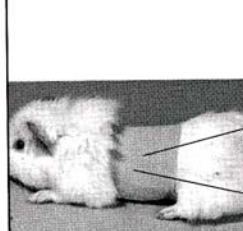
48h irritant occluded patch over id sites

WEEK 2

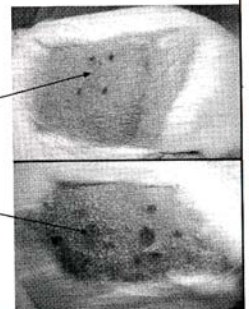


Basketter 2004

M&K Maximization Test: Challenge



WEEK 4



Basketter 2004

Buehlers test -1

(occluded patch test)

- Marsvin, grupper på 20 (10)
- Induksjon: 3 x 6 timer eksponering samme sted under tildekking med en ukes mellomrom, marginalt irriterende konsentrasjon
- Challenge: etter 2 uker, nytt sted, høyeste ikke-irriterende konsentrasjon
- Avlesning 24 og 48 timer
- Etanol, aceton som vehicle

Buehlers test - 2

- etterligner forbrukerens eksponering
- ~ realistisk
- mindre følsom enn adjuvanstestene
- unngår overestimering av sensibiliserende evne
- kan også brukes på ferdige produkter
- USA

Table 6. Scoring system used in the Buehler method

0 = No reaction
± = Slight patchy erythema
1 = Slight, confluent or moderate patchy erythema
2 = Moderate erythema
3 = Severe erythema with or without oedema

Table 7. Data indicating a clear-cut positive response to a theoretical test material

Experimental group	Response grade					Incidence	Severity
	0	0.5	1	2	3		
Test (24 hr)	6	2	7	4	1	12/20	1.0-0.8
(48 hr)	8	2	6	4	0		
Control (24 hr)	7	3	0	0	0	0/10	0.2-0.1
(48 hr)	9	1	0	0	0		

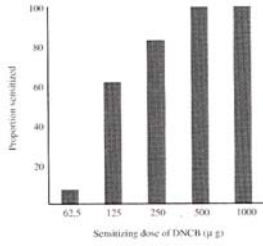
Table 8. Data indicating a borderline response to a test material

Experimental group	Response grade					Incidence	Severity
	0	0.5	1	2	3		
Test (24 hr)	1	19	0	0	0	0/20	0.5-0.5
(48 hr)	1	19	0	0	0		
Control (24 hr)	5	5	0	0	0	0/10	0.3-0.2
(48 hr)	6	4	0	0	0		

THE INDUCTION OF SKIN SENSITIZATION IS DOSE-DEPENDENT

GROUP	APPLICATION SITE diameter (cm)	APPLICATION SITE area (cm ²)	SENSITIZING DOSE total (µg)	SENSITIZING DOSE concentration (µg/cm ²)	% SENSITIZED
1	3	7.1	1000	142	100
2	3	7.1	500	71	100
3	3	7.1	250	35.4	83
4	3	7.1	125	17.7	63
5	3	7.1	62.5	8.8	8

SENSITIZATION OF NORMAL SUBJECTS TO DNCB



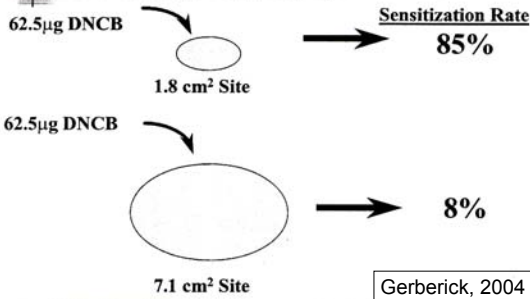
Ian Kimber, 2004

WITHIN LIMITS THE INDUCTION OF SKIN SENSITIZATION IS DEPENDENT UPON DOSE PER UNIT AREA

GROUP	APPLICATION SITE diameter (cm)	APPLICATION SITE area (cm ²)	SENSITIZING DOSE total (µg)	SENSITIZING DOSE concentration (µg/cm ²)	% SENSITIZED
1	3	7.1	62.5	8.8	8
2	1.5	1.8	62.5	35.4	86
3	2.1	3.5	58	16.4	55
4	3	7.1	116	16.4	50
5	4.25	14.2	232	16.4	66

Ian Kimber, 2004

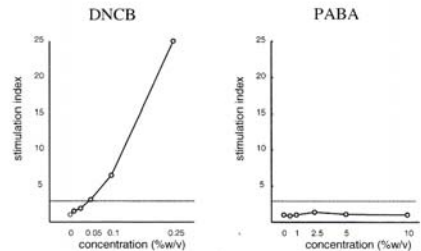
Skin Sensitisation (DNCB, Dinitrochlorobenzene) Exposure Assessment - Influence of Area Exposed



Gerberick, 2004

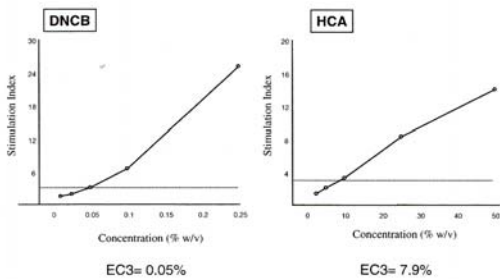
LLNA:

IMMUNE ACTIVATION : PROLIFERATION



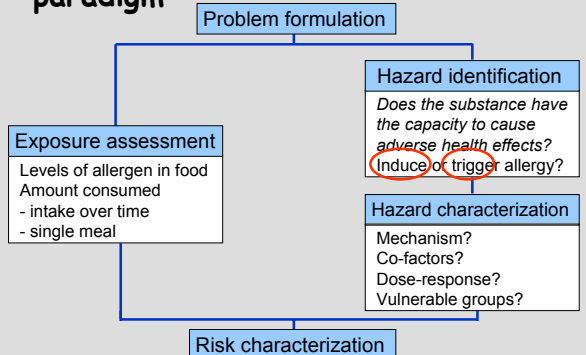
Ian Kimber, 2004

SENSITIZATION POTENCY



Ian Kimber

Toxicological risk assessment paradigm



Risk Assessment - Skin Sensitisation Hazard Identification

- Step 1: Hazard Identification
 - Determined from:
 - Pre-clinical studies e.g. Guinea-Pig Tests, Local Lymph Node Assay (LLNA)
 - Human data (historical)
 - Structure based predictive approach

Gerberick 2004

Risk Assessment - Skin Sensitisation Dose Response

- Step 2: Dose response assessment:
 - Takes into account key factors:
 - Allergen potency
 - No Observed Effect Level (NOEL)
 - LLNA EC₃
 - Uncertainty factors (SUF)

Gerberick, 2004

Risikovurdering *forts.*

Eksposering

- areal og relativ konsentrasjon (håndsåpe, deodorant, intimspray, body lotion, etc etc)
- sikkerhetsfaktorer



FOR 2002-07-16 nr 1139: Forskrift om klassifisering, merking mv. av farlige kjemikalier.

Bruk av basen forutsetter at du samtykker i betingelsene i [brukeravtalen](#)

DATO: FOR-2002-07-16-1139
DEPARTEMENT: MD (Miljøverndepartementet)
DEPARTEMENT: AAD (Arbeids- og administrasjonsdepartementet)
AVD/DIR: Forurensningsavd.
PUBLISERT: I 2002 hefte 14 (Merknader)
IKRAFTTREDELSE: 2002-07-30, 2004-07-30
SIST-ENDRET:
FOR-1997-08-21-996, FOR-1997-12-23-1497, FOR-1997-12-23-1494, FOR-1997-12-23-1493, FOR-1997-12-23-1496, FOR-1997-12-23-1495
GJELDER FOR: Norge, Svalbard
HJEMMEL: LOV-1977-02-04-4-§18, LOV-1977-02-04-4-§74, LOV-1976-06-11-79-§4, LOV-2002-06-14-20-§27

Forskriften

§ 3 Definisjoner

k) Allergifremkallende kjemikalier:

i) Kjemikalier somer i stand til å fremkalle allergi eller overfølsomhet i øynene eller i luftveiene, eller

ii) Kjemikalier som kan gi allergi ved hudkontakt

Ved ytterligere eksponering for kjemikallet oppstår det karakteristiske symptomer

Forskriften

§ 6 Plassering av farlige kjemikalier i fareklasser

Farlige kjemikalier plasseres i en eller flere av følgende **fareklasser**:

(- -)

- irriterende

- allergifremkallende

- kreftfremkallende

(- -)

Forskriften:

Vedlegg I. Kriterier for klassifisering av farlige kjemikalier

1. Testing og innhenting av opplysninger

- Helsefarlige stoffer skal bestemmes ved hjelp av metoder som er angitt i Annex V, del B til direktiv 67/548/EØF
- OECDs testmetoder, "OECD Guidelines for Testing of Chemicals", med tillegg, kan eventuelt benyttes
- Kjemikalier skal klassifiseres ut fra virkningen på mennesker eller virkningen av dyreforsøk

Forskriften:

Vedlegg I. Kriterier for klassifisering av farlige kjemikalier

3.1.1. Grunnlaget for klassifisering

- Kjemikalier skal klassifiseres ut fra virkningen på mennesker eller virkningen av dyreforsøk
- Ved ulikt resultat i mennesker og dyr, skal klassifisering skje ut fra toksiske effekter på mennesker
- Positive funn hos mennesker skal ikke svekkes av negative resultater i dyreforsøk
- Forsøk på mennesker frarådes og skal normalt ikke benyttes til å svekke resultater i dyreforsøk

Forskriften:

Vedlegg I. Kriterier for klassifisering av farlige kjemikalier

Data fra mennesker - forutsetninger:

- Effektene er påvist ved epidemiologiske studier
- Effektene er påvist gjennom vitenskapelig validerte kasusrapporter (enkeltundersøkelser)
- Effektene er påvist gjennom statistisk underbygde erfaringer (f. eks. giftinformasjonssentraler eller data vedrørende yrkessykdommer)

Forskriften:

3.5 Allergifremkallende egenskaper

R42 Kan gi allergi ved innånding

R43 Kan gi allergi ved hudkontakt

Definisjon ut fra eksponeringsveg, ikke ut fra mekanisme! Både R42 og R43 kan i prinsippet omfatte både IgE-mediert allergi ("Type I") og allergisk kontakteksem ("Type IV")

Forskriften:

3.5 Allergifremkallende egenskaper

R42 Kan gi allergi ved innånding

R43 Kan gi allergi ved hudkontakt

Definisjon ut fra eksponeringsveg, ikke ut fra mekanisme! Både R42 og R43 kan i prinsippet omfatte både IgE-mediert allergi ("Type I") og allergisk kontakteksem ("Type IV")

R42 Kan gi allergi ved innånding

"Stoffer og stoffblandinger som kan gi allergi eller annen overfølsomhet i luftveiene eller øynene, skal klassifiseres allergifremkallende og tildeles symbolet **Xn** med farebetegnelsen 'Helseskadelig' "

R43 Kan gi allergi ved hudkontakt

"Stoffer eller stoffblandinger som klassifiseres som allergifremkallende ved hudkontakt skal tildeles symbolet **Xi**, farebetegnelsen "Irriterende" - -

Grunnlaget for klassifisering

R42 Kan gi allergi ved innånding

R43 Kan gi allergi ved hudkontakt

- "kroppens følsomhet for et bestemt stoff er forhøyet i et eller flere av kroppens organer"
- "reagerer på stoffer som normalt ikke gir slike reaksjoner - - eller betydelig mindre doser -"
- "spesifikke immunologiske mekanismer (allergi) eller ikke-immunologiske mekanismer (annen overfølsomhet)"

R42 Kan gi allergi ved innånding

- dokumentasjon på at stoffet eller stoffblandingen kan forårsake spesifikk overfølsomhet ved innånding, eller
- hvis det er positive resultater fra relevante dyreforsøk, eller
- hvis stoffet er et isocyanat, unntatt (-dokumentert ufarlig ved innånding)

R42 Kommentar - 1

- normalt basert på erfaring fra mennesker
- normalt som astma, men andre overfølsomhetsreaksjoner som rhinitt (høysnue) eller alveolitt
- skal ha klinisk karakter av en allergisk reaksjon
- **ikke** nødvendig å påvise immunologiske mekanismer

R42 Kommentar - 2

Menneske:

- klinisk forhistorie og lungefunksjonsprøver satt i relasjon til eksponeringen
- bekreftet ved annen støttende dokumentasjon som
 - * strukturlikhet med kjente overfølsomhetsfremkallende stoffer
 - * in vivo immunologi (prikktest)
 - * serologi
 - * andre undersøkelser - spesifikk effekt
 - * bronkial provokasjonstest

R42 Kommentar - 3

Dyreforsøk:

- kan omfatte IgE-målinger for eksempel hos mus
- kan omfatte spesifikke lungereaksjoner hos marsvin

R43 Kan gi allergi ved hudkontakt

- praktiske erfaringer viser at stoffet kan forårsake overfølsomhet ved hudkontakt hos et betydelig antall personer
- positive resultater fra relevante dyreforsøk

R43 Kommentar - 1

Dokumentasjon fra mennesker:

- positive data fra lappetester, normalt fra mer enn en dermatologisk klinikk (kliniske materialer)
- epidemiologiske undersøkelser (andelen av de eksponerte som får symptomer tillegges stor vekt, selv om antallet er lite)
- positive data fra eksperimentelle undersøkelser på mennesker

R43 Kommentar - 2

Dokumentasjon fra mennesker:

Følgende er nok når det er støttende dokumentasjon:

- isolerte tilfeller av allergisk kontaktdermatitt
- epidemiologiske undersøkelser der bias og confounders (feilkilder) ikke helt kan utelukkes

R43 Kommentar - 3

Støttende dokumentasjon:

- data fra dyreforsøk som ikke helt tilfredsstillende kvalitetskriteriene, men som ligger nær grensen
- data fra ikke-standardiserte metoder
- struktur-aktivitetsstudier/databaser

R43 Dyreforsøk

Som positive forsøk regnes:

- reaksjon hos minst 30% av dyrene ved metoder av adjuvanstypen
- reaksjon hos minst 15% av dyrene ved enhver annen undersøkelsesmetode

R42 Kan gi allergi ved innånding

- ingen standardiserte, godkjente dyremodeller

Immunologisk kontakturticaria

For stoffer som gir kontakturticaria:

- Tilfredsstillende kriteriene for R42, bør opplysninger om kontakturticaria gis i form av relevante S-setninger (-) og utdypes i helse, miljø og sikkerhetsdatabladet
- Oppfylles ikke kriteriene for R42, bør klassifisering med R43 vurderes
- Ingen aksepterte dyremodeller finnes, vil måtte dokumenteres med data fra mennesker lik R43

Stoffblandinger

- Hvert stoff betraktes for seg
- Blandingen klassifiseres som allergifremkallende om ett eller flere stoffer er klassifisert allergifremkallende og
 - har konsentrasjon lik eller større enn angitt i tabell 7
 - er stoffet oppført i Stofflisten med spesifikk klassifiseringsgrense skal denne benyttes

Tabell 7

Stoffblandingers klassifisering ut fra stoffets/stoffenes klassifisering og konsentrasjon

Konsentrasjon (vektprosent) av stoffet i stoffblandingen	Klassifisering av stoffet	
	Xn (R42)	Xi (R43)
0% < kons. < 1%		
1% ≤ kons.	Xn (R42)	Xi (R43)

Tabell 7

Stoffblandingers klassifisering ut fra stoffets/stoffenes klassifisering og konsentrasjon

Konsentrasjon (vektprosent) av stoffet i stoffblandingen	Klassifisering av stoffet	
	Xn (R42)	Xi (R43)
0% < kons. < 1%		
1% ≤ kons.	Xn (R42)	Xi (R43)

