

DIN EN 455-3



ICS 11.140

Einsprüche bis 2022-04-04
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 455-3:2015-07

Entwurf

**Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch –
Teil 3: Anforderungen und Prüfung für die biologische Bewertung;
Deutsche und Englische Fassung prEN 455-3:2022**

Medical gloves for single use –
Part 3: Requirements and testing for biological evaluation;
German and English version prEN 455-3:2022

Gants médicaux non réutilisables –
Partie 3: Exigences et essais pour évaluation biologique;
Version allemande et anglaise prEN 455-3:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-02-04 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 79 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 455-3:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 205 „Nicht aktive Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-01-05 AA „Medizinische Einmalhandschuhe“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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 455-3:2015-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Ergänzung einer Anmerkung im Anwendungsbereich zum einmaligen Gebrauch;
- b) Ergänzung einer neuen Auflistung a) in 4.6, Kennzeichnung, zum einmaligen Gebrauch.

Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch – Teil 3: Anforderungen und Prüfung für die biologische Bewertung

Medical gloves for single use – Part 3: Requirements and testing for biological evaluation

Gants médicaux non réutilisables – Partie 3: Exigences et essais pour évaluation biologique

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Chemikalien	7
4.3 Endotoxine	8
4.4 Puderfreie Handschuhe	8
4.5 Extrahierbare Proteine	8
4.6 Kennzeichnung	8
5 Prüfverfahren	9
5.1 Endotoxine	9
5.2 Puder	10
5.3 Extrahierbare Proteine	10
6 Prüfbericht	10
Anhang A (normativ) Verfahren zur Bestimmung von in Wasser extrahierbaren Proteinen in Naturkautschukhandschuhen mit der modifizierten Lowry-Methode	11
A.1 Anwendungsbereich	11
A.2 Kurzbeschreibung	11
A.3 Reagenzien	11
A.4 Prüfeinrichtung	12
A.5 Messung der Proteinbindungskapazität	13
A.5.1 Allgemeines	13
A.5.2 Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen	13
A.5.3 Proteinbindungskapazität der Filterelemente	14
A.6 Durchführung	14
A.6.1 Allgemeines	14
A.6.2 Extraktionsverfahren	14
A.6.3 Proteinstandard	15
A.6.4 Fällung und Konzentration der Proteine	16
A.6.5 Farbentwicklung	16
A.6.6 Messung	16
A.7 Angabe der Ergebnisse	17
A.7.1 Berechnung	17
A.7.2 Ergebnisse	17
A.7.3 Statistische Informationen	19
A.8 Verweisungen	20
Anhang B (informativ) Immunologische Verfahren für die Messungen von Naturkautschuklatex-Allergenen	21
B.1 Einleitung	21
B.2 Naturkautschuklatex-Allergene in Gummiprodukten	21
B.3 Verfahren zur Messung von Naturkautschuklatex-Allergenen	22
B.3.1 Qualitative Verfahren	22
B.3.2 Semiquantitative Verfahren	22
B.3.3 Spezifische quantitative Verfahren	23
B.4 Zusammenfassende Bemerkungen	24
B.5 Verweisungen	24

Anhang C (informativ) Aminosäureanalyse (AAA, en: amino acid analysis) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, en: high pressure liquid chromatography)	27
C.1 Hintergrund	27
C.2 Kurzbeschreibung der Proteinbestimmung mittels HPLC	27
C.3 Material	27
C.4 Puffer und Lösungen	28
C.4.1 Norvalin-100	28
C.4.2 Norvalin-1	28
C.4.3 o-Phthaldialdehyd (OPA)	28
C.4.4 Boratpuffer	28
C.4.5 Stopp-Lösung	29
C.4.6 Phosphatpuffer	29
C.4.7 Lösemittel 1	29
C.4.8 Lösemittel 2	29
C.4.9 Natriumcarbonatlösung (0,1 M)	29
C.5 Hydrolyse	29
C.5.1 Proben	29
C.5.2 Standards	29
C.5.3 Inkubation (Hydrolyse)	29
C.5.4 Freie Aminosäuren	29
C.6 Analyse (HPLC)	29
C.6.1 Probenvorbereitung	29
C.6.2 Derivatisierung	30
C.6.3 HPLC	30
C.6.4 Berechnung	30
C.7 Beispiele	30
C.7.1 Standard	30
C.7.2 Handschuhextrakt	31
C.8 Vorteile und Nachteile der HPLC-Methode	31
C.8.1 Vorteile	31
C.8.2 Nachteile	31
C.9 Verweisungen	34
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745 [Abl. L 117]	36

Bilder

Bild A.1 — Extraktion von Handschuhen (Schnittdarstellung)	18
Bild A.2 — Typische Kalibrierkurve, gemessen in einem Spektralphotometer bei 750 nm mit einer Weglänge von 1 cm	19
Bild C.1 — Typische Chromatogramme eines Aminosäurestandards (A) und der Analyse eines Handschuhextrakts (35 µg Protein)	34

Tabellen

Tabelle A.1 — Statistische Informationen	20
Tabelle C.1 — Liste der Aminosäuren, die bei der HPLC-Analyse einer Standardlösung (Bild C.1 a)) und eines hydrolysierten Handschuhextrakts (siehe Bild C.1 b)) gefunden wurden	31
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und Anhang I der Verordnung (EU) 2017/745 [Abl. L 117]	37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 455-3:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 205 „Nicht aktive Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 455-3:2015 ersetzen.

Im Vergleich zur Vorgängerausgabe wurden die folgenden wesentlichen Änderungen vorgenommen:

- a) im Anwendungsbereich wurde eine Anmerkung bezüglich des einmaligen Gebrauchs hinzugefügt;
- b) in 4.6, Kennzeichnung, wurde ein neuer Listenpunkt a) zum einmaligen Gebrauch hinzugefügt.

EN 455 besteht unter dem allgemeinen Titel „*Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch*“ aus den folgenden Teilen:

- *Teil 1: Anforderungen und Prüfung auf Dichtheit*
- *Teil 2: Anforderungen und Prüfung der physikalischen Eigenschaften*
- *Teil 3: Anforderungen und Prüfung für die biologische Bewertung*
- *Teil 4: Anforderungen und Prüfung zur Bestimmung der Mindesthaltbarkeit*

Der folgende Teil ist derzeit in Vorbereitung:

- *Teil 5: Extrahierbare chemische Rückstände.*

Einleitung

Seit Jahren wird mit unterschiedlichen Prävalenzen über unerwünschte Reaktionen auf Proteine in Latexpunkten berichtet. Darüber hinaus werden in der wissenschaftlichen Literatur unerwünschte Reaktionen auf Chemikalien, Gleitmittel, Sterilisationsrückstände, Pyrogene oder andere Rückstände beschrieben. Am häufigsten wird über unerwünschte Reaktionen berichtet, die durch Handschuhe aus Naturkautschuklatex ausgelöst werden, wobei einige dieser Reaktionen aber auch bei Handschuhen aus synthetischen Polymeren beobachtet werden können.

EN ISO 10993 legt Anforderungen und Prüfverfahren für die biologische Bewertung von Medizinprodukten fest. Dort werden jedoch die unerwünschten Reaktionen, die beim Gebrauch von medizinischen Handschuhen ausgelöst werden können (wie spontane allergische Reaktionen), nicht speziell behandelt. Diese unerwünschten Reaktionen werden durch spezifische Allergene hervorgerufen, die in Handschuhen vorhanden sein können. Mehrere Faktoren beeinflussen das Risiko, solche Reaktionen auszulösen:

- a) Dauer und Häufigkeit des Hautkontaktes mit Handschuhen;
- b) Allergenexpositionen durch direkten Kontakt zu Haut und Schleimhäuten (insbesondere, wenn diese vorgeschädigt sind) sowie durch Einatmen von Partikeln;
- c) der okklusive Charakter der Wechselwirkung zwischen Handschuh und Haut während der Benutzung des Handschuhs.

Dieser Teil der EN 455 beschreibt Anforderungen und Prüfverfahren für die Bewertung der biologischen Sicherheit von medizinischen Handschuhen als Teil des Risikomanagementprozesses in Übereinstimmung mit EN ISO 10993.

Anwender und Entscheider, die eine Anleitung für die Auswahl, Lagerung und Benutzung von medizinischen Handschuhen zum einmaligen Gebrauch suchen, werden auf CEN/TR 16953:2017 verwiesen.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von EN 455 legt Anforderungen für die Bewertung der biologischen Sicherheit von medizinischen Handschuhen zum einmaligen Gebrauch fest. Er enthält Anforderungen an die Kennzeichnung und die Informationsangaben entsprechend den angewendeten Prüfverfahren.

ANMERKUNG Medizinische Handschuhe, die für den einmaligen Gebrauch gekennzeichnet sind, sind Medizinprodukte für den einmaligen Gebrauch nach der Verordnung (EU) 2017/745. Ein Medizinprodukt zum einmaligen Gebrauch bezieht sich auf ein Produkt, das für die Verwendung an einer einzigen Person an einem einzigen Tag vorgesehen ist.

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).

EN ISO 10993-1:2020, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems (ISO 10993-1:2018, einschließlich korrigierte Fassung 2018-10)*

EN ISO 10993-5:2009, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009)*

EN ISO 10993-10:2013, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Hautsensibilisierung (ISO 10993-10:2010)*

EN ISO 15223-1:2021, *Medizinprodukte — Symbole zur Verwendung im Rahmen der vom Hersteller bereitzustellenden Informationen — Teil 1: Allgemeine Anforderungen (ISO 15223-1:2021)*

EN ISO 21171:2006, *Medizinische Handschuhe — Bestimmung des entfernbaren Oberflächenpuders (ISO 21171:2006)*

European Pharmacopoeia, General chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins: publisher EDQM — Council of Europe; 7 allée Kastner, CS 30026, F-67081 Strasbourg; France <http://www.edqm.eu/>

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

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

3.1

Endotoxine

Lipopolysaccharide, die aus der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien stammen

Anmerkung 1 zum Begriff: Endotoxine gehören zu den Pyrogenen. Endotoxine können durch bakterielle Verunreinigungen der Ausgangsmaterialien, speziell durch das während der Herstellung benutzte Prozesswasser und durch manuelle Bearbeitung der Handschuhe, auftreten.

3.2

Puder

jegliches nicht wasserlösliche Material auf der Oberfläche eines Handschuhs, das durch Waschen unter den Prüfbedingungen entfernt wird

[QUELLE: EN ISO 21171:2006, 3.1]

Anmerkung 1 zum Begriff: Dazu gehören sowohl beabsichtigt hinzugefügter Puder und andere Herstellungszusätze als auch unbeabsichtigt vorhandene Materialien, die sich leicht von der Oberfläche des Handschuhs entfernen lassen. Für die Anwendung dieses Dokuments gilt jeder Handschuh, der 2 mg oder weniger Puder enthält, als puderfrei und jeder Handschuh mit mehr als 2 mg als gepudert (für Anforderungen siehe 4.4).

3.3

Verfahrensgrenzwert

höchster Wert, der bei einem validierten Herstellungsprozesses wahrscheinlich erzielt wird

3.4

allergene Proteine

Proteine, die allergische Reaktionen des Typs I auslösen können

3.5

extrahierbare Proteine

aus dem Endprodukt extrahierbare wasserlösliche Proteine und Peptide

3.6

Pyrogene

Substanzen, die bei Kaninchen Fieber verursachen und ebenfalls beim Menschen Fieber und andere unerwünschte Reaktionen hervorrufen könnten

4 Anforderungen

4.1 Allgemeines

Basierend auf EN ISO 10993-1:2020 werden medizinische Handschuhe als Hilfsmittel mit kurzzeitiger Kontaktdauer eingestuft und erfordern die Einhaltung von EN ISO 10993-5:2009 und EN ISO 10993-10:2013.

4.2 Chemikalien

Bei den Chemikalien, die entsprechend dem Anwendungsbereich dieses Dokument als relevant eingestuft werden, handelt es sich um Substanzen, die in einem Schritt des Herstellungsprozesses oder bei der Lagerung zugesetzt wurden oder entstanden sind, und die im Endprodukt vorhanden sein können

Das kann Gleitmittel, chemische Beschichtungen und Sterilisationsmittel beinhalten. Verschiedene chemische Inhaltsstoffe, von denen einige als Auslöser von Typ-IV-Allergien gelten, werden häufig während der Handschuhherstellung verwendet. Art und Menge der zugesetzten und verbleibenden Chemikalien sind unterschiedlich.

Handschuhe dürfen nicht mit Talkum (Magnesiumsilikat) gepudert sein.

Der Hersteller muss auf Anfrage eine Liste von chemischen Inhaltsstoffen zur Verfügung stellen, die im Herstellungsprozess zugesetzt wurden oder bekanntermaßen im Produkt enthalten sind, wie z. B. Akzeleratoren, Antioxidantien, Biozide, und von denen aufgrund von aktuellen Daten bekannt ist, dass sie unerwünschte gesundheitliche Folgen hervorrufen.

Der Hersteller muss auf Anfrage den Nachweis darüber erbringen, welche Schritte unternommen wurden, um das Risiko der Endverbraucher gegenüber der Exposition chemischer Stoffe, die im Herstellungsprozess verwendet werden und die basierend auf den aktuellsten Daten gesundheitsschädlich sind, zu minimieren.

Die Hersteller dürfen das Nichtvorhandensein einer Substanz nur erklären, wenn diese Substanz an keiner Stelle des Herstellungsprozesses verwendet wurde. Zudem dürfen keine Verbindungen bei der Herstellung des Produkts verwendet werden, von denen bekannt ist, dass sie eine Substanz bilden, über die eine solche Erklärung abgegeben wurde.

4.3 Endotoxine

Wenn der Hersteller seine Handschuhe mit „niedriger Endotoxingehalt“ kennzeichnet, muss die Endotoxin-Kontamination der sterilen Handschuhe unter Anwendung des Prüfverfahrens von 5.1 überwacht werden. Solchermaßen gekennzeichnete Handschuhe dürfen nicht mehr als 20 Endotoxin-Einheiten je Handschuhpaar enthalten.

4.4 Puderfreie Handschuhe

Die gesamte Menge an Puderrückstand, die nach dem in 5.2 beschriebenen Prüfverfahren bestimmt wurde, darf für puderfreie Handschuhe nicht mehr als 2 mg je Handschuh betragen. Jeder Handschuh, der mehr als 2 mg Puder enthält, ist ein gepuderter Handschuh.

4.5 Extrahierbare Proteine

Der Hersteller muss versuchen, die Menge der extrahierbaren Proteine auf ein Mindestmaß zu verringern.

Der Hersteller muss den Verfahrensgrenzwert für extrahierbare Proteine in den fertigen Handschuhen, die Naturkautschuklatex enthalten, nach dem in 5.3 festgelegten und Anhang A beschriebenen Prüfverfahren überwachen. Die Dokumentation dieser Ergebnisse muss aufbewahrt werden. Die Prüfergebnisse und Angaben zum angewendeten Prüfverfahren müssen auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

ANMERKUNG Dieses Dokument legt ein Messverfahren fest, das in grober Annäherung den Allergengehalt bestimmt, z. B. extrahierbare Proteine. Es besteht kein direkter Zusammenhang zwischen extrahierbaren Proteinen und dem Allergengehalt. Quantitative Verfahren zur Messung von allergenen Proteinen sind in Anhang B beschrieben.

4.6 Kennzeichnung

Zusätzlich zu den maßgebenden Symbolen in EN ISO 15223-1:2021 gelten die folgenden Anforderungen:

- a) Medizinische Handschuhe müssen für den einmaligen Gebrauch an einer einzigen Person für eine einzige Behandlung gekennzeichnet sein.

ANMERKUNG 1 Dies entspricht der Verordnung (EU) 2017/745.

Die Produktkennzeichnung von medizinischen Handschuhen darf keine Angaben enthalten, die eine Desinfektion, Wiederaufbereitung oder Wiederverwendung nahelegen.

- b) Alle medizinischen Handschuhe mit chemischen Inhaltsstoffe wie Akzeleratoren, Antioxidantien und Bioziden, die im Herstellungsprozess zugesetzt wurden oder bekanntermaßen im Produkt enthalten sind, und die als Auslöser von Typ-IV-Allergien gelten, müssen mindestens auf der Verpackung der kleinsten Verpackungseinheit wie folgt gekennzeichnet sein.

Die Kennzeichnung muss den folgenden oder einen gleichbedeutenden Warnhinweis enthalten: „(Produkt) enthält Chemikalien, die Typ-IV-Allergien auslösen können“.

- c) Die Produktkennzeichnung aller medizinischen Handschuhe mit chemischen Inhaltsstoffe wie Akzeleratoren, Antioxidantien und Bioziden, die im Herstellungsprozess zugesetzt wurden oder bekanntermaßen im Produkt enthalten sind, und die als Auslöser von Typ-IV-Allergien gelten, darf Folgendes nicht enthalten:

— Angaben, die eine relative Sicherheit vorgeben, wie geringe Allergenität, hypoallergen oder niedriger bzw. verringerter Gehalt an Typ-IV-Allergenen;

— jede ungerechtfertigte Angabe oder irreführende Behauptungen über das Nichtvorhandensein oder das Vorhandensein von Allergenen.

- d) Medizinische Handschuhe, die Naturkautschuklatex enthalten, müssen mindestens auf der Verpackung der kleinsten Verpackungseinheit mit dem Symbol entsprechend EN ISO 15223-1:2021 für Latex gekennzeichnet sein (Bezugsnummer des Symbols: 5.4.5).

Die Kennzeichnung muss den folgenden oder einen gleichbedeutenden Warnhinweis zusammen mit dem Symbol enthalten: „(Produkt) enthält Naturkautschuklatex, das allergische Reaktionen einschließlich anaphylaktischer Reaktionen auslösen kann“.

- e) Die Kennzeichnung muss einen deutlichen Hinweis enthalten, ob der Handschuh gepudert oder puderfrei ist.
- f) Sterile gepuderte Handschuhe müssen mit dem folgenden oder einem gleichbedeutenden Hinweis gekennzeichnet sein „ACHTUNG: Oberflächenpuder muss vor dem operativen Eingriff unter aseptischen Bedingungen entfernt werden, um das Risiko von unerwünschten Gewebereaktionen zu minimieren“.

ANMERKUNG 2 Dieser Warnhinweis kann auf der inneren Einschlagverpackung angebracht werden.

- g) Medizinische Handschuhe, die Naturkautschuklatex enthalten, dürfen folgende Produktkennzeichnungen nicht aufweisen:

— Angaben, die eine relative Sicherheit vorgeben, wie geringe Allergenität, hypoallergen oder niedriger Proteingehalt;

— jede ungerechtfertigte Angabe über das Vorhandensein von Allergenen.

- h) Wenn der Hersteller die Handschuhe mit dem Proteingehalt kennzeichnet, muss der Verfahrensgrenzwert angegeben werden, der entsprechend 5.3 gemessen wurde.

ANMERKUNG 3 Die Angabe von Proteinwerten, die niedriger als 50 µg/g sind, ist nicht erlaubt. Niedrigere Angaben können wegen der zu erwartenden Prozessvariation in der Herstellung und in Ringversuchen nicht als verlässliche Werte angesehen werden.

5 Prüfverfahren

5.1 Endotoxine

Wenn keine nicht-entfernbarer Interferenzen mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) vorhanden sind, müssen Auswahl, Validierung und Ausführung, wie in der Europäischen Pharmakopöe, Monograph 2.6.14 „Bakterielle Endotoxine“ beschrieben, durchgeführt werden. Die Ergebnisse müssen in Endotoxin-Einheiten (EU) je Handschuhpaar angegeben werden.

ANMERKUNG 1 Wenn nicht-entfernbarer Interferenzen mit dem LAL-Test vorhanden sind, kann der Gehalt an bakteriellem Endotoxin nicht exakt bestimmt werden.

Die Mindestanzahl der zu prüfenden Handschuhpaare wird abhängig von der Chargengröße wie folgt empfohlen: 2 Paar Handschuhe bei einer Chargengröße von unter 30, 3 Paar bei 30 bis 100 Stück je Charge sowie 3 % einer Charge mit mehr als 100 Handschuhen und bis höchstens 10 Paar Handschuhe je Charge.

Die Außenseite eines Handschuhpaares wird mit 40 ml endotoxinfreiem Wasser (Wasser-LAL, Europäische Pharmakopöe) für mindestens 40 min und höchstens 60 min bei 37 °C bis 40 °C extrahiert. Dabei muss sichergestellt sein, dass die gesamte Oberfläche mit dem Extraktionsmedium Kontakt hat. Wenn nötig, wird dieser Extrakt für 15 min bei 2 000 g zentrifugiert, um Partikel zu entfernen; anschließend wird Überstand dekantiert und sofort für die Messung von Endotoxinen eingesetzt.

ANMERKUNG 2 Es sind auch andere Verfahren zur Bestimmung von Endotoxinen verfügbar; diese können für die Routinequalitätskontrolle verwendet werden, wenn sie validiert wurden und eine Korrelation zum Referenzverfahren in diesem Dokument nachgewiesen wurde.

5.2 Puder

Zur Bestimmung der Puderrückstände ist das in EN ISO 21171:2006, Abschnitt 7 und Abschnitt 9, beschriebene Prüfverfahren anzuwenden.

5.3 Extrahierbare Proteine

Als Prüfverfahren zur analytischen Bestimmung der extrahierbaren Proteine muss entweder die modifizierte Lowry-Methode nach Anhang A oder eine andere auf geeignete Weise validierte Methode, die mit der modifizierten Lowry-Methode korreliert, angewendet werden.

ANMERKUNG 1 Ein Beispiel einer validierten analytischen Methode wird in Anhang C angegeben.

ANMERKUNG 2 Die immunologischen Methoden in Anhang B sind zurzeit nicht gegen die modifizierte Lowry-Methode validiert, können aber mit klinischen Daten korrelieren.

6 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- Verweisung auf diesen Teil von EN 455;
- den Handschuhtyp und die Nummer der Herstellungscharge;
- Name und Anschrift des Herstellers oder des Vertreibers und des Prüflabors, wenn unterschiedlich;
- Datum, an dem die Prüfung durchgeführt wurde;
- Beschreibung des angewendeten Prüfverfahrens;
- die Prüfergebnisse.

Anhang A (normativ)

Verfahren zur Bestimmung von in Wasser extrahierbaren Proteinen in Naturkautschukhandschuhen mit der modifizierten Lowry-Methode

A.1 Anwendungsbereich

Dieses Verfahren ist zur Messung der Menge an in Wasser extrahierbaren Proteinen in medizinischen Handschuhen aus Naturkautschuk bestimmt. Es wurde in Ringversuchen validiert. Die untere Bestimmungsgrenze liegt abhängig von der Masse des Handschuhs bei etwa 10 µg Protein je g Handschuh (d. h. 2 µg Protein je ml Extrakt).

Einige Chemikalien, wie oberflächenaktive Substanzen, Akzeleratoren und Antioxidantien, die dem Naturkautschuklatex während der Handschuhherstellung zugesetzt wurden, können die Farbentwicklung während der Messung stören. Die Farbentwicklung kann dabei durch unterschiedliche Substanzen verringert oder verstärkt werden. Wenn das Verfahren zu offensichtlich falschen Ergebnissen führt, kann eine validierte Aminosäureanalyse zur Bestimmung herangezogen werden (ein Beispiel ist in Anhang C angegeben).

Personen, die dieses Verfahren anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein.

ANMERKUNG Für dieses Verfahren werden nicht alle Sicherheitsprobleme, die bei seiner Anwendung auftreten können, angesprochen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die notwendigen Sicherheits- und Gesundheitsvorschriften zu beachten und die Einhaltung aller nationalen Gesetze sicherzustellen.

A.2 Kurzbeschreibung

Die wasserlöslichen Proteine werden mit einer Pufferlösung extrahiert und anschließend in Gegenwart von Natriumdesoxycholat mit Säuren gefällt, um sie zu konzentrieren und von wasserlöslichen Substanzen, welche die Messung stören könnten, abzutrennen. Der Proteinniederschlag wird in Natronlauge wieder gelöst und die Proteinmenge wird kolorimetrisch mit einer modifizierten Lowry-Methode bestimmt. Die Messung beruht auf der Bildung eines charakteristischen blauen Farbstoffs durch die Reaktion der Proteine mit Kupfer- und Folin-Reagens in einer alkalischen Lösung. Die spektralphotometrischen Messungen erfolgen bei einer festen Wellenlänge im Bereich von 600 nm bis 750 nm.

A.3 Reagenzien

A.3.1 Allgemeines

Als Wasser sollte immer doppelt destilliertes Wasser oder Wasser von vergleichbarer Qualität verwendet werden. Alle anderen Chemikalien sollten von analytischer Qualität sein.

A.3.2 Extraktionsmittel

A.3.2.1 N-tris-[Hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES), Heminatriumsalz.

A.3.2.2 Extraktionspuffer, 0,1 M, 24 g TES (A.3.2.1) werden in 1 l Wasser gelöst. Es kann jedes äquivalente Puffersystem verwendet werden, solange die Lösung eine ausreichende Pufferkapazität besitzt, um einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,2$ im Handschuhextrakt sicherzustellen.

Es wird eine ausreichende Menge an Pufferlösung hergestellt, um damit die Extraktionen des Handschuhs (A.6.2) durchzuführen, die Proteinstandardlösungen (A.6.3.2) herzustellen und die Leerwerte zu entnehmen.

A.3.2.3 Farbstofflösung, Bromphenolblau, Natriumsalzlösung, 100 mg Bromphenolblau werden in 1 l Wasser gelöst. Alle vier Wochen wird eine neue Lösung hergestellt.

A.3.3 Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry

ANMERKUNG Die Reagenzien können entweder aus handelsüblichen Chemikalien selbst hergestellt werden [1] oder als handelsübliche Kits bezogen werden. Das Verfahren für dieses Dokument wurde mit einem handelsüblichen Kit¹ validiert.

A.3.3.1 Reagens A, Kupfer-Reagens (alkalische Lösung von Kupfertartrat oder -citrat).

A.3.3.2 Reagens B, verdünntes Folins-Reagens.

A.3.4 Natriumhydroxid, wässrige Lösung, 0,1 M.

A.3.5 Natriumdesoxycholat (DOC), 3,47 mM: 0,15 g Natriumdesoxycholat werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung nicht länger als vier Wochen nach Herstellung verwenden.

A.3.6 Trichloressigsäure (TCA), 4,4 mM in Wasser: 72 g TCA werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

A.3.7 Phosphorwolframsäure (PTA), 72 g PTA werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung nicht länger als vier Wochen nach Herstellung verwenden.

A.3.8 Ovalbumin, Hühnerei², lyophilisiert, salzfrei.

A.4 Prüfeinrichtung

A.4.1 Synthetische Handschuhe, puderfrei.

A.4.2 Zentrifuge, geeignet, um mindestens 6 000 g zu erreichen.

A.4.3 Zentrifugenröhrchen, 30-ml- oder 50-ml-Polypropylenröhrchen mit einer niedrigen Proteinbindungskapazität von 10 µg je Röhrchen oder weniger. Wegen der Oberflächenabsorption von Proteinen keine Glasröhrchen verwenden.

ANMERKUNG Eine Methode zur Bestimmung der Proteinbindungskapazität ist in A.5 beschrieben.

A.4.4 Filterelemente, zum einmaligen Gebrauch, mit 0,22 µm Porengröße und niedriger Proteinbindungskapazität von 10 µg je Filter oder weniger.

ANMERKUNG Eine Methode zur Bestimmung der Proteinbindungskapazität ist in A.5 beschrieben.

A.4.5 Einmalspritzen, 20 ml, aus Polyethylen oder Polypropylen.

A.4.6 Mikroröhrchen, 2 ml, aus Polypropylen.

A.4.7 Quarzküvetten, 10 mm optische Weglänge.

1 Lowry Micro DC Protein Assay Kit (Katalog-Nr. 500-0116) von BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, USA. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

2 Dieses Ovalbumin wurde aus frischem Hühnereiweiß durch Ammoniumsulfatfraktionierung und wiederholte Umkristallisierung bei einem pH-Wert von 4,5 hergestellt; z. B. Sigma A 5503, chicken egg albumin, Grade V, von Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

A.4.8 Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Flachboden, aus Polystyrol oder Einmalküvetten (A.4.9).

A.4.9 Einmalküvetten, 1,5-ml-Halbmikroküvetten, 10 mm Weglänge, aus Polystyrol.

A.4.10 Mikrotiterplatten-Lesegerät, das bei einer Wellenlänge im Bereich von 600 nm bis 750 nm betrieben wird.

A.4.11 Spektralphotometer, mit einem Wellenlängenbereich von 230 nm bis 750 nm.

A.4.12 Vortexmischer.

A.4.13 Mikropipetten, mit Einmalspitzen aus Polypropylen.

A.4.14 Klammern, zum wasserdichten Verschließen der Handschuhe während der Extraktion. Es werden jeweils 2 mit Schaumgummi belegte zusammenschraubbare Aluminiumstangen (siehe Bild A.1) oder 170 mm lange Plastikklammern für die Hämodialyse empfohlen.

A.4.15 Schüttler.

A.5 Messung der Proteinbindungskapazität

A.5.1 Allgemeines

Es werden grundsätzlich Einmalpolypropylengefäße empfohlen (von denen bekannt ist, dass sie eine niedrige Proteinbindungskapazität haben). Die Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen oder Filterelementen muss für jede neue Charge vor dem Gebrauch mit den folgenden Methoden gemessen werden. Die Messung muss innerhalb eines Tages durchgeführt werden.

A.5.2 Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen

A.5.2.1 In einem Zentrifugenröhrchen (A.4.3) werden 30 ml einer Referenzlösung mit 10 µg/ml Ovalbumin durch Verdünnung aus der Proteinstammlösung (A.6.3.1) mit Extraktionspuffer (A.3.2.2) hergestellt.

A.5.2.2 Jeweils 10 ml der Ovalbuminlösung (A.5.2.1) werden in zwei frische Zentrifugenröhrchen überführt und auf einem Schüttler (A.4.15) so bewegt, dass die gesamte Oberfläche des Röhrchens benetzt wird. Nach 30 min werden die beiden Lösungen in zwei frische Zentrifugenröhrchen übergeführt und erneut geschüttelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis beide Lösungen jeweils fünf Röhrchen passiert haben. Diese verbleibenden Prüflösungen werden aufbewahrt.

A.5.2.3 Die Proteinkonzentrationen der Referenzlösung und der beiden Prüflösungen werden in Dreifachbestimmung mit der nach A.6.4 bis A.6.6 beschriebenen Methode gemessen.

A.5.2.4 Die mittlere absorbierte Ovalbuminmenge, O , wird mit Gleichung (A.1) berechnet:

$$O = \frac{10(R-T)}{5} = 2(R - T) \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist

O das absorbierte Ovalbumin, in µg/Röhrchen;

R der Mittelwert der Dreifachbestimmung der Ovalbuminkonzentration der Referenzlösung, in µg/ml;

T der Mittelwert der Ovalbuminkonzentration in den Prüflösungen nach der Passage durch die Röhrchen (d. h. der Mittelwert von sechs Messungen), in µg/Röhrchen.

Die absorbierte Ovalbuminmenge (O) muss weniger als 10 µg je Röhrchen betragen, anderenfalls sind die Röhrchen für diese Bestimmungsmethode nicht verwendbar.

A.5.3 Proteinbindungskapazität der Filterelemente

A.5.3.5 In einem Zentrifugenröhrchen (A.4.3) werden 30 ml einer Referenzlösung mit 10 µg/ml Ovalbumin durch Verdünnung aus der Proteinstammlösung (A.6.3.1) mit Extraktionspuffer (A.3.2.2) hergestellt.

A.5.3.6 Es werden zwei Stapel aus jeweils fünf Filterelementen (A.4.4) hergestellt. 10 ml Referenzlösung werden durch jeden Filterstapel in ein Zentrifugenröhrchen (A.4.3) filtriert.

A.5.3.7 Die Proteinkonzentrationen der Referenzlösung und der beiden Prüflösungen werden in Dreifachbestimmung mit der nach A.6.4 bis A.6.6 beschriebenen Methode gemessen.

A.5.3.8 Die mittlere absorbierte Ovalbuminmenge, O , wird mit Gleichung (A.1) berechnet:

$$O = \frac{10(R-T)}{5} = 2(R - T) \quad (A.1)$$

Dabei ist

O das absorbierte Ovalbumin, in µg/Röhrchen;

R der Mittelwert der Dreifachbestimmung der Ovalbuminkonzentration der Referenzlösung, in µg/ml;

T der Mittelwert der Ovalbuminkonzentration in den Prüflösungen nach der Passage durch die Filterelemente (d. h. der Mittelwert von sechs Messungen), in µg/Röhrchen.

Die absorbierte Ovalbuminmenge (O) muss weniger als 10 µg je Filter betragen, anderenfalls sind die Filter für diese Bestimmungsmethode nicht verwendbar.

A.6 Durchführung

A.6.1 Allgemeines

Das Verfahren umfasst die Extraktion der Handschuhe mit anschließender Reinigung und fünffacher Konzentrierung des Extraktes. Der Extrakt wird mithilfe einer Eichkurve bestimmt, die mit in gleicher Weise konzentrierten Standardproteinlösungen erstellt wurde.

Bei dem beschriebenen Extraktionsverfahren werden die Innenseite eines Handschuhs und die Außenseite eines zweiten Handschuhs gleichzeitig extrahiert. Dadurch wird das Extraktionsvolumen auf 25 ml minimiert und ein Proteinverlust an der Oberfläche des Extraktionsgefäßes vermieden, da der Puffer nur mit den Handschuhen in Kontakt kommt.

ANMERKUNG Alternative Extraktionsverfahren können angewendet werden, wenn sie gegen diese Methode validiert wurden. Ein Ringversuch mit ausgesuchten Laboratorien in Europa und den USA kam zu vergleichbaren Ergebnissen mit dem ASTM-Standard D5712:1995 [2], wenn Handschuhstücke 2 h mit TES-Puffer, pH-Wert 7,4, bei 25 °C extrahiert wurden.

A.6.2 Extraktionsverfahren

A.6.2.1 Bei der Handhabung der zu extrahierenden Handschuhproben werden synthetische Handschuhe (A.4.1) getragen.

Acht Handschuhe derselben Größe aus derselben Charge werden in 4 Paare aufgeteilt. Im Fall von handspezifischen Handschuhen werden 4 rechte und 4 linke Handschuhe ausgewählt, die in zwei rechte und zwei linke Paare aufgeteilt werden.

Auf der Stulpe eines Handschuhs je Paar wird ein Punkt markiert, der (200 ± 10) mm von der Mittelfingerspitze entfernt ist, und der Handschuh wird auf 0,1 g gewogen (m_1). Für jedes Paar wird der zweite Handschuh nun in den markierten Handschuh eingeführt, so dass sie genau wie in Bild A.1 a) dargestellt ineinanderpassen.

ANMERKUNG Der Vorgang für das Ineinanderschieben der beiden Handschuhe ist nicht von entscheidender Bedeutung, vorausgesetzt, dass die Handschuhe so wenig wie möglich beeinflusst werden. Hierzu können die Handschuhe mithilfe eines Stabs in Daumen und kleinem Finger des inneren Handschuhs in die entsprechenden Finger des zweiten Handschuhs geschoben werden. Anschließend werden die anderen drei Finger mit dem Stab nachgeschoben.

A.6.2.2 In den inneren Handschuh wird eine ausreichende Menge der Farbstofflösung (A.3.2.3) gefüllt, um alle 5 Finger des Handschuhs zu füllen. Zwischen den inneren und den äußeren Handschuh werden 25 ml Extraktionspuffer (A.3.2.2) bei (25 ± 5) °C eingefüllt. Bei großen Handschuhen darf dieses Volumen auf höchstens 50 ml erhöht werden. Luftblasen werden nun so weit wie möglich entfernt und die Handschuhe mit der Klammer (A.4.14) an der 20-cm-Markierung, wie in Bild A.1 b), dargestellt wasserdicht verschlossen.

A.6.2.3 Die Handschuhe werden auf einem Schüttler (A.4.15) befestigt und für (120 ± 5) min bei (25 ± 5) °C geschüttelt.

A.6.2.4 Die Klammer wird anschließend entfernt und die Handschuhe werden vorsichtig getrennt. Dabei wird darauf geachtet, dass der Extrakt nicht mit der Farbstofflösung verunreinigt wird. Ist der Extrakt blau gefärbt, so ist er zu verwerfen und die Extraktion mit einem neuen Paar Handschuhen zu wiederholen.

A.6.2.5 Der Extrakt wird nun vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen (A.4.3) überführt und entweder durch Zentrifugation bei mindestens 2 000 g für 15 min, oder durch Filtration mit einem Einmalfilter (A.4.4), oder, wenn notwendig, auch durch eine Kombination von beidem geklärt. Die entstandene klare Lösung wird bei 2 °C bis 8 °C gelagert, wenn sie innerhalb der nächsten 48 h analysiert wird, oder ein Aliquot der Lösung wird bei -18 °C oder niedriger für bis zu 2 Monate bis zur Analyse eingefroren.

A.6.2.6 Die Stulpe wird an der 20-cm-Markierung von dem extrahierten äußeren Handschuh abgeschnitten, die Flüssigkeit mit einem Papiertuch abgewischt und der Handschuh bei Raumtemperatur getrocknet; anschließend wird auf 0,1 g gewogen (m_2). Die Masse (m) des extrahierten Teils des Handschuhs wird mit Gleichung 000 bestimmt:

$$m = m_1 - m_2 \quad (\text{A.2})$$

A.6.3 Proteinstandard

A.6.3.1 Proteinstammlösung

Es wird eine Ovalbuminlösung mit einer nominalen Konzentration von 1 mg/ml durch Lösen von 25 mg Ovalbumin (A.3.8) in 25 ml Extraktionspuffer (A.3.2.2) hergestellt. Die Lösung wird durch ein 0,22-µm-Filter (A.4.4) filtriert; anschließend wird die wahre Ovalbuminkonzentration im UV-Spektralphotometer über die Extinktion bei 280 nm in einer Quarzküvette (A.4.7) bestimmt. Die Extinktion wird durch 0,715³ dividiert, um die exakte Konzentration in mg/ml zu erhalten. Die Lösung ist gekühlt für 2 Tage oder tiefgekühlt bei -18 °C für 2 Monate haltbar. Aufgetaut werden muss sie für 15 min bei 45 °C.

A.6.3.2 Proteinstandardlösungen

Aus der Proteinstammlösung (A.6.3.1) werden durch serielle Verdünnung mit Extraktionspuffer (A.3.2.2) Lösungen mit nominalen Konzentrationen von etwa 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 2 µg/ml hergestellt. Als Leerwertlösung wird Extraktionspuffer verwendet. Die Lösung ist gekühlt für 2 Tage oder tiefgekühlt bei -18 °C für 2 Monate haltbar. Aufgetaut werden muss sie für 15 min bei 45 °C.

3 Mit einem Molekulargewicht von 43 000 D und einem molaren Extinktionskoeffizienten von 30 745 bei 280 nm sowie einem pH-Wert von 7,4 ist die Extinktion von 1 mg/ml Ovalbumin in 0,1 M TES, pH-Wert 7,4, bei einer Weglänge von 1 cm gleich 0,715 [3].

A.6.4 Fällung und Konzentration der Proteine

A.6.4.1 Das Verfahren wird als Doppelbestimmung bei (25 ± 5) °C durchgeführt.

A.6.4.2 Jeweils 1 ml der Leerwertlösung, der Proteinstandardlösungen (A.6.3.2) und der vier Handschuhextrakte (A.6.2.5.) werden in Mikroröhrchen (A.4.6) überführt. Es werden jeweils 0,1 ml DOC (A.3.5) hinzugegeben, und nach dem Mischen mit dem Vortexmischer werden sie für 10 min stehengelassen. Anschließend werden jeweils 0,1 ml TCA (A.3.6) und 0,1 ml PTA (A.3.7) zugegeben, und nach dem Mischen mit dem Vortexmischer werden sie für weitere 30 min stehengelassen.

A.6.4.3 Es wird bei 6 000 g für 15 min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und für 5 min ablaufen gelassen, indem jedes Zentrifugenröhrchen kopfüber auf ein Saugpapier gestellt wird.

A.6.4.4 Zu jeder Probe, einschließlich der Leerwertlösung, werden 0,2 ml der 0,1-M-Natriumhydroxidlösung (A.3.4) gegeben. Durch Mischen auf einem Vortexmischer werden die gefällten Proteine wieder gelöst. Es wird dabei sichergestellt, dass die Proteine vollständig zu einer klaren Lösung gelöst werden. Je nach Handschuh ist es manchmal erforderlich, dass die Probe über Nacht gekühlt bei (5 ± 3) °C stehen gelassen wird. Wenn ein Präzipitat zurückbleibt, wird insgesamt 1 ml Natriumhydroxidlösung in 0,2-ml-Schritten zugegeben und für die weiteren Schritte wird eine Teilprobe von 0,2 ml verwendet. Es kann hilfreich sein, den Extrakt solcher Proben vor der Fällung zu verdünnen.

Die Konzentrierung des Proteins durch Fällung und wiederholtes Lösen soll das Protein reinigen und von Störsubstanzen befreien. Es ist dabei unvermeidbar, dass während dieses Vorgangs eine gewisse Proteinmenge verloren geht; für die Durchführung der Prüfung wird dabei angenommen, dass aus den Proteinstandardlösungen und den Probenextrakten dieselbe prozentuale Menge verloren geht. Die Verlustmenge sollte jedoch so gering wie möglich gehalten werden, da große Verluste nicht reproduzierbar sind.

A.6.5 Farbentwicklung

A.6.5.1 Die hier beschriebene Methode ist auf das handelsübliche Kit, das zur Validierung verwendet wurde, ausgerichtet. Andere Kits oder aus handelsüblichen Chemikalien selbst hergestellte Reagenzien können andere Volumina und Inkubationszeiten erfordern.

A.6.5.2 Zu jeder Probe des wieder gelösten Proteins, einschließlich der Leerwertlösung, in den Mikroröhrchen werden 0,125 ml Reagens A (A.3.3.1) hinzugegeben. Es wird gründlich gemischt. Anschließend wird jeweils 1 ml Reagens B (A.3.3.2) hinzugegeben, die Röhrchen werden verschlossen, mit dem Vortexmischer gemischt und bis zur vollständigen Farbentwicklung 30 min inkubiert. Sollten zu diesem Zeitpunkt noch Präzipitate vorhanden sein, wird die Probe vor der Messung der Extinktion zentrifugiert oder filtriert, um diese Präzipitate zu entfernen.

A.6.6 Messung

A.6.6.1 Mikrotiterplatten-Lesegerät

In die Näpfchen einer Mikrotiterplatte (A.4.8) wird ein einheitliches Volumen der Lösung (A.6.5.2) pipettiert, so dass die Näpfchen nahezu vollständig gefüllt sind (z. B. 490 µl in ein 500 µl fassendes Näpfchen). Die Extinktion wird gegen den Leerwert bei einer festen Wellenlänge zwischen 600 nm und 750 nm gemessen.

ANMERKUNG Um einheitliche Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, dass Standardlösungen und Handschuhextrakte zusammen innerhalb 1 h nach der vollständigen Farbentwicklung gemessen werden.

A.6.6.2 Spektralphotometer

Die Lösung (A.6.5.2) wird in eine Küvette (A.4.9) überführt und die Extinktion gegen den Leerwert bei einer festen Wellenlänge zwischen 600 nm und 750 nm gemessen.

ANMERKUNG Um einheitliche Ergebnisse zu erzielen, ist es wichtig, dass Standardlösungen und Handschuhextrakte zusammen innerhalb 1 h nach der vollständigen Farbentwicklung gemessen werden.

A.7 Angabe der Ergebnisse

A.7.1 Berechnung

A.7.1.1 Kalibrierkurve

Aus der zweifachen Bestimmung wird die mittlere Extinktion berechnet. Wenn die einzelnen Werte mehr als 20 % voneinander abweichen, wird die Bestimmung wiederholt. Die Kalibrierkurve wird durch Auftragen der mittleren Extinktionsmesswerte gegen die wahren Konzentrationen der Original-Proteinstandardslösungen dargestellt, wie in Bild A.2 gezeigt. Die Kalibrierkurve sollte im Bereich von 0 µg bis 100 µg Protein je ml der Original-Proteinstandardslösung linear sein.

ANMERKUNG Während der Konzentrierung geht ein Teil der Proteine verloren. Es wird aber vorausgesetzt, dass der Anteil an verlorenem Protein aus Standard und Probe während des Konzentrierungsprozesses gleich groß ist.

A.7.1.2 Konzentrationen in den Extrakten

Die mittleren Extinktionen der Doppelwerte (siehe A.6.4.1) aller vier Extrakte werden bestimmt. Wenn die einzelnen Werte mehr als 20 % voneinander abweichen, wird die Bestimmung wiederholt. Die Konzentrationen in den extrahierten Proben (*C*) werden in µg/ml Extrakt in dem linearen Abschnitt der Kurve direkt abgelesen.

ANMERKUNG Wenn die Kalibrierkurve nicht linear ist, kann der Wert mit einer quadratischen Regressionsgleichung berechnet werden. Für die Kurvenanpassung und die Berechnung der unbekannten Konzentrationen wird empfohlen, handelsübliche Computerprogramme zu verwenden.

A.7.2 Ergebnisse

Der Proteingehalt jeder Probe wird mit Gleichung 000 berechnet:

$$P = \frac{(V \cdot C \cdot F)}{m} \quad (\text{A.3})$$

Dabei ist

P das extrahierbare Protein, in µg/g Handschuh;

V das Volumen des verwendeten Extraktionsmediums, in ml;

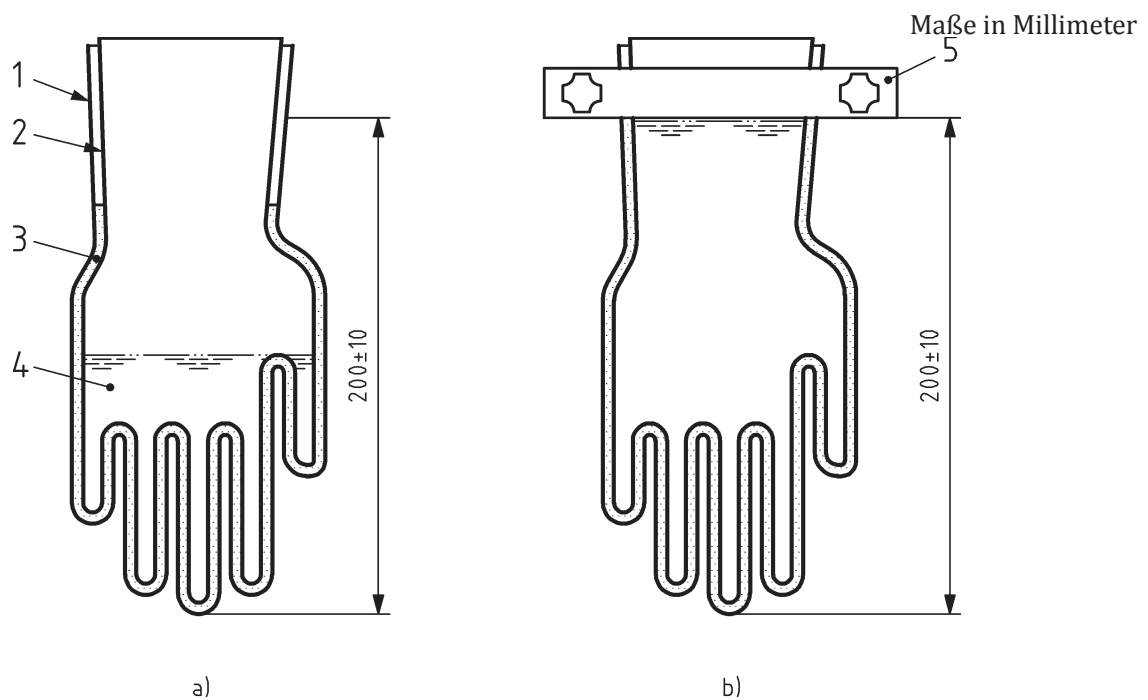
C die Proteinkonzentration des Extrakts, in µg/ml;

F der Verdünnungsfaktor;

ANMERKUNG *F* ist das reale Volumen der NaOH-Lösung, in ml, die zur Lösung des Proteins verwendet wurde, geteilt durch 0,2.

m die Masse des extrahierten Handschuhs, in g (A.6.2.6).

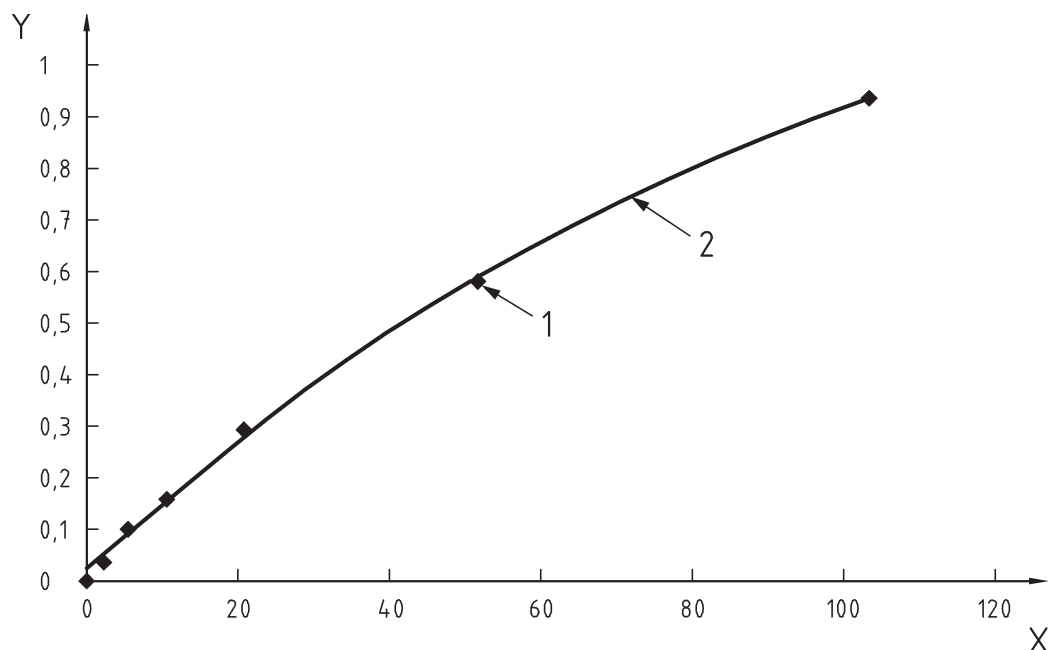
Es wird der mittlere Proteingehalt von vier Handschuhextrakten angegeben.



Legende

- 1 äußerer Handschuh (Handschuh 1)
- 2 innerer Handschuh (Handschuh 2)
- 3 Extraktionspuffer
- 4 Farbstofflösung
- 5 Handschuhklammer

Bild A.1 — Extraktion von Handschuhen (Schnittdarstellung)



Legende

Y Extinktion bei 750 nm

X Ovalbuminkonzentration (µg/ml)

1 Extinktion

2 computerberechnetes Ausgleichspolynom

$$Y = -4E - 0,5x^2 + 0,013x + 0,0247$$

(A.4)

Konzentration [µg/ml]	Extinktion
2,1	0,036
5,2	0,099
10,4	0,159
20,8	0,291
52,0	0,583
104,0	0,945

Bild A.2 — Typische Kalibrierkurve, gemessen in einem Spektralphotometer bei 750 nm mit einer Weglänge von 1 cm

A.7.3 Statistische Informationen

Neun Laboratorien nahmen im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie der EU zwischen 1996 und 1998 an einem Ringversuch teil. Diese Studie wurde in dem „Final Report MAT 1 — CT 940060 European Commission Directorate General XII“ veröffentlicht. In diesem Ringversuch wurden sowohl die Präzision der Lowry-Methode, als auch die Präzision des gesamten Verfahrens, einschließlich der Extraktion, untersucht. Das gesamte Verfahren deckt zusätzlich die Schwankungen in der Proteinkonzentration zwischen einzelnen Handschuhen ab, die in einigen Fällen größer sind als die verfahrensbedingten Schwankungen. Die Ergebnisse werden in Tabelle A.1 zusammengefasst.

Tabelle A.1 — Statistische Informationen

	Anzahl der Messungen	Anzahl der Extrakte	Anzahl der Tage	Mittelwert µg/ml	Variationskoeffizient der Wiederholpräzision % (innerhalb der Laboratorien)	Variationskoeffizient der Vergleichpräzision % (zwischen den Laboratorien)
Handschuh-extrakt	8 Dreifachwerte	Ein Extrakt für alle Teilnehmer	1	63,9	4,9	9,6
Handschuh-extrakt	15 Dreifachwerte		5	61,7	6,8	6,3
Handschuh A	5 Dreifachwerte	5	1	88,8	7,9	22,5
Handschuh A	5 Dreifachwerte	5	5	84,5	6,1	20,3
Handschuh B	3 Dreifachwerte	3	1	109	20,2	23,3
Handschuh C	3 Dreifachwerte	3	1	727	8,3	23,0
Handschuh D	3 Dreifachwerte	3	1	46,5	10,1	31,8
Mittelwert ohne Extraktionsvorgang					5,0	8,0
Mittelwert mit Extraktionsvorgang (Handschuh A bis D)					10,5	24,2

Die Bestimmungsgrenze wurde, weil sie von der Dicke (Masse) der Handschuhe abhängig ist, auf 10 µg/g festgelegt. Sie lag zwischen 1 µg/g und 5 µg/g.

A.8 Verweisungen

- [1] Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem 1951: 193: 265-275
- [2] ASTM D 5712:1995, Standard test method for analysis of protein in natural rubber and its products
- [3] Kidwai SA, Ansari AA, Salahuddin, Effect of succinylation (3-carboxypropionylation) on the conformation and immunological activity of ovalbumin. Biochem J 1976: 155: 171-180

Anhang B (informativ)

Immunologische Verfahren für die Messungen von Naturkautschuklatex-Allergenen

B.1 Einleitung

Allergische Sofortreaktionen auf Proteine aus Naturkautschuklatex (NRL, en: natural rubber latex) sind als maßgebliches medizinisches und arbeitsmedizinisches Problem bekannt. Als Hauptquelle für die Sensibilisierung wurden Proteine und Peptide identifiziert, die aus Schutzhandschuhen aus NRL eluieren [1].

Obwohl der Gehalt an extrahierbarem Gesamtprotein üblicherweise ausreichend gut mit dem Allergengehalt von NRL-Handschuhen, gemessen mit dem Haut-Pricktest oder mit Verfahren, die auf humanem IgE basieren, korreliert [2], [3], [4], [5], werden mit Verfahren zur Gesamtproteinmessung auch nicht allergene Proteine mitgemessen, die wahrscheinlich für NRL-Allergien nicht relevant sind. Dadurch stieg der Bedarf an Verfahren, die in der Lage sind, spezifisch und genau die Allergene in NRL-Produkten zu messen. Es wird davon ausgegangen, dass allergenspezifische Untersuchungen zu genaueren und aussagekräftigeren Informationen führen würden, sowohl für regulatorische Zwecke als auch für das Monitoring im Herstellungsprozess. Die Verfügbarkeit von spezifischen Untersuchungsverfahren ist jedoch noch sehr beschränkt. Das noch immer unvollständige Wissen über die Gesamtbedeutung des großen Spektrums an NRL-Allergenen macht es zudem schwierig zu entscheiden, welche der vielen Allergene im NRL-Ausgangsmaterial gemessen werden sollten.

Semiquantitative Verfahren, wie RAST-Inhibition und IgE-ELISA-Inhibition, unter Verwendung von humanen IgE-Antikörpern, sind seit einigen Jahren in Forschungslaboratorien verfügbar. Diese Verfahren haben aber den Nachteil, dass sie schwierig zu standardisieren sind und sie von nur begrenzt verfügbaren humanen Seren mit klinisch relevanten latexspezifischen IgE-Antikörpern abhängig sind. Außerdem sollte darauf hingewiesen werden, dass die verwendeten Standards nicht den Handschuhproteinen entsprechen. Das Prinzip, dass ein idealer Test zur Beurteilung des allergieauslösenden Potentials von Naturkautschuklatex-Produkten auf der Quantifizierung von spezifischen Allergenen beruhen sollte, wurde vor Kurzem in die laufende Normungsarbeit sowohl in Europa [6], [7] als auch in den USA [8], [31] aufgenommen.

Große Fortschritte wurden in letzter Zeit in der Entwicklung von spezifischen und quantitativen Verfahren für die Messung individueller Naturkautschuklatex-Allergene gemacht [9], [10], [30]. Diese neuen Verfahren, basierend auf dem Capture-Enzyme-Immunoassay-(EIA)-Prinzip und auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern und gereinigten oder rekombinanten Allergenen, sind spezifisch; sie können gut genormt werden und besitzen eine angemessene Empfindlichkeit und Vergleichspräzision. In diesem informativen Anhang werden die aktuellen Verfahren zur Messung von NRL-Allergenen erläutert.

B.2 Naturkautschuklatex-Allergene in Gummiprodukten

In der Latexmilch des Gummibaums *Hevea brasiliensis*, dem Ausgangsmaterial für Naturkautschuklatex-Produkte, wurden fast 250 verschiedene Proteine und Polypeptide nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass ein Fünftel bis ein Viertel dieser Proteine IgE binden können und somit Allergene darstellen [11], [12]. Die Mischung an Pflanzenproteinen im Ausgangsmaterial stellt die Stressantwort des Gummibaums auf die Verwundung dar (Auffangmethode). Etliche dieser Proteine sind Abwehrproteine, die sich im Laufe der Evolution der Pflanzen gut erhalten haben. Die strukturellen Homologien mit diesen Proteinen bilden die molekulare Basis für die bekannten Kreuzreaktionen der IgE-Antworten von latexallergischen Patienten auf verschiedene Pflanzenproteine. Es ist wahrscheinlich, dass alle signifikanten Allergene in der Latexmilch vorhanden sind, aber, wie oben erwähnt, die Mehrzahl der Proteine und Polypeptide des NRL-Ausgangsmaterials keine Rolle bei der Bestimmung der allergologischen Eigenschaften von NRL-Produkten spielt. In den WHO/IUIS-Listen „Allergen Nomenclature Committee lists“ (Februar 2013) werden 14 NRL-Allergene aufgeführt, die auf molekularer Ebene charakterisiert wurden und in den meisten Fällen geklont wurden und durch rekombinante DNA-Technik hergestellt wurden (www.allergen.org).

Ein optimaler Test sollte so ausgelegt sein, dass alle Allergene, die in den Gummiprodukten vorkommen könnten, exakt gemessen werden. Dies könnte Epitope betreffen, die in den natürlichen Proteinen vorkommen, aber auch neue Epitope, die durch die harschen Bedingungen des Herstellungsprozesses entstehen. Bis jetzt konnte nur eine begrenzte Anzahl von Allergenen in NRL-Produkten nachgewiesen werden. Die gegenwärtige Literatur unterstützt die Aussage, dass zumindest Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 in den Endprodukten vorkommen können, und/oder Fragmente bzw. Polymere dieser Proteine, die IgE-bindende Epitope tragen [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Ob andere Allergene wie Hev b 2, Hev b 7, Hev b 13 [19] oder Hev b 14 [32] sich als wichtige gummiproduktsspezifische Allergene erweisen, muss noch gesichert werden.

B.3 Verfahren zur Messung von Naturkautschuklatex-Allergenen

B.3.1 Qualitative Verfahren

Mit den in den frühen 1990er-Jahren häufig angewendeten immunoelektrophoretischen Verfahren und Immunoblottingtechniken wurden einige NRL-Proteine nachgewiesen und vorläufig charakterisiert, die IgE von NRL-allergischen Patienten binden. Es ist allerdings heute anerkannt, dass diese Verfahren alleine für eine ausreichende Identifizierung von Allergenen nicht ausreichen [11], [12], [20], [21].

B.3.2 Semiquantitative Verfahren

B.3.2.1 Haut-Pricktestung an Freiwilligen mit bekannter Latexallergie

Die Allergenität von NRL-Extrakten kann semiquantitativ durch den Haut-Pricktest (SPT, en: skin prick testing) einer statistisch relevanten Anzahl von Patienten mit bekannter Latexallergie bestimmt werden. Das Ausmaß der Reaktion ist abhängig von und proportional zu der Menge der Allergene, gegen die der Patient IgE-Antikörper besitzt [2]. Aus biologischer Sicht wäre der Haut-Pricktest ein ideales Verfahren zur Beurteilung der klinisch relevanten Allergenität, aber aus ethischen Gründen kann er nicht regelmäßig zum Monitoring des Allergengehalts in NRL-Handschuhen durchgeführt werden.

B.3.2.2 IgE-ELISA-Inhibition (auch als RAST-Inhibition bekannt)

ELISA-Inhibitionstests (ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay) können auf der Basis von handelsüblichen oder selbst zusammengestellten Tests zur Messung spezifischer IgE-Antikörper durchgeführt werden. Der früher übliche RAST (Radio Allegro Sorbent Test) verwendet radioaktiv markierte anstelle von enzymmarkierten Antikörpern.

Der ELISA-Inhibitionstest wurde genutzt, um NRL-Allergene in verschiedenen medizinischen und anderen Produkten nachzuweisen [3], [4], [22], [23].

Bei diesem Verfahren werden optimale Mengen an NRL-Allergenen an eine Festphase (z. B. Papier oder Polystyrol) gebunden. Standard und unbekannte Proben werden mit dem IgE-Poolserum von Personen mit bekannter NRL-Allergie inkubiert. Wenn ein IgE-Antikörper ein lösliches Allergen bindet, ist er vor der Bindung an die Allergene der Festphase geschützt. Nach Inkubation wird die Mischung zu einem immobilisierten Allergenpräparat transferiert, wo sich die noch freien IgE-Antikörper an die Allergene auf der Festphase binden. Diese spezifische Bindung wird unter Verwendung eines enzymmarkierten IgE-Antikörpers gemessen. Das Ausmaß der Inhibition ist proportional zu der Menge der löslichen Allergene in dem Extrakt.

Die kritischen Reagenzien sind das immobilisierte Allergen, der Humanserumpool und das Standardallergen.

In dem selbst zusammengestellten Assay, der in der Verweisung Nr. 4 beschrieben wird, wurde nativer, nicht mit Ammoniak behandelter NRL zum Beschichten und als Standardallergen verwendet. Eine Konzentration von 10 mg Protein je ml Standard wurde als 100 000 „willkürliche Einheiten“ definiert. Serielle Verdünnungen von Standard-NRL-Lösungen und von Handschuhextrakten werden mit einem optimal verdünnten IgE-Serumpool aus sorgfältig ausgesuchten hochtitrigen Seren von NRL-allergischen Patienten inkubiert [4].