



POLSKA NORMA

PN-EN 455-3

lipiec 2003

**Rękawice medyczne
jednorazowego użytku
Część 3: Wymagania i badania
w ocenie biologicznej**

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

© Copyright by PKN, Warszawa 2003

Hologram
PKN

**Wszelkie prawa autorskie zastrzeżone. Żadna część niniejszej normy nie może być
zwielokrotniana jakąkolwiek techniką bez pisemnej zgody Prezesa Polskiego Komitetu
Normalizacyjnego**

ABSTRAKT NORMY

Określono wymagania dotyczące oceny bezpieczeństwa biologicznego rękawic medycznych jednorazowego użytku. Podano wymagania dotyczące oznakowania i pakowania rękawic oraz ujawniania informacji o zastosowanych metodach badania. Podano przegląd immunologicznych metod badań do oznaczania wymywalnych białek i alergenów.

TŁUMACZENIE ABSTRAKTU

Specifies requirements for the evaluation of biological safety for medical gloves for single use. It gives requirements for labelling and glove packaging and the disclosure of information relevant to the test methods used. Gives a review of immunological test methods for the determination of leachable proteins and allergens.

**Norma opracowana w Normalizacyjnej Komisji Problemowej nr 247
ds. Materiałów Medycznych i Biomateriałów**

Pierwsze wydanie normy (rok) i lata kolejnych nowelizacji

.....

Zmiany wprowadzone do normy

Numer zmiany	Data wprowadzenia

lipiec 2003

<p>POLSKI KOMITET NORMALIZACYJNY</p>	POLSKA NORMA	PN-EN 455-3
	<p>Rękawice medyczne jednorazowego użytku Część 3: Wymagania i badania w ocenie biologicznej</p>	<p>Zamiast: PN-EN 455-3:2002 (U)</p>
		<p>ICS 11.140</p>

EN 455-3:1999, IDT

This national document is identical with EN 455-3:1999 and is published with the permission of CEN; rue de Stassart, 36; B-1050 Brussels, Belgium.

Niniejsza PN jest identyczna z EN 455-3:1999 i jest publikowana za zgodą CEN; rue de Stassart 36; B-1050 Bruksela; Belgia.

PRZEDMOWA KRAJOWA

Niniejsza norma jest tłumaczeniem angielskiej wersji normy europejskiej EN 455-3:1999.

Wprowadzona norma europejska jest zharmonizowana z dyrektywą nowego podejścia 93/42/EEC Wyroby medyczne (MED).

W normie są stosowane odsyłacze krajowe oznaczone od ^{N1)} do ^{N25)}.

Norma zawiera załącznik krajowy NA (informacyjny), w którym podano wykaz krajowych odpowiedników norm i dokumentów powołanych w treści normy europejskiej.

Stosowane w niniejszej normie terminy "lateks", "kaczuk naturalny" i "lateks kaczuku naturalnego" zawsze oznaczają "wulkanizat lateksu kaczuku naturalnego".

nr ref. PN-EN 455-3:2003

<p>Norma europejska EN 455-3:1999 ma status Polskiej Normy</p>	<p>Zatwierdzona przez Prezesa Polskiego Komitetu Normalizacyjnego dnia 15 maja 2003 r.</p>
--	--

NORMA EUROPEJSKA
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM

EN 455-3

grudzień 1999

ICS 11.140

Wersja polska

**Rękawice medyczne jednorazowego użytku – Część 3: Wymagania
i badania w ocenie biologicznej**

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

Gants médicaux à usage unique –
Partie 3: Exigences et essais pour
évaluation biologique

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

Niniejsza norma jest polską wersją normy europejskiej EN 455-3:1999. Została ona przetłumaczona przez Polski Komitet Normalizacyjny i ma ten sam status co wersje oficjalne.

Niniejsza norma europejska została przyjęta przez CEN 1 kwietnia 1999 r.

Zgodnie z wewnętrznymi przepisami CEN/CENELEC, członkowie CEN są zobowiązani do nadania normie europejskiej statusu normy krajowej bez wprowadzania jakichkolwiek zmian. Aktualne wykazy norm krajowych (powstałych w wyniku nadania normie europejskiej statusu normy krajowej), łącznie z ich danymi bibliograficznymi, można otrzymać w Sekretariacie Centralnym lub w krajowych jednostkach normalizacyjnych będących członkami CEN.

Norma europejska została opracowana w trzech oficjalnych wersjach językowych (angielskiej, francuskiej i niemieckiej). Wersja w każdym innym języku, przetłumaczona na odpowiedzialność danego członka CEN i zarejestrowana w Sekretariacie Centralnym, ma ten sam status, co wersje oficjalne.

Członkami CEN są krajowe jednostki normalizacyjne następujących państw: Austrii, Belgii, Danii, Finlandii, Francji, Grecji, Hiszpanii, Holandii, Irlandii, Islandii, Luksemburga, Niemiec, Norwegii, Portugalii, Republiki Czeskiej, Szwajcarii, Szwecji, Włoch i Zjednoczonego Królestwa.

CEN

Europejski Komitet Normalizacyjny
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation
Europäisches Komitee für Normung

nr ref. EN 455-3:1999 E

Spis treści

Przedmowa

Wprowadzenie

- 1 Zakres normy
- 2 Normy powołane
- 3 Definicje
- 4 Wymagania
- 5 Metody badań
- 6 Sprawozdanie z badań

Załącznik A (normatywny) Metoda oznaczania wymywalnych wodą białek z rękawic z lateksu kauczuku naturalnego z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Lowry'ego

Załącznik B (informacyjny) Immunologiczne metody oznaczania wymywalnych białek i alergenów z rękawic medycznych

Załącznik C (informacyjny) Analiza aminokwasów (AAA) za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC)

Załącznik D (informacyjny) Słownik

Załącznik E (informacyjny) Bibliografia

Załącznik ZA (informacyjny) Rozdziały niniejszej normy europejskiej dotyczące zasadniczych wymagań i innych postanowień dyrektyw UE

stronica 3
EN 455-3:1999

Przedmowa

Niniejsza norma europejska została przygotowana przez Komitet Techniczny CEN/TC 205 "Nieaktywne wyroby medyczne" ^{N1)}, którego sekretariat prowadzi BSI ^{N2)}.

Niniejsza norma europejska powinna uzyskać status normy krajowej, przez opublikowanie identycznego tekstu lub uznanie, najpóźniej do czerwca 2000 r., a normy krajowe sprzeczne z niniejszą normą powinny być wycofane najpóźniej do czerwca 2000 r.

Niniejsza norma europejska została opracowana na podstawie mandatu, udzielonego CEN przez Komisję Europejską ^{N3)} i Europejskie Stowarzyszenie Wolnego Handlu ^{N4)}, i wspiera zasadnicze wymagania dyrektywy(-yw) UE.

W załączniku informacyjnym ZA, który stanowi integralną część niniejszej normy, podano informacje dotyczące powiązania niniejszej normy z dyrektywą(-ami) UE.

Zgodnie z przepisami wewnętrznymi CEN/CENELEC do wprowadzenia niniejszej normy europejskiej są zobowiązane następujące kraje członkowskie: Austria, Belgia, Dania, Finlandia, Francja, Grecja, Hiszpania, Holandia, Irlandia, Islandia, Luksemburg, Niemcy, Norwegia, Portugalia, Republika Czeska, Szwajcaria, Szwecja, Włochy i Zjednoczone Królestwo.

Załącznik A jest normatywny i stanowi część niniejszej normy europejskiej. Załączniki B, C, D, E i ZA zamieszczono w celach informacyjnych.

^{N1)} Odsyłacz krajowy: Nazwa CEN/TC 205 w języku angielskim – „Non-active medical devices”.

^{N2)} Odsyłacz krajowy: British Standards Institution (BSI), krajowa jednostka normalizacyjna Zjednoczonego Królestwa.

^{N3)} Odsyłacz krajowy: Odpowiednia nazwa w języku angielskim – „European Commission”.

^{N4)} Odsyłacz krajowy: Odpowiednia nazwa w języku angielskim – „European Free Trade Association”.

Wprowadzenie

Szkodliwe reakcje występujące u pracowników służby zdrowia i pacjentów, na wyroby z lateksu były zgłaszane w ostatnich kilku latach i przypisywane obecności białek w lateksie. Jednakże, szkodliwe reakcje powodowane przez substancje chemiczne, środki poślizgowe, pirogeny pozostałe po sterylizacji czy pozostałości po sterylizacji (tlenek etylenu) także są opisane w literaturze naukowej. Najczęstsze są doniesienia o szkodliwych reakcjach wywołanych przez rękawice wykonane z lateksu kuczuku naturalnego, ale niektóre reakcje mogą również wywoływać rękawice wykonane z innych polimerów.

W serii norm z tego samego poziomu EN ISO 10993 podano wytyczne dotyczące oceny biologicznej wyrobów medycznych, w tym także oceny i schematy poszczególnych badań oraz innych wymagań związanych z bezpieczeństwem.

Jednakże nie uwzględniono wszystkich szkodliwych reakcji (np. alergii typu wczesnego), które mogą być wywołane używaniem rękawic medycznych. Te szkodliwe reakcje wywoływane są specyficznymi alergenami, które mogą być obecne w rękawicach. Wiele czynników przyczynia się do reakcji:

- a) długotrwałe i częste kontakty rękawic ze skórą użytkownika;
- b) ekspozycja na alergeny przez bezpośredni kontakt ze skórą i śluzówką, szczególnie przez wdychanie cząstek a także jeśli skóra i śluzówka są uszkodzone;
- c) okluzyjny charakter interakcji rękawic ze skórą wywołany wieloletnim używaniem rękawic.

W niniejszej części normy europejskiej EN 455 podano metody badania umożliwiające ocenę bezpieczeństwa biologicznego rękawic medycznych, będąca częścią procesu analizy ryzyka zgodnej z EN 1441.

W niniejszej części EN 455 nie określono dopuszczalnych poziomów zawartości białek i substancji chemicznych w lateksie, ponieważ obecnie w niedostatecznym stopniu znane jest działanie czynników związanych z oceną bezpieczeństwa w tym zakresie, np. rodzaj alergenów, próg uczulania i sterowanie procesem. Wraz z poziomem wzrostu wiedzy, wymagania podane w niniejszej normie będą zmodyfikowane. Opracowywane są dalsze metody pomiaru i sprawdzania tych alergenów.

stronica 5
EN 455-3:1999

1 Zakres normy

W niniejszej części EN 455 określono wymagania dotyczące oceny bezpieczeństwa biologicznego rękawic medycznych jednorazowego użytku. Podano w niej wymagania dotyczące oznakowania i pakowania rękawic oraz ujawniania informacji o zastosowanych metodach badania. Zawiera ona również przegląd immunologicznych metod badań w celu oznaczania wymywalnych białek i alergenów.

2 Normy powołane ^{N5)}

Do niniejszej normy europejskiej wprowadzono, drogą datowanego lub niedatowanego powołania się, wymagania zawarte w innych publikacjach. Te normatywne powołania są cytowane w odpowiednich miejscach tekstu, a publikacje wymieniono poniżej. W przypadku powołań datowanych późniejsze zmiany lub nowelizacje którejkolwiek z wymienionych publikacji mają zastosowanie do niniejszej normy europejskiej tylko wówczas, gdy zostaną do niej wprowadzone przez jej zmianę lub nowelizację. W przypadku powołań niedatowanych stosuje się ostatnie wydanie powołanej publikacji.

EN 1041 Information supplied by the manufacturer with medical devices

EN 1441 Medical devices – risk analysis

EN ISO 10993 Biological evaluation of medical devices

The European Pharmacopoeia 3rd Edition, Suppl. 2.6.14, Bacterial endotoxins, 1998

The European Pharmacopoeia 3rd Edition, 2.6.8 Pyrogens, 1997

3 Definicje

W niniejszej części EN 455 mają zastosowanie poniższe definicje:

3.1

substancje chemiczne:

Substancje dodane albo powstałe w którymkolwiek etapie procesu wytwarzania lub magazynowania, które mogą być wchłaniane z gotowego wyrobu. Mogą to być m.in. środki poślizgowe, powłoki chemiczne i środki sterylizujące.

3.2

endotoksyny:

Lipopolisacharydy pochodzące z zewnętrznych błon komórkowych bakterii Gram-ujemnych.

UWAGA: Źródłem endotoksyn może być m. in. zanieczyszczenie bakteryjne surowców, woda technologiczna użyta w produkcji i ręczne manipulowanie rękawicami.

3.3

wymywalne białka:

Rozpuszczalne w wodzie białka i peptydy o różnych masach cząsteczkowych, wymywalne z gotowego wyrobu.

UWAGA: Większość tych białek pochodzi z lateksu kauczuku naturalnego. Te i inne białka, które mogą być dodane (np. kazeina), mogą ulegać zmianie, modyfikacji i degradacji w trakcie procesu produkcyjnego. Istnieją doniesienia, że wymywane białka roztworami wodnymi wywołują reakcje alergiczne typu 1.

3.4

pirogeny:

Substancje wywołujące gorączkę u królików, mogące mieć związek z gorączką i innymi szkodliwymi reakcjami u ludzi.

UWAGA: Endotoksyny są jednym z rodzajów pirogenów.

^{N5)} Odsyłacz krajowy: Patrz załącznik krajowy NA.

3.5

limit procesowy:

Największa zawartość białka w rękawicach, która prawdopodobnie może wystąpić w przypadku danego procesu produkcyjnego.

4 Wymagania

4.1 Wymagania ogólne

Rękawice medyczne jednorazowego użytku powinny być zbadane tak jak opisano w serii norm EN ISO 10993. Powinno się przeprowadzić analizę ryzyka zgodnie z EN 1441.

4.2 Wymywalne białka

Producent powinien monitorować limit procesowy wymywalnego białka z gotowych rękawic zawierających lateks kauczuku naturalnego, metodami określonymi w **5.1**. Wyniki badań należy przechowywać. Wyniki badań i zastosowane metody badań powinny być dostępne na żądanie.

Dokumentacja ta, łącznie z analizą ryzyka, będzie pomocna w podjęciu decyzji, czy są akceptowalne zagrożenia biologiczne związane z zanieczyszczeniami i pozostałościami.

4.3 Endotoksyny

Jeżeli rękawice są oznakowane "mała zawartość endotoksyn", producent powinien monitorować zanieczyszczenie jałowych rękawic endotoksynami, metodami określonymi w **5.2**. W tak oznakowanych rękawicach zawartość endotoksyn nie powinna przekraczać wartości granicznej 20 jednostek endotoksyny na parę rękawic.

4.4 Substancje chemiczne

Rękawice nie powinny zawierać talku (krzemianu magnezu) lub być nim pudrowane. Producent powinien, na żądanie, ujawnić spis składników chemicznych – o których wiadomo, na podstawie aktualnych danych, że wpływają szkodliwie na zdrowie – zarówno tych dodawanych w produkcji, jak i tych, o których wiadomo, że są już obecne w wyrobie, takich jak przyspieszacze, antyutleniacze i biocydy.

4.5 Oznakowanie

Poza oznakowaniem wymaganym w EN 1041 należy na opakowaniach bezpośrednich umieścić co najmniej niżej podane oznakowania:

- a) Rękawice medyczne otrzymane bezpośrednio z lateksu kauczuku naturalnego należy oznakować następująco lub w sposób równoważny:

"(Wyrób) zawiera lateks kauczuku naturalnego, który może wywoływać reakcje alergiczne."

- b) Rękawice pudrowane należy oznakować w niżej podany sposób.

Pudrowane jałowe rękawice chirurgiczne należy oznakować następująco lub w sposób równoważny:

"**OSTRZEŻENIE:** Przed rozpoczęciem operacji należy aseptycznie usunąć puder z powierzchni w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia szkodliwych reakcji tkankowych."

UWAGA 1: To ostrzeżenie można podać na wewnętrznym opakowaniu.

- c) Jeżeli producent oznakowuje rękawice zawartością białka, to należy podać limit procesowy, zmierzony tak jak określono w **5.1**.

UWAGA 2: Nie pozwala to na oznakowanie deklaracją o zawartości białka poniżej 50 µg/g.

UWAGA 3: Bezpieczne stosowanie tych rękawic przez osoby uczulone na lateks lub na osobach uczulonych na lateks nie jest dowiedzione.

d) Deklaracja o "hipoalergiczności" nie powinna być stosowana.

UWAGA: Zwraca się uwagę na symbole podane w EN 980.

5 Metody badań

5.1 Wymywalne białka

Metodą oznaczania wymywalnego białka powinna być albo zmodyfikowana metoda Lowry'ego, podana w załączniku A, albo inna odpowiednio zwalidowana metoda, która jest skorelowana ze zmodyfikowaną metodą Lowry'ego. Dalsze informacje – patrz załącznik A.

UWAGA 1: Uznaje się, że istnieją inne zwalidowane metody analizy wymywalnych białek (np. zwalidowana metoda analizy aminokwasów podana w załączniku C), które mogą być stosowane, pod warunkiem że będą zwalidowane i że zostanie ustalona korelacja z metodą referencyjną określoną w niniejszej normie. Metody te na razie nie są przydatne do rutynowej kontroli jakości.

UWAGA 2: Opracowywane są także immunologiczne metody oznaczania białka (patrz załącznik B).

5.2 Endotoksyny

Z wyjątkiem przypadków występowania nieusuwalnych zakłóceń w procedurach LAL, wybór, walidacja i stosowana technika powinny być albo takie jak opisano w The European Pharmacopoeia, 3rd Edition, Suppl. 1998 2.6.14. Bacterial endotoxins, albo takie jak w równie czułej i odtwarzalnej procedurze Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Jeżeli występują nieusuwalne zakłócenia w procedurach LAL, to nie można dokładnie zmierzyć poziomu endotoksyn bakteryjnych. W takich przypadkach można zastosować badanie obecności pirogenów na królikach, jak opisane w The European Pharmacopoeia (3rd Edition, 1997 2.6.8). Wyniki należy wyrazić w jednostkach endotoksyny (E.U.) na parę rękawic (1 E.U. = 1 I.U.).

Badania należy wykonywać dla każdej partii. Zalecana minimalna liczba par badanych rękawic w stosunku do liczby sztuk w partii wynosi dwie pary w przypadku liczności partii poniżej trzydziestu, trzy pary rękawic w przypadku liczności partii od trzydziestu do stu, i 3 % partii o liczności powyżej stu, maksymalnie do dziesięciu par z partii.

Zewnętrzna powierzchnia pary rękawic jest ekstrahowana 40 ml wody pozbawionej endotoksyn (Water LAL, The European Pharmacopoeia 3rd Edition, Suppl. 1998, 2.6.14.) nie krócej niż 40 min i nie dłużej niż 60 min w temperaturze od 37 °C do 40 °C, w taki sposób, aby zapewnić kontakt wszystkich powierzchni ze środkiem ekstrakcyjnym. Jeżeli jest to potrzebne, ekstrakt jest wirowany przez 15 min, przy 2000g, w celu usunięcia cząstek, po czym frakcja ciepla jest dekantowana i potem niezwłocznie badana na obecność endotoksyn.

UWAGA: Uznaje się, że istnieją inne metody analizy endotoksyn i mogą one być stosowane do rutynowej kontroli jakości, pod warunkiem że będą zwalidowane i zostanie ustalona korelacja z metodą referencyjną określoną w niniejszej normie europejskiej.

6 Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badania powinno zawierać co najmniej następujące informacje:

- powołanie się na niniejszą część EN 455;
- rodzaj rękawic i numer serii;
- nazwę i adres producenta, lub dystrybutora, oraz laboratorium badawczego, jeśli są różne;
- datę wykonania badania;
- rodzaj zastosowanej metody badań;
- wyniki badania.

Załącznik A (normatywny)

Metoda oznaczania wymywalnych wodą białek z rękawic z lateksu kauczuku naturalnego z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Lowry'ego

A.1 Zakres załącznika

Niniejsza metoda przeznaczona jest do oznaczania ilości wymywalnych wodą białek z rękawic medycznych wykonanych z lateksu kauczuku naturalnego (NR)^{N6)}. Została ona zwalidowana w cyklu badań międzylaboratoryjnych. Dolna granica oznaczalności wynosi około 10 µg białek na gram rękawicy (tj. 2 µg białek na ml ekstraktu) w zależności od jej ciężaru.

Substancje chemiczne, takie jak środki powierzchniowo czynne, przyspieszacze i antyutleniacze, wprowadzane do NR w trakcie produkcji, mogą wpływać na zabarwienie powstające podczas oznaczania; niektóre materiały mogą zmniejszać to zabarwienie, podczas gdy inne mogą je zwiększać. Jeżeli za pomocą tej metody badania uzyskuje się wyniki, które wydają się błędne z powodu substancji zakłócających, wówczas można zastosować jakąkolwiek zwalidowaną metodę analizy aminokwasów (na przykład patrz metoda podana w załączniku C).

UWAGA: Zaleca się, aby personel stosujący tę metodę był zaznajomiony z prawidłową praktyką laboratoryjną. Ta metoda nie obejmuje wszystkich problemów dotyczących bezpieczeństwa, jeśli się pojawiają, związanych z jej stosowaniem. Użytkownik ponosi odpowiedzialność za ustanowienie odpowiednich zasad bezpieczeństwa i ochrony zdrowia oraz zapewnienie zgodności ze wszystkimi warunkami przepisów krajowych.

A.2 Zasada metody

Rozpuszczalne w wodzie białka ekstrahuje się roztworem buforowym, a następnie w celu zagęszczenia białek wytrąca kwasami w obecności dezoksychohanu sodowego i oddzielenia od substancji rozpuszczalnych w wodzie, które mogłyby przeszkadzać w oznaczaniu. Strącone białka ponownie rozpuszcza się w alkaliach i oznacza kolorymetrycznie zmodyfikowaną metodą Lowry'ego. Oznaczanie opiera się na reakcji białek z odczynnikami miedziowym i odczynnikami Folina w środowisku alkalicznym, dającej charakterystyczne niebieskie zabarwienie. Pomiar spektrometryczny wykonuje się przy ustalonej długości fali w zakresie od 600 nm do 750 nm.

A.3 Odczynniki

A.3.1 Postanowienia ogólne

Gdziekolwiek wymienia się wodę, zaleca się używanie wody redestylowanej lub o równoważnej jakości. Zaleca się, aby wszystkie pozostałe odczynniki były jakości analitycznej.

A.3.2 Ekstrahent

A.3.2.1 Sól sodowa kwasu *N*-tris-[hydroksymetylo]-metylo-2-aminoetanosulfonowy (TES).

A.3.2.2 Bufor ekstrakcyjny, 0,1 M^{N7)}, sporządzony przez rozpuszczenie 24 g TES (A.3.2.1) w 1 l wody. Można zastosować jakikolwiek inny układ buforujący, pod warunkiem że roztwór będzie utrzymywał odpowiednią pojemność buforową przy pH 7,4 ± 0,2 w ekstrakcie z rękawic.

UWAGA: Przygotować wystarczającą ilość buforu do ekstrakcji rękawic (A.6.2), wykonania roztworu wzorcowego białka (A.6.3.2) i ślepej próbkę.

^{N6)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "natural rubber".

^{N7)} Odsyłacz krajowy: Obecnie nie stosowane oznaczenie jednostki stężenia mol/l.

stronica 9
EN 455-3:1999

A.3.2.3 Roztwór barwnika, roztwór soli sodowej błękitu bromofenolowego, sporządzony przez rozpuszczenie 100 mg błękitu bromofenolowego w 1 l wody. Należy sporządzać świeży roztwór co cztery tygodnie.

A.3.3 Odczynniki Lowry'ego do oznaczania białka

UWAGA: Odczynniki mogą być albo przygotowane z substancji chemicznych dostępnych w handlu [19], albo zakupione jako zestaw handlowy. Metoda podana w niniejszej normie była zwalidowana z zestawem handlowym.¹⁾

A.3.3.1 Odczynnik A, odczynnik miedziowy (alkaliczny roztwór szczawianu miedziowego lub cytrynianu miedziowego).

A.3.3.2 Odczynnik B, rozcieńczony odczynnik Folina.

A.3.4 Wodorotlenek sodowy, 0,1 M roztwór wodny.

A.3.5 Dezoksycholan sodowy (DOC), 3,47 mM^{N8)}, otrzymany przez rozpuszczenie 0,15 g dezoksycholanu sodowego w wodzie i rozcieńczenie wodą do 100 ml. Nie używać tego roztworu po upływie czterech tygodni od jego sporządzenia.

A.3.6 Kwas trójchlorooctowy (TCA), 4,4 mM w wodzie, sporządzony przez rozpuszczenie 72 g TCA w wodzie i rozcieńczenie wodą do 100 ml.

A.3.7 Kwas wolframianofosforowy (PTA), sporządzony przez rozpuszczenie 72 g PTA w wodzie i rozcieńczenie wodą do 100 ml. Nie używać tego roztworu po upływie czterech tygodni od jego sporządzenia.

A.3.8 Ovalbumina, z jaj kurzych²⁾, liofilizowana, nie zawierająca soli.

A.4 Aparatura

A.4.1 Rękawice syntetyczne, nie pudrowane.

A.4.2 Wirówka, pozwalająca osiągnąć co najmniej 6000g.

A.4.3 Probówki wirówkowe, 30 ml lub 50 ml probówki polipropylenowe o małej zdolności wiązania białka, wynoszącej 10 µg na próbkę, lub mniejszej. Nie używać szklanego sprzętu z powodu powierzchniowej absorpcji białek.

UWAGA: Metoda oznaczania zdolności wiązania białek opisana jest w A.5.

A.4.4 Krążki filtracyjne, jednorazowe, o wielkości porów 0,22 µm i o małej zdolności wiązania białka wynoszącej 10 µg na krążek filtracyjny lub mniej.

UWAGA: Metoda oznaczania zdolności wiązania białek opisana jest w A.5.

A.4.5 Strzykawki, jednorazowego użytku, 20 ml, wykonane z polietylenu lub polipropylenu.

A.4.6 Mikroprobówki, 2 ml, wykonane z polipropylenu.

A.4.7 Kuweta kwarcowa, o drodze optycznej 1 cm.

¹⁾ Lowry Micro DC Protein Assay Kit (numer katalogowy 500-0116), zestaw oferowany przez BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, USA. Informacja ta została podana dla wygody użytkowników niniejszej normy i nie stanowi rekomendacji CEN dla wyrobu tej marki.

²⁾ Ta ovalbumina sporządzana jest z białka świeżych jaj kurzych przez frakcjonowanie siarczanem amonowym i wielokrotne krystalizowanie przy pH 4,5; odpowiednia jest na przykład Sigma A 5503, chicken egg albumin, Grade V, oferowana przez Sigma Chemical Co., P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA. Informacja ta została podana dla wygody użytkowników niniejszej normy i nie stanowi rekomendacji CEN dla wyrobu tej marki.

^{N8)} Odsyłacz krajowy: Obecnie nie stosowane oznaczenie jednostki stężenia mmol/l.

A.4.8 Płytką mikrotitracyjną, z 96 płaskodennymi studzienkami, wykonana z polistyrenu albo jednorazowe kuwety (A.4.9).

A.4.9 Kuwety jednorazowe, 1,5 ml półmikro, o drodze optycznej 1 cm, wykonane z polistyrenu.

A.4.10 Czytnik do płytek mikrotitracyjnych, działający przy długości fal w zakresie od 600 nm do 750 nm.

A.4.11 Spektrofotometr, działający przy długości fal w zakresie od 230 nm do 750 nm.

A.4.12 Mieszadło wirowe

A.4.13 Mikropipety, z jednorazowymi polipropylenowymi końcówkami.

A.4.14 Zaciski, do uszczelnienia rękawic w trakcie ekstrakcji. Zaleca się stosowanie pary aluminiowych sztabek wyścielanych gumą piankową, które mogą być skręcane razem (patrz rysunek A.1) albo plastikowe zaciski do hemodializy o długości 170 mm.

A.4.15 Wytrząsarka

A.5 Pomiar zdolności wiązania białka

A.5.1 Postanowienia ogólne

Zaleca się stosowanie polipropylenowego sprzętu jednorazowego użytku (o którym wiadomo, że ma małą zdolność wiązania białka). Zdolność wiązania białka powinna być sprawdzona poniższą metodą przed użyciem próbek wirówkowych lub krążków filtracyjnych z nowej partii. Badanie powinno być wykonane w ciągu jednego dnia.

A.5.2 Zdolność wiązania białka przez próbki wirówkowe

A.5.2.1 W próbce wirówkowej przygotować (A.4.3) 30 ml roztworu wzorcowego zawierającego 10 µg/ml ovalbuminy przez rozcieńczenie podstawowego roztworu białka (A.6.3.1) buforem ekstrakcyjnym (A.3.2.2).

A.5.2.2 Przenieść 10 ml porcje badanego roztworu ovalbuminy (A.5.2.1) do każdej z dwóch nowych próbek i wytrząsać je za pomocą wytrząsarki (A.3.15)^{N9)}, upewniając się, że cała powierzchnia jest zwilżana roztworem. Po 30 minutach przenieść roztwory do następnych dwóch próbek i wytrząsać je. Powtarzać tę procedurę aż każda 10 ml porcja zostanie poddana działaniu pięciu próbek. Zachować pozostałą ilość badanego roztworu.

A.5.2.3 W trzech powtórzeniach oznaczyć stężenie białka w roztworze wzorcowym oraz w dwóch roztworach badanych, stosując metodę podaną w A.6.4 do A.6.6.

A.5.2.4 Obliczyć średnią ilość zaabsorbowanej ovalbuminy w µg na próbkę, z równania:

$$O = 10 (R - T) \div 5 \\ = 2 (R - T)$$

w którym:

O ilość zaabsorbowanej ovalbuminy,

R średnia z trzech oznaczeń zawartości ovalbuminy w roztworze wzorcowym,

T średnia zawartością ovalbuminy w badanym roztworze po jego kontakcie z próbką (tj. średnią z sześciu wartości).

^{N9)} Odsyłacz krajowy: Błąd w normie europejskiej; powinno być A.4.15.

Ilość zaabsorbowanej ovalbuminy (O) powinna być mniejsza niż 10 µg na próbkę, w przeciwnym razie próbki nie nadają się do użycia w tego rodzaju oznaczaniach.

A.5.3 Zdolność wiązania białka przez krążki filtracyjne

A.5.3.1 W próbce wirówkowej przygotować (A.4.3) 30 ml roztworu wzorcowego, zawierającego 10 µg/ml ovalbuminy, przez rozcieńczenie podstawowego roztworu białka (A.6.3.1) buforem ekstrakcyjnym (A.3.2.2).

A.5.3.2 Przygotować dwa zestawy, po pięć krążków filtracyjnych (A.4.4) ułożonych w stos. Przefiltrować do próbki wirówkowej (A.4.3) 10 ml roztworu wzorcowego przez każdy zestaw krążków filtracyjnych.

A.5.3.3 W trzech powtórzeniach oznaczyć stężenie białka w roztworze wzorcowym oraz w dwóch roztworach badanych, stosując metodę podaną w A.6.4 do A.6.6.

A.5.3.4 Obliczyć średnią ilość zaabsorbowanej ovalbuminy, w µg na próbkę^{N10)}, z równania:

$$\begin{aligned} O &= 10 (R-T) \div 5 \\ &= 2 (R-T) \end{aligned}$$

w którym:

O ilość zaabsorbowanej ovalbuminy,

R średnia z trzech oznaczeń zawartości ovalbuminy w roztworze wzorcowym,

T średnia zawartość ovalbuminy w badanym roztworze po jego przejściu przez krążki filtracyjne (tj. średnią z sześciu wartości).

Ilość zaabsorbowanej ovalbuminy (O) powinna być mniejsza niż 10 µg na krążek filtracyjny, w przeciwnym razie krążki filtracyjne nie nadają się do użycia w oznaczaniach.

A.6 Procedura

A.6.1 Postanowienia ogólne

Procedura obejmuje ekstrakcję rękawic, a następnie oczyszczenie i pięciokrotne zatężenie ekstraktu. Oznaczanie białek w ekstrakcie wykonuje się przez porównanie z krzywą wzorcową sporządzoną dla roztworów wzorcowych białka, zatężonych w ten sam sposób.

Procedura ekstrakcji polega na jednoczesnej ekstrakcji wewnętrznej powierzchni jednej rękawicy i zewnętrznej powierzchni drugiej rękawicy. Pozwala to na zminimalizowanie objętości ekstraktu do 25 ml i uniknięcie jakichkolwiek strat białek powodowanych zaadsorbowaniem na powierzchni pojemnika, ponieważ bufor ekstrakcyjny styka się jedynie z rękawicami.

UWAGA: Dopuszcza się stosowanie innych procedur ekstrakcji, jeżeli zostały zwalidowane w stosunku do niniejszej metody. Badania w wybranych laboratoriach w Europie i USA wykazały, że uzyskuje się równoważne wyniki, jeśli ekstrahuje się wg normy ASTM D5712 w buforze TES o pH 7,4 pocięte kawałki rękawic przez 2 h w temperaturze 25 °C.

A.6.2 Procedura ekstrakcji

A.6.2.1 Do manipulowania próbkami rękawic do ekstrakcji używać rękawic syntetycznych (A.4.1).

Pobrać osiem rękawic tego samego rozmiaru i z tej samej serii i rozdzielić je na cztery pary. W przypadku rękawic anatomicznych na określoną rękę, wybrać cztery na prawą rękę oraz cztery na lewą rękę i rozdzielić je na dwie pary prawych i dwie pary lewych.

^{N10)} Odsyłacz krajowy: Błąd w normie europejskiej, powinno być "w µg na krążek filtracyjny".

Na mankiecie jednej rękawicy z każdej pary zaznaczyć punkt w odległości 20 cm od koniuszka palca środkowego i zważyć rękawicę (m_1) z błędem nie większym niż 0,1 g. Dla każdej pary rękawic, drugą rękawicę włożyć do rękawicy zaznaczonej, tak aby pasowały do siebie jak to pokazano na rysunku A.1.

UWAGA: Metoda wkładania jednej rękawicy w drugą nie jest istotna pod warunkiem że manipuluje się rękawicami i dotyka ich najmniej, jeżeli jest możliwe. Jeden z możliwych sposobów osiągnięcia tego polega na wsunięciu prętów w kciuk i mały palec wewnętrznej rękawicy w celu ułatwienia wprowadzenia ich do odpowiednich palców zewnętrznej rękawicy. Użyć prętów do wprowadzenia pozostałych trzech palców.

A.6.2.2 Nalać do wewnętrznej rękawicy dostateczną ilość roztworu barwnika (A.3.2.3), tak aby napęłnić wszystkie pięć palców. Wprowadzić 25 ml buforu ekstrakcyjnego (A.3.2.2) o temperaturze $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną rękawicę. W przypadku większych rękawic można zwiększyć tę objętość maksymalnie do 50 ml. Usunąć jak najwięcej pęcherzyków powietrza i uszczelnić rękawice za pomocą zacisków (A.4.14) w miejscu zaznaczonej odległości 20 cm, tak aby utworzyć wodoszczelne uszczelnienie, jak to pokazano na rysunku A.1.

A.6.2.3 Zamocować rękawice w wytrząsarce (A.4.15) i wytrząsać przez (120 ± 5) min w temperaturze $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$.

A.6.2.4 Zdjąć zaciski i ostrożnie rozdzielić rękawice. Zachować ostrożność, aby nie zanieczyścić ekstraktu roztworem barwnika. Jeżeli ekstrakt jest zabarwiony na niebiesko, to należy go odrzucić i ekstrakcję powtórzyć z nowymi rękawicami.

A.6.2.5 Ostrożnie przenieść ekstrakt do próbówki wirówkowej (A.4.3) i sklarować ekstrakt albo przez wirowanie, co najmniej przy 2000g, przez 15 min, albo filtrowanie przez krążek filtracyjny jednorazowego użytku (A.4.4), albo stosując w razie potrzeby obie te metody. Otrzymany klarowny roztwór albo przechować w lodówce w temperaturze od 2°C do 8°C i wykonać oznaczanie w ciągu 48 h, albo zamrozić część roztworu i przechowywać ją w temperaturze -18°C , lub niższej, nie dłużej niż 2 miesiące przed wykonaniem analizy.

A.6.2.6 Odciąć część mankietu ekstrahowanej zewnętrznej rękawicy powyżej zaznaczonej odległości 20 cm, wytrzeć cienką tkaniną roztwór z powierzchni, pozostawić w temperaturze pokojowej do wysuszenia i zważyć odciętą część mankietu z błędem nie większym niż 0,1 g (m_2). Obliczyć masę (m) ekstrahowanej części rękawicy z równania:

$$m = m_1 - m_2$$

A.6.3 Wzorzec białka

A.6.3.1 Podstawowy roztwór białka

Sporządzić roztwór ovalbuminy (A.3.8) o nominalnym stężeniu 1 mg/ml, rozpuszczając 25 mg ovalbuminy w 25 ml buforu ekstrakcyjnego (A.3.2.2). Roztwór przefiltrować przez filtr o wielkości porów $0,22\ \mu\text{m}$ (A.4.4) i oznaczyć rzeczywiste stężenie ovalbuminy za pomocą spektrofotometru do pomiaru absorpcji w 280 nm, używając kwarcowej kuwety (A.4.7). Jeżeli absorbancję podzieli się przez 0,715³⁾, to otrzyma się stężenie roztworu w mg/ml. Roztwór przechowywany w lodówce jest trwały przez 2 dni, a zamrożony i przechowywany w temperaturze -18°C przez 2 miesiące. Odmrożenie wymaga ogrzewania w temperaturze 45°C przez 15 min.

A.6.3.2 Wzorcowy roztwór białka

Sporządzić serię rozcieńczeń podstawowego roztworu białka (A.6.3.1) buforem ekstrakcyjnym (A.3.2.2) tak, aby otrzymać roztwory o nominalnym stężeniu w przybliżeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ i 2 $\mu\text{g/ml}$. Jako ślepą próbkę stosować bufor ekstrakcyjny. Roztwory przechowywane w lodówce są trwałe przez 2 dni, a zamrożone i przechowywane w temperaturze -18°C przez 2 miesiące. Odmrożenie wymaga ogrzewania w temperaturze 45°C przez 15 min.

³⁾ Jeśli przyjąć masę cząsteczkową 43000 D i molową ekstynkcję 30745 w 280 nm przy pH 7,4, to ekstynkcja 1 mg/ml ovalbuminy w 0,1 M buforze TES o pH 7,4 wynosi 0,715 w przypadku drogi optycznej 1 cm [15].

stronica 13
EN 455-3:1999

A.6.4 Strącanie i zatężanie białka

A.6.4.1 Procedurę przeprowadzać w dwóch powtórzeniach w temperaturze (25 ± 5 °C).

A.6.4.2 Do mikroprobówek (A.4.6) przenieść dokładnie po 1 ml ślepej próbki wzorcowego roztworu białka (A.6.3.2) i do trzech próbek po 1 ml ekstraktu z rękawic (A.6.2.5). Dodać 0,1 ml DOC (A.3.5), wymieszać za pomocą mieszadła wirowego i pozostawić do odstania na 10 min. Dodać 0,1 ml TCA (A.3.6) i 0,1 ml PTA (A.3.7), wymieszać za pomocą mieszadła wirowego i pozostawić do odstania na dalsze 30 min.

A.6.4.3 Wirować przy 6000g przez 15 min. Zdekantować supernatant i suszyć przez 5 min, odwracając każdą probówkę wirówkową i ustawiając ją na bibule.

A.6.4.4 Dodać 0,2 ml 0,1 M roztworu wodorotlenku sodowego (A.3.4) do każdej probówki, w tym probówki ze ślepą próbką. Mieszać za pomocą mieszadła wirowego w celu ponownego rozpuszczenia strąconych białek. Sprawdzić, czy białka całkowicie się rozpuściły, tworząc klarowny roztwór. W zależności od rękawic nieraz zachodzi potrzeba pozostawienia roztworu na noc w lodówce w temperaturze (5 ± 3) °C. Jeżeli jakaś część osadu pozostanie, dodawać kolejną odmierzoną ilość roztworu wodorotlenku sodu, porcjami po 0,2 ml aż do 1 ml i w następnych etapach używać 0,2 ml porcji. Może okazać się celowe rozcieńczenie ekstraktu z takich próbek przed strąceniem.

UWAGA: Proces zatężania białka poprzez wytrącenie i ponowne rozpuszczenie ma na celu oczyszczenie białka i pozbycie się substancji przeszkadzających. Jest nieuniknione, że w trakcie tego procesu pewna ilość białka zostaje strącona, ale przyjmuje się w badaniu, że ten sam procent białka zostanie strącony z wzorcowego roztworu białka, co z ekstraktów badanych próbek. Jednakże, zaleca się ograniczenie strat do minimum, ponieważ większe straty mogłyby dać wyniki niepowtarzalne.

A.6.5 Wywołanie zabarwienia

A.6.5.1 Metoda tu opisana dostosowana jest do zestawu handlowego używanego do walidacji. Inne zestawy lub odczynniki przygotowane z substancji chemicznych dostępnych w handlu mogą wymagać innych objętości i czasów inkubacji.

A.6.5.2 Dodać po 0,125 ml odczynnika A (A.3.3.1) do każdej mikroprobówki zawierającej ponownie rozpuszczone białko oraz do mikroprobówki ze ślepą próbką. Dobrze wymieszać. Dodać po 1 ml odczynnika B (A.3.3.2), zamknąć probówki, wymieszać za pomocą mieszadła wirowego i pozostawić na 30 min w celu osiągnięcia pełnego zabarwienia. Jeśli na tym etapie wystąpi wytrącanie, odwirować lub przefiltrować w celu usunięcia osadu przed pomiarem absorpcji.

A.6.6 Pomiar

A.6.6.1 Czytnik do płytek mikrotitracyjnych

Odpipetować odpowiednią objętość roztworu (A.6.5.2) do studzienki w płytce mikrotitracyjnej (A.4.8), tak aby studzienka było prawie pełna, np. 490 µl w 500 µl studzienice. Ze ślepą próbką jako odnośnikiem zmierzyć absorbcję przy określonej długości fali z zakresu od 600 nm do 750 nm.

UWAGA: Istotne jest, dla uzyskania jednorodnych wyników, aby roztwory wzorcowe, łącznie z ekstraktami z rękawic, były zbadane równocześnie w ciągu 1 h po uzyskaniu trwałego zabarwienia.

A.6.6.2 Spektrofotometr

Przenieść roztwór (A.6.5.2) do kuwety (A.4.9) i zmierzyć absorbcję ze ślepą próbką jako odnośnikiem przy określonej długości fali z zakresu od 600 nm do 750 nm.

UWAGA: Istotne jest, dla uzyskania jednorodnych wyników, aby roztwory wzorcowe, łącznie z ekstraktami z rękawic, były zbadane równocześnie w ciągu 1 h po uzyskaniu trwałego zabarwienia.

A.7 Wyrażanie wyników

A.7.1 Obliczenia

A.7.1.1 Krzywa wzorcowa

Na podstawie dwóch oznaczeń obliczyć średnią absorbancję. Powtórzyć oznaczanie, jeżeli poszczególne wyniki różnią się więcej niż o 20 %. Sporządzić krzywą wzorcową, nanosząc wartości średnich absorbancji uzyskanych z pomiarów w funkcji rzeczywistego stężenia pierwotnych roztworów wzorcowych białka, jak to pokazano na rysunku A.2. Krzywa wzorcowa powinna być prostoliniowa w zakresie od 0 µg do 100 µg białka/ml pierwotnych roztworów wzorcowych białka.

UWAGA: Pewna ilość białka jest tracona w procesie zatężania. Zakłada się, że w procesie zatężania, z wzorców traci się taki sam procent białka, jak z badanych próbek.

A.7.1.2 Stężenie w ekstrakcie

Dla każdego z czterech ekstraktów obliczyć średnią absorbancję z dwóch oznaczeń (patrz A.6.4.1). Powtórzyć oznaczanie, jeżeli poszczególne wartości różnią się więcej niż o 20 %. Określić stężenia w ekstrahowanych próbkach (C), w µg/ml ekstraktu, odczytując je wprost z prostoliniowej części krzywej wzorcowej.

UWAGA: W przypadku gdy krzywa wzorcowa nie jest prostoliniowa, wartość może być obliczona za pomocą regresji kwadratowej. Sugeruje się, że bardzo praktyczne jest zastosowanie dostępnego w handlu oprogramowania komputerowego do dopasowania krzywej i obliczenia nieznanych stężeń.

A.7.2 Wyniki

W przypadku każdej próbki zawartość białka, w µg/g rękawicy, jest wyrażona wzorem:

$$P = (V \cdot C \cdot F) \div m$$

gdzie:

P zawartość wymywalnego białka

V objętość użytego środka ekstrakcyjnego, w mililitrach

C stężenie białka w ekstrakcie, w mikrogramach na mililitr

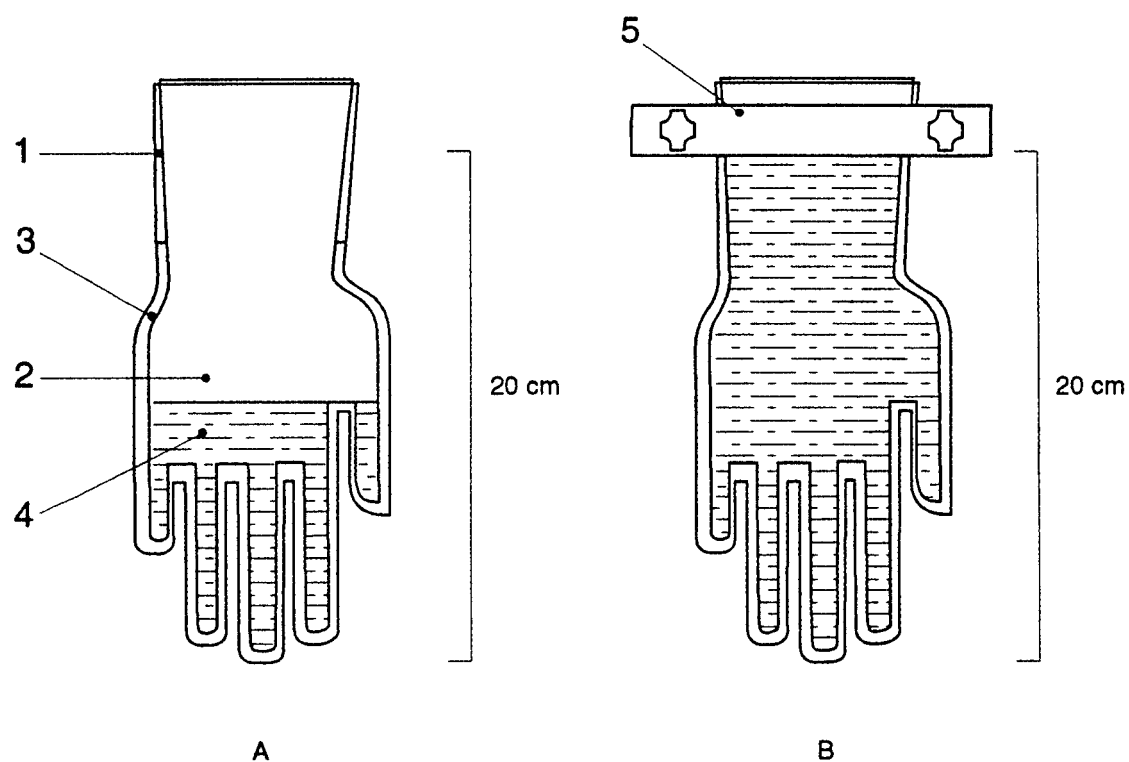
F współczynnik rozcieńczenia

UWAGA: F oznacza rzeczywistą objętość roztworu NaOH, w ml, użytą do ponownego rozpuszczenia białka, podzieloną przez 0,2.

m ciężar ekstrahowanej rękawicy, w gramach (A.6.2.6).

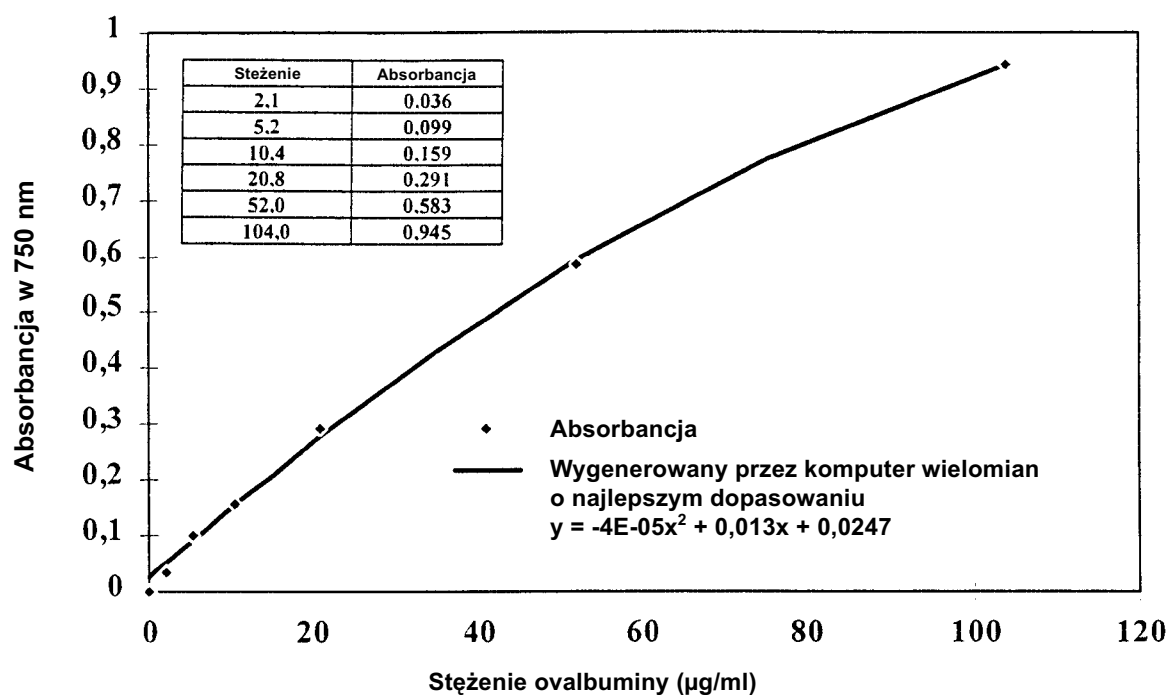
Zanotować średnią zawartość białka z czterech oznaczeń w ekstraktach z rękawic.

stronica 15
EN 455-3:1999



- 1 Zewnętrzna rękawica (rękawica 1)
- 2 Wewnętrzna rękawica (rękawica 2)
- 3 Bufor ekstrakcyjny
- 4 Roztwór barwnika
- 5 Zacisk rękawic

Rysunek A.1 – Ekstrakcja rękawic



Rysunek A.2 – Typowa krzywa wzorcowa wyznaczona z pomiarów za pomocą spektrofotometru przy 750 nm i drodze optycznej 1 cm

Załącznik B (informacyjny)

Immunologiczne metody oznaczania wymywalnych białek i alergenów z rękawic medycznych

B.1 Aktualny stan wiedzy o klinicznie znaczących alergenach z lateksu kauczuku naturalnego (NRL)^{N11)}

Wczesne (typu I, zależne od IgE) reakcje nadwrażliwości na NRL powodują białka i polipeptydy wymyte z wyrobów przemysłowych. W świeżo zebranym NRL stwierdzono, za pomocą dwukierunkowego immunoblottingu, obecność aż 240 różnych polipeptydów, z których co najmniej 57 można uznać za alergeny z powodu ich zdolności do wiązania się z przeciwciałami IgE z surowicy pacjentów uczulonych na lateks [8]. Wykazano, że niektóre białka z NRL są zdolne do wiązania się z IgE i powodują wczesne reakcje nadwrażliwości u pacjentów uczulonych na lateks [5, 6, 7, 8, 25, 26]. Wiele z tych białek poznano ostatnio na poziomie struktury pierwszorzędowej. Najważniejsze alergeny, których dane dotyczące struktury pierwszorzędowej są obecnie dostępne, to 20 kD proheweina, 14 kD C-domena heweiny, 14,6 kD czynnik wydłużenia kauczuku (REF)^{N12)}, 36 kD białko, które jest przypuszczalnie endo-1,3-, -glukozydazą^{N13)} drzewa kauczukowego, i wcześniej nieopisane białka z NRL o pozornej masie cząsteczkowej 27 kD i 45 kD [9, 10, 11, 13].

Niewiele wciąż wiadomo, które ze specyficznych alergenów są wymywane z różnych rodzajów rękawic. Coraz więcej danych wskazuje, że decydującą rolę mogą odgrywać peptydy o małej masie cząsteczkowej, mające epitopy alergenowe odpowiedzialne za reakcje uczuleniowe. Niektóre czynniki związane z traktowaniem surowców z substancjami chemicznymi i innymi substancjami dodawanymi w trakcie wytwarzania i szczególnie związane ze zmianami procedur wytwarzania, takich jak sporządzanie mieszanek, wulkanizacja, wypłukiwanie, mogą mieć znaczący wpływ na ilość i rodzaj wymywalnych białek.

Kiedy rozważa się poszczególne immunologiczne metody oznaczania, istotne jest odróżnienie alergenów (zdolnych do wiązania IgE) od antygenów. W poniższych rozdziałach krótko przedstawiono metody oznaczania o udokumentowanej przydatności do rozpoznawania specyficznych alergenów NRL.

B.2 Immunologiczne metody pomiaru alergenów NRL

B.2.1 Metody jakościowe/półilościowe

B.2.1.1 Immunoblotting^{N14)}

Jedno- i dwukierunkowe metody immunoblottingu są bardzo cennymi metodami, które dostarczają wiele ważnych informacji o niektórych aspektach związanych z klinicznie znaczącymi alergenami NRL. Na razie wyniki badań ekstraktów z rękawic nie mogą być w praktyce użyteczne do oceny obecności ani, co jest nawet ważniejsze, nieobecności alergenów. Należy szczególnie zaznaczyć, że niskocząsteczkowe peptydy, które mogą być w dużej mierze odpowiedzialne za wysoką aktywność wymywalnych alergenów, mogą łatwo uniknąć wykrycia za pomocą standardowego Western blottingu^{N15)}.

^{N11)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "natural rubber latex".

^{N12)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "rubber elongation factor".

^{N13)} Odsyłacz krajowy: Błąd w normie europejskiej, powinno być "endo-1,3-β-glukozydazą" albo "endo-1,3-beta-glukozydazą".

^{N14)} Odsyłacz krajowy: Przyjęta także w Polsce (nazwa "przeniesienie immunologiczne" nie upowszechniła się) nazwa techniki analitycznej, w której próbki antygenów wstępnie rozdziela się elektroforetycznie w żelu separacyjnym (np. w żelu poliakrylamidowym), następnie rozdzielone makrocząsteczki przenosi się elektroforetycznie w komorach do blottingu na błony nitrocelulozowe, które inkubuje się później z przeciwciałami. Związane z rozdzielonym materiałem przeciwciała uwidacznia się za pomocą przeciwciał antyglobulinowych znakowanych radioizotopami.

^{N15)} Odsyłacz krajowy: Western blotting jest przyjętą także w Polsce inną nazwą immunoblottingu. Jest rodzajem blottingu (techniki biochemicznej polegającej na rozdziale makrocząsteczek na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym i przeniesieniu ich na odpowiednie podłoże), w którym elektroforetycznie rozdziela się białka (patrz odsyłacz krajowy N14). Inne rodzaje blottingu to Southern blotting, w którym elektroforetycznie rozdziela się DNA, oraz Northern blotting, w którym elektroforetycznie rozdziela się RNA. Nazwa Southern blotting pochodzi od nazwiska wynalazcy tej techniki E. M. Southerna. Nazwy innych rodzajów blottingu są grą słów w jęz. angielskim, ponieważ "southern" znaczy południowy, "northern" – północny a "western" – zachodni.

B.2.1.2 Immunospot ^{N16)}

Jest to ostatnio opracowana metoda półilościowego wykrywania alergenów przez ich wiązanie z IgE [21, 22]. Próbkę naniesioną na papier nitrocelulozowy są wykrywane przez zastosowanie surowicy pobranej od wielu pacjentów uczulonych na lateks, a każde związane IgE jest wykrywane po autoradiografii. Chociaż prosta, metoda może być czasochłonna i czułość jej nie zawsze jest dostateczna w przypadku próbek o małej aktywności alergicznej. Metody oparte na procedurze, w której laboratorium sporządza dla każdej badanej próbki fazę stałą z alergenem, z reguły nie mogą być wystarczająco wystandaryzowane.

B.2.1.3 Rakiolkowa immunoelektroforeza (RIE) ^{N17)}, **rakiolkowa radioimmunoelektroforeza (RRVE)** ^{N18)}, **krzyżowa immunoelektroforeza (CIE)** ^{N19)} i **krzyżowa radioimmunoelektroforeza (CRIE)** ^{N20)}

RIE/RRVE jest elektroforezą jednokierunkową, a CIE/CRIE elektroforezą dwukierunkową, w których królicze przeciwciała przeciw lateksowi są stosowane do precypitacji antygenów, które są widoczne po wybarwieniu białek, podczas gdy alergeny są ujawniane po związaniu ich z IgE i autoradiografii [20]. W celu otrzymania wiarygodnych wyników zaleca się, aby używana zwierzęca (na ogół królicza) surowica odpornościowa zawierała przeciwciała przeciw wszystkim alergenom lateksu. Metody te są dość czasochłonne i zalecane tylko do celów badawczych.

B.2.2 Metody ilościowe**B.2.2.1 Metoda zahamowania przeciwciał IgE znakowanymi przeciwciałami drugiego rzędu**

W radioalergoadsorpcyjnych testach (RAST) ^{N21)} hamowania, alergeny są unieruchomione na odpowiedniej fazie stałej, gdzie są rozpoznawane przez specyficzne przeciwciała IgE. Podobne alergeny lub ich epitopy mogą, w sposób zależny od dawki, hamować wiązanie przeciwciał IgE ze wzorcowej surowicy zebranej od wielu dawców. Stopień hamowania może być określony ilościowo przez porównanie wyników uzyskanych z serii rozcieńczeń ekstraktów ze znanym wzorcem. Istnieją dwa ważne warunki wstępne oznaczania: zaleca się, aby wszystkie stosowane alergeny były obecne w fazie stałej oraz aby wzorcowa surowica zebrana od wielu dawców zawierała dostateczną ilość wszystkich przeciwciał IgE o określonej swoistości. Zaletą testów hamowania RAST jest to, że są wystandaryzowane do oceny alergenów [24]. Metoda jest wysoce czuła, a niezbędne wyposażenie i wymagane umiejętności ma wiele laboratoriów klinicznych specjalizujących się w badaniach alergii. Główną wadą testów hamowania RAST jest to, że bieżąco zależą od ludzkiej surowicy jako źródła przeciwciał IgE. Oznaczanie jest także uważane za czasochłonne i drogie.

W standardowym teście immuno-enzymatyczno-adsorpcyjnym (ELISA) ^{N22)}, białka NRL są unieruchomione na powierzchni studzienek płytki mikrotitracyjnej. Zasada metody jest identyczna jak w teście hamowania RAST i podobnie jak w teście hamowaniu RAST, test hamowania ELISA zależny jest od ludzkiej surowicy jako źródła przeciwciał IgE. W porównaniu z RAST, własne wykonanie testu ELISA jest mniej kosztowne. Jednakże trudno jest dokładnie wystandaryzować niekowalencyjną adhezję alergenów do fazy stałej.

W przypadku alergii na NRL, hamowanie RAST jest stosowane przez szereg zespołów do ilościowych pomiarów aktywności alergenów z wyrobów przemysłowych wykonanych z NRL [27]. Dotychczas nie opublikowano sprawozdań, w których hamowanie RAST byłoby zwalidowane w stosunku do testów skórnych z nakłuwaniem przez kroplę badanego ekstraktu z NRL. Ostatnio uzyskane dane, dotyczące hamowania RAST według

^{N16)} Odsyłacz krajowy: Nazwa przyjęta także w Polsce.

^{N17)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "rocket immuno-electrophoresis". Nazwa metody pochodzi od kształtu tworzących się precypitatów, który przypomina rakiety.

^{N18)} Odsyłacz krajowy: Błąd w normie europejskiej, powinno być "RRIE", co jest skrótem angielskich słów "rocket radio-immuno-electrophoresis".

^{N19)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "crossed immuno-electrophoresis". Nazwa metody pochodzi od prostopadłych kierunków elektroforezy dwukierunkowej: w pierwszym etapie elektroforetycznie rozdziela się w żelu agarowym mieszaninę białek antygenowych, drugi etap polega na immunoprecypitacji podczas elektroforezy, w kierunku prostopadłym do kierunku pierwszej elektroforezy, w żelu agarowym zawierającym przeciwciała.

^{N20)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "crossed radio-immuno-electrophoresis".

^{N21)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "radio-allergo-sorbent-test".

^{N22)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "enzyme linked immunosorbent assay".

własnej metody, wykazują wysoce znaczącą korelację z takimi testami skórnymi (będą publikowane). Jak dotąd nie są osiągalne żadne dane dotyczące walidacji ilościowego oznaczania, za pomocą metod hamowania ELISA, alergenów wmywanych z przemysłowych wyrobów gumowych. Jednakże, w niepublikowanych badaniach wspomnianych wyżej, opracowana ostatnio metoda hamowania ELISA wykazuje znaczącą korelację zarówno z testami skórnymi, jak i z hamowaniem RAST. Podobnie jak tego rodzaju testy skórne, wyniki testów hamowania przeciwciał IgE wykazują całkowitą zawartość alergenów, w tym rozmaite alergenne białka, każde w nieznanym stężeniu.

Zwykle, zaleca się, aby testy immunologiczne przeznaczone do ilościowego oznaczania alergenów były zwalidowane w stosunku do metod *in vivo*, w celu weryfikacji, czy mierzone alergeny mogą także wywoływać reakcje alergiczne *in vivo*.

B.3 Przewidywania na przyszłość

Niezbędne są dalsze badania w celu scharakteryzowania pierwszorzędowej struktury wszystkich znaczących alergenów NRL, jak też ich dominujących immunologicznie epitopów alergenowych. Takie informacje są niezbędne zanim będzie można rzetelnie opracować i wystandaryzować testy immunologiczne do ilościowego oznaczania pojedynczych alergenów. W badaniach zaleca się szczególne skupienie na scharakteryzowaniu cząsteczek alergenów wmywanych z rękawic, ponieważ obecnie rzeczywiście nic na ten temat nie wiadomo. W wielu laboratoriach trwają badania nad opracowaniem specyficznych immunologicznych metod oznaczania, opartych na zastosowaniu oczyszczonych alergenów NRL oraz monospecyficznych, poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał, z których każde rozpoznaje dobrze scharakteryzowane epitopy istotnych alergenów. Kiedy będzie mogła być zagwarantowana dostępność zarówno oczyszczonych białek NRL, jak i odpowiadających im monospecyficznych przeciwciał, należy oczekiwać wprowadzenia tych alergenospiecycznych metod, po ich walidacji, do rutynowych badań alergenów. Ponieważ liczba różnych alergenów jest przypuszczalnie zbyt duża, zapewne przekracza dwadzieścia, takie badanie przesiewowe będzie polegało na ilościowym oznaczaniu ograniczonej liczby głównych alergenów. Ostatecznym przyszłym celem są alergenospiecyczne testy immunologiczne nie wymagające ludzkiej surowicy jako źródła wzorcowych przeciwciał.

B.4 Zalecenia

Specyficzne metody wykazania obecności oraz ilościowego oznaczania alergenów NRL w ekstraktach z rękawic nie są jeszcze zwalidowane i wystandaryzowane, a dostępność tych metod nie jest jeszcze zorganizowana i zagwarantowana. W ciągu ostatnich kilku lat są gromadzone dowody w celu wykazania, że pomiary całkowitej ilości wmywalnych białek za pomocą odpowiednio wystandaryzowanej i zwalidowanej metody (metod) mogą być uznane za uzasadnioną tymczasową metodę, która w wielu przypadkach może być użyteczna do oszacowania alergenicności rękawic z NRL [28].

Załącznik C (informacyjny)

Analiza aminokwasów (AAA)^{N23)} za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC)^{N24)}

C.1 Podstawy

Oznaczanie białek zazwyczaj oparte jest na reakcjach barwnych z poszczególnymi elementami strukturalnymi, które są nieregularnie rozłożone w różnych białkach [12, 17, 18, 19, 23]. Z tego powodu współczynniki sygnału różnych białek znacząco się różnią [17, 19]. W dodatku, wiele substancji przeszkadza w oznaczaniach kolorymetrycznych z powodu albo niespecyficznego reakcji z odczynnikiem barwnym, albo hamowania powstawania zabarwienia.

W przypadku analizy aminokwasów unika się tych problemów. Zostało to potwierdzone wynikami badań prowadzonych w ramach programu Komisji Europejskiej "Pomiary i badania" [28]. W badaniach tych najlepszą korelację między wynikami badań klinicznych (test skórny z nakłuwaniem przez kroplę) a wynikami analiz chemicznych otrzymano, gdy stężenie białka było oznaczane za pomocą analizy aminokwasów [16].

Jednakże zaleca się stosowanie zmodyfikowanej metody Lowry'ego jako standardowej metody oznaczania białek w rękawicach z kauczuku naturalnego, ponieważ analiza aminokwasów wydaje się zbyt mało powszechna i zbyt skomplikowana, jak na procedurę standardową. Analiza aminokwasów może być stosowana do wyjaśnienia wątpliwych wyników otrzymanych zmodyfikowaną metodą Lowry'ego. Nie zaleca się analizy aminokwasów do oznaczania białka w celu zadeklarowania jego zawartości, ale zaleca się ją jako pomocną dla producentów do unikania wpływu substancji, które mogą powodować błędne oznaczanie białka metodą standardową.

C.2 Zasady oznaczania białek metodą HPLC

W pierwszym etapie białka hydrolizuje się 6 M kwasem chlorowodorowym. Powstałe wolne aminokwasy są następnie rozdzielane i wykrywane metodą HPLC [14]. Oznaczanie ilościowe z użyciem wzorca wewnętrznego (norwalina) i następnie zsumowanie pojedynczych aminokwasów daje całkowitą zawartość białka. Z powodu tej procedury metoda jest niezależna od jakichkolwiek właściwości strukturalnych pierwotnych polimerowych cząsteczek. Dotychczas nie udało się znaleźć substancji przeszkadzających, lecz wydaje się, że obecność soli TES pozwala uniknąć strat aminokwasów (np. przez efekty przyścienne).

C.3 Szczegóły oznaczania białek

C.3.1 Hydroliza

Próbka od 0,4 µg do 10 µg białka, z dodatkiem 5 nmol norwaliny jako wzorca wewnętrznego, jest hydrolizowana w 6 M HCl przez 48 h w temperaturze 110 °C w szczelnie zamkniętej próbówce polipropylenowej. Zaleca się, aby kwas chlorowodorowy był najwyższej dostępnej czystości. Tlen jest przed hydrolizą usuwany strumieniem azotu. Po hydrolizie próbka jest odparowywana do sucha (np. w koncentratorze próżniowym typu speedvac)^{N25)} i ponownie rozpuszczana w buforze derywatyzującym.

Poszczególne aminokwasy rozkładają się z różną szybkością w trakcie hydrolizy z HCl. Dlatego niezbędna jest hydroliza równomolowej mieszaniny wszystkich aminokwasów, których obecność jest spodziewana, w tych samych warunkach, równocześnie z każdym zestawem próbek.

^{N23)} Odsyłacz krajowy: Skrót angielskich słów "amino acid analysis".

^{N24)} Odsyłacz krajowy: Używany także w Polsce skrót angielskich słów "high pressure liquid chromatography" lub "high performance liquid chromatography" (po polsku: "wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa" lub "wysokosprawna chromatografia cieczowa").

^{N25)} Odsyłacz krajowy: Urządzenie do zatężania i osuszania próbek (najczęściej biologicznych) metodą próżniową, składające się m.in. z wirówki próżniowej, wymrażacza par (o temperaturze minus kilkudziesięciu stopni Celsjusza lub niższej), pochłaniacza par i pompy próżniowej. Nazwa urządzeń tego typu pochodzi od nazwy handlowej "SpeedVac".

C.3.2 Derywatywacja na kolumnie wstępnej

Ponieważ niezmienione aminokwasy dają bardzo różne sygnały fotometryczne, przed oznaczaniem przeprowadza się je w wykrywalne pochodne [14]. Zaleca się bardzo popularną derywatyzację na kolumnie wstępnej z aldehydem ftalowym (OPA) i kwasem 3-merkaptopropionowym (MPA) [14]. Powstające fluoryzujące pochodne izoindolu są rozdzielne na kolumnie HPLC i wykrywane detektorem fluorymetrycznym. Derywatywacja zależy od czasu i temperatury i dlatego zaleca się jej zautomatyzowanie (np. za pomocą automatycznego dozownika).

C.3.3 Rozdział na HPLC

Do analizy HPLC zaleca się zastosowanie sterowanego komputerowo podwójnego układu gradientowego po stronie wysokiego ciśnienia. Warunki rozdziału wszystkich 19 aminokwasów zależą od, zastosowanej jako wypełnienie kolumny, fazy odwróconej, której poszczególne partie mogą się znacząco różnić. Dlatego użyteczne są kolumny wypróbowane w tym zastosowaniu.

C.4 Obliczenia

Stężenia poszczególnych aminokwasów obliczane są z ich stosunku do wzorca wewnętrznego (norwaliny). Zsumowanie ilości wszystkich poszczególnych aminokwasów daje w wyniku stężenie całkowitej zawartości białka. Z powodu znaczącej zawartości wolnych aminokwasów w niektórych ekstraktach z rękawic, konieczne jest dwukrotne wykonanie analizy HPLC, raz z hydrolizą i raz bez hydrolizy z HCl. Całkowita zawartość aminokwasów (po hydrolizie) pomniejszona o zawartość wolnych aminokwasów (bez hydrolizy) daje stężenie białka z lateksu.

Hydroliza polimerowych białek wymaga przyłączenia jednej cząsteczki wody do każdego wiązania peptydowego. Powoduje to około 12 % błąd w oznaczaniu stężenia białka, zakładając równomolowy rozkład i średnią masę cząsteczkową wynoszącą 147 w przypadku wymienionych aminokwasów (tablica C.1). Jednak błąd ten jest prawie skompensowany utratą tryptofanu, cystyny i proliny. Dokładność i precyzja analizy aminokwasów za pomocą HPLC, z wykorzystaniem ovalbuminy pokazane są w tablicy C.2.

C.5 Przykłady

C.5.1 Wzorzec (rysunek C.1 a))

Na rysunku C.1 a) przedstawiono typowy chromatogram zhydrolizowanego roztworu wzorcowego 19 aminokwasów w stężeniu równomolowym. Spodziewane aminokwasy wymieniono w tablicy C.1. Asparagina i glutamina zostają całkowicie przekształcone w kwasy asparaginowy i glutaminowy, które nie wchodzi w skład roztworu wzorcowego. Norwalina, która nie występuje w naturze, użyta została jako wzorzec wewnętrzny. Tryptofan i cystyna są obecne w niezhydrolizowanym roztworze wzorcowym, ale są niszczone przez HCl. Prolina nie reaguje z OPA/MPA z powodu braku pierwszorzędowej grupy aminowej i dlatego nie jest wykrywalna przy tych warunkach derywatywacji. Lizyna często daje dwa piki, ponieważ jedna lub dwie z jej grup aminowych mogą reagować z OPA/MPA. Stosunek tych dwóch pików zależy od warunków reakcji (temperatury i czasu, który upłynął od chwili sporządzenia roztworu OPA) i dlatego zmienia się z oznaczania na oznaczanie, ale nie wpływa to na wyniki, jeśli uwzględni się powierzchnie obu pików.

C.5.2 Ekstrakt z rękawic (rysunek C.1 b))

Chromatogram zhydrolizowanego ekstraktu z rękawic (sporządzonego jak opisano w załączniku A) przedstawiono na rysunku C.1 b). Ta hydroliza białek lateksowych ujawnia całą listę spodziewanych aminokwasów (tablica C.1). Dodatkowe piki występujące przy 14,23 minuty oraz przy 24,08 minuty zostały zidentyfikowane jako pochodzące od pochodnych TES. Piki te są całkowicie odseparowane od wszystkich pików pochodzących od aminokwasów i nie mają wpływu na wynik analizy.

C.6 Zalety i wady metody HPLC

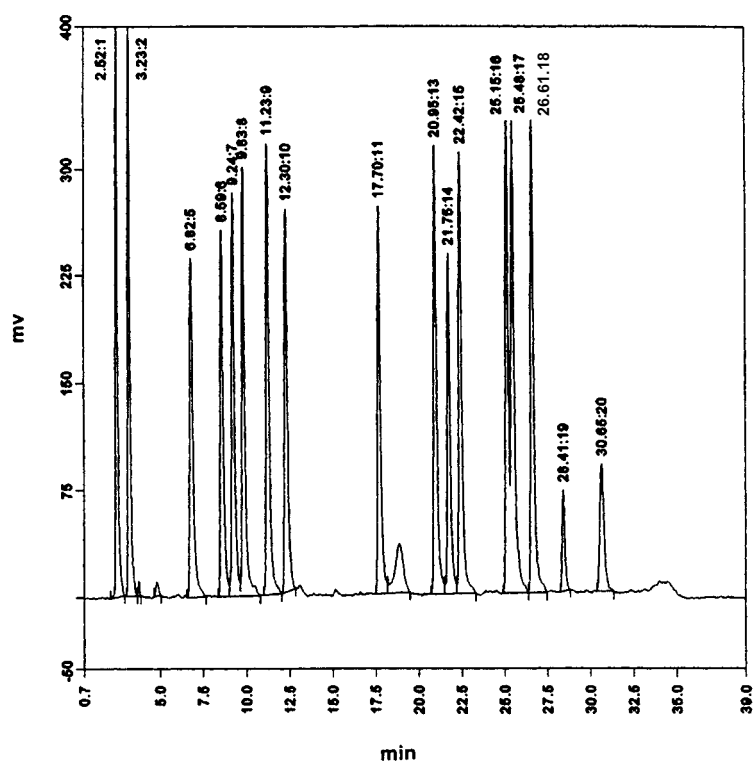
C.6.1 *Zalety*

1. Nie zależy od polimerowej struktury białka.
2. Wykazuje najwyższą korelację z danymi klinicznymi (test skórny z nakłuwaniem przez kroplę).
3. Nie są znane substancje przeszkadzające.
4. Wykazuje wyższą czułość niż oznaczania kolorymetryczne.
5. Jest wysoce specyficzna dla białek.

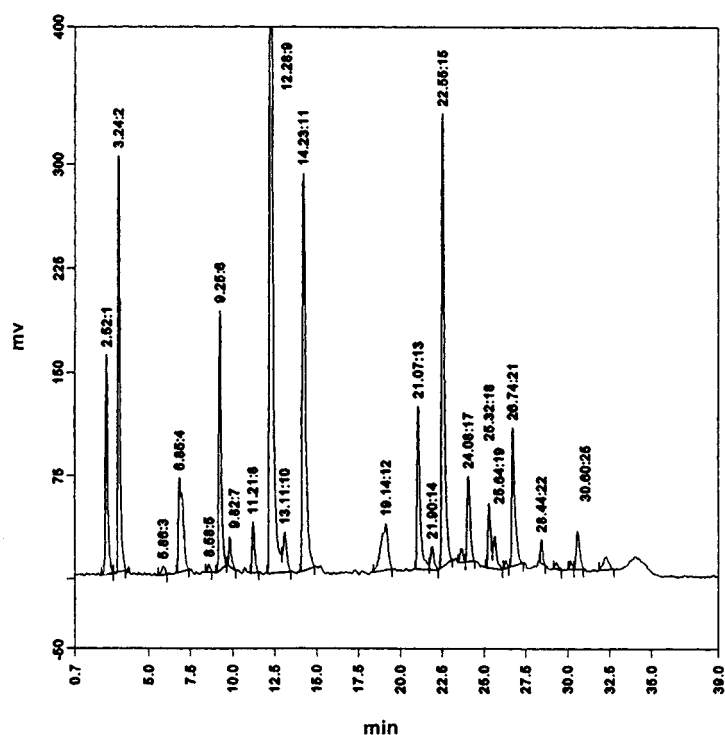
C.6.2 *Wady*

1. Nie jest metodą powszechną, stosowana jest jedynie w niewielu laboratoriach.
2. Jest czasochłonna.
3. Bardzo skomplikowana ocena wyników wymaga dużego doświadczenia.

stronica 23
EN 455-3:1999



Rysunek C.1. a) Wzorzec aminokwasów



Rysunek C.1. b) Ekstrakt z rękawic

Rysunek C.1 – Typowe chromatogramy wzorca aminokwasów i analizowanego ekstraktu z rękawic (35 µg białka)

Tablica C.1 – Wykaz aminokwasów znalezionych podczas analizy HPLC roztworu wzorcowego (rysunek C.1. a) i hydrolizatu ekstraktu z rękawic (rysunek C.1. b)).

Aminokwas	Czas retencji (minuty)		Uwagi
	Wzorzec	Analiza	
Kwas asparaginowy (ASP)	2,52	2,52	
Asparagina (ASN)	–	–	przekształcona w ASP
Kwas glutaminowy (GLU)	3,23	3,24	
Glutamina (GLN)	–	–	przekształcona w GLU
Seryna (SER)	6,83	6,85	
Histydyna (HIS)	8,60	-	
Glicyna (GLY)	9,25	9,25	
Treonina (THR)	9,84	9,82	
Arginina (ARG)	11,24	11,21	
Alanina (ALA)	12,30	12,29	
	–	14,23	TES (bufor ekstrakcyjny)
Tyrozyna (TYR)	17,7	–	
Walina (VAL)	20,95	21,07	
Metionina (MET)	21,75	21,90	
Norwalina (NORVAL)	22,42	22,55	wzorzec wewnętrzny
	–	24,08	TES (bufor ekstrakcyjny)
Izoleucyna (ILE)	25,15	25,32	
Feniloalanina (PHE)	25,48	25,64	
Leucyna (LEU)	26,61	26,74	
Lizyna (LYS)	28,41 30,65	28,44 30,60	
Tryptofan (TRY)	–	–	zniszczony przez hydrolizę
Cystyna, Cysteina (CYS)	–	–	zniszczone przez hydrolizę
Prolina (PRO)	–	–	niewykrywalna

Tablica C.2 – Wyniki analizy ovalbuminy w buforze TES o pH 7,4 oznaczonej metodą absorpcji przy 280 nm (maksimum absorpcji białek), za pomocą zmodyfikowanej metody Lowry’ego i AAA (HPLC).

Białko	Ciężar µg/ml	UV 280 nm µg/ml	Metoda Lowry’ego		HPLC	
			µg/ml	Cv (%) ¹⁾	µg/ml	Cv (%)
Ovalbumina	10,0	10,0	10,6	8,6	10,1	8,1
Ovalbumina	25,0	25,0	25,8	8,3	25,4	6,3
¹⁾ Cv = współczynnik zmienności (%) z 20 oznaczeń dzień po dniu.						

stronica 25
EN 455-3:1999

Załącznik D (informacyjny)

Słownik

Alergen: Antygen wywołujący alergię.

Przeciwciało: Immunoglobulina produkowana przez uaktywnione komórki B i komórki plazmatyczne, po ich ekspozycji na antygen, swoista dla indukującego antygeny.

Antygen: Jakikolwiek związek chemiczny rozpoznany przez receptory antygenowe limfocytów. Antygeny indukują odpowiedzi immunologiczne lub tolerancję immunologiczną. Antygeny indukujące odpowiedzi immunologiczne jedynie za pomocą komórek T są antygenami T-zależnymi podczas, gdy te, które nie wymagają pomocy komórek T, są antygenami T-niezależnymi. Wszystkie immunogeny są antygenami, ale niekoniecznie wszystkie antygeny są immunogenami (patrz także immunogen).

Determinant antygenowy: Pojedynczy obszar antygeny (epitop) zazwyczaj dostępny na powierzchni złożonego antygeny. Epitopy są rozpoznawane przez receptory antygenowe komórek T lub B (epitopy komórek T lub komórek B).

Nadwrażliwość: Nadmiernie wzmożona odpowiedź immunologiczna na bodziec.

Nadwrażliwość typu wczesnego (reakcja typu I wg Gella i Coombsa): Postać alergii rozwijająca się, od minut do godzin, po podaniu antygeny, w której uczestniczą przeciwciała. Niezbędna jest wcześniejsza ekspozycja. Przykładem jest katar sienny wywołany przez pyłki roślin.

Immunogen: Substancja zdolna wywołać specyficzną odpowiedź immunologiczną, objawiającą się tworzeniem specyficznych przeciwciał i/lub specyficznie zaangażowanych limfocytów. Aby indukować odpowiedź immunologiczną, immunogen powinien mieć strukturalnie i funkcjonalnie rozpoznawalne determinanty w celu aktywacji komórek B i komórek T.

Limfocyt: Komórki wywodzące się ze szpiku kostnego, z niewielką ilością cytoplazmy, zdolne do migracji i wymiany pomiędzy krwiobiegami i tkankami, trafia do miejsc ekspozycji na antygeny i pozostawia w tych miejscach. Jedynie komórki, które specyficznie rozpoznają i odpowiadają na antygeny (głównie z pomocą komórek dodatkowych). Limfocyty dzieli się na różne subpopulacje różniące się funkcją i produktami (np. limfocyty B, wspomagające komórki T, cytotoxiczne komórki T).

Uczulenie: Indukowanie swoistej pamięci immunologicznej w wyniku ekspozycji na alergen.

Załącznik E (informacyjny)**Bibliografia**

- 1 EN 455-1 Medical gloves for single use – Part 1: Requirements and testing for freedom from holes
- 2 EN 455-2 Medical gloves for single use – Part 2: Requirements and testing for physical properties
- 3 EN 980 Terminology, symbols and information provided with medical devices – Graphical symbols for use in the labelling of medical devices
- 4 EN ISO 10993 Biological evaluation of medical devices
- 5 Akasawa A, Hsieh L-S, Lin Y, Serum reactivities to latex proteins (*Hevea brasiliensis*). J Allergy Clin Immunol 1995 : **95** : 1196-1205
- 6 Alenius H, Palosuo T, Kelly K, et al. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. Int Arch Allergy Immunol 1993 : **102** : 61-66
- 7 Alenius H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T, IgE immune response to rubber proteins in adult patients with latex allergy. J Allergy Clin Immunol 1994 : **93** : 859-863
- 8 Alenius H, Kurup V, Kelly K, Palosuo T, Turjanmaa K, Fink J, Latex allergy: Frequent occurrence of IgE antibodies to a cluster of 11 latex proteins in patients with spina bifida and histories of anaphylaxis. J Lab Clin Med 1994: **123** : 712-720
- 9 Alenius H, Kalkinen N, Lukka M, et al. Purification and partial amino acid sequencing of a 27-kD natural rubber allergen recognized by latex allergic children with spina bifida. Int Arch Allergy Immunol 1995 : **106** : 258-262
- 10 Alenius H, Kalkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Yip E, Palosuo T, Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. Clin Exp Allergy 1995 : **24** : 659-661
- 11 Beezold D, Sussmann G, Kostyal D, Chang N-S, Identification of a 46-kD latex protein allergen in health care workers. Clin Exp Immunol 1994 : **98** : 408-413
- 12 Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976 : **72** : 248-255
- 13 Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, et al, The rubber elongating factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. J Allergy Clin Immunol 1993 : **92** : 690-670
- 14 Graser TA, Godel HG, Albers S, Foldi P, Furst P, An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. Anal Biochem 1985 : **151**: 142-152
- 15 Kidwai SA, Ansari AA, Salahuddin, Effect of succinylation (3-carboxypropionylation) on the conformation and immunological activity of ovalbumin. Biochem J 1976 : **155** : 171-180
- 16 Koch HU, Regulatory aspects of latex allergy (CEN; extractable protein and allergen assay for latex gloves). Rev Fr Allergol 1997: **37** : 1201-1210
- 17 Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 1: Chemie in Labor und Biotechnik 1995 : **46** : 82-85
- 18 Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 2: Chemie in Labor und Biotechnik 1995 : **46** : 135-136

stronica 27
EN 455-3:1999

- 19 Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem 1951 : **193** : 265-275
- 20 Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T, Characterization of latex antigens and allergens in surgical gloves and natural rubber by immunoelectrophoretic methods. J Allergy Clin Immunol 1992 : **90** : 230-235
- 21 Mäkinen-Kiljunen S, Detection and characterization of atopic allergens. Ann Med 1994 : **26** : 283-288
- 22 Mäkinen-Kiljunen S, Banana allergy in patients with immediate type hypersensitivity to natural rubber latex, Characterization of cross-reacting antibodies and allergens. J Allergy Clin Immunol 1994 : **93** : 990-996
- 23 Petersen GL, Determination of total protein. In Methods of Ezymology, Academic Press, Inc., New York 91, 95-118
- 24 Schröder H, Yinan L, Standardization of the RAST inhibition assay. Allergy 1980 : **35** : 234-236
- 25 Slater JE, Chhabra SK, Latex antigens. J Allergy Clin Immunol 1992 : **89** : 673-678
- 26 Slater JE, Trybul DE, Affinity purification of latex antigens. J Allergy Clin Immunol 1994 : **93** : 644
- 27 Yunginger JW, Jones RT, Fransway AF, Kelso JM, Warner MA, Hunt LW, Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. J Allergy Clin Immunol 1994 : **93** : 836-842
- 28 MATI-CT 940060 European Commission Study – Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves – Correlation of chemical allergological and immunological data
- 29 ATSM D 5712 Standard test method for analysis of protein in natural rubber and its products

Załącznik ZA (informacyjny)**Rozdziały niniejszej normy europejskiej dotyczące zasadniczych wymagań i innych postanowień dyrektyw UE**

Niniejsza norma europejska została opracowana na podstawie mandatu, udzielonego CEN przez Komisję Europejską i Europejskie Stowarzyszenie Wolnego Handlu, i wspiera zasadnicze wymagania dyrektywy UE 93/42/EEC.

OSTRZEŻENIE: Inne wymagania i inne dyrektywy UE moga być zastosowane w odniesieniu do wyrobu(-ów) objętego(-ych) zakresem niniejszej normy.

Niżej wymienione rozdziały niniejszej normy, podane w tablicy ZA.1, są zbieżne z zasadniczymi wymaganiami dyrektywy 93/42/EEC.

Stosowanie postanowień niniejszej normy jest jednym ze sposobów osiągnięcia zgodności z określonymi zasadniczymi wymaganiami odnośnej dyrektywy i związanych z nią przepisów EFTA.

Tablica ZA.1 – Powiązania niniejszej normy europejskiej z dyrektywami UE

Rozdział/podrozdział niniejszej normy europejskiej	Odpowiednie zasadnicze wymagania dyrektywy 93/42/EEC	Uwagi
4	1, 7.1, 7.2	
4.1	1, 2, 6	
4.2	7.5	
4.3	7.5	
4.5a)	13.3k)	
4.5b)	13.3j), 13.3k)	
4.5e)	13.2	

Załącznik krajowy NA (informacyjny)

NORMY I DOKUMENTY POWOŁANE W TREŚCI NORMY EUROPEJSKIEJ I ICH ODPOWIEDNIKI KRAJOWE

Normy i dokumenty powołane w EN	Odpowiedniki krajowe
EN 1041:1998	– PN-EN 1041:2001 Informacja dostarczana przez producenta wraz z wyrobem medycznym
EN 1441:1997	– PN-EN 1441:2001 Wyroby medyczne – Analiza ryzyka
EN ISO 10993 ¹⁾	–
The European Pharmacopoeia ²⁾ 3rd Edition, Suppl. 2.6.14, Bacterial endotoxins, 1998	–
The European Pharmacopoeia ³⁾ 3rd Edition, 2.6.8 Pyrogens, 1997	–

¹⁾ Istnieją krajowe odpowiedniki części 1 z roku 1997, części 2 z roku 1998, części 5 z roku 1999, części 7 z roku 1995, części 8 z roku 2000, części 9 z roku 1999, części 10 z roku 1995, części 11 z roku 1995, części 12 z 1996, części 13 z roku 1998, części 14 z roku 2001, części 15 z roku 2000, części 16 z roku 1997 – odpowiednio: PN-EN ISO 10993-1:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Ocena i badanie, PN-EN ISO 10993-2:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 2: Wymagania dotyczące postępowania ze zwierzętami, PN-EN ISO 10993-5:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Badania cytotoksyczności in vitro, PN-EN ISO 10993-7:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 7: Pozostałości po sterylizacji tlenkiem etylenu, PN-EN ISO 10993-8:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 8: Dobór i kwalifikacja materiałów odniesienia do badań biologicznych, PN-EN ISO 10993-9:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 9: Ramowy plan identyfikacji i oznaczania ilościowego potencjalnych produktów degradacji, PN-EN ISO 10993-10:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 10: Badania działania drażniącego i uczulającego, PN-EN ISO 10993-11:2000 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Badania toksyczności ogólnoustrojowej, PN-EN ISO 10993-12:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 12: Przygotowanie próbek i materiałów odniesienia, PN-EN ISO 10993-13:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 13: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji wyrobów medycznych z polimerów, PN-EN ISO 10993-14:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 14: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji ceramiki, PN-EN ISO 10993-15:2002(U) Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 15: Identyfikacja i ilościowe oznaczanie produktów degradacji metali i stopów, PN-EN ISO 10993-16:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 16: Projektowanie badań toksykokinetycznych produktów degradacji i substancji wymywalnych.

²⁾ Brak odpowiednika krajowego; oryginał dokumentu dostępny jest w bibliotece Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego oraz w niektórych bibliotekach wydziałów farmacji Akademii Medycznych; w Farmakopei Polskiej V (Tom III, 1996) zamieszczono monografię *Badanie obecności endotoksyn bakteryjnych (test LAL)*, która nie różni się merytorycznie od oryginału.

³⁾ Brak odpowiednika krajowego; oryginał dokumentu dostępny jest w bibliotece Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego oraz w niektórych bibliotekach wydziałów farmacji Akademii Medycznych; w Farmakopei Polskiej V (Tom I, 1990) zamieszczono monografię *Badanie obecności substancji gorączkotwórczych (pirogenów)*, która różni się od oryginału jedynie kryteriami oceny wyników badań.



ISBN 83-243-0971-3

Polski Komitet Normalizacyjny
ul. Świętokrzyska 14, 00-050 Warszawa
<http://www.pkn.pl>
