 <p>БЪЛГАРСКИ ИНСТИТУТ ЗА СТАНДАРТИЗАЦИЯ</p>	<p align="center">БЪЛГАРСКИ СТАНДАРТ</p> <hr/> <p align="center">МЕДИЦИНСКИ РЪКАВИЦИ ЗА ЕДНОКРАТНА УПОТРЕБА</p> <p align="center">Част 3: Изисквания и изпитване за биологична оценка</p>	<p align="center">БДС</p> <p align="center">EN 455-3</p>
<p>ICS 11.140</p> <p>Medical gloves for single use - Part 3: Requirements and testing for biological evaluation</p> <p>Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch – Teil 3: Anforderungen und Prüfung für die biologische Bewertung</p> <p>Gants médicaux non réutilisables — Partie 3: Exigences et essais pour évaluation biologique</p> <p>Европейският стандарт EN 455-3:2015 има статут на български стандарт от 2015-07-16.</p> <p>Този стандарт е официално издание на български език на европейския стандарт EN 455-3:2015.</p> <p>Преводът е направен от Българския институт за стандартизация. Изданието има същия статут като изданията на официалните езици на CEN.</p> <p>Изданието на български език на този стандарт е одобрено от изпълнителния директор на Българския институт за стандартизация на 2017-12-29.</p>		<p align="right">Заменя БДС EN 455-3:2007</p> <p align="right"><i>Национални стр. 2 и 34 стр. на EN</i></p>

НАЦИОНАЛЕН ПРЕДГОВОР

Този стандарт е подготвен с участието на БИС/ТК 87 „Медицински изделия“.

Този български стандарт заменя и отменя БДС EN 455-3:2007.

С прилагането на този стандарт се изпълняват съществените изисквания, определени в Наредбата за съществените изисквания и процедурите за оценяване на съответствието със съществените изисквания за медицинските изделия по чл. 2, ал. 1, т. 3 от Закона за медицинските изделия (приета с ПМС № 186 от 31.07.2007, обн. ДВ. бр. 65 от 10.08.2007).

В стандарта е направено позоваване на международни/европейски стандарти и документи, на които съответстват следните български стандарти:

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| - EN 1041:2008+A1:2013 | - БДС EN 1041:2008+A1:2013; |
| - EN ISO 10993-1:2009 | - БДС EN ISO 10993-1:2010; |
| - EN ISO 10993-5:2009 | - БДС EN ISO 10993-5:2010; |
| - EN ISO 10993-10:2013 | - БДС EN ISO 10993-10:2013; |
| - EN ISO 14971:2012 | - БДС EN ISO 14971:2012; |
| - EN ISO 15223-1:2012 | - БДС EN ISO 15223-1:2012; |
| - EN ISO 21171:2006 | - БДС EN ISO 21171:2006. |

Следват 34 страници на EN 455-3:2015 в превод на български език.

Издание на български език

МЕДИЦИНСКИ РЪКАВИЦИ ЗА ЕДНОКРАТНА УПОТРЕБА
Част 3: Изисквания и изпитване за биологична оценка

Medical gloves for single use - Part 3: Requirements and testing for biological evaluation
Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch – Teil 3: Anforderungen und Prüfung für die biologische Bewertung
Gants médicaux non réutilisables - Partie 3: Exigences et essais pour évaluation biologique

Този европейски стандарт е приет от CEN на 24 януари 2015 г.

Членовете на CEN са задължени да спазват Вътрешния правилник на CEN/CENELEC, в който са определени условията, при които без всякаква промяна този европейски стандарт получава статут на национален стандарт. Актуализирани списъци на такива национални стандарти с техните библиографски справки могат да бъдат получени от CEN-CENELEC Management Centre или от всеки член на CEN.

Този европейски стандарт съществува в три официални издания (на английски, немски и френски език). Всяко издание на друг език, направено от член на CEN на негова отговорност чрез превод на неговия национален език и регистрирано в CEN-CENELEC Management Centre, има същия статут като официалните издания.

Членове на CEN са националните органи по стандартизация на следните държави: Австрия, Белгия, Бивша югославска република Македония, България, Германия, Гърция, Дания, Естония, Ирландия, Исландия, Испания, Италия, Кипър, Латвия, Литва, Люксембург, Малта, Нидерландия, Норвегия, Обединено кралство, Полша, Португалия, Румъния, Словакия, Словения, Турция, Унгария, Финландия, Франция, Хърватия, Чешка република, Швейцария и Швеция.



ЕВРОПЕЙСКИ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИЯ
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels

СЪДЪРЖАНИЕ

Предговор	3
Въведение	4
1 Обект и област на приложение	5
2 Нормативни позовавания	5
3 Термини и определения	5
4 Изисквания	6
4.1 Общи положения	6
4.2 Химикали	6
4.3 Ендотоксини	7
4.4 Неопудрени ръкавици	7
4.5 Протеини, екстрахируеми	7
4.6 Етикетиране	7
5 Методи за изпитване	8
5.1 Ендотоксини	8
5.2 Опудрящ агент	8
5.3 Протеини, екстрахируеми	8
6 Протокол от изпитване	9
Приложение А (нормативно) Метод за определяне на екстрахируеми с вода протеини в ръкавици от естествен каучук чрез използване на модифицирания анализ на Lowry	10
Приложение В (информационно) Имунологични методи за измерване на алергени в латекс на естествен каучук	20
Приложение С (информационно) Анализи на аминокиселини чрез течна хроматография при високо налягане (HPLC)	26
Приложение ZA (информационно) Връзка между този европейски стандарт и съществените изисквания на Директива 93/42/ЕИО на ЕС за медицински изделия	34

ПРЕДГОВОР

Този документ (EN 455-3:2015) е разработен от технически комитет CEN/TC 205 *Non-active medical devices [Неактивни медицински изделия]*, чиито секретариат се поддържа от DIN [Немски институт по стандартизация].

Този европейски стандарт получава статут на национален стандарт или чрез публикуване на идентичен текст, или чрез потвърждаване най-късно до месец октомври 2015 г. и всички противоречащи му национални стандарти трябва да бъдат отменени най-късно до месец октомври 2015 г.

Обръща се внимание на възможността някои от елементите на този документ да бъдат обект на патентни права. От CEN [и/или CENELEC] не трябва да бъде търсена отговорност за идентифициране на едно или всички такива патентни права.

Този документ заменя EN 455-3:2006.

Този европейски стандарт е разработен по мандат, даден на CEN от Европейската комисия и Европейската асоциация за свободна търговия (EFTA), и е в подкрепа на съществените изисквания на директива(и) на Европейския съюз (ЕС).

За връзката с директива(и) на ЕС виж информационно приложение ZA, което е неразделна част от този стандарт.

По отношение на EN 455-3:2006 са направени следните промени:

- a) стандартът е посочен в съответните части на EN ISO 10993 за биологична оценка на медицинските изделия;
- b) нормативните позовавания са преработени;
- c) EN 980 е заменен с EN ISO 15223-1;
- d) в подточка 4.2 се определят "химикали";
- e) подточка 4.4 е определена като "неопудрени ръкавици";
- f) в целия стандарт е премахнато ниво "толкова ниско, колкото е възможно практично" (ALARP);
- g) в подточка 4.6 се определя "етикетиране";
- h) премахнат е символът за продукти, съдържащи естествен латекс (фигура 1);
- i) в приложение B са преработени позоваванията;
- j) направено е съответствие между този европейски стандарт и Директива 89/686/ЕИО за лични предпазни средства (виж приложение ZA).

EN 455 по общото заглавие *Медицински ръкавици за еднократна употреба* се състои от следните части:

- *Част 1: Изисквания и изпитване за откриване на дупки;*
- *Част 2: Изисквания и изпитване за физични свойства;*
- *Част 3: Изисквания и изпитване за биологична оценка;*
- *Част 4: Изисквания и изпитвания, отнасящи се за обявената дълготрайност при съхранение.*

Съгласно Вътрешния правилник на CEN/CENELEC националните органи по стандартизация на следните държави са задължени да въведат този европейски стандарт: Австрия, Белгия, Бивша югославска република Македония, България, Германия, Гърция, Дания, Естония, Ирландия, Исландия, Испания, Италия, Кипър, Латвия, Литва, Люксембург, Малта, Нидерландия, Норвегия, Обединено кралство, Полша, Португалия, Румъния, Словакия, Словения, Турция, Унгария, Финландия, Франция, Хърватия, Чешка република, Швейцария и Швеция.

ВЪВЕДЕНИЕ

Нежелани реакции на протеини в продукти от латекс са били установени преди доста години с различна степен на разпространение. Освен това в научната литература са описани нежелани реакции, дължащи се на химикали, омаслителни, остатъци от агенти на стерилизация, пирогени или други остатъци. Най-често съобщаваните нежелани реакции се дължат на ръкавици, изработени от латекс на естествен каучук, но някои от реакциите може да са били и от ръкавици, изработени от синтетични полимери.

EN ISO 10993 определя изискванията и методите за изпитване за биологична оценка на медицински изделия, но този стандарт не отбелязва специално нежелани реакции, които може да са резултат от използването на медицински ръкавици (например спонтанен вид алергии). Тези нежелани реакции се предизвикват от специфични алергени, които може да се съдържат в ръкавиците. Няколко са факторите, които допринасят за риска от реакция:

- a) продължителността и честотата на контакт на кожата с ръкавиците;
- b) въздействието на алергените чрез директния им контакт с лигавици и кожа (особено когато те предварително са били наранени) и при вдишване на частици;
- c) оклузивният характер на взаимодействието ръкавица/кожа при използване на ръкавицата.

Тази част на EN 455 съдържа изискванията и методите за изпитване за оценка на биологичната безопасност на медицинските ръкавици като част от процеса на управление на риска в съответствие с EN ISO 10993.

1 Обект и област на приложение

Тази част на EN 455 определя изисквания за оценка на биологичната безопасност на медицински ръкавици за еднократна употреба. Тя съдържа изисквания за етикетиране и за предоставяне на приложима информация относно използваните методи за изпитване.

2 Нормативни позовавания

Следните документи, изцяло или частично, са позовани нормативно в този документ и са задължителни за неговото прилагане. За датираните позовавания се прилага само цитираното издание. За недатираните позовавания се прилага последното издание на позовавания документ (включително измененията).

EN 1041:2008+A1:2013	<i>Информация, предоставяна от производителя на медицински изделия</i>
EN ISO 10993-1:2009	<i>Биологично оценяване на медицински устройства. Част 1: Оценяване и изпитване (ISO 10993-1:2009)</i>
EN ISO 10993-5:2009	<i>Биологично оценяване на медицински устройства. Част 5: Изпитвания за in vitro цитотоксичност (ISO 10993-5:2009)</i>
EN ISO 10993-10:2013	<i>Биологично оценяване на медицински устройства. Част 10: Изпитвания за раздразнение и чувствителност на кожата (ISO 10993-10:2010)</i>
EN ISO 14971:2012	<i>Медицински изделия. Прилагане на управлението на риска при медицински изделия (ISO 14971:2007, коригирана версия 2007-10-01)</i>
EN ISO 15223-1:2012	<i>Медицински изделия. Символи, използвани в етикетите, при етикетиране и в предоставяната информация за медицински изделия. Част 1: Общи изисквания (ISO 15223-1:2012)</i>
EN ISO 21171:2006	<i>Медицински ръкавици. Определяне на количеството опудрящ агент, което се отстранява от повърхността (ISO 21171:2006)</i>

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 Термини и определения

За целите на този документ се прилагат следните термини и определения.

3.1

химикали

вещества, прибавени или образувани по време на някой етап от производствения процес или при съхранение, които може да се съдържат в крайния продукт

ЗАБЕЛЕЖКА 1 към термина: Към тези вещества се отнасят омаслителите, химични покрития и стерилизиращи агенти. Обикновено малко химични компоненти се използват по време на производството на ръкавиците, като е известно, че някои от тях причиняват алергични реакции от тип IV. Видът и количеството на прибавените и остатъчните химикали е различно.

3.2

ендотоксини

липополизахариди, произхождащи от външната мембрана на клетката на Gram-отрицателни бактерии

ЗАБЕЛЕЖКА 1 към термина: Ендотоксините са вид пирогени. Ендотоксини може да се появят в резултат на бактериално замърсяване на суровините, по-специално при водния процес по време на производството или при ръчната обработка на ръкавиците.

3.3

опудрящ агент

всеки неразтворим във вода материал върху повърхността на ръкавица, който се отстранява чрез измиване при условията на изпитване

[ИЗТОЧНИК: EN ISO 21171:2006, 3.1]

ЗАБЕЛЕЖКА 1 към термина: Тук се включват както прибавените опудрящи агенти и други технологични добавки, така и случайно попаднали материали, които лесно може да бъдат отстранени от повърхността на ръкавицата. За целите този европейски стандарт всяка ръкавица, съдържаща 2 mg или по-малко опудрящ агент, е неопудрена ръкавица, а съдържаща над 2 mg, е опудрена ръкавица (за изискването виж 4.4)

3.4

гранична стойност на процеса

най-високата стойност, която вероятно е постигната за действителен производствен процес

3.5

протеини, алергенни

протеини, които могат да причинят алергична реакция от вид I

3.6

протеини, екстрахируеми

водоразтворими протеини и пептиди, екстрахируеми от крайния продукт

3.7

пирогени

вещества, които може да предизвикат повишена температура при зайци и също така повишена температура и други нежелани реакции при хората

4 Изисквания

4.1 Общи положения

EN ISO 10993-1:2009 описва общите принципи за биологичната оценка на медицински изделия и трябва да се използва за избор на съответни методи за изпитване, както това е описано в други части от тази серия. Въз основа на EN ISO 10993-1:2009 медицинските ръкавици се определят като изделия с ограничена продължителност на контакт с повърхността и изискват съответствие с EN ISO 10993-5:2009 и EN ISO 10993-10:2013.

Класификацията на медицинските ръкавици съгласно EN ISO 10993-1:2009 не трябва да се обърква с определенията за тези продукти в директивите за медицински изделия.

Трябва да бъде установен процес за управление на риска съгласно EN ISO 14971:2012.

4.2 Химикали

Ръкавиците не трябва да бъдат опудряни с прахообразен талк (магнезиев силикат).

Производителят трябва да предоставя при поискване списък на химичните ingredienti, които са прибавени по време на производството или, както това е известно, се съдържат в продукта като ускорители, антиоксиданти и биоциди, които, както също е известно, причиняват нежелани здравословни ефекти според съвременни данни.

При поискване производителят трябва да осигури доказателство за стъпките, предприети за намаляване на риска крайният потребител да бъде изложен на въздействието на химикали, използвани при производството, които според съвременни данни причиняват нежелани здравословни ефекти.

Производителите може да декларират отсъствието на вещество само ако веществото не е използвано в някой етап от производството. При производството на продукта не трябва да се използва никакво съединение, за което е известно, че образува вещество – обект на такава декларация.

4.3 Ендотоксини

Когато ръкавиците са етикетирани като „ниско съдържание на ендотоксини“, производителят трябва да контролира замърсяването с ендотоксини на стерилните ръкавици, като използва методи за изпитване, описани в 5.1. За така етикетирани ръкавици съдържанието на ендотоксини не трябва да надхвърля границата от 20 единици ендотоксини за един чифт ръкавици.

4.4 Неопудрени ръкавици

За неопудрени ръкавици общото количество на прахообразния остатък, определен съгласно метода за изпитване в 5.2, не трябва да надхвърля 2 mg за ръкавица. Всяка ръкавица, която съдържа над 2 mg опудрящ агент, е опудрена ръкавица.

4.5 Протеини, екстрахируеми

Производителят трябва да се стреми да намали до минимум нивото на екстрахируемите протеини.

Производителят трябва да контролира граничната стойност на процеса на екстрахируемите протеини, съдържащи се в латекса на естествен каучук, с помощта на метода, описан в 5.3 и приложение А. Документацията за тези резултати трябва да се запази. Резултатите от изпитването и използваният метод за изпитване трябва да бъдат предоставени при поискване.

ЗАБЕЛЕЖКА: Протеини, алергенни: този европейски стандарт описва метод за измерване, който определя с широко приближение съдържанието на алергени, т.е. екстрахируеми протеини. Няма пряка корелация между съдържанието на екстрахируеми протеини и на алергени. Количествени методи за определяне на протеините са описани в приложение В.

4.6 Етикетирание

Към етикетирането, определено в EN 1041:2008+A1:2013, и към съответните символи, дадени в EN ISO 15223-1:2012, се прибавят и следните изисквания:

- a) медицинските ръкавици от латекс на естествен каучук трябва да имат етикет върху опаковката на най-малката опакована единица със символ за латекс съгласно EN ISO 15223-1:2012 (виж 5.4.5).

Етикетът трябва да включва следното или еквивалентно предупредително указание заедно със символа (продукт), съдържащ латекс на естествен каучук, който може да причини алергични реакции, включително и последствия от свръхчувствителност.

- b) етикетът трябва да съдържа много ясно указание дали ръкавицата е опудрена или неопудрена;
- c) стерилни опудрени ръкавици трябва да имат етикет със следното или еквивалентно указание: „ВНИМАНИЕ: Опудрящият агент от повърхността трябва да бъде отстранен асептично преди оперативни процедури, за да се минимизира рискът от нежелани реакции на тъканите;

ЗАБЕЛЕЖКА 1: Това предупреждение трябва да бъде дадено върху вътрешната опаковка.

- d) етикетът за продукта за всяка медицинска ръкавица от латекс на естествен каучук не трябва да включва:
 - каквито и да е термини с предположение за относителна безопасност като ниска алергичност, хипоалергичност или ниско съдържание на протеини;
 - каквито и да е непотвърдени индикации за наличието на алергени;

- е) когато производителят етикетира ръкавиците със съдържание на протеини, трябва да бъде дадена и граничната стойност на процеса, измерена според 5.3.

ЗАБЕЛЕЖКА 2: Не се допуска обявяване върху етикети за стойности на протеините под 50 µg/g. По-ниски изисквания не се разглеждат поради свързането им с изменения в производството и междулабораторни изпитвания.

5 Методи за изпитване

5.1 Ендотоксини

Изборът, утвърждаването и използването на методи трябва да се опишат така, както са дадени в European Pharmacopoeia, Monograph 2.6.14, "Bacterial Endotoxins", с изключение на случаите, когато има неотстраними смущения в процедурите на Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Резултатите трябва да се изразяват в единици ендотоксини (E.U.) за чифт ръкавици.

ЗАБЕЛЕЖКА 1: Когато в процедурите на LAL има неотстраними смущения, нивото на бактериалните ендотоксини не може да бъде точно измерено.

Минималният брой чифтове ръкавици, препоръчван за изпитване в зависимост от техния брой в партидата, е два чифта ръкавици за партида, в която броят на ръкавиците е под тридесет, три чифта ръкавици за партида от тридесет до сто и 3 % за партида от над сто, като максимумът е десет чифта ръкавици за партида.

Външната повърхност на чифт ръкавици се екстрахира с 40 ml вода, пречистена от ендотоксини (Water LAL, European Pharmacopoeia), в продължение на не по-малко от 40 min и не повече от 60 min при температура между 37 °C и 40 °C. При това трябва да е сигурно, че всички повърхности са в контакт с екстрахиращата среда. Ако е необходимо, екстрактът се центрофугира в продължение на 15 min при 2 000 g, за да се отстранят частиците в него, след което течният компонент се отдекантира и веднага се подлага на изпитване за ендотоксини.

ЗАБЕЛЕЖКА 2: Съществуват и други методи за анализ на ендотоксини и те може да бъдат използвани за рутинен контрол на качеството, при условие че са валидирани и са в съответствие с метода, описан в този европейски стандарт.

5.2 Опудрящ агент

За определяне на остатъците от опудрящия агент трябва да се използва методът за изпитване, описан в EN ISO 21171:2006, точки 7 и 9.

5.3 Протеини, екстрахируеми

Методът за изпитване за аналитично определяне на екстрахируем протеин трябва да бъде модифицираният метод Lowry, описан в приложение А или подходящ валидиран метод в замяна на модифицирания метод Lowry.

ЗАБЕЛЕЖКА 1: Пример за валидиран аналитичен метод е даден в приложение С.

ЗАБЕЛЕЖКА 2: Имунологичните методи в приложение В засега не са валидирани в замяна на модифицирания метод Lowry, но може да бъдат съпоставени с клинични данни.

6 Протокол от изпитване

Протоколът от изпитване трябва да съдържа най-малко следната информация:

- позоваване на тази част на EN 455;
- вид на ръкавиците и код на производствената партида;
- наименование и адрес на производителя или дистрибутора и на лабораторията за изпитване, ако се различават;
- дата на извършване на изпитването;
- описание на използвания метод за изпитване;
- резултати от изпитването.

Приложение А (нормативно)

МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕКСТРАХИРУЕМИ С ВОДА ПРОТЕИНИ В РЪКАВИЦИ ОТ ЕСТЕСТВЕН КАУЧУК ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА МОДИФИЦИРАНИЯ АНАЛИЗ НА LOWRY

А.1 Обект и област на приложение

Този метод е предназначен за определяне на количеството на екстрахируеми с вода протеини в медицински ръкавици, изработени от естествен каучук (NR). Той е бил валидиран по време на междулабораторни изпитвания. Долната граница на измерването зависи от теглото на ръкавицата и е приблизително 10 µg протеин за g от ръкавицата (т.е. 2 µg протеин за ml от екстракта).

Някои химикали, като повърхностноактивни вещества, ускорители и антиоксиданти, които се прибавят към латекс на NR по време на производството на ръкавиците, може да попречат на проявяване на оцветяването при определянето, като някои материали може да намалят оцветяването, а други – да го увеличат. Ако методът за изпитване води очевидно до погрешни резултати поради смущения, тогава може да се използва всеки валидиран метод за анализ на аминокиселини (за пример да се види методът, даден в приложение С).

Лицата, използващи този метод, трябва да бъдат запознати с обичайната лабораторна практика.

ЗАБЕЛЕЖКА: Този метод не претендира за изчерпателност на всички проблеми на безопасността, свързани с неговото прилагане. Отговорност на потребителя е да въведе подходяща практика за безопасност и опазване на здравето и да осигури съответствие с националното законодателство.

А.2 Принцип

Водоразтворими протеини се екстрахират в буферен разтвор, след което се утаяват с киселини в присъствието на дезоксихолат, за да се концентрират и да се отделят от водоразтворими вещества, които може да пречат при определянето. След това утаените протеини отново се разтварят в натриева основа и се определят колориметрично с помощта на модифицирания метод Lowry. Анализът се основава на реакцията на протеини с меден реагент и реагент на Folin в алкална среда, при което се получава характерен син цвят. Спектрофотометричните измервания се извършват при определена дължина на вълната в интервала от 600 nm до 750 nm.

А.3 Реагенти

А.3.1 Общи положения

За анализ трябва да се използва двойно дестилирана вода или еквивалентна на това качество. Всички други реагенти трябва да бъдат с качество „за анализ“.

А.3.2 Екстрахиращ разтвор

А.3.2.1 N-трис-[хидроксиметил]-метил-2-аминоетансулфонова киселина (TES), полунатриева сол.

А.3.2.2 Буфер за екстракция, 0,1 M, приготвен чрез разтваряне на 24 g TES (А.3.2.1) в 1 l вода. Може да се използва всяка друга еквивалентна буферна система, ако разтворът има достатъчен буферен капацитет да поддържа pH $7,4 \pm 0,2$ в екстрактите на ръкавицата.

Приготвя се достатъчно количество за екстракция на ръкавици (А.6.2), за приготвяне на стандартни протеинови разтвори (А.6.3.2) и за празна проба.

А.3.2.3 Разтвор на багрило, бромфенолблау, разтвор на натриева сол; приготвя се чрез разтваряне на 100 mg бромфенолблау в 1 l вода. На всеки четири седмици се приготвя пресен разтвор.

A.3.3 Реагенти за анализ на протеини по Lowry

ЗАБЕЛЕЖКА: Реагентите може да се приготвят от налични в лабораторията химикали [1] или закупени като търговски продукти в комплект. Методът за този европейски стандарт е валидиран с търговски комплект. ¹⁾

A.3.3.1 Реагент А, меден реагент (алкален разтвор на меден тартарат или меден цитрат).

A.3.3.2 Реагент В, разреден реактив на Folin.

A.3.4 Натриев хидроксид, 0,1 М воден разтвор

A.3.5 Натриев дезоксихолат (DOC), 3,47 mM, приготвен чрез разтваряне на 0,15 g натриев дезоксихолат във вода и разреждане с вода до 100 ml. Този разтвор не трябва да се използва повече от четири седмици след приготвянето му.

A.3.6 Трихлороцетна киселина (ТСА), 4,4 mM във вода, приготвен се чрез разтваряне на 72 g ТСА във вода и последващо разреждане с вода до 100 ml.

A.3.7 Фосфоволфрамова киселина (РТА), приготвя се чрез разтваряне на 72 g РТА във вода и последващо разреждане с вода до 100 ml. Този разтвор не трябва да се използва повече от четири седмици след приготвянето му.

A.3.8 Яйчен албумин, от кокоши яйца ²⁾, лиофилизиран, несъдържащ соли.

A.4 Апаратура

A.4.1 Синтетични ръкавици, неопудрени.

A.4.2 Центрофуга, подходяща за достигане най-малко на 6 000 g.

A.4.3 Тръбички за центрофуга, 30 ml или 50 ml полипропиленови тръбички с ниска способност за абсорбция на протеини от 10 µg за тръбичка или по-малко. Да не се използва стъклено оборудване поради повърхностна абсорбция на протеините.

ЗАБЕЛЕЖКА: Метод за определяне на способността за абсорбция на протеини е описан в А.5.

A.4.4 Филтри за еднократна употреба, с размер на порите 0,22 µm и ниска способност за абсорбция на протеините от 10 µg на филтър или по-малка.

ЗАБЕЛЕЖКА: Метод за определяне на способността за абсорбция на протеини е описан в А.5.

A.4.5 Спринцовки за еднократна употреба, 20 ml, изработени от полиетилен или полипропилен.

A.4.6 Микротръбички, 2 ml, изработени от полипропилен.

A.4.7 Кварцови кювети, с дебелина 10 mm.

A.4.8 Плочки за микротитруване с 96 гнезда с плоско дъно, изработени от полистирен или кювети за еднократна употреба (А.4.9).

¹⁾ Комплект за изследване Lowry Micro DC протеин (каталожен номер 500-0116) е на разположение от BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, USA. Тази информация се дава само за улеснение на ползвателите на този европейски стандарт и не представлява потвърждаване от CEN на посочения продукт.

²⁾ Този яйчен албумин се приготвя от пресен белтък от кокоши яйца чрез фракциониране с амониев сулфат и повторна кристализация при рН 4,5; подходящ е например Sigma A 5503, албумин от кокоши яйца, Grade V, предлаган от Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA. Тази информация се дава само за улеснение на ползвателите на този европейски стандарт и не представлява потвърждаване от CEN на посочения продукт.

A.4.9 Кювети за еднократна употреба, 1,5 ml полумикро, 10 mm дебелина, изработени от полистирен.

A.4.10 Четящо устройство за микроплочки, предназначено за работа при дължина на вълната от 600 nm до 750 nm.

A.4.11 Спектрофотометър, предназначен за работа при дължина на вълната от 230 nm до 750 nm.

A.4.12 Смесител Vortex.

A.4.13 Микропипети, за еднократна употреба от полипропилен.

A.4.14 Стяга, за гарантиране на херметичност на ръкавиците по време на екстракцията. Препоръчват се две алуминиеви ленти, обвити с порест каучук и които могат да бъдат свързани с винтово съединение (виж фигура А.1) или пластмасов кламер с дължина 170 mm, предназначен за хемодиализа.

A.4.15 Клатачна машина

A.5 Измерване на способността за абсорбция на протеини

A.5.1 Общи положения

За употреба се препоръчва единствено оборудване от полипропилен (за който е известно, че има ниска способност за абсорбция на протеини). Преди използване на тръбичките за центрофугата и филтрите от нова партида трябва да се провери способността им да абсорбират протеини с помощта на следните методи. Изпитването трябва да се извърши в рамките на един и същи ден.

A.5.2 Способност на тръбичките за центрофуга да абсорбират протеини

A.5.2.1 В тръбичка за центрофуга (А.4.3) се поставят 30 ml от стандартния разтвор, съдържащ 10 µg/ml яйчен албумин, чрез разреждане на лабораторния разтвор на протеини (А.6.3.1) с буфер за екстракция (А.3.2.2).

A.5.2.2 Във всяка от две нови тръбички за центрофуга се прехвърлят по 10 ml порция за изпитване от разтвора на яйчения албумин (А.5.2.1), след което тръбичките се разклащат в клатачна машина (А.4.15), за да е сигурно, че цялата им повърхност е омокрена от разтвора. След 30 min разтворите се прехвърлят в други две нови тръбички и те се разклащат. Процедурата се повтаря, докато всяка порция от 10 ml е прехвърлена в пет тръбички. Останалият разтвор за изпитване се запазва.

A.5.2.3 Концентрацията на протеин в стандартния разтвор и в двата изпитвани разтвора се определя три пъти, като се използва методът, даден в А.6.4 до А.6.6.

A.5.2.4 Средната стойност на абсорбирания яйчен албумин се изчислява от израза:

$$O = \frac{10(R - T)}{5}$$

$$= 2 (R - T)$$

където:

O е абсорбираният яйчен албумин, в µg/тръбичка;

R е средната стойност от трите определяния на съдържанието на яйчен албумин в стандартния разтвор, в µg/ml;

T е средната стойност на съдържанието на яйчен албумин на изпитвания разтвор след преминаването му през тръбичките (т.е. средната от шест стойности) в µg/тръбичка.

Стойността на абсорбирания албумин (O) трябва да бъде по-малка от 10 μg за тръбичка, в противен случай тръбичките не са подходящи за определянето.

A.5.3 Абсорбционна способност на филтри

A.5.3.1 В тръбичка за центрофуга (A.4.3) се приготвят 30 ml от стандартния разтвор, съдържащ 10 $\mu\text{g/ml}$ яйчен албумин чрез разреждане на лабораторния разтвор на протеини (A.6.3.1) с буфер за екстракция (A.3.2.2).

A.5.3.2 Приготвят се две групи, съдържащи по пет филтъра (A.4.4). През филтрите на всяка група се филтруват 10 ml от стандартния разтвор в тръбичка за центрофугиране (A.4.3).

A.5.3.3 Съдържанието на протеини в стандартния разтвор и в двата разтвора за изпитване се определя три пъти, като се използва методът, даден в A.6.4 до A.6.6.

A.5.3.4 Средната стойност на абсорбирания яйчен албумин се изчислява от следния израз:

$$O = \frac{10(R - T)}{5}$$

$$= 2(R - T)$$

където:

O е абсорбираният яйчен албумин в μg /тръбичка;

R е средната стойност от трите определяния на съдържанието на яйчен албумин в стандартния разтвор в $\mu\text{g/ml}$;

T е средната стойност на съдържанието на яйчен албумин на изпитвания разтвор след преминаването му през филтрите за еднократна употреба (т.е. средната от шест стойности) в μg /тръбичка.

Стойността на абсорбирания албумин (O) трябва да бъде по-малка от 10 μg за филтър, в противен случай филтрите не са подходящи за определянето.

A.6 Процедура

A.6.1 Общи положения

Процедурата включва екстракцията на ръкавиците, след което екстрактът се пречиства и концентрира пет пъти. Определянето на екстракта се извършва чрез отчитане от калибрационна крива, получена от стандартни протеинови разтвори, концентрирани по същия начин.

При описания метод за екстракция вътрешната страна на една ръкавица и външната страна на друга ръкавица се екстрахират едновременно. По този начин екстракционният обем от 25 ml остава минимален и се избягва загубата на протеини към повърхностите на екстракционния съд поради това, че само буферът за екстракцията е в контакт с ръкавиците.

ЗАБЕЛЕЖКА: Вместо този метод може да се използва алтернативна процедура за екстракция, ако тя е валидирана. Серия от опити с избрани лаборатории от Европа и САЩ са показали еквивалентни резултати със стандарта ASTM D5712:1995 [2], когато се екстрахират отрязани от ръкавици парчета в продължение на 2 h при 25 °C в буфер TES pH 7,4.

A.6.2 Процедура за екстракция

A.6.2.1 При обработка на предназначения за изпитване ръкавици за екстракция трябва да се използват синтетични ръкавици (A.4.1).

Вземат се пробни тела от осем ръкавици от един и същи размер и от една и съща партида и се разделят на четири чифта. В случай на специфични за ръцете ръкавици се избират четири десни ръкавици за изпитване и четири леви ръкавици за изпитване, след което се разделят на по два десни и два леви чифта.

Маншетът на една ръкавица от всеки чифт се маркира с точка на (200 ± 10) mm от върха на средния пръст и тази ръкавица се претегля (m_1) с точност до 0,1 g. За всеки чифт втората ръкавица се вмъква в маркираната ръкавица, така че те да изглеждат, както е показано на фигура A.1a).

ЗАБЕЛЕЖКА: Методът за вмъкването на едната ръкавица в другата не е от решаващо значение от гледна точка на осигуряване възможно най-малко манипулиране на ръкавиците. Един от начините за това е да се вмъкне по една стъклена пръчка в палеца и малкия пръст на вътрешната ръкавица, за да се помогне да попаднат в съответните пръсти на втората ръкавица. След това пръчките се използват за другите три пръста.

A.6.2.2 Във вътрешната ръкавица се налива оцветен разтвор (A.3.2.3) в достатъчно количество, за да напълни и петте пръста. Между вътрешната и външната ръкавица се прибавят 25 ml буфер за екстракция (A.3.2.2) при (25 ± 5) °C. За по-големи ръкавици този обем може да се увеличи максимум до 50 ml. Отстраняват се повечето въздушни мехурчета и ръкавиците се притискат със стягата (A.4.14) при маркировката на 20 cm, за да се херметизират по отношение на водата, както това е показано на фигура A.1 b).

A.6.2.3 Ръкавиците се закрепват в клатачната машина (A.4.15) и се разклащат в продължение на (120 ± 5) min при (25 ± 5) °C.

A.6.2.4 Стягата се отстранява и ръкавиците се отделят внимателно една от друга. Особено трябва да се внимава екстрактът да не се замърси с цветния разтвор. Ако екстрактът е оцветен в синьо, той трябва да се изхвърли и екстракцията да се повтори с нов чифт ръкавици.

A.6.2.5 Екстрактът внимателно се прехвърля в тръбичка за центрофугиране (A.4.3) и се избистря чрез центрофугиране при не по-малко от 2 000 g в продължение на 15 min или чрез филтруване през филтър за еднократна употреба (A.4.4), или чрез комбинация от двата, ако това е необходимо. Бистрият екстракт може да бъде съхраняван при температура от 2 °C до 8 °C и анализът да се извърши в рамките на 48 h, или кратен брой проби от разтвора може да се замразят при минус 18 °C или още по-ниска температура за период от време не повече от 2 месеца преди анализа.

A.6.2.6 Отрязва се частта от маншета над 20 cm от марката от екстрахираната външна ръкавица, течността по повърхността ѝ се избърсва с хартиена кърпа, след което се изсушава при стайна температура и се претегля с точност до 0,1 g (m_2). Масата на екстрахираната част от ръкавиците (m) се изчислява, както следва:

$$m = m_1 - m_2$$

A.6.3 Стандарт за протеини

A.6.3.1 Лабораторен разтвор за протеини

Приготвя се разтвор от яйчен албумин (A.3.8) с номинална концентрация 1 mg/ml чрез разтваряне на 25 mg яйчен албумин в 25 ml буфер за екстракция (A.3.2.2). Разтворът се филтрува през филтър 0,22 µm (A.4.4) и се определя действителната концентрация на яйчения албумин с помощта на UV спектрофотометър, като се измерва екстинцията при 280 nm в кварцова кювета (A.4.7).

Екстинкцията се дели на 0,715³⁾, за да се получи точната концентрация в mg/ml. Разтворът е стабилен в продължение на 2 дни при охлаждане или в продължение на 2 месеца замразен при -18 °C. При размразяването пробата трябва да се загрее до 45 °C за 15 min.

A.6.3.2 Стандартни разтвори на протеини

От лабораторния разтвор на протеини (A.6.3.1) се приготвят поредица от разредени с буфер за екстракция (A.3.2.2) разтвори с номинална концентрация 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml и 2 µg/ml. Буферът за екстракция се използва като празна проба. Разтворите са стабилни в продължение на 2 дни при охлаждане или в продължение на 2 месеца замразени при -18 °C. При размразяването пробите трябва да се загрее до 45 °C за 15 min.

A.6.4 Утаяване и концентриране на протеини

A.6.4.1 Процедурата се извършва двукратно при (25 ± 5) °C.

A.6.4.2 По 1 ml от празната проба, стандартните протеинови разтвори (A.6.3.2) и четири екстракта от ръкавици (A.6.2.5) се прехвърлят старателно в микротръбички (A.4.6). Прибавят се по 0,1 ml от DOC (A.3.5), разбъркват се със смесител Vortex и се оставят да престоят 10 min. Прибавят се 0,1 ml от TCA (A.3.6) и 0,1 ml PTA (A.3.7), разбъркват се със смесител Vortex и се оставят да престоят 30 min.

A.6.4.3 След това се центрофугират при 6 000 *g* в продължение на 15 min. Горният течен слой се отделя и всяка от тръбичките за центрофуга се подсушава с филтърна хартия в продължение на 5 min.

A.6.4.4 Във всяка от тръбичките, включително и в тази с празната проба, се прибавят по 0,2 ml от 0,1 M разтвор на натриев хидроксид (A.3.4). Разбъркват се в Vortex смесителя, за да се разтворят отново протеините. При това трябва да се установи със сигурност, че протеините са се разтворили напълно и се е получил бистър разтвор. За да се постигне това понякога е необходимо в зависимост от ръкавиците разтворът да престои за да се размрази през нощта при (5 ± 3) °C. Ако все пак е останала някаква утайка, се прибавят измерени количества от разтвора на натриев хидроксид, като количеството нараства със стъпка от 0,2 ml до общо количество 1 ml. Може да е полезно екстрактът от такава проба да се разреди преди утаяването.

ЗАБЕЛЕЖКА: Процесът на концентриране на протеините чрез утаяване и повторно разтваряне е предназначен за пречистването им и за отстраняване на примеси. По време на този процес е неизбежно известно количество от протеина да се загуби. Приема се обаче, че същият процент загуби ще има и от стандартните разтвори на протеини, както това е при екстрактите на изпитваните проби. Независимо от това, загубата трябва да бъде намалена до минимум, тъй като големите загуби не биха били възпроизводими.

A.6.5 Проявяване на оцветяване

A.6.5.1 Описаният тук метод е адаптиран към търговски комплект химикали, който е използван за валидирането му. Други комплекти или реагенти, приготвени от налични в лабораторията химикали, може да изискват други обеми и инкубационни времена.

A.6.5.2 Във всяка микротръбичка, съдържаща разтвори на отново разтворен протеин, включително и празната проба, се прибавят 0,125 ml реагент А (A.3.3.1). Разбърква се добре. Прибавя се 1 ml реагент В (A.3.3.2), поставя се запушалка на тръбичката, разбърква се в смесителя и се изчаква пълното проявяване на цвета за 30 min. Ако през този етап се появи утайка, тогава преди измерване на абсорбцията утайката трябва да се центрофугира или филтрува.

³⁾ С молекулна маса от 43000 D и молна екстинкция от 30745 при 280 nm и рН 7,4, екстинкцията на 1 mg/ml яйчен албумин в 0,1 M TES буфер с рН 7,4 е 0,715 при използване на кювета с дебелина 1 cm [3].

A.6.6 Измерване

A.6.6.1 Четящо устройство за микроплочки

Във всяко гнездо на плочката за микротитруване (A.4.8) се отпипетирва такъв обем от разтвора (A.6.5.2), че гнездото да не е съвсем пълно, например 490 µl в гнездо от 500 µl. Измерва се абсорбцията по отношение на празната проба в специфичния интервал от дължини на вълната от 600 nm до 750 nm.

ЗАБЕЛЕЖКА: За получаването на еднородни резултати е важно стандартните разтвори и екстрактите от ръкавици да бъдат анализирани заедно в рамките на 1 h след проявяването на стабилно оцветяване.

A.6.6.2 Спектрофотометър

Разтворът (A.6.5.2) се прехвърля в кювета (A.4.9) и се измерва абсорбцията в сравнение с празната проба при специфична дължина на вълната в интервала от 600 nm до 760 nm.

ЗАБЕЛЕЖКА: За получаването на еднородни резултати е важно стандартните разтвори и екстрактите от ръкавици да бъдат анализирани заедно в рамките на 1 h след проявяването на стабилно оцветяване.

A.7 Изразяване на резултатите

A.7.1 Изчисляване

A.7.1.1 Калибрационна крива

Изчислява се средната абсорбция от две определяния. Ако отделните стойности се различават една от друга с повече от 20 %, определянето се повтаря. Приготвя се калибрационна крива, като се чертае графика на средната абсорбция от измерванията в зависимост от действителната концентрация на оригиналните стандартни протеинови разтвори, както е показано на фигура A.2. Калибрационната крива трябва да бъде линейна след интервала от 0 µg до 100 µg протеин/ml в оригиналните стандартни протеинови разтвори.

ЗАБЕЛЕЖКА: По време на концентрирането малка част от протеините се губи. Приема се, че същият процент от протеина се губи от стандартните разтвори, както и от изпитваната проба по време на концентрирането.

A.7.1.2 Концентриране на екстракт

За всеки от четирите екстракта се изчислява средната абсорбция от двете определяния (виж A.6.4.1). Ако отделните стойности се различават с повече от 20 %, определянето се повтаря. Концентрацията на екстрахираната проба (*C*) в µg/ml екстракт се отчита директно от линейната част на калибрационната крива.

ЗАБЕЛЕЖКА: Когато калибрационната крива не е линейна, стойността може да се изчисли чрез уравнение за квадратична регресия. Приема се, че търговски компютърен софтуер за изправяне на крива и изчисление на неизвестна концентрация е по-практично.

A.7.2 Резултати

Съдържанието на протеин във всяка проба се изчислява от израза:

$$P = \frac{(V \cdot C \cdot F)}{m}$$

където:

P е екстрахируемият протеин в µg/g ръкавица;

V е обемът на използваната среда за екстракция, в ml;

C е концентрацията на протеина в екстракта, в $\mu\text{g/ml}$;

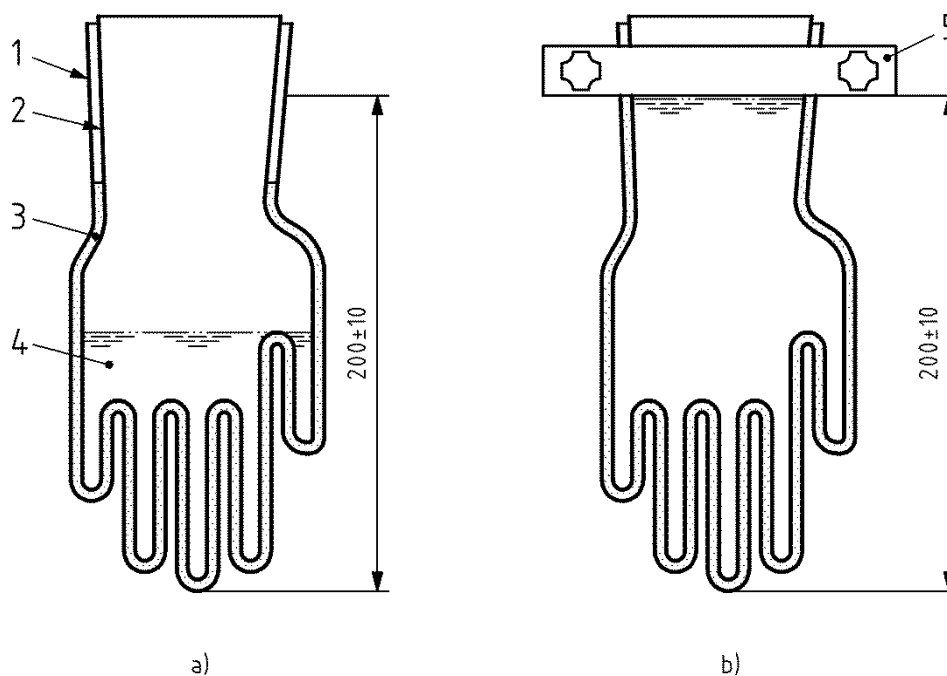
F е факторът на разреждане;

ЗАБЕЛЕЖКА: F е действителният обем на разтвора от NaOH в ml, използван за повторното разтваряне на протеина, разделен с 0,2.

m е масата на екстрахираната ръкавица в g (A.6.2.6).

Определя се средното съдържание на протеин от четири определяния на екстракти от ръкавици.

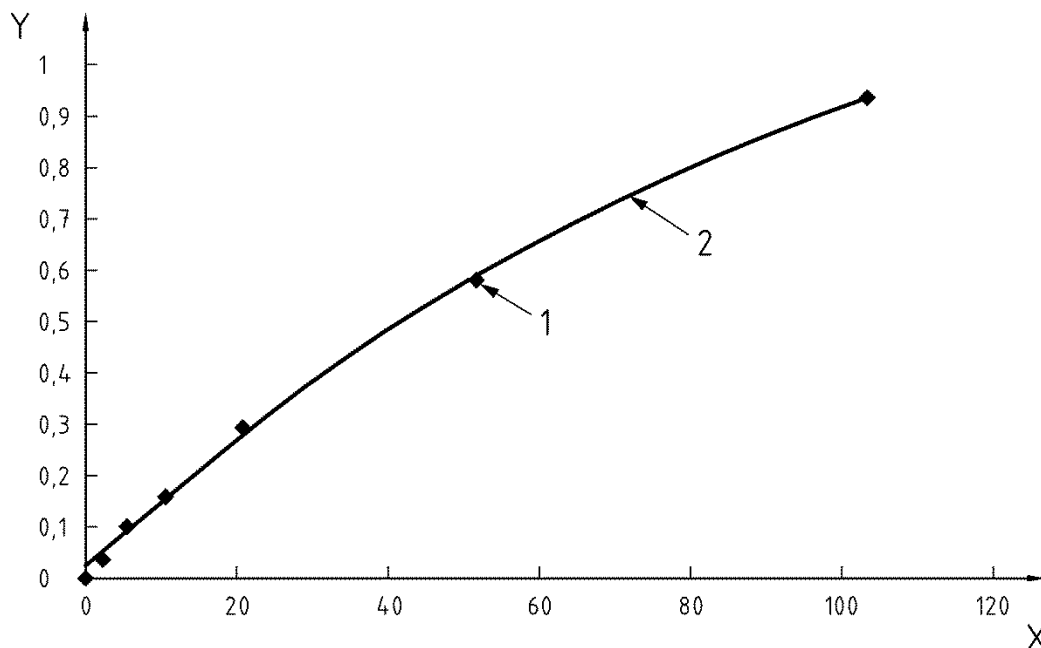
Размерите са в милиметри



Легенда

- 1 външна ръкавица (ръкавица 1)
- 2 вънтрешна ръкавица (ръкавица 2)
- 3 буфер за екстракция
- 4 оцветен разтвор
- 5 стяга за ръкавица

Фигура А.1– Екстракция на ръкавици (напречно сечение)



Легенда

Y абсорбция при 750 nm

X концентрация на яйчен албумин в (µg/ml)

1 абсорбция

2 компютърно изчислен полином за изправяне на кривата

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

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

Фигура А.2 – Типична стандартна крива, определена в спектрофотометър при 750 nm с дебелина на кюветата 1 cm

А.7.3 Статистическа информация

Девет лаборатории са участвали в междулабораторен експеримент като част от научно изследване, подкрепено от ЕС от 1996 г. до 1998 г. и публикувано в окончателния доклад MAT 1 – СТ 940060 European Commission Directorate General XII. В този експеримент са изпитани точността на метода на Lowry и точността на целия метод, включително и екстракцията. Целият метод включва допълнително изменението на съдържанието на протеин в отделните ръкавици, което в някои случаи е много по-голямо от изменението на метода. Резултатите са обобщени в таблица А.1.

Таблица А.1 – Статистическа информация

	Брой на измерванията	Брой на екстрактите	Брой на дните	Средна стойност, в $\mu\text{g/ml}$	Коефициент на повторяемост на измененията в % (в лабораториите)	Коефициент на повторяемост на измененията в % (между лабораториите)
Екстракт от ръкавица	8 трикратно	1 използван от всички участници	1	63,9	4,9	9,6
Екстракт от ръкавица	15 трикратно		5	61,7	6,8	6,3
Ръкавица А	5 трикратно	5	1	88,8	7,9	22,5
Ръкавица А	5 трикратно	5	5	84,5	6,1	20,3
Ръкавица В	3 трикратно	3	1	109	20,2	23,3
Ръкавица С	3 трикратно	3	1	727	8,3	23,0
Ръкавица D	3 трикратно	3	1	46,5	10,1	31,8
Средна стойност без процедура на екстракция					5,0	8,0
Средна стойност за цялата процедура (ръкавица А до D)					10,5	24,2

Границата за количествено определяне е била установена на $10 \mu\text{g/g}$, тъй като тази стойност зависи от дебелината (теглото) на ръкавиците. Установено е, че тя е между $1 \mu\text{g/g}$ и $5 \mu\text{g/g}$.

А.8 Литература

- [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

Приложение В (информационно)

ИМУНОЛОГИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА АЛЕРГЕНИ В ЛАТЕКС НА ЕСТЕСТВЕН КАУЧУК

В.1 Въведение

Незабавните алергични реакции към протеини в латекс на естествен каучук (NRL) са признават за важен медицински и професионално здравен проблем. Като главен източник на чувствителност са разглеждани протеини или пептиди, извлечени от предпазни ръкавици от латекс на NR [1].

Въпреки че количеството на тоталния екстрахируем протеин обикновено съответства на съдържанието на алерген в ръкавиците от латекс на NR, измерен с изпитване чрез убождане на кожата или чрез анализа на човешки IgE [2], [3], [4], [5], методите за тотален протеин измерват и неалергенни протеини, които не са от съществено значение за алергията от латекс на NR. Поради това е нарастнала необходимостта от методи за специфично и точно измерване на алергени в продукти от латекс на NR. Има съгласие по въпроса, че специфичните анализи на алергени предоставят по-точна и надеждна информация както за регулаторни цели, така и за процесите на контрол на производството. Въпреки това, наличието на специфични анализи е твърде ограничено. Освен това все още непълните познания за значението на широкия спектър от алергени в латекса на NR затрудняват да се вземе решение кои от многобройните, налични в латекса на NR като изходен материал, алергени трябва да се измерват.

Полуколичествени методи, като RAST-инхибиране и IgE ELISA инхибиране, основани на използването на човешки IgE антитела, са достъпни от няколко години в изследователски лаборатории. Недостатъците на тези методи се състоят в това, че те са трудни за стандартизиране и зависят от ограниченото количество човешки серуми, съдържащи клинично важните специфични за латекса IgE антитела. В допълнение трябва да се отбележи, че използваните стандарти не съответстват на протеините от ръкавиците. Принципът, че идеално изпитване на анализирания алергенен потенциал на продукти от латекс на NR трябва да се основава на специфична алергенна оценка, е бил възприет и одобрен в съществуващата стандартизация както в Европа [6], [7], така и в САЩ [8], [31].

Напоследък се наблюдава значителен напредък в разработването на специфични и количествени анализи за индивидуална алергенна оценка на латекса на NR [9], [10], [30]. Тези нови анализи, основаващи се на принципа на имуноензимен анализ (EIA) и на използването на моноклонални антитела и пречистени и рекомбинирани алергени, са специфични; те може да бъдат стандартизирани и са достатъчно чувствителни и възпроизводими. В това информационно приложение са разгледани актуални методи за измерване на алергени в латекс на NR.

В.2 Алергени в латекс на естествен каучук в произведени каучукови продукти

Доказано е, че в течния латекс от каучуковото дърво *Hevea brasiliensis* се съдържат около 250 различни протеини или полипептиди, като около една четвърт до една пета от тях се свързват с IgE и представляват алергени [11], [12]. Сместа от растителни протеини в изходния материал отразява стресовия отговор на каучуковото дърво при нараняването му (процедурата на нарязване на дървото). Някои от тези протеини са защитни протеини, които са били добре съхранени през време на еволюцията. Структурните хомологии с тези протеини представляват молекулната основа за кръстосани реакции на алергични към латекс пациенти по отношение на различни растителни протеини. Вероятно всички важни алергени се съдържат в течния латекс на NR, но, както бе отбелязано по-горе, голямата част от протеините и полипептидите в изходния материал на латекса на NR вероятно няма принос за алергенните свойства на продуктите, произведени от латекс на NR. В каталога на Световната здравна организация - WHO/IUIS Allergen Nomenclature Committee lists (февруари 2013) са включени 14 алергени в латекс на NR, охарактеризирани на молекулно ниво (www.allergen.org), повечето от които са били клонирани и получени чрез рекомбинирани ДНК-техники.

Оптималното изпитване трябва да бъде такова, че да измерва точно всички алергени, които се съдържат в произведените каучукови продукти. То може да включва епитопи, налични в природните протеини, както и нови епитопи от разрушените продукти в резултат на тежките условия при преработката на каучука. До сега са доказани ограничен брой алергени в продуктите от латекс на NR. Съвременната литература поддържа твърдението, че най-малко Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 и Hev b 6.02, и/или фрагменти или полимери от тях, които носят свързани с IgE епитопи, може да се съдържат в произведените продукти [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Дали допълнителни алергени като Hev b2, Hev b7 Hev b13 [19] или Hev b14 [32], се проявяват като важни специфични алергени в каучука, това предстои да се потвърди.

В.3 Методи за измерване на алергени в латекс на естествен каучук

В.3.1 Качествени методи

През недалечната 1990 г. често са били използвани имуноелектрофорезни методи и имунопроникващи техники, които са установявали и охарактеризирали някои протеини в латекса на NR и към които се свързва IgE от серума на алергични към латекс на NR пациенти. В наши дни се приема, че само тези методи не са достатъчни за действителна идентификация на алергени [11], [12], [20], [21].

В.3.2 Полуколичествени методи

В.3.2.1 Изпитване чрез убождане на кожата на алергични към латекс доброволци

Алергичността към екстракти от латекс на NR може да бъде определена полуколичествено като изпитване чрез убождане на кожата на статистически значителен брой пациенти, алергични към латекс на NR. Степента на реакцията зависи от количеството на алергените и е пропорционална на това количество на алергените, към което пациентът има IgE антитела [2]. От биологична гледна точка изпитването чрез убождане на кожата може да бъде идеален метод за анализ на клинично съществена алергичност, но поради етични съображения този подход не може да бъде обичайно използван като изпитване за контрол на съдържанието на алергени в ръкавици от латекс на NR.

В.3.2.2 IgE-ELISA инхибиране (известно още като RAST-инхибиране)

ELISA-инхибиране (ELISA = enzyme linked immunosorbent assay) може да се използва въз основа на търговско достъпни или собствено разработени анализи за определянето на специфични IgE антитела. По-рано прилаганият RAST (radio allegro sorbent test) е използвал радиоактивно класифицирано вместо ензимно класифицирано детектиране на антитела.

Инхибирането ELISA е било използвано за оценка на алергени в латекс на NR в различни медицински и потребителски продукти [3], [4], [22], [23].

При този метод оптимални количества от алергени в латекс на NR са свързани към твърда фаза (т.е. хартия или полистирен). Неизвестни и стандартни проби са инкубирани с набор от IgE серум от личности с потвърдена алергия към латекс на NR. Когато антитялото IgE се свързва с разтворимия алерген, тогава се избягва свързването му с твърдофазния алерген. След инкубирането сместа се прехвърля в имобилизирания препарат от алерген, където свободните антитела IgE се свързват с алергените от твърдата фаза. Това специфично свързване се измерва като се използват ензимно класифицирани IgE антитела. Степента на инхибиране е пропорционална на количеството на разтворимите алергени в екстракта.

Критичните реагенти са имобилизираният алерген, човешкият серум и стандартният алерген.

В литературния източник 4 собствено разработен анализ за природен латекс на NR без добавен амоняк, е използван за покритие и като стандартен алерген. Концентрация от 10 mg протеин за ml в стандарта е определена като 100 000 произволни единици. Серийни разреждания на екстракти от ръкавици и на стандартни разтвори на латекс на NR са подложени на инкубиране с оптимално разреден IgE серум, съставен от грижливо охарактеризирани серуми с висока степен на титруване на пациенти с алергия към латекс на NR [4].

В.3.3 Специфични количествени методи

В.3.3.1 Имуноензимен анализ за количествена оценка на алергени в латекс на NR

В.3.3.2 Състояние на проблема

Потвърждава се принципът, че при оптимален анализ за определяне трябва да се измерват само тези алергени, които се съдържат в продуктите от латекс на NR. Доказано е категорично, че етири алергена (Hev b 1, Hev b3, Hev b5 и Hev b6.02) се съдържат в екстракт от ръкавици от латекс на NR [13], [15], [16], [17], [24]. Двата най-важни алергена за възрастни лица са Hev b 5 и Hev b 6.02 (hevein) [15], [17], [25]. Hev b 1 и Hev b 3 са важни алергени за деца с spina bifida [26], [27]. Специфични за алергени анализи със захващане на ензими, предназначени за количествена оценка на тези четири алергена в латекс на NR са били разработени неотдавна и от декември 2001 г. комплекти за измерване на тези алергени вече са достъпни в търговската мрежа. Реагенти и оборудване може да се закупят поотделно.

В.3.3.3 Описание на методи EIA⁴⁾

Методите EIA използват като стандарти специфични моноклонални антитела и пречистени алергени или протеини, получени по рекомбинантна ДНК технология. При всяко изпитване микроплочките се покриват с едно специфично моноклонално антитяло, което свързва желанния алерген от пробата. След инкубацията несвързаният материал се отстранява чрез измиване. При втората инкубация специфичното моноклонално антитяло, класифицирано с ензим (обикновено пероксидаза от хрян), свързва молекули на алергена от покритата с тях микроплочка от първата инкубация. След измиване се прибавя субстрат за ензима. След прекратяване на реакцията се измерва абсорбцията при подходяща дължина на вълната. Интензивността на цвета е право пропорционална на концентрацията на алергена в пробата.

В.3.3.4 Характеристика на метода EIA в сравнение с анализите на базата на IgE алергени

В серия от изследвания са били използвани специфични изпитвания на алергени, за да се анализира алергичността на медицинските ръкавици. Най-доброто доказателство за алергенния потенциал на даден екстракт се показва от реактивността му върху кожата на пациенти, алергични към латекс на NR. При изследването на 22 ръкавици от латекс на NR се очертава значителна корелация, когато сумата от тези 4 алергена (измерени с търговски комплект за EIA се отнесе към резултати от анализи на инхибиране на човешки IgE [10]. На-добра корелация е била отбелязана между сумата от четирите алергена в ръкавиците и изпитванията с убождане на кожата на 20 доброволци, алергични към латекс на NR ($r = 0,95$), следвани от резултатите на сумата и IgE ELISA инхибиране ($r = 0,90$). Корелацията за тотални протеини, измерени по модифицирания метод Lowry е била много ниска ($r = -0,11$). В друга серия от 58 ръкавици от латекс на NR, показано в същото съобщение [10], корелацията между сумата от четирите алергена и тоталната активност на алергените чрез инхибиране IgE ELISA е била 0,84. Резултатите от неотдавна проведено изследване в международен мащаб [28], организирано от FDA и проведено в седем лаборатории за измерване на алергени в 30 ръкавици от латекс на NR също е показало, че сумата от четирите алергена, измерена чрез моноклоналната EIAs показва най-високата корелация ($r^2 = 0,91 - 0,95$) с анализите, използващи основаното на човешки IgE инхибиране RAST/ELISA. Необходими са още разширени изследвания с голям брой ръкавици, за да се потвърди приложимостта на специфичен за алергените метод EIA, но засега изглежда, че сумата от четирите алергена отразява тоталното алергенно съдържание на екстрактите от ръкавици в напълно биологичен смесъл. Очаква се, че продължаващите изследвания ще докажат дали ще се използват други алергени и дали те ще имат ефект върху резултатите от изследванията.

⁴⁾Съгласно предоставената от производителя информация за наличните в търговската мрежа комплекти (FITkit® Insert leaflets, www.quattromed.com) границата на откриване за 4-те алергени варира от 0,1 µg/l (Hev b6.02) до 2,3 µg / l (Hev b3). Коефициентът на повторемост на изменението е представен от 2,8 % до 5,8 %, а коефициентът на възпроизводимост от 2,6% до 7,6%. Тази информация се дава само за улеснение на потребителите на този европейски стандарт и не представлява потвърждаване от CEN на посочения продукт.

Друго изследване на 208 ръкавици [30] с търговски имуноанализи (FitKit, Icosagen AS, Tartu, Estonia), които отговарят напълно на критериите на стандартите ASTM D7427-08, показват добра корелация между сумата от четирите клинично важни алергени и валидираното изпитване чрез убождане на кожата, основано на имуноанализ на човешки IgE [4]. Необходими са още задълбочени изследвания с голям брой ръкавици, за да се потвърди приложимостта на специфичен за алергените EIAs, но засега изглежда, че сумата от четирите алергена отразява тоталното алергенно съдържание на екстрактите от ръкавици в напълно биологичен смисъл. Очаква се, че продължаващите изследвания ще докажат дали ще се използват други алергени и дали те ще имат ефект върху резултатите от изследванията.

В.4 Заключение

Измерването на тоталните екстрахируеми протеини не се разглежда като идеален метод за контрол на съдържанието на алергени в медицински ръкавици от латекс на NR. Независимо от това по време на публикуването на стандарта методите за измерване на алергени въз основа на специфичен човешки IgE не са валидирани, не са стандартизирани и не са осигурени с необходимите реагенти. Поради това методът е все още в нормативната част на този стандарт. Методите EIA за количествена оценка на алергените в латекс на NR преодоляват редица ограничения на предишните методи чрез използването на охарактеризирани и пречистени алергени и на специфични моноклонални антитела за сравняване с алергените в латекс на NR, за които е известно, че се съдържат в продукти от латекс на NR. Анализите са много специфични, не зависят от присъствието на други протеини или химически вещества, отделени при производството на продуктите от латекс на NR, и са много чувствителни. Изпитванията са относително лесни за техническо изпълнение и резултатите може да се получат за кратко време (< 2 h). Недостатъците включват текущите големи разходи и това, че не е било възможно да се установи със сигурност кои от множеството известни алергени в латекса на NR се нуждаят от препоръки и граници на безопасност. Освен това може да се окаже, че е необходим голям брой моноклонални антитела за осигуряване на детекцията на всички важни алергени. Засега изпитвания и/или реагенти за измерване на четирите индивидуални алергени в латекс на NR чрез методи въз основа на EIA са достъпни в търговската мрежа. Ако в каучуковите продукти се появят в значително количество други алергени, тогава трябва да се разработят нови реагенти и комплекти въз основа на съществуващите рамки.

За да се определят три метода за изпитване с количествена оценка на протеини и алергени в латекс на NR в медицински ръкавици, през 2002 г. е проведен междулабораторен експеримент, организиран от CEN/TC205/WG3. Оценени са трите метода:

- Измерване на специфични алергени (виж бележка 4 от В.3.3.3)
- ASTM D 6499 (антигенни протеини) [29]
- Анализ на аминокиселини (тотален протеин)

Експериментът не дава достатъчно резултати за утвърждаването на трите посочени метода като нормативни в този стандарт.

Необходими са изчерпателни проучвания на представителна колекция ръкавици в продажба в Европа и референтни проби с точна количествена концентрация на алергени, за да се валидират характеристиките и приложимостта на новите анализи на специфични алергени.

В.5 Литература

- [1] Turjanmaa, K. et al., Natural rubber latex allergy (review), *Allergy*, 51, 593, 1966.
- [2] Turjanmaa, K., et al, Rubber contact urticaria. Allergenic properties of 19 brands of latex gloves, *Contact Dermatitis*, 19, 362, 1988.

- [3] Yunginger, J.W., et al., Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93, 836,1994.
- [4] Palosuo, T. et al., Measurement of natural rubber latex allergen levels in medical gloves by allergen-specific IgE-ELISA inhibition, RAST inhibition, and skin prick test. *Allergy*, 53, 59, 1998.
- [5] Yip, E., et al., Allergic responses and levels of extractable proteins in NR latex gloves and dry rubber products. *J. Nat. Rubber Res.*, 9, 79, 1994.
- [6] CEN/STAR Document N 409 – Endorsement by star of research proposal on immunological test to measure allergens in natural rubber latex (document CEN/TC 205 N 1187), European Committee for Standardisation, Brussels, 2002.
- [7] Scientific committee on medicinal products and medical devices. Opinion on Natural rubber latex allergy. European Commission, http://europa.eu.int/comm/foods/fs/sc/scmp/out31_en.pdf, 2000
- [8] Hamilton, R.G., Palosuo, T., Minutes of the ASTM meeting on Immunoenzymetric assay (IEMA) task group (D11.40.08), Denver, CO, June, 2003.
- [9] Turjanmaa, K., et al., Recent developments in latex allergy, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2, 407, 2002.
- [10] Palosuo, T., Alenius, H. and Turjanmaa, K., Quantitation of latex allergens, *Methods*, 27, 52, 2002.
- [11] Alenius, H., et al., 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.*, 123, 712, 1994.
- [12] Posch, A. et al., Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein micro sequencing, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99, 385, 1997.
- [13] Czuppon, A.B. et al., The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 92:690,. 1993.
- [14] Lu, L-J. et al., Characterization of a major latex allergen associated with hypersensitivity in spina bifida patients, *J. Immunol.*, 155, 2721, 1995.
- [15] Alenius, H., et al., The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein. *J. Immunol.*, 156, 1618, 1996.
- [16] Akasawa, A., et al., A novel acidic allergen, Hev b5, in latex: purification, cloning and characterization, *J. Biol. Chem.*, 271, 25389, 1996.
- [17] Sutherland, M.F., et al., Specific monoclonal antibodies and human immunoglobulin E show that Hev b 5 is an abundant allergen in high protein powdered latex gloves. *Clin. Exp. Allergy*. 32, 583, 2002.
- [18] Palosuo, T., et al., The Major Latex Allergens Hev b 6.02 (hevein) and Hev b 5 are regularly detected in medical gloves with moderate or high allergen content. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107, S321(abstract), 2001.
- [19] Yeang HY, Arif SA, Raulf-Heimsoth M, Loke YH, Sander I, Sulong SH, Lau CH, Hamilton RG. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J. Allergy Clin Immunol* 2004; 114:593-8.
- [20] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 77, 680, 685, 1970.
- [21] O'Farrell, P.H., High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, 1975.

- [22] Yman, L., Ponterius, G. and Brandt, R., RAST-based allergen assay methods. *Dev. Biol. Stand.*, 29, 151, 1975.
- [23] Crippa, M., et al., Prevention of latex allergy among health care workers: evaluation of the extractable latex protein content in different types of medical gloves. *Am. J. Ind. Med.*, 44, 24, 2003.
- [24] Baur, X., et al., Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy*, 52, 661, 1997.
- [25] Ylitalo, L., et al., IgE antibodies to prohevein, hevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 659, 1998.
- [26] Alenius, H., Palosuo, T., Kelly, K., Kurup, V., Reunala, T., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Fink, J. 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.
- [27] Yeang, H.Y., et al., The 14.6 kD rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 98, 628, 1996.
- [28] Tomazic-Jezic V.J., et al., Performance of methods for the measurement of natural rubber latex (NRL) proteins, antigens and allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 113, S78 (abstract), 2004.
- [29] ASTM D 6499, Standard Test Method for the Immunological Measurement of Antigenic Protein in Natural Rubber and its Products
- [30] Palosuo, T., Reinikka-Railo, H., Kautiainen, H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Kulomaa, M., Reunala, T. and Turjanmaa, K. Latex allergy: the sum quantity of four major allergens shows the allergenic potential of medical gloves. *Allergy*, 62: 781–786, 2007.
- [31] ASTM D7427-08 Standard Test Method for Immunological Measurement of Four Principal Allergenic Proteins (Hev b 1, 3, 5 and 6.02) in Natural Rubber and Its Products Derived from Latex.
- [32] Lee, M.F., Wang, N.M., Han, J.L., Lin, S.J., Tsai, .JJ. and Chen, Y.H Estimating Allergenicity of Latex Gloves Using Hev b 1 and Hevamine. *J Investigat Allergol Clin Immunol.* 20: 499-505, 2010.

Приложение С (информационно)

АНАЛИЗ НА АМИНОКИСЕЛИНИ ЧРЕЗ ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ ПРИ ВИСОКО НАЛЯГАНЕ (HPLC)

С.1 Състояние на проблема

Определянето на протеини обикновено се основава на цветни реакции със специфични структурни елементи, които не са равномерно разпределени в различните протеини [1], [2], [3], [4], [5]. Поради това отговорният фактор се различава от протеин до протеин [2], [4]. Освен това известен брой вещества пречат на колориметричните анализи поради неспецифични реакции с цветния реагент или поради забавяне на проявяването на цвета.

При анализа на аминокиселини се избягват тези проблеми. Това е било потвърдено от резултатите на изследването 'Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves - Correlation of chemical, allergological and immunological data' в рамките на програмата "Measurement and Testing" на Европейската комисия (MATI-CT 940060) [8]. В това изследване е установена най-добра корелация между клиничните данни (изпитване с убождане) и химичния анализ, когато концентрацията на протеина е измерена чрез анализ на аминокиселини [6].

Въпреки всичко модифицираният метод Lowry трябва да бъде използван като стандартен метод за определянето на протеини в ръкавици от латекс на NR, тъй като анализът на аминокиселини изглежда много необичаен и сложен за една стандартна процедура. Анализът на аминокиселини може да се използва за изясняване на съмнителни резултати, появили се при модифицирания метод Lowry. Той не трябва да се използва за обявяването на протеини, но трябва да помогне на производителите да избягват вещества, които водят до неточно определяне на протеини чрез стандартния метод.

С.2 Принципи за определянето на протеини чрез HPLC

Най-напред протеините се хидролизират с 6 M хлороводородна киселина. Получените в резултат на това свободни аминокиселини се разделят и се идентифицират чрез HPLC [7]. Количествената оценка по отношение на вътрешния стандарт (норвалин) и последващото сумиране на индивидуалните аминокиселини представлява тоталното съдържание на протеин. Благодарение на тази процедура методът не зависи от структурните характеристики на оригиналната полимерна молекула. Засега не са открити пречещи вещества, но наличието на соли TES изглежда забавя загубата на аминокиселини (например при ефекта на стената).

С.3 Материал

С.3.1 DL- норвалин.

С.3.2 HCl 30 % свърхчиста.

С.3.3 Стандарт за аминокиселини (съдържащ L-аланин, амониев хлорид, L-аргинин, L-аспартамова киселина, L-глутаминова киселина, глицин, L-хистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин 0,5 mM всеки и L-цистин 0,25 mM).

С.3.4 Метанол за анализ на последователността на протеини.

С.3.5 о-Фталдиалдехид (OPA).

С.3.6 Борна киселина.

- C.3.7** Етилендиаминтетраоцетна киселина, динатриева сол (EDTA).
- C.3.8** Калиев фосфат моноосновен (KH_2PO_4).
- C.3.9** Натриев фосфат диосновен (Na_2HPO_4).
- C.3.10** Натриев фосфат моноосновен (NaH_2PO_4).
- C.3.11** 3-меркаптопропионова киселина.
- C.3.12** Колонка за разделяне: Hypersil ODS 3 μm , 150 x 4,6 mm, предварително изпитана за приложение на ОРА.
- C.3.13** Предварителна колонка: Hypersil ODS, 3 μm , 5 x 4,6 mm.
- C.3.14** Вода с най-малко Milli-Q качество или еквивалентно на него.
- C.3.15** Филтър с размер на порите 0,2 μm
- C.3.16** Тетрахидрофуран (THF) предназначен за течна хроматография при високо налягане
- C.3.17** Ацетонитрил, предназначен за течна хроматография.
- C.3.18** Различни полипропиленови съдчета с капачки на винт и обем от 2 ml.
- C.3.19** Натриев карбонат.
- C.3.20** Натриев хидроксид или калиев хидроксид на гранули.

C.4 Буфери и разтвори

ЗАБЕЛЕЖКА: Разтворител 1 и разтворител 2 са приготвени за колонка ОРА-1 на Grom, Herrenberg, Germany. Ако се използват други колонки, може да са необходими изменения.

C.4.1 Норвалин-100

11,7 mg норвалин (C.3.1) в 1 ml вода (C.3.14) = 100 mM норвалин.

C.4.2 Норвалин-1

100 μl норвалин-100 (C.4.1) в 10 ml вода (C.3.14) = 1 mM норвалин, съхранява се при температура под 8 °C в продължение на не повече от 4 седмици.

C.4.3 о-Фталдиалдехид (ОРА)

50 mg о-фталдиалдехид (C.3.5), 4,5 ml метанол (C.3.4), 50 μl меркаптопропионова киселина (C.3.11).

C.4.4 Боратен буфер

400 mM натриев борат, 5 mM EDTA, pH 10,4.

1,24 g борна киселина и 85 mg EDTA в 30 ml вода (C.3.14), достига се до pH 10,4 чрез добавяне на 2 M NaOH и се долива с вода (C.3.14) до 50 ml. Филтрува се през филтър 0,2 μm (C.3.15), съхранява се при стайна температура в продължение на не повече от две седмици. Да се избягва замразяване, тъй като то причинява образуване на неразтворима утайка.

C.4.5 Стоп-разтвор

1,36 g KH_2PO_4 (C.3.8) във вода (C.3.14), филтрува се през филтър 0,2 μm (C.3.15) и се съхранява при стайна температура в продължение на не повече от 4 седмици.

C.4.6 Фосфатен буфер

7,15 g Na_2HPO_4 (C.3.8) и 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (C.3.9) в 1,5 l вода (C.3.14).

C.4.7 Разтворител 1

20 ml тетраhydroфуран (C.3.16) плюс 1 l фосфатен буфер (C.4.6).

C.4.8 Разтворител 2

250 ml ацетонитрил (C.3.17) 100 ml тетраhydroфуран (C.3.16) се допълват до 1 l с фосфатен буфер (C.4.6).

C.4.9 Натриев карбонат разтвор (0,1 M)

2,12 g Натриев карбонат (C.3.19) в 10 ml вода (C.3.14).

C.5 Хидролиза

C.5.1 Проби

400 μl екстракт (в TES буфер) + 10 μl норвалин-1 (C.4.2) + 700 μl HCl (C.3.3).

C.5.2 Стандарти

380 μl вода (C.3.14) + 20 μl стандарт за аминокиселини (C.3.3) + 10 μl норвалин-1 (C.4.2) + 700 μl HCl (C.3.2).

C.5.3 Инкубиране (хидролиза)

Пробите и стандартите се подлагат едновременно на хидролиза в продължение на 48 h при 100 °C в съдове от PP, плътно затворени със запушалки на винт (C.3.18). Съдовете трябва да бъдат добре закрепени в носач, за да се избегне изваждане на запушалките. Много важно е хидролизата на стандартите и на пробите да се извършват едновременно с оглед на това да има еднаква температура и време на въздействие.

Пробите и стандартите се охлаждат, изсушават се във вакуумна центрофуга или в ексикатор над NaOH или KOH във вакуум.

HCl трябва да бъде напълно отстранена; в противен случай капацитетът на боратния буфер за разделянето може да се окаже недостатъчен.

C.5.4 Свободни аминокиселини

От всеки екстракт и от всеки стандарт се приготвя нехидролизирана проба.

- 400 μl екстракт + 10 μl норвалин 1 (C.4.2);
- 380 μl вода (C.3.14) + 20 μl стандарт за аминокиселина (C.3.3) + 10 μl норвалин 1 (C.4.2).

С.6 Анализ (HPLC)

С.6.1 Приготвяне на проба

- Към всяка хидролизирана и изсушена проба (С.4.9) се прибавят 20 µl разтвор на натриев карбонат;
- смесват се добре или се разбъркват в ултразвукова водна баня;
- инкубират се за 15 min при стайна температура и отново се разбъркват, за да се отстрани CO₂;
- прибавят се 180 µl боратен буфер (С.4.4).

С.6.2 Дериватизация

Етапът на дериватизация зависи от времето и от температурата; той трябва да се извърши с автоматичен уред за вземане на проби при постоянна температура между 20 °C и 25 °C.

Смесват се 25 µl боратен буфер (С.4.4), 12 µl OPA (С.4.3) и 8 µl проба.

След 2,5 min реакцията се прекратява чрез прибавяне на 25 µl стоп разтвор (С.4.5).

С.6.3 HPLC

Анализът HPLC може да бъде извършен с всяко оборудване за HPLC, което използва градиентна система и флуоресцентен детектор.

Тук е представен пример, като точните условия трябва да бъдат адаптирани спрямо използваните система и колона.

ПРИМЕР

0 min до 2,5 min	0 % разтворител 2	100 % разтворител 1
2,5 min до 3,0 min	0 до 12,5 % разтворител 2	87,5 до 100 % разтворител 1
3,0 min до 9,0 min	12,5 % разтворител 2	87,5 % разтворител 1
9,0 min до 13,0 min	12,5% до 42% разтворител 2	58 до 87,5 % разтворител 1
13,0 min до 24,0 min	42 % разтворител 2	58 % разтворител 1
24,0 min до 26,0 min	42 % до 80% разтворител 2	20 до 58 % разтворител 1
26,0 min до 30,0 min	80 % разтворител 2	20 % разтворител 1
30,0 min до 31,0 min	0 % до 80% разтворител 2	20 до 100 % разтворител 1

С.6.5 Изчисляване

Концентрацията на индивидуалните аминокиселини трябва да се определи с помощта на вътрешен стандарт чрез изваждане на свободните аминокиселини. Сумата от аминокиселините е равна на тоталното съдържание на протеини.

С.7 Примери

С.7.1 Стандарт

На фигура С.1 а) е показана типична хроматограма на хидролизиран стандартен разтвор с 19 аминокиселини в еквимолни концентрации. Очакваните аминокиселини са включени в таблица С.1. Аспаргин и глутамин, които напълно съответствуват на аспартиновата киселина и на глутаминовата киселина не са били включени в стандартния разтвор. Норвалинът, който не се среща в природата, е използван като вътрешен стандарт. Триптофанът и цистинът се съдържат в хидролизирания стандартен разтвор, но се разрушават при хидролизата с HCl. Пролинът не реагира с ОРА/МРА, което се дължи на отсъствието на първични аминокрупи в молекулата му, и затова не се установяват при тези условия на разделянето. Лизинът често дава два пика, защото една или две от аминокрупите му може да реагират с ОРА/МРА. Съотношението на тези два пика зависи от условията на реакцията (температура, изминалото време след приготвяне на разтвора ОРА) и поради това варира и не влияе върху резултата, ако и двата пика се вземат предвид.

С.7.2 Екстракт от ръкавици

На фигура С.1 б) е показана хроматограмата на екстракт от хидролизирана ръкавица (приготвена както е описано в приложение А). Хидролизата на протеините в латекса е показала пълния спектър от очаквани аминокиселини (таблица С.1). Установени са били допълнителни пикове на 14,23 min и 24,08 min, които са идентифицирани като производни продукти на TES. Тези пикове са напълно изолирани от тези на всички аминокиселини и не влияят върху анализа.

С.8 Предимства и недостатъци на метода HPLC

С.8.1 Предимства

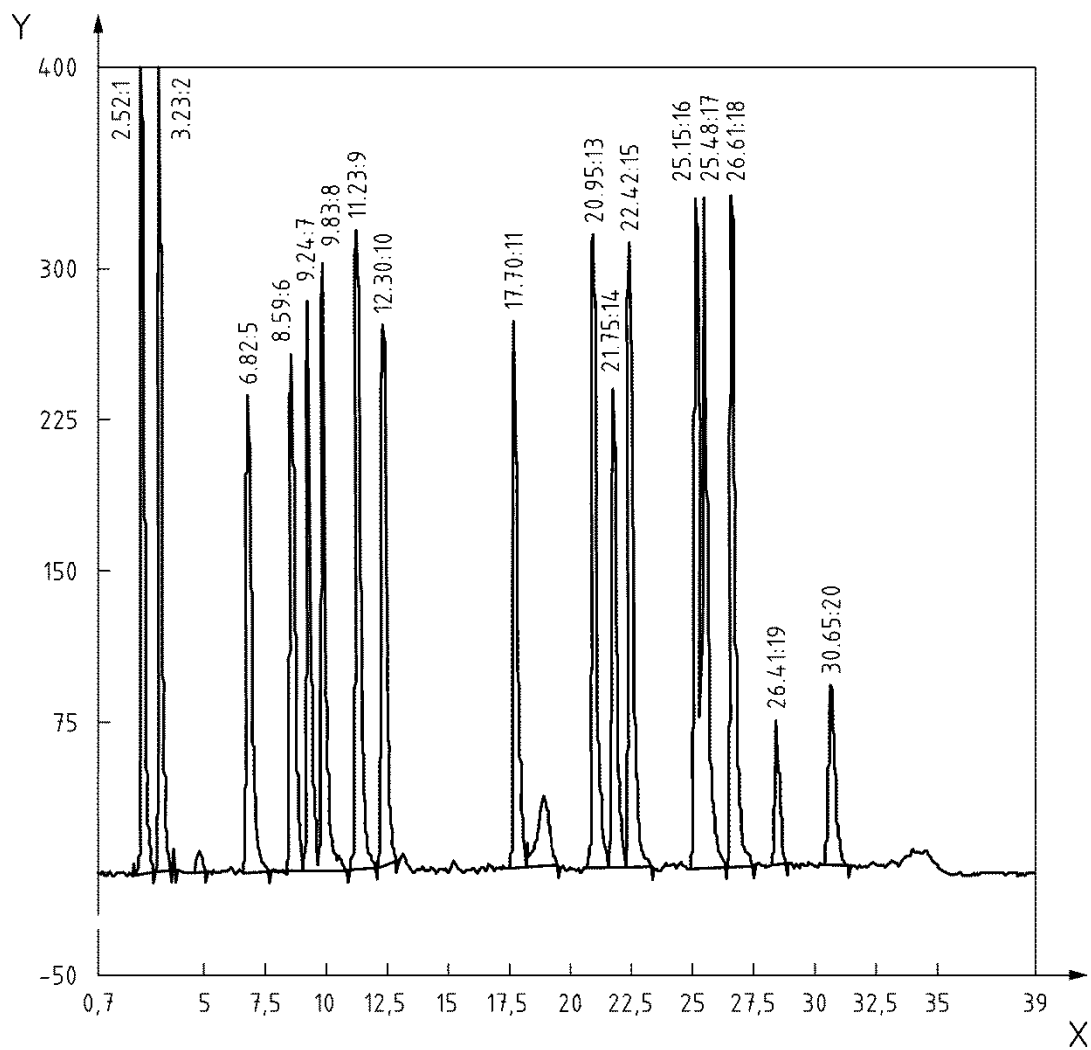
- Не зависи от полимерната структура на протеина;
- Показва най-добра корелация с клиничните данни (изпитване с убождане на кожата);
- Не са известни пречещи вещества;
- По-чувствителен от колориметричните определяния;
- Много специфичен за протеини.

С.8.2 Недостатъци

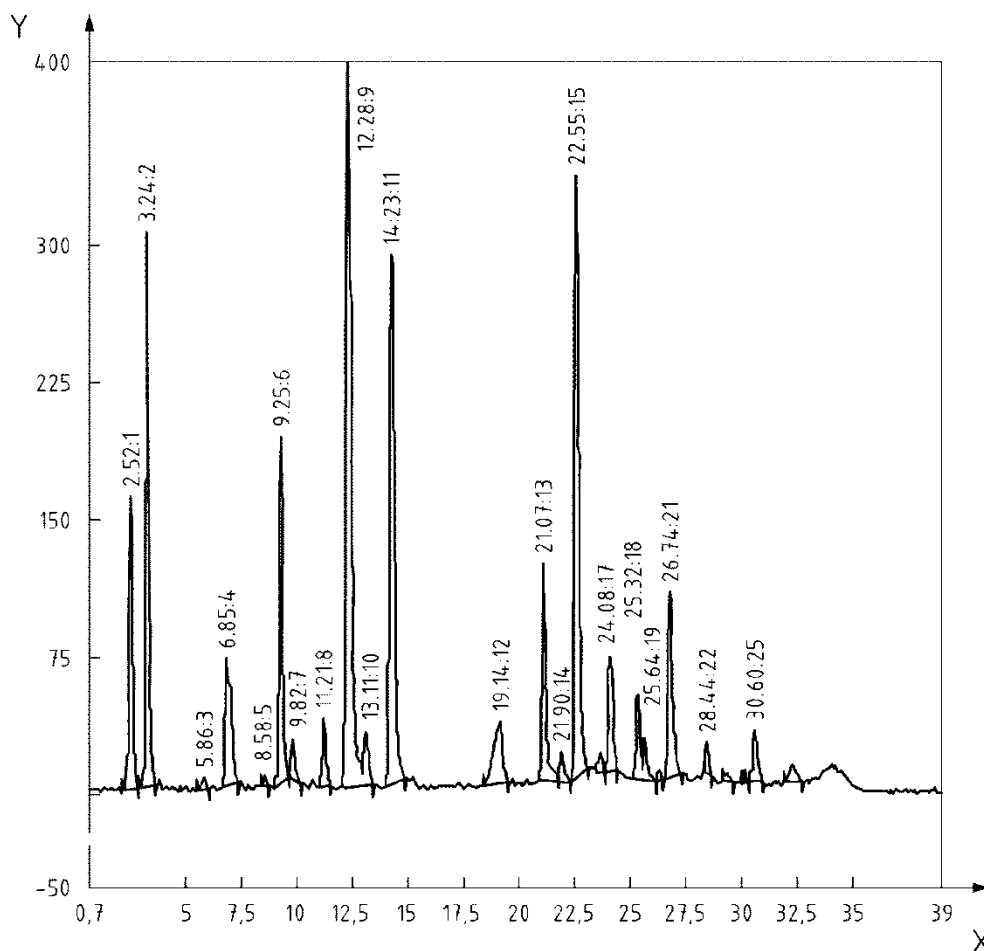
- Необичаен метод, който е въведен от малък брой лаборатории.
- Свързан с голям разход на време.
- Много сложната оценка на данните изисква сериозен професионален опит.

Таблица С.1 — Списък на аминокиселини, установени при анализ чрез HPLC на стандартен разтвор (фигура С.1а)) и в екстракт от хидролизирана ръкавица (фигура С.1b)

Аминокиселина	Време на задържане, в min		Коментар
	Стандарт	Анализ	
Аспартинова киселина (ASP)	2,52	2,52	
Аспаргин (ASN)			превърнат в ASP
Глутаминова киселина (GLU)	3,23	3,24	
Глутамин(GLN)			превърнат в GLU
Серин (SER)	6,83	6,85	
Хистидин (HIS)	8,60		
Глицин (GLY)	9,25	9,25	
Треонин (THR)	9,84	9,82	
Аргинин(ARG)	11,24	11,21	
Аланин (ALA)	12,30	12,29	
		14,23	TES (буфер за екстракция)
Тирозин (TYR)	17,7		
Валин (VAL)	20,95	21,07	
Метионин (MET)	21,75	21,90	
Норвалин (NORVAL)	22,42	22,55	вътрешен стандарт
		24,08	TES (буфер за екстракция)
изо-Лейцин (ILE)	25,15	25,32	
Фенилаланин (PHE)	25,48	25,64	
Лейцин (LEU)	26,61	26,74	
Лизин (LYS)	28,41 30,65	28,44 30,60	
Триптофан (TRY)			разрушен при хидролиза
Цистин, Цистеин (CYS)			разрушен при хидролиза
Пролин(PRO)			не е установен



а) Стандарт за аминокиселини



б) Экстракт от ръкавици

Фигура С.1 — Типични хроматограми на стандарт за аминокиселини (А)
и анализ на екстракт от ръкавици (35 µg протеин)

С.9 Литература

- [1] 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
- [2] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 1: Chemie in Labor und Biotechnik 1995 : 46 : 82-85
- [3] Langheinrich U, Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen Teil 2: Chemie in Labor und Biotechnik 1995 : 46 : 135-136
- [4] Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
- [5] Petersen GL, Determination of total protein. In *Methods of Ezymology*, Academic Press, Inc., New York 91, 95-118
- [6] Koch HU, Regulatory aspects of latex allergy (CEN; extractable protein and allergen assay for latex gloves). *Rev Fr Allergol* 1997: 37 : 1201-1210
- [7] 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
- [8] MATI_CT 940064 European Commission Study - Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves - Correlation of chemical allergological and immunological data

Приложение ZA
(информационно)

ВРЪЗКА МЕЖДУ ТОЗИ ЕВРОПЕЙСКИ СТАНДАРТ И СЪЩЕСТВЕНИТЕ ИЗИСКВАНИЯ НА ДИРЕКТИВА 93/42/ЕИО НА ЕС ЗА МЕДИЦИНСКИ ИЗДЕЛИЯ

Този европейски стандарт е разработен по мандат, даден на CEN от Европейската комисия и Европейската асоциация за свободна търговия (EFTA), за да осигури средство за оценяване на съответствието със съществените изисквания на Директива 93/42/ЕИО от Нов подход относно медицинските изделия.

След като този стандарт е цитиран в Официален вестник на Европейския съюз във връзка с тази директива и е въведен като национален стандарт най-малко в една държава-членка, съответствието с точките на този стандарт в таблица ZA.1 потвърждава в границите на обекта и областта на приложение на този стандарт презумпцията за съответствие със съществените изисквания на тази директива и свързаните с нея предписания на EFTA.

Таблица ZA.1 — Съответствие между този европейски стандарт и Директива 93/42/ЕИО за медицински изделия

Точка(и)/подточка(и) от този европейски стандарт	Съществени изисквания на Директива 93/42/ЕИО за медицински изделия	Уточняващи забележки/Бележки
4	6, 7.1,7.2,7.5	
4.6	2, 13.1,13.3	

За изделия, предназначени от производителя за многократна употреба по смисъла на член 1(6) на Директива 93/42/ЕИО, таблица ZA.2 дава подробности за съответните съществени изисквания на Директива 89/686/ЕИО за лични предпазни средства и съответните точки на този европейски стандарт. Таблица ZA.2, обаче, не предполага каквото и да е цитиране в Официалния вестник на ЕС (OJEU) в съответствие с директивата за личните предпазни средства и по този начин не дава презумпция за съответствие на директивата за личните предпазни средства.

Таблица ZA.2 — Приложими съществени изисквания на Директива 89/686/ЕИО за лични предпазни средства, които са разгледани от този европейски стандарт

Точка(и)/подточка(и) от този европейски стандарт	Съществени изисквания на Директива 89/686/ЕИО за лични предпазни средства	Уточняващи забележки/Бележки
4.2	1.2.1.1.	

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Към продукта(ите) от областта на приложение на този стандарт могат да бъдат приложени други изисквания и други директиви на ЕС.