

Ersetzt / Remplace / Replaces:
SN EN 455-3:2007

Ausgabe / Edition: 2015-05
ICS Code: 11.140

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

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

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

In der vorliegenden Schweizer Norm ist die EN 455-3:2015 identisch abgedruckt.
Dans la présente Norme Suisse le EN 455-3:2015 est reproduit identiquement.
In this Swiss standard EN 455-3:2015 is reprinted identically.

Für diese Norm ist das Normen-Komitee INB/NK 2205 << Passive medizinische Geräte >> des interdisziplinären Normenbereichs zuständig.

La présente norme est de la compétence du comité de normalisation INB/NK 2205 << Dispositifs médicaux non-actifs >> du secteur interdisciplinaire de normalisation.

The standardization committee INB/NK 2205 << Non-active medical devices >> of the interdisciplinary sector is in charge of the present standard.

Ref Nr. / No. de réf / No ref.:
SN EN 455-3:2015 fr

Herausgeber / Editeur / Editor
SNV Schweizerische
Normen-Vereinigung
Bürglistrasse 29
CH-8400 Winterthur
© SNV

Vertrieb / Distribution
SNV Schweizerische
Normen-Vereinigung
Bürglistrasse 29
CH-8400 Winterthur

Anzahl Seiten / Nombre de pages / Number of pages:
37

Gültig ab / Valide de / Valid from:
2015-05-01

Preisklasse / Classe de prix / Price class:
0015 SNV

– Leerseite / Page blanche –

Version Française

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

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

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

La présente Norme européenne a été adoptée par le CEN le 24 janvier 2015.

Les membres du CEN sont tenus de se soumettre au Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, qui définit les conditions dans lesquelles doit être attribué, sans modification, le statut de norme nationale à la Norme européenne. Les listes mises à jour et les références bibliographiques relatives à ces normes nationales peuvent être obtenues auprès du Centre de Gestion du CEN-CENELEC ou auprès des membres du CEN.

La présente Norme européenne existe en trois versions officielles (allemand, anglais, français). Une version dans une autre langue faite par traduction sous la responsabilité d'un membre du CEN dans sa langue nationale et notifiée au Centre de Gestion du CEN-CENELEC, a le même statut que les versions officielles.

Les membres du CEN sont les organismes nationaux de normalisation des pays suivants: Allemagne, Ancienne République yougoslave de Macédoine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.



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

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

Sommaire

	Page
Avant-propos.....	3
Introduction	5
1 Domaine d'application	6
2 Références normatives	6
3 Termes et définitions	6
4 Exigences	7
4.1 Généralités	7
4.2 Substances chimiques	7
4.3 Endotoxines	8
4.4 Gants non poudrés	8
4.5 Protéines extractibles	8
4.6 Étiquetage	8
5 Méthodes d'essai	9
5.1 Endotoxines	9
5.2 Poudre	9
5.3 Protéines extractibles	9
6 Rapport d'essai	10
Annexe A (normative) Méthode de dosage des protéines extractibles en milieu aqueux contenues dans les gants à base de caoutchouc naturel par l'essai Lowry modifié	11
Annexe B (informative) Méthodes immunologiques de dosage des allergènes du latex de caoutchouc naturel	21
Annexe C (informative) Analyse des aminoacides (AAA) par chromatographie liquide haute pression (CLHP)	28
Annexe ZA (informative) Relation entre la présente Norme européenne et les exigences essentiels de la Directive UE 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux	37

Avant-propos

Le présent document (EN 455-3:2015) a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 205 "Dispositifs médicaux non-actifs", dont le secrétariat est tenu par DIN.

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en **octobre 2015**, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en octobre 2015.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. Le CEN et/ou le CENELEC ne saurait [sauraient] être tenu[s] pour responsable[s] de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Le présent document remplace l'EN 455-3:2006.

Le présent document a été élaboré dans le cadre d'un mandat donné au CEN par la Commission Européenne et l'Association Européenne de Libre Échange et vient à l'appui des exigences essentielles de la (de) Directive(s) UE.

Pour la relation avec la (les) Directive(s) UE, voir l'annexe ZA, informative, qui fait partie intégrante du présent document.

Les modifications suivantes seront apportées par rapport à l'EN 455-3:2006 :

- a) spécification des parties pertinentes de l'EN ISO 10993 pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux ;
- b) révision des références normatives ;
- c) remplacement de l'EN 980 par l'EN ISO 15223-1 ;
- d) spécification du paragraphe 4.2 « substances chimiques » ;
- e) modification de l'intitulé du paragraphe 4.4 en « gants non poudrés » ;
- f) suppression du niveau « aussi faible que raisonnablement praticable » (ALARP) dans l'ensemble de la norme ;
- g) spécification du paragraphe 4.6 « étiquetage » ;
- h) suppression du symbole pour les produits contenant du latex naturel (Figure 1) ;
- i) révisions des références à l'Annexe B ;
- j) mise en correspondance de la présente Norme européenne et de la Directive 89/686/CEE relative aux Équipements de Protection Individuelle (voir Annexe ZA).

L'EN 455 comprend les parties suivantes sous le titre général « *Gants médicaux non réutilisables* » :

— *Partie 1 : Détection des trous — Prescriptions et essais*

— *Partie 2 : Propriétés physiques : Exigences et essais*

— *Partie 3 : Exigences et essais pour évaluation biologique*

— *Partie 4 : Exigences et essais relatifs à la détermination de la durée de conservation*

Selon le Règlement Intérieur du CEN-CENELEC les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Ancienne République Yougoslave de Macédoine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

Introduction

Des réactions allergiques aux protéines contenues dans le latex sont constatées depuis plusieurs années, avec des prévalences variables. De plus, les réactions allergiques aux substances chimiques, lubrifiants, résidus d'agents de stérilisation, pyrogènes ou autres résidus font l'objet de publications scientifiques. Les réactions allergiques sont généralement constatées avec les gants à base de latex de caoutchouc naturel, mais certaines peuvent également apparaître avec des gants à base de polymères synthétiques.

L'EN ISO 10993 spécifie les exigences et méthodes d'essai concernant l'évaluation biologique des dispositifs médicaux. Néanmoins, elle ne traite pas spécifiquement des réactions allergiques pouvant résulter de l'usage des gants médicaux (telles que les allergies de type immédiat). Ce type d'allergie se produit avec des allergènes spécifiques pouvant être présents dans les gants. Plusieurs facteurs favorisent le risque de réaction :

- a) la durée et la fréquence du contact cutané avec les gants,
- b) l'exposition aux allergènes par contact direct avec les muqueuses et avec la peau (notamment lorsque ces dernières ne sont pas indemnes) et par inhalation de particules,
- c) la nature occlusive de l'interaction gant/main au cours de l'utilisation des gants.

La présente partie de l'EN 455 indique les exigences et méthodes d'essai permettant d'évaluer la sécurité biologique des gants médicaux dans le cadre du processus de gestion des risques, conformément à l'EN ISO 10993.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'EN 455 spécifie les exigences permettant d'évaluer la sécurité biologique des gants médicaux à usage unique. Elle mentionne les exigences d'étiquetage des gants et de diffusion des informations concernant les méthodes d'essai utilisées.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

EN 1041:2008+A1:2013, *Informations fournies par le fabricant de dispositifs médicaux*

EN ISO 10993-1:2009, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 1 : Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque (ISO 10993-1:2009)*

EN ISO 10993-5:2009, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité in vitro (ISO 10993-5:2009)*

EN ISO 10993-10:2013, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 10 : Essais d'irritation et de sensibilisation cutanée (ISO 10993-10:2010)*

EN ISO 14971:2012, *Dispositifs médicaux — Application de la gestion des risques aux dispositifs médicaux (ISO 14971:2007, version corrigée de 2007-10-01)*

EN ISO 15223-1:2012, *Dispositifs médicaux — Symboles à utiliser avec les étiquettes, l'étiquetage et les informations à fournir relatifs aux dispositifs médicaux — Partie 1 : Exigences générales (ISO 15223-1:2012)*

EN ISO 21171:2006, *Gants à usage médical — Détermination de la poudre résiduelle en surface (ISO 21171:2006)*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 substances chimiques
substances ajoutées ou formées au cours d'une étape quelconque du procédé de fabrication ou lors du stockage, susceptibles de se retrouver dans le produit fini

Note 1 à l'article : Il peut s'agir notamment d'agents de lubrification, de revêtements de surface et d'agents de stérilisation. Plusieurs composants chimiques sont couramment utilisés au cours du procédé de fabrication des gants, dont certains provoquent des réactions allergiques de type IV. Le type et la quantité de substances chimiques résiduelles ajoutées et présentes dans le produit fini sont variables.

3.2 endotoxines
lipo-polysaccharides provenant de la membrane externe des bactéries Gram-négatif

Note 1 à l'article : Les endotoxines sont un type de pyrogène. Parmi les sources possibles figure la contamination bactérienne des matières premières, en particulier l'eau utilisée au cours de la fabrication et de la manipulation des gants.

3.3

poudre

tout matériau de surface du gant qui est insoluble dans l'eau et qui s'élimine par lavage dans les conditions de l'essai

[SOURCE : EN ISO 21171:2006, 3.1]

Note 1 à l'article : Cela inclut la poudre ajoutée intentionnellement et les autres auxiliaires de fabrication ou les matériaux accidentellement présents qui peuvent être facilement éliminés de la surface du gant. Pour les besoins de la présente Norme européenne, un gant contenant 2 mg ou moins de poudre est un gant non poudré et un gant contenant plus de 2 mg est un gant poudré (pour ce qui est relatif aux exigences, voir en 4.4).

3.4

limite du procédé

teneur la plus élevée susceptible d'être constatée pour un procédé de fabrication validé

3.5

protéines allergéniques

protéines pouvant provoquer une réaction allergique de type I

3.6

protéines extractibles

protéines et peptides enlevés du produit fini par extraction en milieu aqueux

3.7

pyrogènes

substances provoquant la fièvre chez les lapins, source de fièvre et autres réactions allergiques constatées chez l'être humain

4 Exigences

4.1 Généralités

L'EN ISO 10993-1:2009 décrit les principes généraux régissant l'évaluation biologique des dispositifs médicaux et doit être utilisée pour sélectionner les essais appropriés tels que décrits dans les autres parties de la série. Conformément à l'EN ISO 10993-1:2009, les gants médicaux sont classés comme étant des dispositifs de surface à durée de contact limitée et doivent être conformes à l'EN ISO 10993-5:2009 et l'EN ISO 10993-10:2013.

Il convient de ne pas confondre la classification des gants médicaux conformément à l'EN ISO 10993-1:2009 avec les définitions fournies dans les Directives relatives aux dispositifs médicaux pour ces produits.

Un processus de gestion des risques doit être établi conformément à l'EN ISO 14971:2012.

4.2 Substances chimiques

Les gants ne doivent pas être revêtus de poudre de talc (silicate de magnésium).

Le fabricant doit fournir, sur demande, une liste des composants chimiques ajoutés en cours de fabrication ou qu'il sait présents dans le produit, tels qu'accélérateurs, antioxydants et biocides, dont les effets nocifs pour la santé sont actuellement connus.

Le fabricant doit fournir, sur demande, des preuves des mesures prises afin de réduire le risque, pour l'utilisateur final, d'exposition aux substances chimiques utilisées dans le procédé de fabrication dont les effets nocifs pour la santé sont actuellement connus.

Les fabricants ne peuvent déclarer l'absence d'une substance que si cette substance n'est utilisée dans aucune partie du procédé de fabrication. Aucun composé connu pour former une substance soumise à une telle déclaration ne doit être utilisé dans la fabrication du produit.

4.3 Endotoxines

Le fabricant doit contrôler la contamination des gants stériles par les endotoxines en appliquant la méthode d'essai spécifiée en 5.1 si les gants comportent un étiquetage « à faible teneur en endotoxines ». La teneur en endotoxines de ces gants étiquetés ne doit pas dépasser la limite de 20 unités d'endotoxine par paire de gants.

4.4 Gants non poudrés

Pour les gants non poudrés, la quantité totale de résidus de poudre déterminée selon la méthode d'essai de 5.2 ne doit pas être supérieure à 2 mg par gant. Tout gant contenant plus de 2 mg de poudre est un gant poudré.

4.5 Protéines extractibles

Le fabricant doit s'efforcer de réduire au maximum le niveau de protéines extractibles.

Le fabricant doit contrôler la limite du procédé des protéines extractibles présentes dans les gants à l'état fini contenant du latex de caoutchouc naturel selon la méthode spécifiée en 5.3 et décrite à l'Annexe A. Un suivi documenté sur les résultats obtenus doit être assuré. Les résultats de l'essai et la méthode d'essai appliquée doivent être disponibles sur demande.

NOTE Protéines allergéniques : La présente Norme européenne spécifie une méthode de dosage approximatif de la teneur en allergènes, par exemple en protéines extractibles. Il n'existe pas de corrélation directe entre les protéines extractibles et la teneur en allergènes. Des méthodes quantitatives pour mesurer les protéines allergéniques sont décrites à l'Annexe B.

4.6 Étiquetage

Outre l'étiquetage spécifié dans l'EN 1041:2008+A1:2013 et les symboles appropriés figurant dans l'EN ISO 15223-1:2012, les exigences suivantes s'appliquent :

- a) les gants médicaux contenant du latex de caoutchouc naturel doivent porter une étiquette sur l'emballage d'au moins la plus petite unité d'emballage, avec le symbole de l'EN ISO 15223-1:2012 pour le latex (numéro de référence 5.4.5) ;

L'étiquetage doit comporter l'avertissement suivant, ou un avertissement équivalent, en accompagnement du symbole : (Produit) contient du latex de caoutchouc naturel, qui est susceptible de provoquer des réactions allergiques, notamment un choc anaphylactique ;

- b) l'étiquetage doit comporter une mention bien visible indiquant si le gant est poudré ou non ;
- c) les gants poudrés stériles doivent porter l'étiquetage suivant, ou l'équivalent :
ATTENTION : La poudre présente en surface doit être éliminée de manière aseptique avant toute intervention chirurgicale, pour réduire au minimum le risque de réactions des tissus ;

NOTE 1 Cet avertissement peut figurer sur l'emballage intérieur.

- d) pour les gants médicaux contenant du latex de caoutchouc naturel, l'étiquette du produit ne doit comporter :
 - aucun terme suggérant une sécurité relative, comme par exemple une faible allergénicité, une hypoallergénicité ou une faible teneur en protéines,

- aucune indication injustifiée de la présence d'allergènes,
- e) si le fabricant indique sur l'étiquette des gants la teneur en protéines, la limite du procédé, mesurée selon 5.3, doit être indiquée.

NOTE 2 Cela n'autorise pas un étiquetage déclarant une teneur en protéines inférieure à 50 µg/g. Des teneurs déclarées plus faibles ne sont pas jugées fiables en raison de la variation de procédé attendue dans la fabrication et les essais interlaboratoires.

5 Méthodes d'essai

5.1 Endotoxines

Le choix, la validation et le mode opératoire doivent être conformes aux exigences de la Pharmacopée européenne, Monographie 2.6.14, « Endotoxines bactériennes », à l'exception des cas où il y a des interférences inévitables dans le mode opératoire Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Les résultats doivent être exprimés en unités d'endotoxine (UE) par paire de gants.

NOTE 1 En cas d'interférences inévitables dans le mode opératoire LAL, le niveau d'endotoxines bactériennes ne peut être mesuré avec exactitude.

Le minimum recommandé de paires de gants à soumettre aux essais par rapport au nombre d'éléments dans un lot est de deux paires de gants pour un lot de dimension inférieure à trente, trois paires pour un lot de dimension comprise entre trente et cent, et 3 % d'un lot de dimension supérieure à cent, le maximum étant de dix paires de gants par lot.

La surface externe d'une paire de gants est soumise à une extraction avec 40 ml d'eau exempte d'endotoxines (Eau LAL, Pharmacopée européenne) pendant 40 min minimum et 60 min maximum, à une température comprise entre 37 °C et 40 °C, de façon à s'assurer que toutes les surfaces entrent en contact avec le milieu d'extraction. Si nécessaire, l'extrait est centrifugé pendant 15 min en appliquant une force de 2 000 g afin d'éliminer les particules. Le liquide est ensuite décanté puis immédiatement soumis à un essai de recherche d'endotoxines.

NOTE 2 Il existe d'autres méthodes d'analyse des endotoxines, et elles peuvent servir aux contrôles de qualité de routine, à condition d'avoir été validées et d'avoir établi une corrélation avec la méthode de référence spécifiée dans la présente Norme européenne.

5.2 Poudre

La méthode d'essai pour la détermination des résidus de poudre décrite dans l'EN ISO 21171:2006, Articles 7 et 9, doit être utilisée.

5.3 Protéines extractibles

La méthode d'essai relative au dosage analytique des protéines extractibles doit être la méthode Lowry modifiée décrite à l'Annexe A ou une méthode validée comme il convient et dont on a établi la corrélation vis-à-vis de la méthode Lowry modifiée.

NOTE 1 L'Annexe C donne un exemple de méthode d'analyse validée.

NOTE 2 Les méthodes immunologiques de l'Annexe B ne sont actuellement pas validées vis-à-vis de la méthode Lowry modifiée, mais on peut établir la corrélation vis-à-vis des données cliniques.

6 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes :

- la référence à la présente partie de l'EN 455 ;
- le type de gants et le code du lot de fabrication ;
- le nom et l'adresse du fabricant ou du distributeur, et du laboratoire d'essai, s'il est différent ;
- la date de réalisation de l'essai ;
- la description de la méthode d'essai appliquée ;
- les résultats de l'essai.

Annexe A (normative)

Méthode de dosage des protéines extractibles en milieu aqueux contenues dans les gants à base de caoutchouc naturel par l'essai Lowry modifié

A.1 Domaine d'application

Cette méthode permet de doser la quantité de protéines extractibles en milieu aqueux contenues dans les gants à usage médical à base de caoutchouc naturel. Elle a été validée au cours d'essais interlaboratoires. La limite inférieure de quantification est d'environ 10 μg de protéines par g de gant en fonction du poids du gant (c'est-à-dire 2 μg de protéines par ml d'extrait).

Les substances chimiques telles qu'agents de surface, accélérateurs et antioxydants ajoutés au latex de caoutchouc naturel pendant la fabrication des gants peuvent perturber le développement de la coloration pendant le dosage, certains matériaux pouvant réduire ce développement et d'autres l'augmenter. Si la méthode d'essai donne des résultats qui semblent erronés du fait de la présence de substances qui la perturbent, il est alors possible d'appliquer n'importe quelle méthode validée d'analyse des aminoacides (à titre d'exemple, voir la méthode de l'Annexe C).

Il convient que les personnes appliquant cette méthode soient familiarisées avec les pratiques courantes de laboratoire.

NOTE La présente méthode ne vise pas à aborder tous les problèmes de sécurité éventuellement liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

A.2 Principe

Les protéines solubles dans l'eau sont soumises à une extraction dans une solution tampon puis à une précipitation acide en présence de désoxycholate de sodium afin de les concentrer et également de les séparer des substances solubles dans l'eau qui peuvent perturber le dosage. Les protéines précipitées sont à nouveau dissoutes dans un milieu alcalin et quantifiées par colorimétrie selon la méthode Lowry modifiée. L'essai repose sur la réaction des protéines avec le réactif de Folin en présence de cuivre en milieu alcalin et se traduit par une coloration bleue caractéristique. Les mesures spectrophotométriques sont effectuées à une longueur d'onde déterminée comprise entre 600 nm et 750 nm.

A.3 Réactifs

A.3.1 Généralités

Quand il est prévu d'utiliser de l'eau pour les essais, il est recommandé de prendre de l'eau bidistillée ou de qualité équivalente. Il convient que tous les autres réactifs soient de qualité analytique.

A.3.2 Solvant d'extraction

A.3.2.1 Sel hémisodique de l'acide N-Tris-[hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthane sulfonique (TES).

A.3.2.2 Tampon d'extraction, 0,1 M, préparé en dissolvant 24 g de TES (A.3.2.1) dans 1 l d'eau. Il est possible d'utiliser un tampon équivalent à condition que celui-ci ait une capacité tampon suffisante pour maintenir un pH de $7,4 \pm 0,2$ dans les extraits de gant.

Préparer une quantité suffisante pour l'extraction des protéines du gant (A.6.2) ainsi que pour la préparation des solutions étalons de protéines (A.6.3.2) et la solution à blanc.

A.3.2.3 Solution de coloration, solution de bleu de bromophénol sodique, préparée en dissolvant 100 mg de bleu de bromophénol sodique dans 1 l d'eau. Renouveler la solution toutes les quatre semaines.

A.3.3 Réactifs pour l'essai Lowry

NOTE Les réactifs peuvent être préparés à partir de substances chimiques en réserve au laboratoire [1] ou être achetés dans le commerce sous forme de solutions prêtes à l'emploi. La méthode utilisée pour la présente Norme européenne a été validée avec un coffret du commerce¹⁾.

A.3.3.1 Réactif A : Réactif à base de cuivre (solution alcaline de tartrate ou de citrate de cuivre).

A.3.3.2 Réactif B : Réactif de Folin dilué.

A.3.4 Hydroxyde de sodium, solution aqueuse à 0,1 M.

A.3.5 Désoxycholate de sodium (DOC), à 3,47 mM, préparé en dissolvant 0,15 g de désoxycholate de sodium dans de l'eau et en complétant à 100 ml avec de l'eau. Ne pas utiliser cette solution plus de quatre semaines après sa préparation.

A.3.6 Acide trichloracétique (ATC), 4,4 mM dans de l'eau, préparé en dissolvant 72 g d'ATC dans de l'eau et en complétant à 100 ml avec de l'eau.

A.3.7 Acide phosphotungstique (APT), préparé en dissolvant 72 g d'APT dans de l'eau et en complétant à 100 ml avec de l'eau. Ne pas utiliser cette solution plus de quatre semaines après sa préparation.

A.3.8 Ovalbumine à base d'œuf de poule²⁾, lyophilisée, exempte de sel.

A.4 Appareillage

A.4.1 Gants synthétiques, exempts de poudre.

A.4.2 Centrifugeuse, pouvant atteindre au moins 6 000 g.

A.4.3 Tubes à centrifuger, tubes de 30 ml ou 50 ml en polypropylène, de capacité de combinaison protéique inférieure ou égale à 10 µg par tube. Ne pas utiliser de verre afin de réduire le risque d'adsorption superficielle des protéines.

NOTE Une méthode de détermination de la capacité de combinaison protéique est décrite en A.5.

A.4.4 Filtres, à usage unique, de 0,22 µm de taille de pore, de capacité de combinaison protéique inférieure ou égale à 10 µg par filtre.

NOTE Une méthode de détermination de la capacité de combinaison protéique est décrite en A.5.

1) Coffret d'essai Lowry DC (numéro de catalogue 500-0116), disponible auprès de BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, États-Unis. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme européenne et ne saurait constituer un engagement du CEN à l'égard de ce produit.

2) Cette ovalbumine est préparée à partir de blancs d'œufs de poule frais par fractionnement au sulfate d'ammonium et cristallisation répétée à pH 4,5, par exemple, l'albumine d'œuf de poule, Sigma A 5503, de qualité V, disponible auprès de Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, États-Unis. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme européenne et ne saurait constituer un engagement du CEN à l'égard de ce produit.

A.4.5 Seringues jetables, de 20 ml, en polyéthylène ou en polypropylène.

A.4.6 Micro-tubes, de 2 ml, en polypropylène.

A.4.7 Micro-cuve en quartz, de 10 mm d'épaisseur.

A.4.8 Microplaque à 96 puits, à fond plat, en polystyrène, ou micro-cuves jetables (A.4.9).

A.4.9 Semi-micro-cuves jetables, de 1,5 ml, de 10 mm d'épaisseur, en polystyrène.

A.4.10 Lecteur de microplaques, de longueurs d'onde comprises entre 600 nm et 750 nm.

A.4.11 Spectrophotomètre, fonctionnant dans le domaine de longueurs d'ondes comprises entre 230 nm et 750 nm.

A.4.12 Agitateur/mélangeur vortex.

A.4.13 Micropipettes, à embouts jetables en polypropylène.

A.4.14 Pince-gant, assurant l'étanchéité des gants à l'eau pendant l'extraction. On suggère d'utiliser des paires de barres d'aluminium alignées et munies d'un tampon de mousse, susceptibles d'être vissées ensemble (voir la Figure A.1) ou des pinces pour hémodialyse en plastique de 170 mm de long.

A.4.15 Agitateur.

A.5 Mesure de la capacité de combinaison protéique

A.5.1 Généralités

Il est conseillé d'utiliser, lors de l'essai, du matériel en polypropylène à usage unique (connu pour être de faible capacité de combinaison protéique). La capacité de combinaison protéique doit être contrôlée selon les méthodes suivantes avant d'utiliser les tubes à centrifuger ou les filtres d'un nouveau lot. L'essai doit être effectué dans la journée.

A.5.2 Capacité de combinaison protéique des tubes à centrifuger

A.5.2.1 Dans un tube à centrifuger (A.4.3), préparer 30 ml de solution de référence contenant 10 µg/ml d'ovalbumine en diluant la solution mère de protéines (A.6.3.1) avec le tampon d'extraction (A.3.2.2).

A.5.2.2 Transvaser des prises d'essai de 10 ml de solution d'ovalbumine (A.5.2.1) dans deux tubes à centrifuger et agiter ces derniers sur un agitateur (A.4.15) en veillant à ce que toute la surface du tube soit humectée par cette solution. 30 min après, transvaser les solutions dans deux autres tubes et les agiter. Répéter cette opération jusqu'à ce que chaque prise d'essai de 10 ml ait été successivement exposée à cinq tubes. Garder le reste des solutions pour essai.

A.5.2.3 Déterminer trois fois la concentration en protéines de la solution de référence et des deux solutions pour essai en appliquant la méthode indiquée de A.6.4 à A.6.6.

A.5.2.4 Calculer la quantité moyenne d'ovalbumine adsorbée à partir de l'équation suivante :

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

$$= 2(R - T)$$

où

O est l'ovalbumine adsorbée, en μg /tube,

R est la moyenne des trois déterminations de la teneur en ovalbumine de la solution de référence, en μg /ml,

T est la teneur moyenne en ovalbumine de la solution pour essai après passage au travers des tubes (c'est-à-dire la moyenne des six valeurs), en μg /tube.

La teneur en albumine adsorbée (*O*) doit être inférieure à 10 μg par tube, sinon les tubes ne conviennent pas pour le dosage.

A.5.3 Capacité de combinaison protéique des filtres

A.5.3.1 Dans un tube à centrifuger (A.4.3), préparer 30 ml de solution de référence contenant 10 μg /ml d'ovalbumine en diluant la solution mère de protéines (A.6.3.1) avec le tampon d'extraction (A.3.2.2).

A.5.3.2 Préparer deux colonnes de cinq filtres (A.4.4). Filtrer 10 ml de la solution de référence dans un tube à centrifuger (A.4.3) à travers chaque colonne de filtres.

A.5.3.3 Déterminer trois fois la teneur en protéines de la solution de référence et des deux solutions pour essai selon la méthode indiquée de A.6.4 à A.6.6.

A.5.3.4 Calculer la quantité moyenne d'ovalbumine adsorbée à partir de l'équation suivante :

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

$$= 2(R - T)$$

où

O est l'ovalbumine adsorbée, en μg /tube,

R est la moyenne des trois déterminations de la teneur en ovalbumine de la solution de référence, en μg /ml,

T est la teneur moyenne en ovalbumine de la solution pour essai après passage au travers des filtres (c'est-à-dire la moyenne des six valeurs), en μg /tube.

La teneur en albumine adsorbée (*O*) doit être inférieure à 10 μg par filtre, sinon les filtres ne conviennent pas pour le dosage.

A.6 Mode opératoire

A.6.1 Généralités

Le mode opératoire consiste à extraire les protéines des gants, à les purifier et à les concentrer d'un facteur cinq. Le dosage sur l'extrait est effectué par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de solutions protéiques étalons traitées de façon analogue.

La méthode d'extraction employée consiste à soumettre simultanément à l'extraction l'intérieur d'un gant et l'extérieur d'un deuxième gant. Elle permet de réduire à 25 ml le volume d'extraction et d'éviter toute perte de protéines sur les surfaces du récipient car le tampon d'extraction est uniquement exposé aux gants.

NOTE D'autres méthodes d'extraction peuvent être utilisées si elles sont validées par rapport à la présente méthode. Des essais interlaboratoires effectués par des laboratoires sélectionnés en Europe et aux États-Unis ont donné des résultats équivalents à ceux de la Norme ASTM D5712:1995 [2] utilisant l'extraction de fragments découpés dans les gants pendant 2 h, à 25 °C, dans un tampon TES de pH 7,4.

A.6.2 Méthode d'extraction

A.6.2.1 Utiliser des gants synthétiques (A.4.1) pour manipuler les échantillons de gants servant à l'extraction.

Prélever huit gants de taille identique, du même lot, et les séparer en quatre paires. Dans le cas de gants droits ou gauches, choisir quatre échantillons droits et quatre échantillons gauches et les séparer en deux paires de gants droits et deux paires de gants gauches.

Marquer le poignet d'un gant de chaque paire à (200 ± 10) mm du bout du majeur et peser le gant (m_1) à 0,1 g près. Pour chaque paire, insérer le deuxième gant dans celui qui est marqué de manière à ce qu'ils s'emboîtent, comme représenté sur la Figure A.1 a).

NOTE La méthode d'introduction d'un gant dans l'autre n'est pas déterminante si les gants sont manipulés le moins possible. Pour y parvenir, un des moyens consiste à glisser une baguette dans le pouce et l'auriculaire du gant intérieur afin de faciliter leur insertion dans les doigts correspondants du second gant. Utiliser les baguettes pour insérer les trois autres doigts.

A.6.2.2 Verser dans le gant intérieur une quantité de solution de coloration (A.3.2.3) suffisante pour remplir les cinq doigts. Introduire 25 ml de tampon d'extraction (A.3.2.2) à (25 ± 5) °C entre le gant intérieur et le gant extérieur. Dans le cas de gants plus grands, ce volume peut être porté à 50 ml maximum. Retirer le maximum de bulles d'air et obturer les gants avec le pince-gant (A.4.14) au niveau de la marque située à 20 cm afin de les rendre étanches à l'eau, comme représenté sur la Figure A.1 b).

A.6.2.3 Disposer les gants sur l'agitateur (A.4.15) et agiter pendant (120 ± 5) min, à (25 ± 5) °C.

A.6.2.4 Retirer le pince-gant et séparer les gants avec précaution. Veiller à ne pas contaminer l'extrait avec la solution de coloration. Si l'extrait est coloré en bleu, il doit être mis au rebut et l'extraction répétée avec des gants neufs.

A.6.2.5 Transvaser l'extrait avec précaution dans un tube à centrifuger (A.4.3) et éliminer les particules en suspension par centrifugation à 2 000 g minimum pendant 15 min ou par filtration à travers un filtre à usage unique (A.4.4) ou encore en combinant les deux, selon le cas. Entreposer la solution limpide obtenue au réfrigérateur, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, et procéder au dosage dans les 48 h, ou bien congeler des parties aliquotes de la solution à une température inférieure ou égale à -18 °C pendant 2 mois maximum avant analyse.

A.6.2.6 Découper la partie du poignet se trouvant au-dessus de la marque située à 20 cm du gant extérieur ayant subi l'extraction, essuyer la surface avec un papier absorbant pour éliminer le liquide, la laisser sécher à température ambiante et la peser à 0,1 g près (m_2). Calculer la masse (m) de la partie extraite du gant de la façon suivante :

$$m = m_1 - m_2$$

A.6.3 Étalon de protéine

A.6.3.1 Solution mère de protéines

Préparer une solution d'ovalbumine (A.3.8), à une concentration nominale de 1 mg/ml, en dissolvant 25 mg d'ovalbumine dans 25 ml de tampon d'extraction (A.3.2.2). Filtrer la solution sur un filtre de 0,22 μm (A.4.4) et déterminer la concentration réelle d'ovalbumine à l'aide d'un spectrophotomètre U.V. en mesurant l'absorbance à 280 nm à l'aide d'une micro-cuve en quartz (A.4.7). On obtient la concentration exacte en mg/ml en divisant l'absorbance par 0,715³⁾. La solution reste stable pendant 2 jours au réfrigérateur ou pendant 2 mois au congélateur, à -18 °C. La décongélation nécessite un échauffement à 45 °C, pendant 15 min.

A.6.3.2 Solutions étalons de protéines

Préparer des dilutions successives de la solution mère de protéines (A.6.3.1) avec le tampon d'extraction (A.3.2.2) afin d'obtenir des solutions présentant des concentrations nominales d'environ 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ et 2 $\mu\text{g/ml}$. Utiliser le tampon d'extraction comme solution à blanc. Les solutions restent stables pendant 2 jours au réfrigérateur ou pendant 2 mois au congélateur, à -18 °C. La décongélation nécessite un échauffement à 45 °C, pendant 15 min.

A.6.4 Précipitation et concentration des protéines

A.6.4.1 Effectuer les opérations en double, à (25 ± 5) °C.

A.6.4.2 Transvaser exactement 1 ml de la solution à blanc, des solutions étalons de protéines (A.6.3.2) et des quatre extraits de gants (A.6.2.5) dans des micro-tubes (A.4.6). Ajouter 0,1 ml de DOC (A.3.5), procéder à une homogénéisation de type vortex et laisser reposer 10 min. Ajouter 0,1 ml d'ATC (A.3.6) et 0,1 ml d'APT (A.3.7), procéder à une homogénéisation de type vortex et laisser à nouveau reposer 30 min.

A.6.4.3 Centrifuger à 6 000 g pendant 15 min. Éliminer le liquide surnageant et maintenir les tubes retournés sur du papier absorbant pendant 5 min.

A.6.4.4 Ajouter 0,2 ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M (A.3.4) dans chaque tube, y compris la solution à blanc. Homogénéiser sur un agitateur type vortex de façon à dissoudre à nouveau les protéines précipitées. S'assurer que les protéines sont à nouveau complètement dissoutes pour donner une solution limpide. En fonction du gant utilisé, cette opération nécessite parfois une nuit au réfrigérateur à (5 ± 3) °C. S'il reste un précipité, ajouter une nouvelle quantité mesurée de solution d'hydroxyde de sodium par paliers de 0,2 ml jusqu'à un total de 1 ml et utiliser une partie aliquote de 0,2 ml pour les étapes suivantes. Il peut être utile de diluer l'extrait de ces échantillons avant précipitation.

NOTE Le processus de concentration des protéines par précipitation et de dissolution est destiné à purifier les protéines et à les débarrasser des substances qui les perturbent. La perte d'une certaine quantité de protéine est inévitable au cours de ce processus et on suppose, pour les besoins de l'essai, que les solutions étalons de protéines et les extraits d'échantillons pour essai présenteront un pourcentage de perte identique. Il convient toutefois de réduire la perte au minimum car des pertes importantes ne seraient pas reproductibles.

3) Le poids moléculaire étant de 43 000 D, l'extinction molaire de 30 745 à 280 nm et le pH de 7,4, 1 mg/ml d'ovalbumine dans un tampon de TES 0,1 M, de pH 7,4, présente une extinction de 0,715 en utilisant des cuves de 1 cm d'épaisseur du trajet optique [3].

A.6.5 Développement de la coloration

A.6.5.1 La méthode décrite ici est adaptée au coffret du commerce utilisé pour la validation. D'autres substances ou réactifs préparés à partir de substances chimiques en réserve au laboratoire peuvent nécessiter d'autres volumes et d'autres durées d'incubation.

A.6.5.2 Ajouter 0,125 ml de réactif A (A.3.3.1) dans chaque micro-tube contenant les solutions de protéines préalablement dissoutes, y compris la solution à blanc. Bien mélanger. Ajouter 1 ml de réactif B (A.3.3.2), boucher le tube, procéder à une homogénéisation de type vortex et laisser reposer 30 min pour permettre le développement de la coloration. S'il se produit une précipitation à ce stade, centrifuger ou filtrer afin de retirer le précipité avant de mesurer l'absorbance.

A.6.6 Mesurage

A.6.6.1 Lecteur de microplaques

À l'aide d'une micropipette, transvaser dans les puits de micro-titrage (A.4.8) un volume adéquat de la solution (A.6.5.2) de manière à remplir presque entièrement les puits, par exemple 490 μ l dans un puits de 500 μ l. Mesurer l'absorbance par rapport au blanc, à une longueur d'onde déterminée se situant dans le domaine compris entre 600 nm et 750 nm.

NOTE Pour obtenir des résultats uniformes, il importe que les solutions étalons ainsi que les extraits de gants soient analysés ensemble dans l'heure qui suit le développement d'une coloration stable.

A.6.6.2 Spectrophotomètre

Transvaser la solution (A.6.5.2) dans une cuve (A.4.9) et mesurer l'absorbance par rapport au blanc, à une longueur d'onde déterminée se situant dans le domaine compris entre 600 nm et 760 nm.

NOTE Pour obtenir des résultats uniformes, il importe que les solutions étalons ainsi que les extraits de gants soient analysés ensemble dans l'heure qui suit le développement d'une coloration stable.

A.7 Expression des résultats

A.7.1 Calcul

A.7.1.1 Courbe d'étalonnage

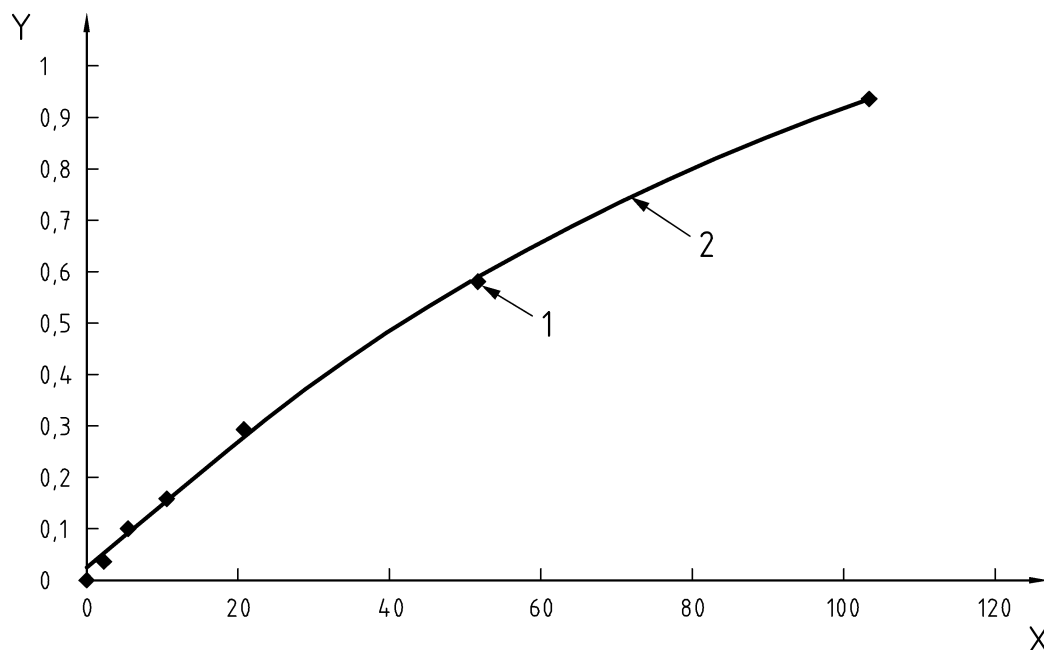
Calculer l'absorbance moyenne des deux déterminations. Si les valeurs individuelles diffèrent de plus de 20 %, répéter le dosage. Établir la courbe d'étalonnage en traçant la courbe des mesures d'absorbance moyenne par rapport à la valeur vraie de la concentration des solutions étalons de protéines, comme représenté sur la Figure A.2. Il convient que la courbe d'étalonnage soit linéaire dans la plage comprise entre 0 μ g et 100 μ g de protéines/ml dans les solutions étalons de protéines.

NOTE Une certaine quantité de protéines est perdue lors de la concentration et l'on suppose cette perte identique pour les étalons et les échantillons pour essai.

A.7.1.2 Concentration de l'extrait

Pour chacun des quatre extraits, calculer l'absorbance moyenne des deux dosages (voir en A.6.4.1). Si les valeurs individuelles diffèrent de plus de 20 %, répéter le dosage. Déterminer les concentrations des échantillons extraits (C) en μ g/ml d'extrait en les lisant directement sur la partie linéaire de la courbe.

NOTE Si la courbe d'étalonnage n'est pas linéaire, la valeur peut être calculée par régression quadratique. On suggère d'utiliser des logiciels disponibles dans le commerce pour établir la courbe et calculer les concentrations inconnues.



Légende

Y absorbance à 750 nm

X concentration d'ovalbumine ($\mu\text{g/ml}$)

1 absorbance

2 polynôme de meilleure adaptation généré par ordinateur

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

Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Absorbance
2,1	0,036
5,2	0,099
10,4	0,159
20,8	0,291
52,0	0,583
104,0	0,945

Figure A.2 — Courbe normalisée caractéristique dans un spectrophotomètre à 750 nm, de 1 cm

A.7.3 Informations statistiques

Neuf laboratoires ont participé à un essai interlaboratoires dans le cadre d'une étude scientifique soutenue par l'UE, de 1996 à 1998, publiée dans le rapport final MAT 1 — CT 940060 *European Commission Directorate General XII*. Cette étude visait à vérifier la précision de la méthode Lowry et celle de l'ensemble du mode opératoire, y compris l'extraction. L'ensemble de la méthode inclut en outre la variation de teneur en protéines d'un gant à l'autre, qui, dans certains cas, est beaucoup plus importante que les variations dues à la méthode. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau A.1.

Tableau A.1 — Informations statistiques

	Nombre de mesures	Nombre d'extraits	Nombre de jours	Moyenne en $\mu\text{g/ml}$	Coefficient de répétabilité de la variation, en % (intralaboratoires)	Coefficient de reproductibilité de la variation, en % (interlaboratoires)
Extrait de gant	8 mesures triples	1 utilisé par tous les participants	1	63,9	4,9	9,6
Extrait de gant	15 mesures triples		5	61,7	6,8	6,3
Gant A	5 mesures triples	5	1	88,8	7,9	22,5
Gant A	5 mesures triples	5	5	84,5	6,1	20,3
Gant B	3 mesures triples	3	1	109	20,2	23,3
Gant C	3 mesures triples	3	1	727	8,3	23,0
Gant D	3 mesures triples	3	1	46,5	10,1	31,8
Moyenne de l'extrait sans la méthode d'extraction					5,0	8,0
Moyenne de l'extrait avec la méthode d'extraction (gants A à D)					10,5	24,2

La limite de quantification a été fixée à 10 $\mu\text{g/g}$ car elle dépend de l'épaisseur (poids) des gants. Elle s'est révélée comprise entre 1 $\mu\text{g/g}$ et 5 $\mu\text{g/g}$.

A.8 Références

- [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

Annexe B (informative)

Méthodes immunologiques de dosage des allergènes du latex de caoutchouc naturel

B.1 Introduction

Il est reconnu que les réactions allergiques immédiates aux protéines du latex de caoutchouc naturel sont un problème important en matière de santé publique et de santé au travail. On considère que les protéines ou les peptides libérés des gants de protection en latex de caoutchouc naturel [1] constituent une source majeure de sensibilisation.

Même si la quantité de protéines totales extractibles correspond généralement assez bien à la teneur en allergènes des gants en latex de caoutchouc naturel, mesurée par un test cutané ou par des tests immunologiques à base d'IgE humaine [2], [3], [4], [5], les méthodes de dosage des protéines totales permettent également de mesurer les protéines non allergéniques qui ne sont pas susceptibles d'être en cause dans les allergies au latex de caoutchouc naturel. Par conséquent, il est de plus en plus nécessaire de disposer de méthodes permettant de mesurer de manière spécifique et précise les allergènes présents dans les produits en latex de caoutchouc naturel. Il est admis que des méthodes d'essai propres à certains allergènes fourniraient des informations beaucoup plus précises et fiables, utilisables à la fois à des fins réglementaires et pour le contrôle des procédés de fabrication. Il existe cependant peu de méthodes d'essai spécifiques. De plus, comme on appréhende encore mal le spectre large des allergènes du latex de caoutchouc naturel, il est difficile de décider lequel des nombreux allergènes présents dans le latex de caoutchouc naturel il convient de mesurer.

Des méthodes semi-quantitatives, comme la méthode d'inhibition du test RAST ou la méthode d'inhibition du test ELISA, fondées sur l'utilisation d'anticorps IgE humains, sont utilisées depuis plusieurs années dans les laboratoires de recherche. L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles sont difficiles à normaliser et qu'elles souffrent de la faible disponibilité de sérums humains contenant des anticorps IgE spécifiques au latex et cliniquement pertinents. De plus, il convient de noter que les normes utilisées ne s'appliquent pas aux protéines des gants. Le principe selon lequel il convient qu'un essai idéal en vue d'évaluer le potentiel allergénique des produits en latex de caoutchouc naturel soit fondé sur la quantification d'allergènes spécifiques a récemment été adopté et avalisé pour les travaux de normalisation en cours, tant en Europe [6], [7] qu'aux États-Unis [8], [31].

Des progrès importants ont récemment été réalisés dans la mise au point de méthodes d'essai spécifiques et quantitatives en vue de quantifier individuellement les allergènes du latex de caoutchouc naturel [9], [10], [30]. Ces nouvelles méthodes d'essai, fondées sur le principe d'un test immuno-enzymatique et sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux et d'allergènes purifiés ou recombinés, sont spécifiques. Elles peuvent être normalisées et ont une sensibilité et une reproductibilité suffisantes. La présente Annexe informative présente des méthodes actuelles de dosage des allergènes du latex de caoutchouc naturel.

B.2 Allergènes du latex de caoutchouc naturel dans les produits manufacturés en caoutchouc

Parmi les quelque 250 protéines ou polypeptides différents présents dans le matériau d'origine, à savoir le latex liquide de l'hévéa, *Hevea brasiliensis*, environ un quart à un cinquième se combinent aux IgE et constituent des allergènes [11], [12]. Le mélange de protéines végétales dans le matériau d'origine reflète la réaction de l'hévéa à la blessure qui lui est infligée (technique de la saignée). Plusieurs de ces protéines sont des protéines de défense, que les plantes ont conservées au cours de l'évolution. Les homologies structurales avec ces protéines fournissent la base moléculaire des réactions croisées courantes des patients allergiques au latex envers différentes protéines végétales. Il est probable que tous les allergènes significatifs sont présents dans le latex de caoutchouc naturel liquide, mais, comme indiqué ci-dessus, la plupart des protéines et polypeptides présents dans le matériau d'origine risquent de ne pas être pertinents pour l'évaluation des propriétés allergéniques des produits manufacturés en latex de caoutchouc naturel. La nomenclature internationale de l'OMS/UIS donne la liste (février 2013) des 14 allergènes du latex de caoutchouc naturel caractérisés au niveau moléculaire (www.allergen.org), dont la plupart ont été clonés et produits selon des techniques d'ADN recombinant.

Il convient de concevoir un essai optimal permettant de mesurer avec exactitude tous les allergènes susceptibles d'être présents dans les produits manufacturés en caoutchouc. Celui-ci pourrait inclure les épitopes présents sur les protéines naturelles, ainsi que de nouveaux épitopes présents à la surface des produits de dégradation résultant des procédés agressifs liés à la fabrication du caoutchouc. À l'heure actuelle, un nombre limité d'allergènes ont été détectés dans les produits en latex de caoutchouc naturel. Selon la littérature existante, au moins Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 et Hev b 6.02, et/ou des fragments ou polymères de ces derniers comportant des épitopes se combinant aux IgE, peuvent être présents dans les produits manufacturés [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Il reste à confirmer si d'autres allergènes, comme Hev b2, Hev b7, Hev b13 [19] ou Hev b14 [32], s'avèrent être d'importants allergènes propres aux produits en caoutchouc.

B.3 Méthodes de dosage des allergènes du latex de caoutchouc naturel

B.3.1 Méthodes qualitatives

Les méthodes immuno-électrophorétiques et les techniques d'immuno-empreinte, largement utilisées au début des années 1990, ont permis de détecter et d'étudier plusieurs protéines du latex de caoutchouc naturel se combinant aux IgE du sérum de patients allergiques au latex de caoutchouc naturel. Cependant, il est aujourd'hui admis que l'utilisation de ces seules méthodes ne permet pas d'identifier les allergènes de manière fiable [11], [12], [20], [21].

B.3.2 Méthodes semi-quantitatives

B.3.2.1 Tests cutanés sur des sujets volontaires allergiques au latex

L'allergénicité d'extraits de latex de caoutchouc naturel peut être évaluée de manière semi-quantitative à l'aide de tests cutanés effectués sur un nombre statistiquement pertinent de patients allergiques au latex. L'importance de la réaction est proportionnelle à la quantité d'allergènes pour lesquels le patient possède des anticorps IgE [2]. D'un point de vue biologique, les tests cutanés seraient l'idéal pour évaluer l'allergénicité d'intérêt clinique, mais, en raison de contraintes d'ordre éthique, cette approche ne peut pas être utilisée comme méthode de routine pour contrôler la teneur en allergènes des gants en latex de caoutchouc naturel.

B.3.2.2 Méthode d'inhibition du test ELISA (également connue en tant que méthode d'inhibition du test RAST)

Le test d'inhibition ELISA (ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) peut être utilisé pour le dosage d'anticorps IgE spécifiques à partir de réactifs d'essais disponibles dans le commerce ou préparés au sein même du laboratoire. La méthode du test d'inhibition RAST (Radio Allergo Sorbent Test), autrefois courante, utilisait des anticorps de détection radiomarqués au lieu d'anticorps de détection conjugués à une enzyme.

L'inhibition du test ELISA a été utilisée pour évaluer les allergènes du latex de caoutchouc naturel dans différents produits médicaux ou de consommation courante [3], [4], [22], [23].

Dans cette méthode, des quantités optimales d'allergènes du latex de caoutchouc naturel sont immobilisées sur une phase solide (par exemple, papier ou polystyrène). Des échantillons inconnus et des étalons sont incubés avec un mélange de sérums IgE d'individus ayant une allergie confirmée au latex de caoutchouc naturel. Lorsque l'anticorps IgE se combine à l'allergène soluble, il ne peut pas se combiner à l'allergène en phase solide. Après incubation, le mélange est transféré sur la préparation d'allergènes immobilisés où les anticorps IgE libres sont combinés aux allergènes se trouvant sur la phase solide. La combinaison spécifique est ensuite mesurée à l'aide d'un anticorps anti-IgE conjugué à une enzyme. Le degré d'inhibition est proportionnel à la quantité d'allergènes solubles dans l'extrait.

Les réactifs critiques sont l'allergène immobilisé, le mélange de sérums humains et l'allergène étalon.

Dans le cas de la méthode d'essai de la référence 4 où les réactifs sont préparés au sein même du laboratoire, un latex de caoutchouc naturel natif non ammoniacqué est utilisé pour le revêtement et comme allergène étalon. Une concentration de 10 mg de protéine par ml dans l'étalon a été fixée arbitrairement à 100 000 unités. Des dilutions en série d'extraits de gants et des dilutions de l'étalon de latex de caoutchouc naturel sont incubées avec un mélange de sérums IgE dilué de manière optimale, composé de sérums avec un titre élevé en anticorps et soigneusement caractérisés, provenant de patients allergiques au latex de caoutchouc naturel [4].

B.3.3 Méthodes quantitatives spécifiques

B.3.3.1 Tests immuno-enzymatiques pour la quantification des allergènes du latex de caoutchouc naturel

B.3.3.2 Contexte

Il convient de concevoir un essai optimal permettant de détecter seulement les allergènes du latex de caoutchouc naturel qui ont été détectés dans des produits manufacturés. Quatre allergènes du latex de caoutchouc naturel, à savoir Hev b 1, Hev b3, Hev b5 et Hev b6.02, ont actuellement été détectés sans équivoque dans des extraits de gants en latex de caoutchouc naturel [13], [15], [16], [17], [24]. Les deux principaux allergènes pour les sujets adultes sont Hev b 5 et Hev b 6.02 (hévéine) [15], [17], [25]. Hev b 1 et Hev b 3 sont des allergènes importants pour les enfants présentant un spina bifida [26], [27]. Des dosages immuno-enzymatiques propres à certains allergènes, permettant de quantifier ces quatre allergènes du latex de caoutchouc naturel, ont récemment été mis au point, et des kits permettant de mesurer ces allergènes sont vendus dans le commerce depuis décembre 2001. Les réactifs et le matériel peuvent également être achetés séparément.

B.3.3.3 Description des méthodes de tests immuno-enzymatiques⁴⁾

Les tests immuno-enzymatiques utilisent des anticorps monoclonaux spécifiques et des allergènes purifiés ou des protéines obtenues par des techniques d'ADN recombinant et servant d'étalons. Les puits de microplaque de titrage sont revêtus lors de chaque essai d'un anticorps monoclonal spécifique, qui se combine avec l'allergène souhaité provenant de l'échantillon. Après incubation, le matériau non combiné est éliminé par lavage. Lors de la deuxième incubation, l'anticorps monoclonal propre à un allergène et couplé à une enzyme de révélation (habituellement Horseradish peroxydase) se combine aux molécules allergènes combinées sur la microplaque lors de la première incubation. Après le lavage, un substrat de l'enzyme est ajouté. Après l'arrêt de la réaction, l'absorbance est mesurée à une longueur d'ondes appropriée. L'intensité de la coloration obtenue est directement proportionnelle à la concentration en allergènes de l'échantillon.

4) Selon les informations fournies par le fabricant des kits vendus dans le commerce (documentation technique FITkit®, www.quattromed.com) la limite de détection pour les quatre allergènes est comprise entre 0,1 µg/l (Hev b6.02) et 2,3 µg/l (Hev b3). Le coefficient de variation de la répétabilité s'est révélé compris entre 2,8 % et 5,8 %, et le coefficient de variation de la reproductibilité entre 2,6 % et 7,6 %. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme européenne et ne saurait constituer un engagement du CEN à l'égard de ce produit.

B.3.3.4 Performance des tests immuno-enzymatiques comparés aux tests allergéniques à base d'IgE

Des tests allergéniques spécifiques ont été utilisés dans plusieurs séries d'études pour évaluer l'allergénicité des gants médicaux. La meilleure vérification du potentiel allergénique d'un extrait donné serait la réactivité de la peau de patients allergiques au latex de caoutchouc naturel. Lors d'une étude portant sur 22 gants en latex de caoutchouc naturel, des corrélations très significatives ont été constatées lorsque la somme de ces quatre allergènes (mesurés par le kit commercial de test immuno-enzymatique) a été comparée aux résultats de tests d'inhibition à base d'IgE humaine [10]. La plus forte corrélation a été observée entre la somme des quatre allergènes des gants et les tests cutanés sur 20 volontaires allergiques au latex de caoutchouc naturel ($r = 0,95$) suivie de la somme et des résultats de l'inhibition de type ELISA aux IgE ($r = 0,90$). La corrélation avec les protéines totales mesurées selon la méthode Lowry modifiée a été très faible ($r = -0,11$). Dans une autre série de 58 gants en latex de caoutchouc naturel mentionnée dans le même document [10], la corrélation entre la somme des quatre allergènes et l'activité allergénique totale par l'inhibition de type ELISA aux IgE a été de 0,84. Les résultats d'une étude interlaboratoires internationale récente [28] lancée par la FDA et réalisée dans sept laboratoires afin de mesurer les allergènes du latex de caoutchouc naturel dans 30 gants ont également montré que la somme des quatre allergènes mesurés par les tests immuno-enzymatiques monoclonaux donnait la plus forte corrélation ($r^2 = 0,91 - 0,95$) avec les tests d'inhibition RAST/ELISA à base d'IgE humaine. Actuellement, il est encore nécessaire de poursuivre les études sur un grand nombre de gants, pour confirmer l'applicabilité des tests immuno-enzymatiques propres à certains allergènes, mais il apparaît déjà que la somme des quatre allergènes reflète la teneur allergénique totale des extraits de gants de manière biologiquement significative. Les études en cours sont destinées à indiquer si des allergènes supplémentaires sont nécessaires, et s'ils auraient une incidence sur le résultat des évaluations.

Une autre étude de 208 gants [30] utilisant l'immunoessai vendu dans le commerce (FitKit, Icosagen AS, Tartu, Estonie) et remplissant les critères de la Norme ASTM D7427-08 a fourni une forte corrélation entre la somme des quatre allergènes cliniquement pertinents et l'immunoessai à base d'IgE humaine validé par un test cutané [4]. Actuellement, il est encore nécessaire de poursuivre les études sur un grand nombre de gants pour confirmer l'applicabilité des tests immuno-enzymatiques propres à certains allergènes, mais il apparaît déjà que la somme des quatre allergènes reflète la teneur allergénique totale des extraits de gants de manière biologiquement significative même si aucune prescription de sécurité ne peut être présentée. D'autres études en cours sont nécessaires afin d'indiquer si des allergènes supplémentaires sont nécessaires, et s'ils auraient une incidence sur le résultat des évaluations.

B.4 Conclusion

Le dosage des protéines extractibles totales n'est pas considéré comme une méthode idéale de contrôle de la teneur en allergènes du latex de caoutchouc naturel des gants médicaux. Toutefois, à la date de publication de la norme, l'inconvénient des méthodes de mesure des allergènes à base d'IgE humaine est qu'elles ne sont pas validées, sont peu normalisées et que la disponibilité des réactifs est insuffisante. Par conséquent, elle demeure la méthode prescrite dans la partie normative de la présente norme. Les méthodes de dosage immuno-enzymatiques permettant de quantifier les allergènes du latex de caoutchouc naturel ne sont pas soumises à toutes les limites qui s'appliquent aux méthodes précédentes car elles utilisent des allergènes caractérisés et très purs, et des anticorps monoclonaux spécifiques des allergènes du latex de caoutchouc naturel présents dans les produits en latex de caoutchouc naturel. Les tests sont très spécifiques, qu'il y ait ou non d'autres protéines ou substances chimiques liées au procédé de fabrication des produits en latex de caoutchouc naturel, et très sensibles. Les tests sont techniquement relativement faciles à réaliser, et les résultats peuvent être obtenus en un court laps de temps (< 2 h). L'inconvénient est qu'ils sont actuellement coûteux et qu'il n'a pas encore été possible d'établir avec certitude lesquels des nombreux allergènes connus du latex de caoutchouc naturel sont nécessaires pour établir des recommandations et des limites de sécurité. De plus, un grand nombre d'anticorps monoclonaux peuvent s'avérer nécessaires pour garantir la détection de tous les allergènes pertinents. Actuellement, des tests et/ou des réactifs permettant de mesurer quatre allergènes du latex de caoutchouc naturel par dosage immuno-enzymatique sont vendus dans le commerce. Si d'autres allergènes apparaissent en quantités significatives dans des produits en caoutchouc, de nouveaux réactifs et kits pourront être mis au point.

Une expérience interlaboratoires d'évaluation de trois méthodes d'essai visant à quantifier les protéines du latex de caoutchouc naturel et les allergènes présents dans les gants médicaux a été réalisée par le CEN/TC205/GT3 en 2002. Les trois méthodes d'essai évaluées sont les suivantes :

- dosage d'allergènes spécifiques (voir note de bas de page 4 de B.3.3.3),
- ASTM D 6499 (protéines antigènes) [29],
- analyse des aminoacides (protéines totales).

Cette expérience n'a permis de tirer aucune conclusion permettant de recommander l'introduction des méthodes d'essai mentionnées ci-dessus dans la norme à titre normatif.

Il est nécessaire de poursuivre les études avec une collection représentative de gants commercialisés en Europe et des échantillons de référence ayant des concentrations quantifiées avec précision en allergènes considérés pour valider la performance et confirmer l'utilité des nouveaux tests propres à certains allergènes.

B.5 Références

- [1] Turjanmaa, K. et al., Natural rubber latex allergy (review), *Allergy*, 51, 593, 1966
- [2] Turjanmaa, K., et al, Rubber contact urticaria. Allergic 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., Mékinen-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

Annexe C (informative)

Analyse des aminoacides (AAA) par chromatographie liquide haute pression (CLHP)

C.1 Contexte

Le dosage des protéines repose généralement sur des réactions colorées à des éléments structuraux particuliers irrégulièrement répartis dans différentes protéines [1], [2], [3], [4], [5]. Le facteur de réaction diffère donc considérablement d'une protéine à l'autre [2], [4]. De plus, un certain nombre de substances perturbent les essais colorimétriques en ne réagissant pas de façon spécifique au réactif de coloration ou en empêchant le développement de la coloration.

L'analyse des aminoacides évite ces problèmes, ce que confirment les résultats de l'étude « Dosage des composés allergologiques pertinents présents dans les gants à usage unique — Corrélation entre les données chimiques, allergologiques et immunologiques » menée dans le cadre du programme « Mesurage et Essais » de la Commission européenne (MATI-CT 940060) [8]. Cette étude fait apparaître la meilleure corrélation entre les données cliniques (test par piqûre) et l'analyse chimique si la concentration en protéines est mesurée par analyse des aminoacides [6].

Néanmoins, il convient d'utiliser la méthode Lowry modifiée comme méthode normalisée de dosage des protéines dans les gants à base de caoutchouc naturel car l'analyse des aminoacides semble trop peu utilisée et trop complexe pour un mode opératoire normalisé. L'analyse des aminoacides peut être utilisée pour clarifier des résultats douteux obtenus selon la méthode Lowry modifiée. Il convient de ne pas l'utiliser pour la déclaration de dosage des protéines, mais elle devrait aider le fabricant à éviter des substances conduisant à un dosage incorrect des protéines selon la méthode normalisée.

C.2 Principes de dosage des protéines par CLHP

En premier lieu, les protéines font l'objet d'une hydrolyse à l'acide chlorhydrique 6 M. Les aminoacides libres ainsi obtenus sont ensuite séparés et détectés par CLHP [7]. La quantification par l'intermédiaire d'un étalon interne (norvaline) et la somme ultérieure des aminoacides individuels indiquent la teneur en protéines totales. Du fait de ce mode opératoire, la méthode est indépendante de toute caractéristique de structure de la molécule de polymère initiale. À ce jour, on n'a constaté aucune interaction de substances, mais la présence de sels de TES semble empêcher la perte d'acides aminés (par exemple par effets de paroi).

C.3 Matériau

C.3.1 Norvaline DL.

C.3.2 HCl 30 % Suprapur.

C.3.3 Étalon d'acide aminé (contenant : L-alanine, chlorure d'ammonium, L-arginine, L-acide aspartique, L-acide glutamique, glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-méthionine, L-phénylalanine, L-proline, L-sérine, L-thréonine, L-tryptophane, L-tyrosine, L-valine, à raison de 0,5 mM de chaque, et L-cystine 0,25 mM).

C.3.4 Méthanol haute qualité pour séquençage protéique.

C.3.5 o-Phtaldialdéhyde (OPA).

C.3.6 Acide borique.

- C.3.7** Acide éthylènediaminetétracétique, sel de disodium (EDTA).
- C.3.8** Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4).
- C.3.9** Phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4).
- C.3.10** Phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4).
- C.3.11** Acide 3-mercaptopropionique.
- C.3.12** Colonne de séparation : Hypersil ODS 3 μm , (150 x 4,6) mm, pré-testée pour application OPA.
- C.3.13** Pré-colonne : Hypersil ODS, 3 μm , (5 x 4,6) mm.
- C.3.14** Eau, au moins Milli-Q ou de qualité équivalente.
- C.3.15** Filtre de taille de pores 0,2 μm .
- C.3.16** Tétrahydrofurane (THF) de qualité CLHP.
- C.3.17** Acétonitrile de qualité CLHP.
- C.3.18** Récipients en polypropylène de 2 ml à bouchon à vis.
- C.3.19** Carbonate de sodium.
- C.3.20** Pastilles d'hydroxyde de sodium ou d'hydroxyde de potassium.

C.4 Tampons et solutions

NOTE Le solvant 1 et le solvant 2 sont destinés à une colonne OPA-1 de Grom, Herrenberg, Allemagne. En cas d'utilisation d'autres colonnes, des modifications peuvent s'avérer nécessaires.

C.4.1 Norvaline-100

11,7 mg de norvaline (C.3.1) dans 1 ml d'eau (C.3.14) = 100 mM de norvaline.

C.4.2 Norvaline-1

100 μl de norvaline-100 (C.4.1) dans 10 ml d'eau (C.3.14) = 1 mM de norvaline, à conserver à moins de 8 °C pendant au maximum quatre semaines.

C.4.3 o-Phtaldialdéhyde (OPA)

50 mg de o-phtaldialdéhyde (C.3.5), 4,5 ml de méthanol (C.3.4), 50 μl d'acide mercaptopropionique (C.3.11).

C.4.4 Tampon de borate

400 mM de borate de sodium, 5 mM d'EDTA, pH 10,4.

1,24 g d'acide borique et 85 mg d'EDTA dans 30 ml d'eau (C.3.14), ajuster à pH 10,4 avec 2M de NaOH et ajouter de l'eau (C.3.14) jusqu'à 50 ml. Filtrer à travers un filtre de 0,2 μm (C.3.15), conserver à température ambiante au maximum deux semaines. Éviter de réfrigérer pour ne pas entraîner de précipité insoluble.

C.4.5 Solution de neutralisation

1,36 g de KH_2PO_4 (C.3.8) dans de l'eau (C.3.14), filtrer à travers un filtre de $0,2 \mu\text{m}$ (C.3.15) et conserver à température ambiante au maximum quatre semaines.

C.4.6 Tampon phosphate

7,15 g de Na_2HPO_4 (C.3.8) et 3,45 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (C.3.9) dans 1,5 l d'eau (C.3.14).

C.4.7 Solvant 1

20 ml de tétrahydrofurane (C.3.16) plus 1 l de tampon de phosphate (C.4.6).

C.4.8 Solvant 2

250 ml d'acétonitrile (C.3.17), 100 ml de tétrahydrofurane (C.3.16), compléter à 1 l avec du tampon de phosphate (C.4.6)

C.4.9 Solution de carbonate de sodium (0,1 M)

2,12 g de carbonate de sodium (C.3.19) dans 10 ml d'eau (C.3.14).

C.5 Hydrolyse

C.5.1 Échantillons

400 μl d'extrait (dans le tampon TES) + 10 μl de norvaline-1 (C.4.2) + 700 μl de HCl (C.3.3).

C.5.2 Étalons

380 μl d'eau (C.3.14) + 20 μl d'étalon aminoacide (C.3.3) + 10 μl de norvaline-1 (C.4.2) + 700 μl de HCl (C.3.2).

C.5.3 Incubation (hydrolyse)

Faire incuber les échantillons et les étalons simultanément pendant 48 h à 100°C dans des récipients en polypropylène fermés par un bouchon à vis (C.3.18). Il convient que les récipients soient fixés à un support vissé, pour éviter toute fissuration des bouchons. Il est très important de procéder à l'hydrolyse des étalons et des échantillons simultanément, de manière ce que la température et les conditions de temps soient identiques.

Faire refroidir les échantillons et les étalons, les sécher dans un concentrateur sous vide ou dans un dessiccateur sur du NaOH ou du KOH sous vide.

Le HCl doit être complètement éliminé, sinon la capacité du tampon de borate de dérivation pourrait être insuffisante.

C.5.4 Aminoacides libres

À partir de chaque extrait et de l'étalon, préparer un échantillon non hydrolysé :

- 400 μl d'extrait + 10 μl de norvaline 1 (C.4.2),
- 380 μl d'eau (C.3.14) + 20 μl d'étalon aminoacide (C.3.3) + 10 μl de norvaline 1 (C.4.2).

C.6 Analyse (CLHP)

C.6.1 Préparation des échantillons

- Ajouter 20 μl de solution de carbonate de sodium aux échantillons séchés (C.4.9),
- bien mélanger ou passer aux ultrasons,
- incuber pendant 15 min à température ambiante, mélanger à nouveau pour éliminer le CO_2 ,
- ajouter 180 μl de tampon de borate (C.4.4).

C.6.2 Dérivatisation

L'étape de dérivation dépend du temps et de la température. Il convient d'utiliser un auto-échantillonneur à température constante comprise entre 20 °C et 25 °C.

Mélanger 25 μl de tampon de borate (C.4.4), 12 μl d'OPA (C.4.3) et 8 μl d'échantillon.

Au bout de 2,5 min, terminer la réaction en ajoutant 25 μl de solution de neutralisation (C.4.5).

C.6.3 CLHP

L'analyse CLHP peut être effectuée avec tout équipement de CLHP utilisant un système de gradient et un détecteur à fluorescence.

Un exemple est donné ci-après, mais ces conditions doivent être adaptées au système et à la colonne utilisée.

EXEMPLE

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

C.6.4 Calcul

La concentration des aminoacides individuels doit être déterminée par une méthode d'étalon interne avec soustraction des aminoacides libres. La somme des aminoacides est égale à la teneur en protéines totales.

C.7 Exemples

C.7.1 Étalon

La Figure C.1 a) présente un chromatogramme type de la solution étalon hydrolysée avec 19 aminoacides en concentrations équimolaires. La liste des aminoacides prévus figure dans le Tableau C.1. L'asparagine et la glutamine, qui se transforment entièrement en acide aspartique et en acide glutamique, n'entrent pas dans la composition de la solution étalon. La norvaline qui n'apparaît pas naturellement a été utilisée comme étalon interne. Le tryptophane et la cystine sont présents dans la solution étalon non hydrolysée mais sont détruits par l'hydrolyse à l'HCl. En raison de l'absence d'un groupe aminé primaire, la proline ne réagit pas à l'OPA/MPA et n'est donc pas détectable dans ces conditions de dérivation. La lysine provoque souvent deux pics car un ou deux de ses groupes aminés peuvent réagir à l'OPA/MPA. Le rapport de ces deux pics dépend des conditions de réaction (température, âge de la solution d'OPA) et varie donc d'un essai à l'autre mais n'influe pas sur les résultats si l'on tient compte des deux zones de pics.

C.7.2 Extrait de gant

La Figure C.1 b) présente le chromatogramme d'un extrait de gant hydrolysé (préparé comme décrit à l'Annexe A). Cette hydrolyse des protéines de latex a mis en évidence la liste complète des aminoacides prévus (Tableau C.1). D'autres pics ont été constatés à 14,23 min et 24,08 min, identifiés comme étant des produits dérivés du TES. Ces pics ont été complètement séparés de ceux de l'ensemble des aminoacides et n'ont pas influé sur l'analyse.

C.8 Avantages et inconvénients de la méthode CLHP

C.8.1 Avantages

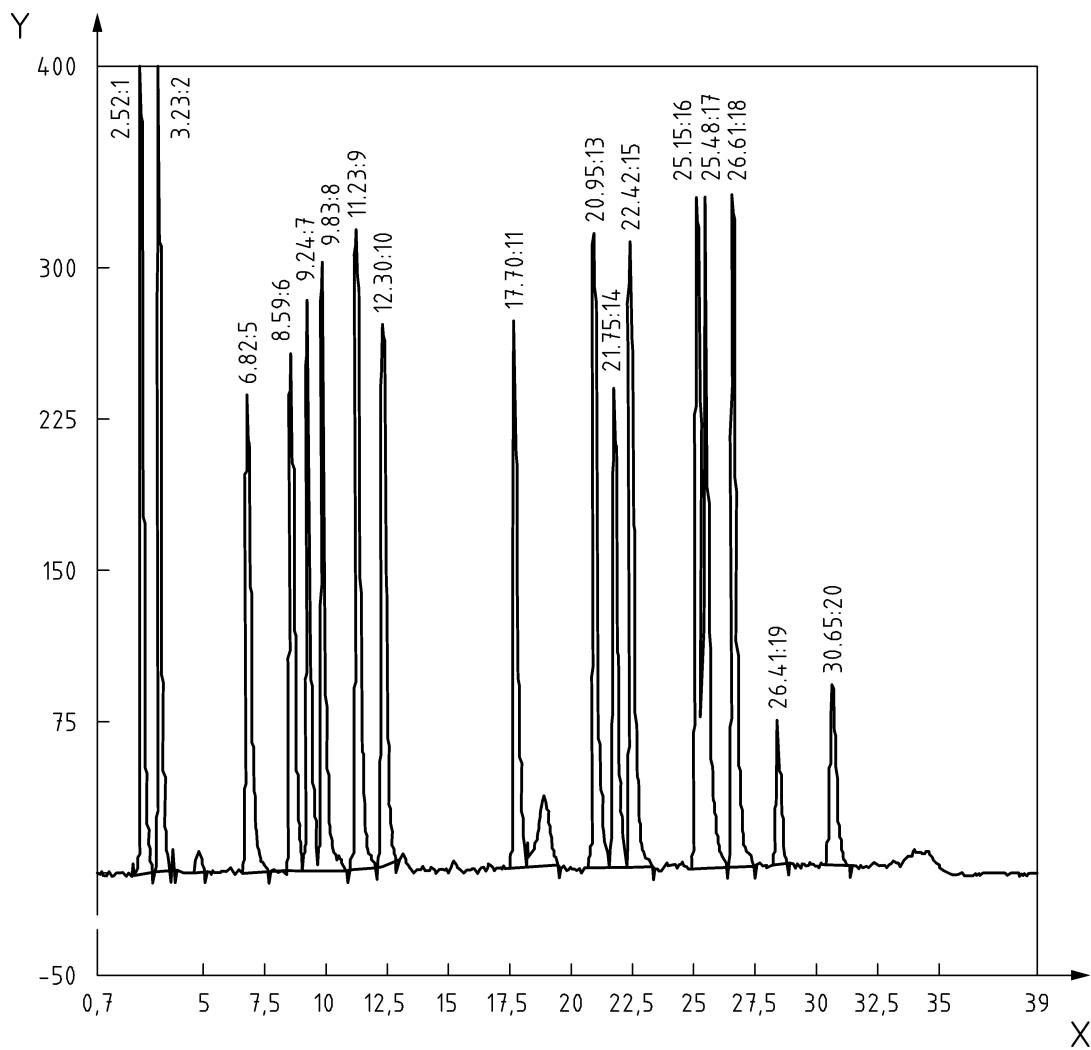
- Elle ne dépend pas de la structure des polymères de la protéine.
- Elle met en évidence la meilleure corrélation avec les données cliniques (test par piqûre).
- Il n'existe aucune interaction connue de substances.
- Elle est plus sensible que les dosages colorimétriques.
- Elle est hautement spécifique des protéines.

C.8.2 Inconvénients

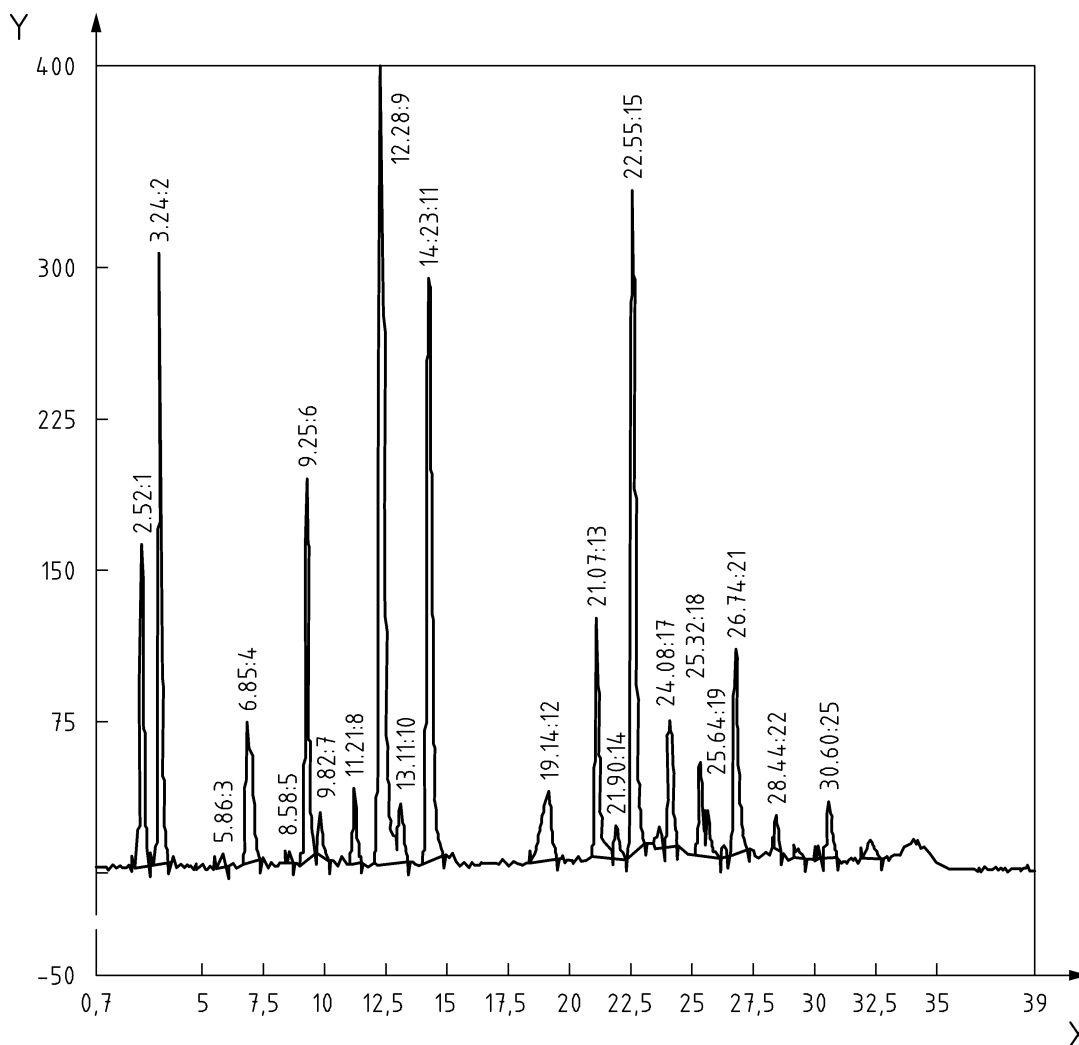
- Ce n'est pas une méthode fréquemment utilisée, et elle ne l'est que dans quelques laboratoires.
- Elle prend du temps.
- L'évaluation très complexe des données nécessite une grande expérience.

Tableau C.1 — Liste des aminoacides trouvés lors de l'analyse CLHP d'une solution étalon (Figure C.1 a)) et de l'hydrolyse de l'extrait de gant (Figure C.1 b))

Aminoacide	Temps de rétention en minutes		Commentaire
	Étalon	Analyse	
Acide aspartique (ASP)	2,52	2,52	
Asparagine (ASN)			Transformée en ASP
Acide glutamique (GLU)	3,23	3,24	
Glutamine (GLN)			Transformée en GLU
Sérine (SER)	6,83	6,85	
Histidine (HIS)	8,60		
Glycine (GLY)	9,25	9,25	
Thréonine (THR)	9,84	9,82	
Arginine (ARG)	11,24	11,21	
Alanine (ALA)	12,30	12,29	
		14,23	TES (tampon d'extraction)
Tyrosine (TYR)	17,7		
Valine (VAL)	20,95	21,07	
Méthionine (MET)	21,75	21,90	
Norvaline (NORVAL)	22,42	22,55	Étalon interne
		24,08	TES (tampon d'extraction)
Iso-leucine (ILE)	25,15	25,32	
Phénylalanine (PHE)	25,48	25,64	
Leucine (LEU)	26,61	26,74	
Lysine (LYS)	28,41 30,65	28,44 30,60	
Tryptophane (TRY)			Détruit par hydrolyse
Cystine, cystéine (CYS)			Détruite par hydrolyse
Proline (PRO)			Non détectable



a) Étalon d'acide aminé



b) Extrait de gant

Figure C.1 — Chromatogrammes types d'un étalon d'acide aminé (A) et d'une analyse d'un extrait de gant (35 µg de protéine)

C.9 Références

- [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

Annexe ZA (informative)

Relation entre la présente Norme européenne et les exigences essentielles de la Directive UE 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux

La présente Norme européenne a été élaborée dans le cadre d'un mandat donné au CEN par l'Union Européenne et l'Association Européenne de Libre Échange afin d'offrir un moyen de se conformer aux exigences essentielles de la Directive Nouvelle approche 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux.

Une fois la présente norme citée au Journal officiel de l'Union européenne au titre de ladite Directive et dès sa reprise en norme nationale dans au moins un État membre, la conformité aux articles de cette norme indiqués dans le Tableau ZA.1 confère, dans les limites du domaine d'application de la présente norme, présomption de conformité aux exigences essentielles correspondantes de ladite Directive et de la réglementation AELE associée.

Tableau ZA.1 — Correspondance entre la présente Norme européenne et la Directive 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux

Article(s)/paragraphe(s) de la présente EN	Exigences essentielles de la Directive 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux	Remarques/Notes
4	6, 7.1, 7.2, 7.5	
4.6	2, 13.1, 13.3	

Pour les dispositifs destinés par le fabricant à une double utilisation au sens de l'Article 1(6) de la Directive 93/42/CEE, le Tableau ZA.2 présente la correspondance entre les exigences essentielles de la Directive 89/686/CEE relative aux Équipements de Protection Individuelle et les articles de la présente Norme européenne. Cependant, le Tableau ZA.2 n'impliquant aucune citation au JOUE au titre de la Directive EPI, il ne confère pas de présomption de conformité à ladite Directive.

Tableau ZA.2 — Exigences essentielles pertinentes de la Directive 89/686/CEE relative aux équipements de protection individuelle abordées dans la présente Norme européenne

Article(s)/paragraphe(s) de la présente EN	Exigences essentielles de la Directive 89/686/CEE relative aux équipements de protection individuelle	Remarques/Notes
4.2	1.2.1.1.	

AVERTISSEMENT — D'autres exigences et d'autres Directives européennes peuvent être applicables au(x) produit(s) relevant du domaine d'application de la présente norme.