

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

Ausgabe / Edition: 2015-05
ICS Code: 11.140

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

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 de

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:
36

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

Preisklasse / Classe de prix / Price class:
0015 SNV

– Leerseite –

Deutsche Fassung

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

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

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

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. Januar 2015 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Chemikalien	8
4.3 Endotoxine	9
4.4 Puderfreie Handschuhe	9
4.5 Extrahierbare Proteine	9
4.6 Kennzeichnung	9
5 Prüfverfahren	10
5.1 Endotoxine	10
5.2 Puder	10
5.3 Extrahierbare Proteine	10
6 Prüfbericht.....	10
Anhang A (normativ) Bestimmung von wasserlöslichen Proteinen in Naturkautschukhandschuhen mit der modifizierten Lowry-Methode.....	11
A.1 Anwendungsbereich	11
A.2 Messprinzip	11
A.3 Reagenzien	11
A.3.1 Allgemeines	11
A.3.2 Extraktionslösung.....	11
A.3.3 Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry	12
A.4 Geräte.....	12
A.5 Messung der Proteinbindungskapazität	13
A.5.1 Allgemeines	13
A.5.2 Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen	13
A.5.3 Proteinbindungskapazität der Einmalfilter	13
A.6 Verfahren	14
A.6.1 Allgemeines	14
A.6.2 Extraktionsmethode	14
A.6.3 Proteinstandard	15
A.6.4 Fällung und Konzentration der Proteine	15
A.6.5 Farbentwicklung	16
A.6.6 Messung	16
A.7 Auswertung der Ergebnisse	16
A.7.1 Berechnung	16
A.7.2 Ergebnisse.....	17
A.7.3 Statistische Informationen.....	20
A.8 Literatur	20
Anhang B (informativ) Immunologische Methoden für die Messungen von Naturkautschuklatex- Allergenen	21
B.1 Einleitung.....	21
B.2 Naturkautschuklatex-Allergene in Gummiprodukten	21
B.3 Methoden zur Messung von Naturkautschuklatex-Allergenen.....	22

B.3.1	Qualitative Methoden	22
B.3.2	Semiquantitative Methoden.....	22
B.3.3	Spezifische quantitative Methoden	23
B.4	Zusammenfassende Bemerkungen	24
B.5	Literatur	25
Anhang C (informative) Aminosäureanalyse (AAA) mittels Hochdruck-Flüssigkeits-		
	Chromatographie (HPLC)	27
C.1	Hintergrund	27
C.2	Kurzbeschreibung der Proteinbestimmung mittels HPLC.....	27
C.3	Material	27
C.4	Puffer und Lösungen	28
C.4.1	Norvalin-100	28
C.4.2	Norvalin-1	28
C.4.3	o-Phthaldialdehyd (OPA)	28
C.4.4	Boratpuffer	28
C.4.5	Stopp-Lösung	28
C.4.6	Phosphatpuffer	29
C.4.7	Fließmittel 1	29
C.4.8	Fließmittel 2.....	29
C.4.9	Natriumkarbonatlösung (0,1 M)	29
C.5	Hydrolyse	29
C.5.1	Proben	29
C.5.2	Standards	29
C.5.3	Inkubation (Hydrolyse).....	29
C.5.4	Freie Aminosäuren	29
C.6	Analyse (HPLC).....	29
C.6.1	Probenvorbereitung	29
C.6.2	Derivatisierung	30
C.6.3	HPLC	30
C.6.4	Berechnung.....	30
C.7	Beispiele	30
C.7.1	Standard	30
C.7.2	Handschuhextrakt	31
C.8	Vorteile und Nachteile der HPLC-Methode	31
C.8.1	Vorteile.....	31
C.8.2	Nachteile.....	31
C.9	Literatur	35
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den		
	grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG Medizinprodukte.....	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 455-3:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 205 „Nicht aktive Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2015, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2015 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt DIN EN 455-3:2006.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Gegenüber EN 455-3:2006 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Norm wurde an die entsprechenden Teile von EN ISO 10993 zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten angepasst;
- b) normative Verweisungen wurden überarbeitet;
- c) EN 980 wurde durch EN ISO 15223-1 ersetzt;
- d) Abschnitt 4.2 „Chemikalien“ wurde angepasst;
- e) Abschnitt 4.4 wurde in „Puderfreie Handschuhe“ umbenannt;
- f) die Angabe „so gering wie vernünftigerweise praktikabel“ (ALARP = as low as reasonably practicable) wurde im gesamten Dokument entfernt;
- g) Abschnitt 4.6 „Kennzeichnung“ wurde angepasst;
- h) Symbol für Produkte, die Naturkautschuklatex enthalten (Bild 1) wurde entfernt;
- i) die Verweisungen in Anhang B wurden überarbeitet;
- j) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Richtlinie 89/686/EWG über persönliche Schutzausrüstung (siehe Anhang ZA) wurde hergestellt.

EN 455 besteht aus folgenden Teilen mit dem Haupttitel *Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch*:

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

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

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

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

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

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

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von EN 455 legt Anforderungen für die Bewertung der biologischen Sicherheit von medizinischen Einmalhandschuhen fest. Er enthält Anforderungen an die Kennzeichnung und die Informationsangaben entsprechend der angewendeten Prüfmethode.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 1041:2008+A1:2013, *Bereitstellung von Informationen durch den Hersteller eines Medizinprodukts*

EN ISO 10993-1:2009, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfung im Rahmen eines Risikomanagementverfahrens (ISO 10993-1:2009)*

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

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

EN ISO 14971:2012, *Medizinprodukte — Anwendung des Risikomanagements auf Medizinprodukte (ISO 14971:2007, korrigierte Fassung von 2007-10-01)*

EN ISO 15223-1:2012, *Medizinprodukte — Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen — Teil 1: Allgemeine Anforderungen (ISO 15223-1:2012)*

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

Europäische Pharmakopö, General chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins: zu beziehen durch EDQM — Council of Europe; 7 allée Kastner, CS 30026, F-67081 Straßburg; Frankreich <http://www.edqm.eu>

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Chemikalien

zu irgendeinem Zeitpunkt während der Produktion oder Lagerung zugesetzte oder entstandene Substanzen, die im Endprodukt vorhanden sein können

Anmerkung 1 zum Begriff: Das kann Gleitmittel, chemische Beschichtungen und Sterilisationsmittel beinhalten. Verschiedene chemische Inhaltsstoffe, von denen einige als Auslöser von Typ-IV-Allergien gelten, werden häufig während der Handschuhherstellung verwendet. Art und Menge der zugesetzten und verbleibenden Chemikalien sind unterschiedlich.

3.2

Endotoxine

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

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

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

[QUELLE: EN ISO 21171:2006, 3.1]

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

3.4 Verfahrensgrenzwert
höchster Wert, der bei einem validierten Herstellungsprozesses wahrscheinlich erzielt wird

3.5 allergene Proteine
Proteine, die allergische Reaktionen des Typs I auslösen können

3.6 extrahierbare Proteine
aus dem Endprodukt extrahierbare wasserlösliche Proteine und Peptide

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

4 Anforderungen

4.1 Allgemeines
EN ISO 10993-1:2009 beschreibt allgemeine Prinzipien der biologischen Bewertung von Medizinprodukten und muss zur Auswahl der entsprechenden Prüfverfahren in den anderen Teilen der Reihe herangezogen werden. Basierend auf EN ISO 10993-1:2009 werden medizinische Handschuhe als Hilfsmittel mit limitierter Kontaktdauer eingestuft und erfordern die Einhaltung der EN ISO 10993-5:2009 und EN ISO 10993-10:2013.

Die Klassifizierung medizinischer Handschuhe entsprechend EN ISO 10993-1:2009 sollte nicht mit den Definitionen der Richtlinie über Medizinprodukte verwechselt werden.

Ein Risikomanagementprozess nach EN ISO 14971:2012 muss eingeführt sein.

4.2 Chemikalien
Handschuhe dürfen nicht mit Talkum (Magnesiumsilikat) gepudert sein.
Der Hersteller muss auf Anfrage eine Liste von chemischen Inhaltsstoffen zur Verfügung stellen, die im Herstellungsprozess zugesetzt wurden oder bekanntermaßen im Produkt enthalten sind wie z. B. Akzeleratoren, Antioxidantien, Biozide und von denen aufgrund von aktuellen Daten bekannt ist, dass sie unerwünschte gesundheitliche Folgen hervorrufen können.

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

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

4.3 Endotoxine

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

4.4 Puderfreie Handschuhe

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

4.5 Extrahierbare Proteine

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

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

ANMERKUNG Allergene Proteine: Diese Norm beschreibt ein Messverfahren, das in grober Annäherung den Allergengehalt bestimmt, z. B. extrahierbare Proteine. Es besteht keine direkte Korrelation zwischen extrahierbare Proteinen und dem Allergengehalt. Quantitative Prüfverfahren für allergene Proteine sind im informativen Anhang B beschrieben.

4.6 Kennzeichnung

Zu den in EN 1041:2008+A1:2013 beschriebenen Kennzeichnungen und den in EN ISO 15223-1:2012 aufgeführten relevanten Symbolen gelten zusätzlich folgende Anforderungen:

- a) Medizinische Handschuhe, die Naturkautschuklatex enthalten, müssen auf der Verpackung mindestens der kleinsten Verpackungseinheit mit dem Symbol entsprechend EN ISO 15223-1:2012 für Latex gekennzeichnet sein (Verweis siehe 5.4.5).

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

- b) Die Kennzeichnung muss einen deutlichen Hinweis enthalten, ob der Handschuh gepudert oder puderfrei ist.
- c) Sterile gepuderte Handschuhe müssen wie folgt oder gleichwertig gekennzeichnet sein: „**ACHTUNG** Oberflächenpuder muss vor dem operativen Eingriff unter aseptischen Bedingungen entfernt werden, um das Risiko von unerwünschten Gewebereaktionen zu minimieren.“

ANMERKUNG 1 Dieser Warnhinweis kann auf der inneren Einschlagverpackung angebracht werden.

- d) Medizinische Handschuhe, die Naturkautschuklatex enthalten, dürfen folgende Produktkennzeichnungen nicht aufweisen:
- Angaben, die eine relative Sicherheit vorgeben, wie geringe Allergenität, hypoallergen oder niedriger Proteingehalt;
 - jede ungerechtfertigte Angabe über das Vorhandensein von Allergenen.
- e) Wenn der Hersteller die Handschuhe mit dem Proteingehalt kennzeichnet, muss der Verfahrensgrenzwert angegeben werden, der entsprechend 5.3 gemessen wurde.

ANMERKUNG 2 Die Angabe von Proteinwerten, die niedriger als 50 µg/g sind, ist nicht erlaubt. Niedrigere Angaben können nicht als verlässliche Werte wegen der zu erwartenden Prozessvariation in der Herstellung und in Ringversuchen angesehen werden.

5 Prüfverfahren

5.1 Endotoxine

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

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

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

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

ANMERKUNG 2 Es sind auch andere Methoden zur Bestimmung von Endotoxinen verfügbar. Diese können für die Routinequalitätskontrolle verwendet werden, wenn sie validiert wurden und eine Korrelation zur Referenzmethode in dieser Europäischen Norm nachgewiesen wurde.

5.2 Puder

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

5.3 Extrahierbare Proteine

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

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

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

6 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- Verweisung auf diesen Teil der EN 455;
- den Handschuhtyp und die Chargennummer des Herstellers;
- Name und Adresse des Herstellers oder des Vertreibers und des Prüflabors, wenn unterschiedlich;
- Datum der durchgeführten Prüfung;
- Beschreibung der angewendeten Prüfverfahren;
- Prüfergebnisse.

Anhang A (normativ)

Bestimmung von wasserlöslichen Proteinen in Naturkautschukhandschuhen mit der modifizierten Lowry-Methode

A.1 Anwendungsbereich

Diese Methode ist zur Messung der wässrig extrahierbaren Proteinmenge in medizinischen Handschuhen aus Naturkautschuk bestimmt. Sie wurde in Ringversuchen validiert. Die untere Messgrenze liegt abhängig vom Handschuhgewicht bei etwa 10 µg Protein je g Handschuh (d. h. 2 µg je ml Extrakt).

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

Personen, die diese Methode benutzen, sollten mit der normalen Laborarbeit vertraut sein.

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

A.2 Messprinzip

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

A.3 Reagenzien

A.3.1 Allgemeines

Als Wasser sollte immer bidestilliertes Wasser oder eine vergleichbare Wasserqualität verwendet werden. Alle anderen Chemikalien sollten Analysen-Qualität entsprechen.

A.3.2 Extraktionslösung

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

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

Es soll genügend Pufferlösung hergestellt werden, um damit die Extraktionen (A.6.2) durchzuführen, die Standardreihe (A.6.3.2) zu präparieren und die Leerwerte zu entnehmen.

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

A.3.3 Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry

ANMERKUNG Die Reagenzien können entweder selbst hergestellt werden [1] oder als käufliche Kits bezogen werden. Die Methode für diesen Europäischen Standard wurde mit einem käuflichen Kit validiert¹⁾.

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

A.3.3.2 Reagens B, verdünntes Folins-Reagens.

A.3.4 Natriumhydroxidlösung, 0,1 M in wässriger Lösung.

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

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

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

A.3.8 Ovalbumin, Hühnerei²⁾, lyophilisiert, salzfrei.

A.4 Geräte

A.4.1 Synthetische Handschuhe, puderfrei.

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

A.4.3 Zentrifugenröhrchen, 30 ml oder 50 ml Polypropylenröhrchen mit einer niedrigen Proteinbindungskapazität von 10 µg je Röhrchen oder weniger. Glasröhrchen dürfen wegen der Oberflächenabsorption von Proteinen nicht verwendet werden.

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

A.4.4 Einmalfilter, mit 0,22 µm Porengröße und niedriger Proteinbindungskapazität von 10 µg je Filter oder weniger.

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

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

A.4.6 Mikroröhrchen, 2 ml, aus Polypropylen.

A.4.7 Quarzküvetten, 10 mm Lichtweg.

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

A.4.9 Einmalküvetten, 1,5 ml Halbmikro, 10 mm Lichtweg, aus Polystyrol.

1) Lowry Micro DC Protein Assay Kit (Katalog-Nr. 500-0116) von BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, USA. Diese Information dient als Hilfestellung für den Benutzer und ist nicht als Empfehlung des CEN für das benannte Produkt anzusehen.

2) Ovalbumin wurde aus frischem Hühnereiweiß durch Ammoniumsulfatfraktionierung und wiederholte Umkristallisierung bei pH 4,5 hergestellt; z. B. Sigma A5503, chicken egg albumin, Grade V, von Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA. Diese Information dient als Hilfestellung für den Benutzer und ist nicht als Empfehlung des CEN für das benannte Produkt anzusehen.

A.4.10 Mikrotiterplatten-Leser, mit einer Wellenlänge zwischen 600 nm und 750 nm.

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

A.4.12 Vortex-Mischer.

A.4.13 Mikropipetten, mit Einmalspitzen aus Polypropylen.

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

A.4.15 Schüttler.

A.5 Messung der Proteinbindungskapazität

A.5.1 Allgemeines

Es werden grundsätzlich Einmalpolypropylengefäße empfohlen, da sie eine niedrige Proteinbindungskapazität haben. Die Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen oder Einmalfiltern muss für jede neue Charge vor dem Gebrauch mit den folgenden Methoden gemessen werden. Die Messung muss innerhalb eines Tages durchgeführt werden.

A.5.2 Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen

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

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

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

A.5.2.4 Die absorbierte Ovalbuminmenge wird nach folgender Gleichung berechnet:

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

$$= 2(R - T)$$

Dabei ist

O das absorbierte Ovalbumin, in µg/Röhrchen;

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

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

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

A.5.3 Proteinbindungskapazität der Einmalfilter

A.5.3.1 In einem Zentrifugenröhrchen (A.4.3) werden 30 ml einer Referenzlösung mit 10 µg/ml Ovalbumin durch Verdünnung aus der Protein-Stammlösung (A.6.3.1) mit Extraktionspuffer (A.3.2.2) hergestellt.

A.5.3.2 Jeweils 10 ml dieser Referenzlösung werden durch zwei Säulen von je fünf Einmalfiltern (A.4.4) in ein Zentrifugenröhrchen (A.4.3) filtriert.

A.5.3.3 Die Proteinkonzentrationen der Referenzlösung und der beiden Prüflösungen werden in Dreifachbestimmung mit der nach A.6.4 bis A.6.6 beschriebenen Methode gemessen.

A.5.3.4 Die absorbierte Ovalbuminmenge wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$O = \frac{10(R - T)}{5} \\ = 2(R - T)$$

Dabei ist

- O* das absorbierte Ovalbumin, in µg/Röhrchen;
- R* der Mittelwert der Dreifachbestimmung der Ovalbuminkonzentration der Referenzlösung, in µg/ml;
- T* der Mittelwert der Ovalbuminkonzentration in den Prüflösungen nach der Passage durch die Einmalfilter (d. h. der Mittelwert von sechs Messungen), in µg/Röhrchen.

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

A.6 Verfahren

A.6.1 Allgemeines

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

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

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

A.6.2 Extraktionsmethode

A.6.2.1 Beim Bearbeiten der zu untersuchenden Handschuhe müssen synthetische Handschuhe (A.4.1) getragen werden.

Acht Handschuhe derselben Größe aus derselben Charge werden in 4 Paare aufgeteilt. Im Fall von handspezifischen Handschuhen müssen 4 rechte und 4 linke Handschuhe ausgewählt werden, die in 2 rechte und 2 linke Paaren aufgeteilt werden.

Auf der Stulpe eines der Handschuhe jedes Paares wird ein Punkt markiert, der (200 ± 10) mm von der Mittelfingerspitze entfernt ist. Der Handschuh wird auf 0,1 g gewogen (m_1). Für jedes Paar wird der zweite Handschuh nun in den markierten Handschuh eingeführt, sodass sie genau wie in Bild A.1 a) dargestellt ineinander passen.

ANMERKUNG Die Methode für das Ineinanderschieben der Handschuhe ist nicht von entscheidender Bedeutung, vorausgesetzt, dass die Handschuhe so wenig wie möglich manipuliert werden. Man kann die Handschuhe mithilfe von Glasstäben in Daumen und kleinem Finger des inneren Handschuhs ineinander schieben und anschließend die anderen drei Finger mit dem Glasstab nachschieben.

A.6.2.2 In den inneren Handschuh wird eine ausreichende Menge der Farbstofflösung (A.3.2.3) gefüllt, um alle 5 Finger des Handschuhs zu füllen. Zwischen inneren und äußeren Handschuhe werden 25 ml Extraktionspuffer (A.3.2.2) bei $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ eingefüllt. Für große Handschuhe darf das Volumen auf höchstens 50 ml erhöht werden. Luftblasen werden nun so weit wie möglich entfernt und die Handschuhe mit der Klammer (A.4.14) an der 20-cm-Marke wie in Bild A.1 b) dargestellt wasserdicht verschlossen.

A.6.2.3 Die Handschuhe werden auf einem Schüttler (A.4.15) befestigt und für (120 ± 5) min bei $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ geschüttelt.

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

A.6.2.5 Der Extrakt wird nun vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen (A.4.3) überführt und entweder durch Zentrifugation bei mindestens 2 000 g für 15 min oder durch Filtration mit einem Einmalfilter (A.4.4) oder, wenn notwendig, auch durch eine Kombination von beidem geklärt. Der klare Extrakt kann bei 2°C bis 8°C gelagert werden, wenn er innerhalb der nächsten 48 h gemessen wird, oder ein Aliquot der Lösung kann bei -18°C oder weniger für nicht mehr als 2 Monate bis zum Messen eingefroren werden.

A.6.2.6 Die Stulpe wird an der 20-cm-Marke von dem extrahierten äußeren Handschuh abgeschnitten, die Flüssigkeit mit einem Papiertuch abgewischt und der Handschuh bei Zimmertemperatur getrocknet. Anschließend wird auf 0,1 g gewogen (m_2). Das Gewicht (m) des extrahierten Teils des Handschuhs wird wie folgt bestimmt:

$$m = m_1 - m_2$$

A.6.3 Proteinstandard

A.6.3.1 Protein-Stammlösung

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

A.6.3.2 Proteinstandardlösungen

Aus der Protein-Stammlösung (A.6.3.1) werden durch serielle Verdünnung mit Extraktionspuffer (A.3.2.2) nominale Konzentrationen von etwa 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 2 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Als Leerwert wird Extraktionspuffer verwendet. Die Lösungen sind unter Kühlung für 2 Tage oder bei -18°C für 2 Monate stabil. Beim Auftauen müssen die Proben für 15 min auf 45°C erwärmt werden.

A.6.4 Fällung und Konzentration der Proteine

A.6.4.1 Die Bestimmungen werden als Doppelwerte bei $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$ ausgeführt.

A.6.4.2 Genau 1 ml des Leerwertes, der Proteinstandardlösungen (A.6.3.2) und der vier Handschuhextrakte (A.6.2.5.) werden in Mikroröhrchen (A.4.6) pipettiert. Jeweils 0,1 ml DOC (A.3.5) werden dazu pipettiert, und nach dem Mischen mit dem Vortex-Mischer wird für 10 min inkubiert. Anschließend werden jeweils 0,1 ml TCA (A.3.6) und 0,1 ml PTA (A.3.7) zugegeben, und nach dem Mischen mit dem Vortex-Mischer wird für weitere 30 min inkubiert.

A.6.4.3 Danach wird für 15 min bei 6 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Flüssigkeitsreste werden 5 min durch Abtropfen auf Saugpapier getrocknet.

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

A.6.4.4 Zu jeder Probe, einschließlich der Leerwerte, werden 0,2 ml einer 0,1-M-Natriumhydroxidlösung (A.3.4) gegeben. Durch Mischen auf einem Vortex-Mischer werden die gefällten Proteine gelöst. Es muss dabei sichergestellt sein, dass das Protein vollständig zu einer klaren Lösung gelöst wird. Dazu muss bei manchen Handschuhen die Probe über Nacht bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ stehen. Sollte ein Präzipitat zurückbleiben, muss weitere Natriumhydroxidlösung in 0,2-ml-Schritten bis insgesamt 1 ml Natriumhydroxidlösung zugegeben werden und für die weiteren Schritte eine Teilprobe von 0,2 ml verwendet werden. Es ist oft hilfreich, den Extrakt solcher Proben vor der Fällung zu verdünnen.

ANMERKUNG Die Konzentrierung des Proteins durch Fällung und Lösen soll das Protein reinigen und von Störsubstanzen befreien. Es ist dabei unvermeidbar, dass eine gewisse Proteinmenge verloren wird. Es wird aber angenommen, dass aus den Protein-Standardlösungen und den Probenextrakten dieselbe prozentuale Menge verloren geht. Trotzdem sollte die Menge auf ein Minimum reduziert werden, da große Verluste nicht reproduzierbar wären.

A.6.5 Farbentwicklung

A.6.5.1 Die Methode, die hier beschrieben wird, ist auf den kommerziellen Kit, der zur Validierung verwendet wurde, ausgerichtet. Andere Kits oder selbst hergestellte Reagenzien können andere Volumina und Inkubationszeiten benötigen.

A.6.5.2 Zu jeder Probe des wieder gelösten Proteins, einschließlich der Leerwerte, im Mikroröhrchen werden 0,125 ml Reagens A (A.3.3.1) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wird jeweils 1 ml Reagens B (A.3.3.2) dazugegeben, die Proben werden geschlossen, mit dem Vortex-Mischer gemischt und bis zur vollständigen Farbentwicklung 30 min inkubiert. Wenn zu diesem Zeitpunkt noch Präzipitate vorhanden sind, sollte die Probe vor der Messung zentrifugiert oder filtriert werden.

A.6.6 Messung

A.6.6.1 Mikrotiterplattenleser

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte (A.4.8) wird das gleiche Volumen der Lösung (A.6.5.2) pipettiert, sodass die Vertiefungen nicht ganz gefüllt sind (z. B. 490 μl in eine 500 μl fassende Vertiefung). Die Absorption wird gegen den Leerwert bei einer festen Wellenlänge zwischen 600 nm und 750 nm gemessen.

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

A.6.6.2 Spektralphotometer

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

ANMERKUNG Es ist wichtig, dass Standardlösungen und Handschuhextrakte zusammen innerhalb 1 h nach der vollständigen Farbentwicklung gemessen werden.

A.7 Auswertung der Ergebnisse

A.7.1 Berechnung

A.7.1.1 Kalibrierungskurve

Die mittlere Absorption der Doppelwerte wird berechnet. Wenn die Doppelwerte mehr als 20 % voneinander abweichen, muss die Messung wiederholt werden. Die Kalibrierungskurve wird dargestellt durch Auftragen der mittleren Absorptionswerte gegen die wahren Konzentrationen der Proteinstandardlösungen wie in Bild A.2. Die Kalibrierungskurve sollte in dem Bereich von 0 μg bis 100 μg Protein je ml der Original-Proteinstandardlösung linear sein.

ANMERKUNG Während des Konzentrierungsprozesses wird ein geringer Teil des Proteins verloren. Es wird aber angenommen, dass der Anteil an verlorenem Protein aus Standard und Probe während des Konzentrierungsprozesses gleich groß ist.

A.7.1.2 Konzentrationen in den Extrakten

Die mittleren Extinktionen der Doppelwerte (A.6.4.1) aller vier Extrakte werden bestimmt. Wenn die einzelnen Werte mehr als 20 % voneinander abweichen, muss die Messung wiederholt werden. Die Konzentration der Extraktionsproben (C) kann direkt in $\mu\text{g/ml}$ von dem linearen Teil der Kurve abgelesen werden.

ANMERKUNG Wenn die Kalibrierungskurve nicht linear ist, können die Werte mit einer quadratischen Regressionsgleichung berechnet werden. Es wird empfohlen, kommerzielle Computerprogramme für das Ausgleichen der Kurve und der unbekanntenen Konzentrationen zu verwenden.

A.7.2 Ergebnisse

Der Proteingehalt der Proben wird wie folgt berechnet:

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

Dabei ist

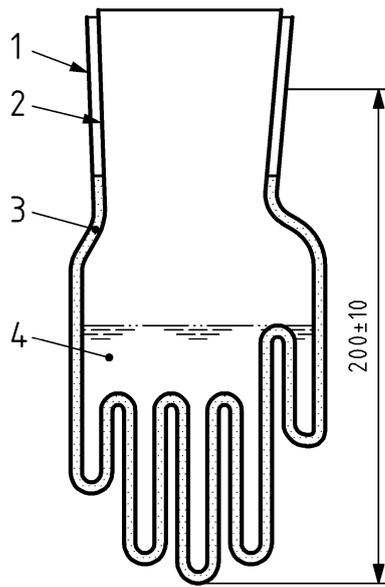
- P das extrahierbare Protein, in $\mu\text{g/g}$ Handschuh;
- V das Volumen des verwendeten Extraktionsmediums, in ml;
- C die Proteinkonzentration des Extrakts, in $\mu\text{g/ml}$;
- F der Verdünnungsfaktor;

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

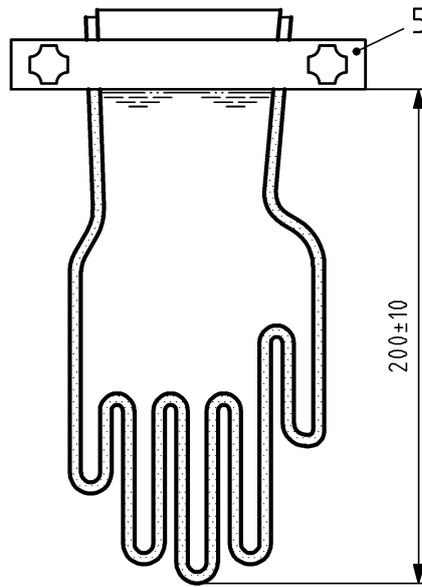
- m das Gewicht des extrahierten Handschuhs, in g (A.6.2.6).

Angegeben wird der mittlere Proteingehalt von vier Handschuhextrakten.

Maße in Millimeter



a)

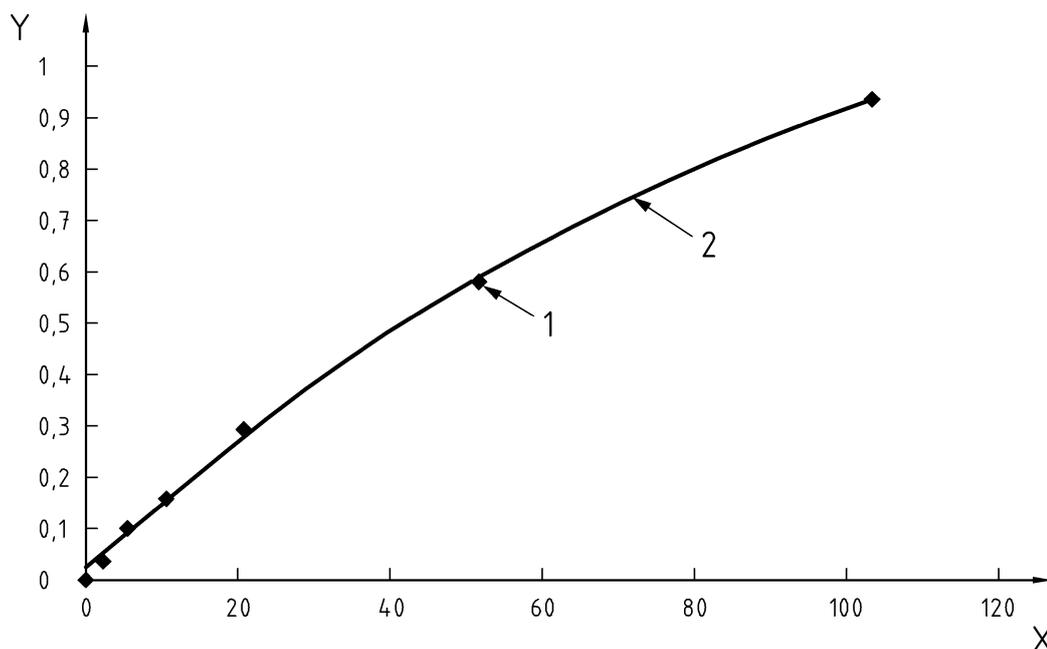


b)

Legende

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

Bild A.1 — Extraktion von Handschuhen (Schnittdarstellung)

**Legende**

Y Extinktion bei 750 nm

X Ovalbuminkonzentrat ($\mu\text{g/ml}$)

1 Extinktion

2 computerberechnetes Ausgleichspolynom

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

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

Bild A.2 — Typische Kalibrierungskurve, in einem Spektralphotometer bei 750 nm mit einem Lichtweg von 1 cm gemessen

A.7.3 Statistische Informationen

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

Tabelle A.1 — Statistische Informationen

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

Die untere Messgrenze wurde, weil sie von der Dicke (Gewicht) des Handschuhs abhängig ist, auf 10 µg/g festgelegt. Sie liegt zwischen 1 µg/g und 5 µg/g.

A.8 Literatur

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

Anhang B (informativ)

Immunologische Methoden für die Messungen von Naturkautschuklatex-Allergenen

B.1 Einleitung

Allergische Reaktionen vom Soforttyp auf Proteine aus Naturkautschuklatex (NRL, von **N**atural **R**ubber **L**atex) sind als wichtiges medizinisches und arbeitsmedizinisches Problem bekannt. Als Hauptquelle für die Sensibilisierung wurden Proteine und Peptide identifiziert, die aus NRL-Handschuhen eluieren [1].

Obwohl der Gehalt an extrahierbarem Gesamtprotein üblicherweise ausreichend gut mit dem Allergengehalt von NRL-Handschuhen, gemessen mit dem Haut-Pricktest oder mit Methoden, die auf humanem IgE basieren, korreliert [2], [3], [4], [5], werden mit Methoden zur Gesamtproteinmessung auch nicht allergene Proteine mitgemessen, die wahrscheinlich für Latexallergien nicht relevant sind. Deshalb stieg der Bedarf für Methoden, die in der Lage sind, spezifisch und genau die Allergene in NRL-Produkten zu messen. Man geht davon aus, dass allergenspezifische Untersuchungsmethoden zu genaueren und aussagekräftigeren Informationen führen, sowohl für regulatorische Zwecke als auch für das Monitoring im Herstellungsprozess. Die Verfügbarkeit von spezifischen Methoden ist noch sehr beschränkt. Das immer noch unvollständige Wissen über die Signifikanz des großen Spektrums an Naturkautschuk-Allergenen machte es zudem schwierig zu entscheiden, welche der vielen Allergene im Naturkautschuklatex-Ausgangsmaterial gemessen werden sollen.

Semiquantitative Methoden, wie RAST-Inhibition und IgE-ELISA-Inhibition, unter Verwendung von humanen IgE-Antikörpern, sind seit einigen Jahren in Forschungslaboratorien verfügbar. Diese Methoden haben aber den Nachteil, dass sie schwierig zu standardisieren und sie von nur limitiert verfügbaren humanen Seren mit klinisch relevanten latexspezifischen IgE-Antikörpern abhängig sind. Außerdem muss man feststellen, dass die verwendeten Standards nicht den Handschuhproteinen entsprechen. Das Prinzip, dass ein idealer Test für die Bestimmung des allergenen Potenzials von Naturkautschuklatex-Produkten auf der Quantifizierung von spezifischen Allergenen beruhen sollte, wurde vor kurzem in die laufende Standardisierungsarbeit sowohl in Europa [6], [7] als auch in den USA [8], [31] aufgenommen.

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

B.2 Naturkautschuklatex-Allergene in Gummiprodukten

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

Ein optimaler Test sollte so ausgelegt sein, dass alle Allergene, die in den Gummiprodukten vorkommen könnten, exakt gemessen werden. Dies kann Epitope betreffen, die in den natürlichen Proteinen vorkommen, aber auch neue Epitope, die durch die harschen Bedingungen des Herstellungsprozesses entstehen. Bis jetzt konnte nur eine begrenzte Anzahl von Allergenen in NRL-Produkten nachgewiesen werden. Die gegenwärtige Literatur unterstützt die Aussage, dass zumindest Hev b1, Hev b3, Hev b5 und Hev b6.02 in den Endprodukten vorkommen können, ebenso wie Fragmente oder Polymere dieser Proteine, die IgE-bindende Epitope tragen [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Ob andere Allergene wie Hev b2, Hev b7 oder Hev b13 [19] oder Hev b14 [32] sich als wichtige gummiproduktsspezifische Allergene erweisen, muss noch gesichert werden.

B.3 Methoden zur Messung von Naturkautschuklatex-Allergenen

B.3.1 Qualitative Methoden

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

B.3.2 Semiquantitative Methoden

B.3.2.1 Haut-Pricktestung an Freiwilligen mit bekannter Latexallergie

Die Allergenität von NRL-Extrakten kann semiquantitativ durch Haut-Pricktestungen einer statistisch relevanten Anzahl von Patienten mit bekannter Latexallergie bestimmt werden. Das Ausmaß der Reaktion ist abhängig von und proportional zu der Menge der Allergene, gegen die der Patient IgE-Antikörper besitzt [2]. Aus biologischer Sicht wäre der Haut-Pricktest eine ideale Methode zur Bestimmung der klinisch relevanten Allergenität, aber aus ethischen Gründen kann sie nicht routinemäßig zum Monitoring des allergenen Gehalts in NRL-Handschuhen angewendet werden.

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

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

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

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

Die kritischen Reagenzien sind die immobilisierten Antigene, der Humanserumpool und das Standardallergen.

In dem selbst zusammengestellten Assay, der in Referenz 4 beschrieben wird, wurde ammoniakalische Latexmilch (NRL) zum Beschichten und als Standardallergen verwendet. Die Menge von 10 mg Protein je ml Standard wurde als 100 000 „willkürliche Einheiten“ definiert. Serielle Verdünnungen von Standard-NRL-Lösungen und von Handschuhextrakten werden mit einem optimal verdünnten IgE-Serumpool aus sorgfältig ausgesuchten hochtitrigen Seren von NRL-allergischen Patienten inkubiert [4].

B.3.3 Spezifische quantitative Methoden

B.3.3.1 Capture Enzyme Immunoassays (EIA) zur Quantifizierung von NRL-Allergenen

B.3.3.2 Hintergrund

Anerkanntermaßen sollte eine optimale Bestimmungsmethode nur solche NRL-Allergene messen, die in den Endprodukten nachgewiesen wurden. Vier NRL-Allergene (Hev b1, Hev b3, Hev b5 und Hev b6.02) konnten bisher eindeutig in Extrakten von NRL-Handschuhen nachgewiesen werden [13], [15], [16], [17], [24]. Die beiden wichtigsten Allergene bei Erwachsenen sind Hev b5 und Hev b6.02 (Hevein) [15], [17], [25]. Hev b1 und Hev b3 sind wichtige Allergene bei Kindern mit Spina bifida [26], [27]. Allergenspezifische Capture Enzyme Immunoassays (EIA) zur Messung dieser vier NRL-Allergene wurden kürzlich entwickelt. Seit Dezember 2001 sind Kits zur Messung dieser Allergene kommerziell erhältlich. Reagenzien und Geräte können auch separat gekauft werden.

B.3.3.3 Beschreibung der Capture-EIA-Methoden⁴⁾

Die Capture-EIA verwenden spezifische monoklonale Antikörper und gereinigte Allergene oder Proteine aus rekombinanten DNA-Technologien als Standards. In jedem einzelnen Test werden Mikrotiterplatten mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper, der das entsprechende Allergen aus der Probe bindet, beschichtet. Nach Inkubation wird das ungebundene Material durch Waschen entfernt. In einem zweiten Inkubationsschritt binden sich enzymmarkierte (üblicherweise Meerrettichperoxidase) allergenspezifische monoklonale Antikörper an die Allergenmoleküle, die auf der Mikrotiterplatte in der ersten Inkubation gebunden wurde. Nach dem Waschen wird das Substrat für das Enzym dazugegeben. Nach dem Anhalten der Reaktion wird die Extinktion bei einer passenden Wellenlänge gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Allergenkonzentration in der Probe.

B.3.3.4 Leistungsvergleich zwischen der Capture-EIA-Methode und den IgE-abhängigen Allergenassays

Spezifische Allergentests sind inzwischen in einigen Studienreihen verwendet worden, um die Allergenität von medizinischen Handschuhen zu messen. Das allergene Potenzial eines Extrakts zeigt sich am besten in seiner Reaktivität auf der Haut von NRL-allergischen Patienten. In einer Studie mit 22 NRL-Handschuhen wurde eine hoch signifikante Korrelation festgestellt, wenn die Summe dieser vier Allergene (gemessen mit dem kommerziellen Capture-EIA-Kit) verglichen wurde mit den Ergebnissen von Inhibitionsassays auf der Basis von humanem IgE [10]. Die höchste Korrelation wurde zwischen der Summe der vier Allergene in den Handschuhen und dem Haut-Pricktest an 20 NRL-allergischen Freiwilligen ($r = 0,95$) gefunden, gefolgt von der Summe und den Ergebnissen des ELISA-Inhibitionstests ($r = 0,90$). Die Korrelation zum Gesamtprotein, das mit der modifizierten Lowry-Methode gemessen wurde, war sehr gering ($r = -0,11$). In einer anderen Reihe mit 58 NRL-Handschuhen aus derselben Publikation [10] war die Korrelation zwischen der Summe der vier Allergene und der totalen Allergenaktivität gemessen mit IgE-ELISA-Inhibition 0,84. Die Ergebnisse einer kürzlich durchgeführten internationalen Multicenterstudie [28], die von der FDA organisiert wurde und in sieben Laboratorien durchgeführt wurde, und in der die Allergene von 30 Handschuhen gemessen wurden, zeigte, dass die Summe der vier Allergene, die mit den monoklonalen EIA gemessen wurden, die höchste Korrelation ($r^2 = 0,91 - 0,95$) mit der RAST/ELISA-Inhibitions-Methode auf der Basis humaner IgE zeigten. Es sind zwar noch ausgedehnte Studien mit einer großen Anzahl von Handschuhen notwendig, um die Anwendbarkeit der allergenspezifischen EIA zu sichern, aber es scheint sich zu bewahrheiten, dass die Summe der vier Allergene den totalen Allergehalt in Handschuhextrakten in einer biologisch relevanten Weise reflektieren. Es wird erwartet, dass in zurzeit laufenden Studien nachgewiesen werden kann, ob weitere Allergene gebraucht werden und ob sie einen Effekt auf die Ergebnisse der Messungen haben.

4) Nach Informationen des Anbieters des kommerziell erhältlichen Kits (FITkit® Insert leaflets, www.quattromed.com) liegt die Grenze der Nachweisbarkeit für die vier Allergene zwischen 0,1 µg/l (Hev b6.02) und 2,3 µg/l (Hev b3). Als Variationskoeffizient wurden für die Wiederholpräzision 2,8 % bis 5,8 % und für die Vergleichpräzision 2,6 % bis 7,6 % bestimmt. Diese Information dient als Hilfestellung für den Anwender dieser Europäischen Norm und ist nicht als Empfehlung des CEN für das benannte Produkt anzusehen.

Eine weitere Untersuchung von 208 Handschuhen [30] unter Verwendung des kommerziellen Immunoassays (FitKit, Icosagen AS, Tartu, Estland), dass die Standardkriterien nach ASTM D7427-08 erfüllt, zeigte starke Korrelationen zwischen der Summe von vier klinisch relevanten Allergenen und Haut-Pricktest-validierten Immunoassays, die auf humanem IgE basieren [4]. Vorerst sind noch umfangreichere Untersuchungen mit einer größeren Menge Handschuhe notwendig, um die Anwendbarkeit des allergenspezifischen EIA-Prinzips noch besser sicherzustellen. Aber es ist bereits erkennbar, dass die Summe der vier Allergene den totalen Allergengehalt in Handschuhextrakten in einer biologisch relevanten Weise abbildet, obwohl keine Sicherheitsangaben vorgelegt werden können. Weitere zurzeit laufende Studien sind nötig, um nachzuweisen, ob weitere Allergene gebraucht werden und ob sie einen Effekt auf die Ergebnisse der Messungen haben.

B.4 Zusammenfassende Bemerkungen

Das Messen des gesamten extrahierbaren Proteins wird nicht als ideale Methode zur Kontrolle des NRL-Allergengehalts in medizinischen Handschuhen angesehen. Methoden zur Messung der Allergene auf der Basis humaner IgE waren jedoch zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Norm nicht validiert, nicht standardisiert und scheitern daran, dass die notwendigen Reagenzien nur in geringer Menge zur Verfügung stehen. Deshalb bleibt die im normativen Teil des Standards beschriebene Methode bestehen. Capture-EIA-Methoden für die Quantifizierung von NRL-Allergenen haben einige der Einschränkungen früherer Methoden überwunden durch das Verwenden charakterisierter, hochreiner Allergene und spezifischer monoklonaler Antikörper gegen NRL-Allergene, von denen bekannt ist, dass sie in NRL-Produkten vorhanden sind. Diese Assays sind hochspezifisch, unabhängig von der Gegenwart anderer Proteine und chemischer Substanzen aus dem Herstellungsprozess von NRL-Produkten, und besitzen eine hohe Sensitivität. Die Tests sind technisch relativ einfach durchzuführen, und die Ergebnisse können in kurzer Zeit erhalten werden (< 2 h). Nachteile sind die zurzeit noch hohen Kosten und die Tatsache, dass es bis heute noch nicht sicher ist, welche der bekannten NRL-Allergene benötigt werden, um Empfehlungen und Sicherheitsgrenzen festzulegen. Außerdem könnte eine große Menge von Antigenen notwendig sein, um alle relevanten Allergene zu erfassen. Im Augenblick sind Tests und/oder Reagenzien für das Messen von 4 unterschiedlichen NRL-Allergenen mit einem Capture-EIA kommerziell erhältlich. Sollten weitere Allergene nachweislich in signifikanten Mengen in Gummiprodukten auftreten, könnten in dem vorhandenen Rahmen neue Reagenzien und Kits entwickelt werden.

Ein Ringversuch zur Bewertung von drei Testmethoden zur Quantifizierung von NRL-Proteinen und -Allergenen in medizinischen Handschuhen wurde vom CEN/TC 205/WG 3 im Jahr 2002 ausgeführt. Die drei Testmethoden waren:

- Messung der spezifischen Allergene (siehe Fußnote 4 in B.3.3.3);
- ASTM D 6499 (Antigene Proteine) [29];
- Aminosäureanalyse (Gesamtprotein).

Das Experiment lieferte keine ausreichenden Ergebnisse, um eine Aufnahme der drei oben genannten Methoden als normative Verfahren in diese Norm zu rechtfertigen.

Ausführliche Studien mit einer repräsentativen Auswahl von derzeit auf dem europäischen Markt erhältlichen Handschuhen und Referenzproben mit genau quantifizierter Konzentration von wichtigen Allergenen sind notwendig, um die Leistungsfähigkeit und den Nutzen der neuen allergenspezifischen Essays zu validieren.

B.5 Literatur

- [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 H. Y., Arif S. A., Raulf-Heimsoth M., Loke Y. H., Sander I., Sulong S. H., Lau C. H., Hamilton R. G. 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

Anhang C (informative)

Aminosäureanalyse (AAA) mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

C.1 Hintergrund

Die Bestimmung von Proteinen beruht meistens auf Farbreaktionen mit bestimmten Strukturelementen, die in unterschiedlichen Proteinen nicht gleichmäßig verteilt sind [1], [2], [3], [4], [5]. Deshalb unterscheiden sich die Ansprechfaktoren beträchtlich von Protein zu Protein [2], [4]. Außerdem gibt es eine Reihe von Substanzen, die kolorimetrische Methoden stören, sei es durch unspezifische Reaktionen mit dem Farbreagens oder durch eine Inhibition der Farbbildung.

Durch die Aminosäureanalyse werden diese Probleme vermieden. Dies wurde bestätigt durch die Ergebnisse der Studie „Determination of allergological relevant compounds in disposable gloves — Correlation of chemical, allergological and immunological data“ im Programm „Messen und Prüfen“ der Europäischen Kommission (MATI-CT 940060) [8]. In dieser Studie wurde die beste Korrelation zwischen den klinischen Daten (Haut-Pricktestung) und den chemischen Analyseergebnissen gefunden, wenn die Proteinkonzentration über die Aminosäuremessung bestimmt wurde [6].

Trotzdem sollte die modifizierte Lowry-Methode als Standardmethode zur Bestimmung der Proteine in Handschuhen aus Naturkautschuklatex verwendet werden, da die Aminosäureanalyse zu wenig verbreitet und zu aufwendig für eine Standardmethode ist. Die Aminosäuremethode darf jedoch verwendet werden, um zweifelhafte Resultate, die mit der modifizierten Lowry-Methode erzielt wurden, zu überprüfen. Sie sollte nicht zur Proteindeklaration verwendet werden, sondern soll den Herstellern helfen, Substanzen zu vermeiden, die zu einer falschen Proteinbestimmung mit der Standardmethode führen.

C.2 Kurzbeschreibung der Proteinbestimmung mittels HPLC

Zunächst werden die Proteine mit 6 M Chlorwasserstoff hydrolysiert. Die resultierenden freien Aminosäuren werden dann mithilfe der HPLC [7] getrennt und nachgewiesen. Deren Quantifizierung über einen internen Standard (Norvalin) und anschließende Summierung der einzelnen Aminosäuren ergibt den Gesamtproteingehalt. Aufgrund dieser Vorgehensweise ist die Methode unabhängig von allen strukturellen Eigenschaften des ursprünglichen polymeren Moleküls. Bis jetzt wurden keine störenden Substanzen gefunden, aber die Anwesenheit von TES-Salzen scheint einen Aminosäureverlust (z. B. durch Wandeffekte) zu verhindern.

C.3 Material

C.3.1 DL-Norvalin.

C.3.2 HCl 30 % Suprapur.

C.3.3 Aminosäurestandard (enthält: L-Alanin, Ammoniumchlorid, L-Arginin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin je 0,5 mM und L-Cystin 0,25 mM).

C.3.4 Methanol zur Proteinsequenzanalyse.

C.3.5 o-Phthaldialdehyd (OPA).

C.3.6 Borsäure.

EN 455-3:2015 (D)

- C.3.7 Ethylendiaminetetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA).
- C.3.8 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4).
- C.3.9 Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4).
- C.3.10 Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4).
- C.3.11 3-Mercaptopropionsäure.
- C.3.12 Trennsäule: Hypersil ODS, 3 μm , 150 mm x 4,6 mm, vorab geprüft für die Anwendung mit OPA.
- C.3.13 Vorsäule: Hypersil ODS, 3 μm , 5 mm x 4,6 mm.
- C.3.14 Wasser mindestens Milli-Q oder äquivalente Qualität.
- C.3.15 Filtereinheit, 0,2 μm Porengröße.
- C.3.16 Tetrahydrofuran (THF), gradientengeeignet für Flüssigkeitschromatographie.
- C.3.17 Acetonitril, gradientengeeignet für Flüssigkeitschromatographie.
- C.3.18 Verschließbare 2-ml-Polypropylen-Schraubgefäße.
- C.3.19 Natriumkarbonat.
- C.3.20 Natriumhydroxyd oder Kaliumhydroxidplättchen.

C.4 Puffer und Lösungen

ANMERKUNG Fließmittel 1 und Fließmittel 2 wurden für eine OPA-1-Säule von Grom, Herrenberg, Deutschland hergestellt. Wenn andere Säulen verwendet werden, können Änderungen notwendig sein.

C.4.1 Norvalin-100

11,7 mg Norvalin (C.3.1) in 1 ml Wasser (C.3.14) = 100 mM Norvalin.

C.4.2 Norvalin-1

100 μl Norvalin-100 (C.4.1) in 10 ml Wasser (C.3.14) = 1 mM Norvalin, Lagerung unter 8 °C für nicht länger als vier Wochen.

C.4.3 o-Phthaldialdehyd (OPA)

50 mg o-Phthaldialdehyd (C.3.5), 4,5 ml Methanol (C.3.4), 50 μl Mercap-topropionsäure (C.3.11).

C.4.4 Boratpuffer

400 mM Natriumtetraborat, 5 mM EDTA, pH 10,4.

1,24 g Borsäure und 85 mg EDTA in 30 ml Wasser (C.3.14) mit 2 M NaOH auf pH 10,4 einstellen, mit Wasser (C.3.14) auf 50 ml auffüllen. Anschließend durch eine 0,2- μm -Filtereinheit (C.3.15) filtrieren. Die Lösung ist bei Raumtemperatur für höchstens zwei Wochen aufzubewahren. Kühlung muss vermieden werden, da dadurch Präzipitate entstehen.

C.4.5 Stopp-Lösung

1,36 g KH_2PO_4 (C.3.8) in Wasser (C.3.14), anschließend durch eine 0,2- μm -Filtereinheit (C.3.15) filtrieren; die Lösung ist höchstens 4 Wochen bei Raumtemperatur haltbar.

C.4.6 Phosphatpuffer

7,15 g Na_2HPO_4 (C.3.8) und 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (C.3.9) in 1,5 l Wasser (C.3.14).

C.4.7 Fließmittel 1

20 ml Tetrahydrofuran (C.3.16) mit 1 l Phosphatpuffer (C.4.6) mischen.

C.4.8 Fließmittel 2

250 ml Acetonitril (C.3.17), 100 ml Tetrahydrofuran (C.3.16) mit Phosphatpuffer (C.4.6) auf 1 l auffüllen.

C.4.9 Natriumkarbonatlösung (0,1 M)

2,12 g Natriumkarbonat (C.3.19) in 10 ml Wasser (C.3.14) lösen.

C.5 Hydrolyse**C.5.1 Proben**

400 μl Extract (in TES-Puffer) + 10 μl Norvalin-1 (C.4.2) + 700 μl HCl (C.3.3).

C.5.2 Standards

380 μl Wasser (C.3.14) + 20 μl Aminosäurestandard (C.3.3) + 10 μl Norvalin-1 (C.4.2) + 700 μl HCl (C.3.2).

C.5.3 Inkubation (Hydrolyse)

Proben und Standards werden in verschlossenen PP-Schraubgefäßen (C.3.18) gleichzeitig für 48 h bei 100°C inkubiert. Die Gefäße sollten dabei in verschraubbare Racks eingeklemmt werden, damit die Deckel nicht platzen. Es ist sehr wichtig, dass Proben und Standards gleichzeitig hydrolysiert werden, um exakt gleiche zeitliche und Temperaturbedingungen sicherzustellen.

Nach dem Abkühlen werden die Proben und Standards in einer Vakuum-Konzentrator-Zentrifuge oder in einem Exsikkator über NaOH oder KOH im Vakuum getrocknet.

Die HCl muss vollständig entfernt werden, da sonst die Kapazität des Boratpuffers zur Derivatisierung nicht ausreichen könnte.

C.5.4 Freie Aminosäuren

Von jedem Extrakt und vom Standard werden nicht-hydrolysierte Proben vorbereitet

- 400 μl Extrakt + 10 μl Norvalin-1 (C.4.2) ;
- 380 μl Wasser (C.3.14) + 20 μl Aminosäurestandard (C.3.3) + 10 μl Norvalin-1 (C.4.2).

C.6 Analyse (HPLC)**C.6.1 Probenvorbereitung**

- zu jeder hydrolysierten getrockneten Probe werden 20 μl Natriumkarbonatlösung (C.4.9) pipettiert;
- gut mischen oder im Ultraschallwasserbad beschallen;
- 15 min bei Raumtemperatur inkubieren und noch einmal gut mischen, um CO_2 zu entfernen;
- 180 μl Boratpuffer (C.4.4) zugeben.

C.6.2 Derivatisierung

Die Derivatisierung ist von Zeit und Temperatur abhängig und sollte mit einem automatischen Probengeber zwischen 20 °C und 25 °C durchgeführt werden.

25 µl Boratpuffer (C.4.4), 12 µl OPA (C.4.3) und 8 µl der Probe werden gemischt.

Nach 2,5 min wird die Reaktion durch Hinzufügen von 25 µl Stopplösung (C.4.5) beendet.

C.6.3 HPLC

Die HPLC-Analyse kann mit jeder HPLC-Anlage mit Gradientensystem und Fluoreszenzdetektor durchgeführt werden.

Ein Beispiel für einen Gradientenverlauf ist hier dargestellt. Die genauen Bedingungen müssen den jeweiligen Systemen und verwendeten Säulen angepasst werden.

BEISPIEL

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

C.6.4 Berechnung

Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind mithilfe eines internen Standards zu bestimmen, freie Aminosäuren werden abgezogen. Die Summe der Aminosäuren entspricht dem Gesamtproteingehalt.

C.7 Beispiele

C.7.1 Standard

Ein typisches Chromatogramm einer hydrolysierten Standardlösung mit 19 Aminosäuren in äquimolaren Konzentrationen ist in Bild C.1 a) dargestellt. Die erwarteten Aminosäuren sind in Tabelle C.1 aufgelistet. Asparagin und Glutamin, die bei der Hydrolyse komplett zu Asparaginsäure und Glutaminsäure umgewandelt werden, waren in der Standardlösung nicht enthalten. Norvalin, das nicht auf natürliche Weise vorkommt, diente als interner Standard. Tryptophan und Cystin waren im unhydrolysierten Standard vorhanden, wurden aber bei der HCl-Hydrolyse zerstört. Prolin reagiert nicht mit OPA/MPA, da es keine primäre Aminogruppe besitzt, und war deshalb unter diesen Derivatisierungsbedingungen nicht nachweisbar. Lysin ist oft in zwei Peaks vorhanden, da eine oder beide Aminogruppen mit OPA/MPA reagieren können. Das Verhältnis der beiden Peaks ist von den Reaktionsbedingungen (Temperatur, Alter der OPA-Lösung) abhängig und variiert deshalb von Lauf zu Lauf, beeinflusst aber das Ergebnis nicht, wenn beide Peak-Bereiche berücksichtigt werden.

C.7.2 Handschuhextrakt

Das Chromatogramm eines hydrolysierten Handschuhextrakts (hergestellt nach Anhang A) ist in Bild C.1 b) dargestellt. Die Hydrolyse der Latexproteine zeigte das komplette Spektrum der erwarteten Aminosäuren (Tabelle C.1). Zusätzlich wurden 2 Peaks bei 14,23 min und 24,08 min gefunden, die aus dem TES-Puffer stammen. Diese Peaks wurden vollständig von allen Aminosäuren abgetrennt und beeinflussten die Analyse nicht.

C.8 Vorteile und Nachteile der HPLC-Methode

C.8.1 Vorteile

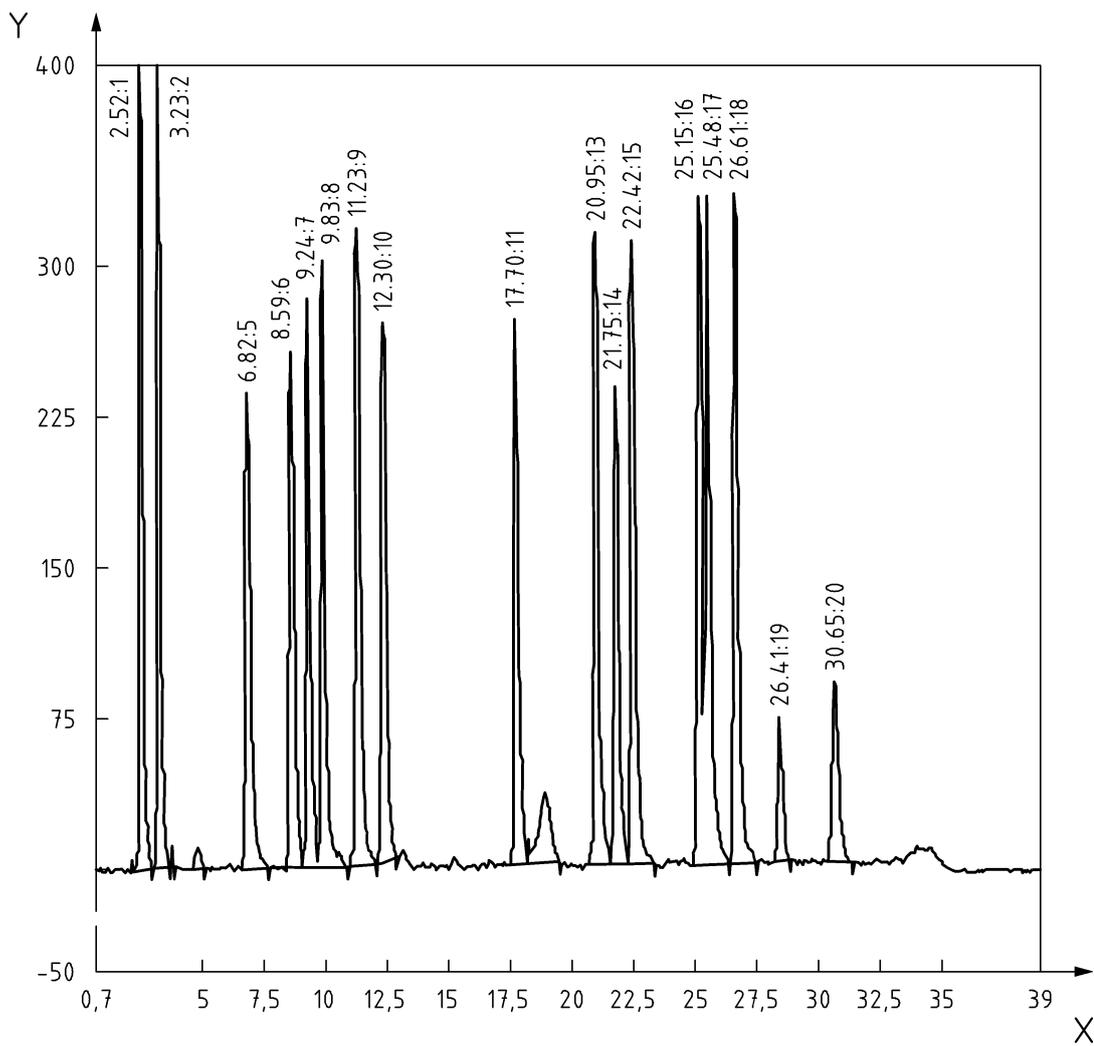
- Sie ist unabhängig von der Polymerstruktur der Proteine.
- Sie zeigt die beste Korrelation zu den klinischen Daten (Pricktest).
- Es sind keine Interferenzen mit anderen Substanzen bekannt.
- Sie ist sensitiver als kolorimetrische Methoden.
- Sie ist hochspezifisch für Proteine.

C.8.2 Nachteile

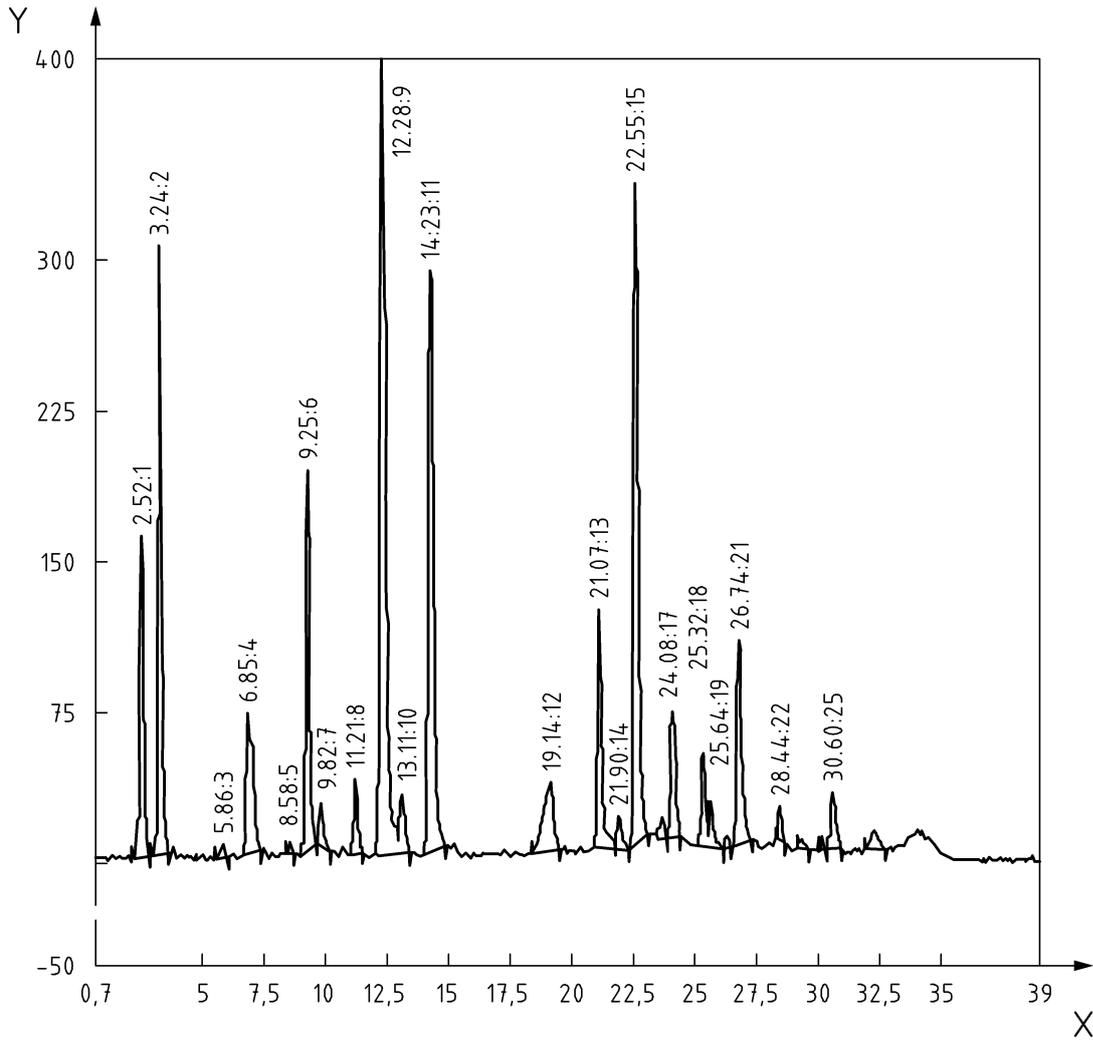
- Sie ist eine unübliche Methode, die nur von wenigen Laboratorien eingesetzt wird.
- Sie ist zeitaufwendig.
- Die sehr komplexe Auswertung der Daten erfordert viel Erfahrung.

Tabelle C.1 — Liste der Aminosäuren, die bei der HPLC-Analyse einer Standardlösung (Bild C.1 a) und eines hydrolysierten Handschuhextrakts (siehe Bild C.1 b)) gefunden wurden

Aminosäure	Retentionszeit min		Kommentar
	Standard	Analyse	
Asparaginsäure (ASP)	2,52	2,52	
Asparagin (ASN)			zu ASP umgesetzt
Glutaminsäure (GLU)	3,23	3,24	
Glutamin (GLN)			zu GLU umgesetzt
Serin (SER)	6,83	6,85	
Histidin (HIS)	8,60		
Glycin (GLY)	9,25	9,25	
Threonin (THR)	9,84	9,82	
Arginin (ARG)	11,24	11,21	
Alanin (ALA)	12,30	12,29	
		14,23	TES (Extraktionspuffer)
Tyrosin (TYR)	17,7		
Valin (VAL)	20,95	21,07	
Methionin (MET)	21,75	21,90	
Norvalin (NORVAL)	22,42	22,55	interner Standard
		24,08	TES (Extraktionspuffer)
iso-Leucin (ILE)	25,15	25,32	
Phenylalanin (PHE)	25,48	25,64	
Leucin (LEU)	26,61	26,74	
Lysin (LYS)	28,41 30,65	28,44 30,60	
Tryptophan (TRY)			bei der Hydrolyse zerstört
Cystin, Cystein (CYS)			bei der Hydrolyse zerstört
Prolin (PRO)			nicht nachweisbar



a) Aminosäurestandard



b) Handschuhextrakt

Bild C.1 — Typische Chromatogramme eines Aminosäurestandards (A) und der Analyse eines Handschuhextrakts (35 µg Protein)

C.9 Literatur

- [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, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
- [5] Petersen, G. L., Determination of total protein. In *Methods of Ezymology*, Academic Press, Inc., New York 91, 95-118
- [6] Koch, H. U., Regulatory aspects of latex allergy (CEN; extractable protein and allergen assay for latex gloves). *Rev Fr Allergol* 1997: 37 : 1201-1210
- [7] Graser, T. A., Godel, H. G., 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

Anhang ZA (informativ)

Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG Medizinprodukte

Diese Europäische Norm wurde im Rahmen eines Mandates, das dem CEN von der Europäischen Kommission und der Europäischen Freihandelszone erteilt wurde, erarbeitet, um ein Mittel zur Erfüllung der grundlegenden Anforderungen der Richtlinie nach der neuen Konzeption 93/42/EWG Medizinprodukte bereitzustellen.

Sobald diese Norm im Amtsblatt der Europäischen Union im Rahmen der betreffenden Richtlinie in Bezug genommen und in mindestens einem der Mitgliedstaaten als nationale Norm umgesetzt worden ist, berechtigt die Übereinstimmung mit den in Tabelle ZA.1 aufgeführten Abschnitten dieser Norm innerhalb der Grenzen des Anwendungsbereichs dieser Norm zu der Annahme, dass eine Übereinstimmung mit den entsprechenden grundlegenden Anforderungen der Richtlinie und der zugehörigen EFTA-Vorschriften gegeben ist.

**Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und
der Richtlinie 93/42/EWG Medizinprodukte**

Abschnitte/Unterabschnitte dieser Europäischen Norm	Grundlegende Anforderungen der Richtlinie 93/42/EWG Medizinprodukte	Erläuterungen/Anmerkungen
4	6, 7.1, 7.2, 7.5	
4.6	2, 13.1, 13.3	

Für Produkte, die gemäß Artikel 1(6) der Richtlinie 93/42/EWG vom Hersteller bestimmungsgemäß sowohl zum Gebrauch als Medizinprodukt als auch als persönliche Schutzausrüstung vorgesehen sind, sind in der nachfolgenden Tabelle ZA.2 die einschlägigen grundlegenden Anforderungen der Richtlinie 89/686/EWG über persönliche Schutzausrüstungen zusammen mit den entsprechenden Abschnitten dieser Europäischen Norm aufgeführt. Tabelle ZA.2 beinhaltet jedoch nicht die Aufnahme in das Amtsblatt der Europäischen Union unter der Richtlinie für persönliche Schutzausrüstungen und berechtigt folglich nicht zu der Annahme der Übereinstimmung mit den Anforderungen der Richtlinie für persönliche Schutzausrüstungen.

**Table ZA.2 — Grundlegende Anforderungen der Richtlinie 89/686/EWG über persönliche
Schutzausrüstung, die in dieser Europäischen Norm behandelt werden**

Abschnitte/Unterabschnitte dieser Europäischen Norm	Grundlegende Anforderungen der Richtlinie 89/686/EWG über persönliche Schutzausrüstung	Erläuterungen/Anmerkungen
4.2	1.2.1.1.	

WARNHINWEIS — Für Produkte, die in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen, können weitere Anforderungen und weitere EU-Richtlinien anwendbar sein.