



LICENZA D'USO

UNI riconosce al Cliente che acquisterà dal webstore UNI una o più norme (d'ora in avanti denominati solo "prodotto") i diritti non esclusivi e non trasferibili di cui al dettaglio seguente, in conseguenza del pagamento degli importi dovuti. Il cliente ha accettato di essere vincolato ai termini fissati in questa licenza circa l'installazione e la realizzazione di copie o qualsiasi altro utilizzo del prodotto. La licenza d'uso non riconosce al cliente la proprietà del prodotto, ma esclusivamente un diritto d'uso secondo i termini fissati in questa licenza. UNI può modificare in qualsiasi momento le condizioni di licenza d'uso.

COPYRIGHT

Il cliente ha riconosciuto che:

- Il titolare del copyright del prodotto è indicato all'interno dello stesso e che tale diritto è tutelato dalle leggi nazionali e dai trattati internazionali sulla tutela del copyright
- tutti i diritti, titoli e interessi nel e sul prodotto sono e saranno del relativo titolare, compresi i diritti di proprietà intellettuale.

UTILIZZO DEL PRODOTTO

Il cliente può installare ed utilizzare esclusivamente per fini interni del proprio personale dipendente una sola copia di questo prodotto, su postazione singola.

Il Cliente accetta ed acconsente che l'acquisto della licenza d'uso di una norma attraverso un Abbonamento che preveda l'applicazione di un prezzo speciale abbia una durata limitata circoscritta al periodo di validità dell'abbonamento a cui appartiene.

Al cliente è consentita la realizzazione di UNA SOLA COPIA del file del prodotto, ai fini di backup. Il testo del prodotto non può essere modificato, tradotto, adattato e ridotto. L'unica versione del testo che fa fede è quella conservata negli archivi UNI. È vietato dare il prodotto in licenza o in affitto, rivenderlo, distribuirlo o cederlo a qualunque titolo in alcuna sua parte, né in originale né in copia.

Il Cliente accetta ed acconsente che tutti i documenti acquisiti attraverso UNISore, siano muniti, su ogni singola pagina, di un apposito watermark. Il watermark non pregiudica in alcun modo la leggibilità del documento, né, a qualsiasi effetto, ne inficia e/o pregiudica la validità e/o ufficialità. Tale misura di protezione è conforme a quanto stabilito dal combinato disposto degli artt. 102-quater e 102-quinques della Legge 22 aprile 1941 n° 633.

Resta impregiudicato per l'UNI il diritto di adottare nuove ed ulteriori misure di protezione a tutela dei propri diritti di proprietà intellettuale.

La rimozione e/o alterazione anche parziale del watermark e di altre misure di protezione in assenza del consenso dell'UNI costituisce reato ai sensi dell'art. 171-ter della Legge 22 aprile 1941 n° 633.

Costituisce altresì reato, ai sensi degli artt. 171 e ss della Legge 22 aprile 1941 n° 633, ogni e qualsiasi duplicazione e diffusione abusiva dei contenuti acquisiti tramite il servizio UNISore e protetti da diritto d'autore, intendendosi con diffusione anche l'immissione degli stessi su rete telematica, con qualsiasi tipo di connessione.

AGGIORNAMENTO DEL PRODOTTO

Questo prodotto scaricato on-line dal webstore UNI è la versione in vigore al momento della vendita. Il prodotto è revisionato, quando necessario, con la pubblicazione di nuove edizioni o di aggiornamenti. UNI non si impegna ad avvisare il cliente della pubblicazione di varianti, errata corrige o nuove edizioni che modificano, aggiornano o superano completamente il prodotto; è importante quindi che il cliente si accerti di essere in possesso dell'ultima edizione e degli eventuali aggiornamenti.

RESPONSABILITA' UNI

Né UNI né un suo dirigente, dipendente o distributore può essere considerato responsabile per ogni eventuale danno che possa derivare, nascere o essere in qualche modo correlato con il possesso o l'uso del prodotto da parte del cliente. Tali responsabilità sono a carico del cliente.

TUTELA LEGALE

Il cliente assicura a UNI la fornitura di tutte le informazioni necessarie affinché sia garantito il pieno rispetto dei termini di questo accordo da parte di terzi. Nel caso in cui l'azione di terzi possa mettere in discussione il rispetto dei termini di questo accordo, il cliente si impegna a collaborare con UNI al fine di garantirne l'osservanza. UNI si riserva di intraprendere qualsiasi azione legale nei confronti del cliente a salvaguardia dei propri diritti in qualsiasi giurisdizione presso la quale vi sia stata una violazione del presente accordo. L'accordo è regolato dalla normativa vigente in Italia e il tribunale competente per qualsiasi controversia relativa all'interpretazione, esecuzione e risoluzione del rapporto è in via esclusiva quello di Milano.

**NORMA
EUROPEA**

**Guanti medicali monouso
Parte 3: Requisiti e prove per la valutazione biologica**

UNI EN 455-3

GIUGNO 2015

Versione italiana
dell'ottobre 2015

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

La norma specifica i requisiti relativi alla valutazione della sicurezza biologica dei guanti medicali monouso. Essa fornisce i requisiti relativi all'etichettatura e la divulgazione delle informazioni relative ai metodi di prova impiegati.

TESTO ITALIANO

La presente norma è la versione ufficiale in lingua italiana della norma europea EN 455-3 (edizione aprile 2015).

La presente norma sostituisce la UNI EN 455-3:2007.

ICS 11.140

PREMESSA NAZIONALE

La presente norma costituisce il recepimento, in lingua italiana, della norma europea EN 455-3 (edizione aprile 2015), che assume così lo status di norma nazionale italiana.

La presente norma è stata elaborata sotto la competenza della Commissione Tecnica UNI

Tecnologie biomediche e diagnostiche

La presente norma è stata ratificata dal Presidente dell'UNI ed è entrata a far parte del corpo normativo nazionale il 18 giugno 2015.

Le norme UNI sono elaborate cercando di tenere conto dei punti di vista di tutte le parti interessate e di conciliare ogni aspetto conflittuale, per rappresentare il reale stato dell'arte della materia ed il necessario grado di consenso.

Chiunque ritenesse, a seguito dell'applicazione di questa norma, di poter fornire suggerimenti per un suo miglioramento o per un suo adeguamento ad uno stato dell'arte in evoluzione è pregato di inviare i propri contributi all'UNI, Ente Nazionale Italiano di Unificazione, che li terrà in considerazione per l'eventuale revisione della norma stessa.

Le norme UNI sono revisionate, quando necessario, con la pubblicazione di nuove edizioni o di aggiornamenti.

È importante pertanto che gli utilizzatori delle stesse si accertino di essere in possesso dell'ultima edizione e degli eventuali aggiornamenti.

Si invitano inoltre gli utilizzatori a verificare l'esistenza di norme UNI corrispondenti alle norme EN o ISO ove citate nei riferimenti normativi.

English version

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

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

This European Standard was approved by CEN on 24 January 2015.

CEN members are bound to comply with the CEN/CENELEC Internal Regulations which stipulate the conditions for giving this European Standard the status of a national standard without any alteration. Up-to-date lists and bibliographical references concerning such national standards may be obtained on application to the CEN-CENELEC Management Centre or to any CEN member.

This European Standard exists in three official versions (English, French, German). A version in any other language made by translation under the responsibility of a CEN member into its own language and notified to the CEN-CENELEC Management Centre has the same status as the official versions.

CEN members are the national standards bodies of Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, Former Yugoslav Republic of Macedonia, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, Turkey and United Kingdom.



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

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

INDICE

	PREMESSA	1
	INTRODUZIONE	2
1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	RIFERIMENTI NORMATIVI	2
3	TERMINI E DEFINIZIONI	3
4	REQUISITI	3
4.1	Generalità.....	3
4.2	Prodotti chimici.....	3
4.3	Endotossine.....	4
4.4	Guanti privi di polveri.....	4
4.5	Proteine, soggette a rilascio.....	4
4.6	Etichettatura.....	4
5	METODI DI PROVA	5
5.1	Endotossine.....	5
5.2	Polvere.....	5
5.3	Proteine, soggette a rilascio.....	5
6	RAPPORTO DI PROVA	5
APPENDICE A (normativa)	METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE ESTRAIBILI IN MEZZO ACQUOSO DAI GUANTI IN GOMMA NATURALE UTILIZZANDO IL METODO DI LOWRY MODIFICATO	6
figura A.1	Estrazione dai guanti (sezione trasversale).....	13
figura A.2	Curva di riferimento tipica misurata in uno spettrofotometro a 750 nm con lunghezza del cammino ottico di 1 cm.....	14
prospetto A.1	Informazioni statistiche.....	15
APPENDICE B (informativa)	METODI IMMUNOLOGICI PER LE MISURAZIONI DEGLI ALLERGENI DEL LATTICE DI GOMMA NATURALE	16
APPENDICE C (informativa)	ANALISI DEGLI AMMINOACIDI (AAA) MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)	22
prospetto C.1	Elenco degli amminoacidi ottenuti con HPLC di una soluzione di riferimento e con l'idrolisi di un estratto di guanto.....	26
figura C.1	Cromatogrammi tipici di una soluzione di riferimento di amminoacidi e di un'analisi di un estratto di guanto (35 µg di proteina).....	27
APPENDICE ZA (informativa)	RAPPORTO FRA LA PRESENTE NORMA EUROPEA E I REQUISITI ESSENZIALI DELLA DIRETTIVA UE 93/42/CEE CONCERNENTE I DISPOSITIVI MEDICI	29
prospetto ZA.1	Corrispondenza tra la presente norma europea e la Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici.....	29
prospetto ZA.2	Requisiti essenziali pertinenti della Direttiva 89/686/CEE Dispositivi di protezione individuali trattati dalla presente norma europea.....	29

PREMESSA

Il presente documento (EN 455-3:2015) è stato elaborato dal Comitato Tecnico CEN/TC 205 "Dispositivi medici non attivi", la cui segreteria è affidata al DIN.

Alla presente norma europea deve essere attribuito lo status di norma nazionale, o mediante pubblicazione di un testo identico o mediante notifica di adozione, al più tardi entro ottobre 2015, e le norme nazionali in contrasto devono essere ritirate al più tardi entro ottobre 2015.

Si richiama l'attenzione alla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di brevetti. Il CEN (e/o il CENELEC) non deve(devono) essere ritenuto(i) responsabile(i) di avere citato tali brevetti.

Il presente documento sostituisce la EN 455-3:2006.

Il presente documento è stato elaborato nell'ambito di un mandato conferito al CEN dalla Commissione Europea e dall'Associazione Europea di Libero Scambio ed è di supporto ai requisiti essenziali della(e) Direttiva(e) dell'UE.

Per quanto riguarda il rapporto con la(e) Direttiva(e) UE, si rimanda all'appendice informativa ZA che costituisce parte integrante del presente documento.

Rispetto alla EN 455-3:2006 sono apportate le seguenti modifiche:

- a) specifica delle parti pertinenti della EN ISO 10993 per la valutazione biologica dei dispositivi medici;
- b) revisione dei riferimenti normativi;
- c) sostituzione della EN 980 con la EN ISO 15223-1;
- d) specifica del punto 4.2 "Prodotti chimici";
- e) il punto 4.4 specificato come "Guanti privi di polveri";
- f) rimozione in tutta la norma del livello "il più basso ragionevolmente praticabile" (As Low As Reasonably practicable - ALARP);
- g) specifica del punto 4.6 "Etichettatura";
- h) rimozione del simbolo per i prodotti che contengono lattice naturale (figura 1);
- i) revisione dei riferimenti dell'appendice B;
- j) introduzione della corrispondenza tra la presente norma europea e la Direttiva 89/686/CEE relativa ai dispositivi di protezione individuale (vedere appendice ZA).

La EN 455 è costituita dalle seguenti parti sotto il titolo generale "Medical gloves for single use":

- Part 1: Requirements and testing for freedom from holes
- Part 2: Requirements and testing for physical properties
- Part 3: Requirements and testing for biological evaluation
- Part 4: Requirements and testing for shelf life determination

In conformità alle Regole Comuni CEN/CENELEC, gli enti nazionali di normazione dei seguenti Paesi sono tenuti a recepire la presente norma europea: Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Croazia, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Norvegia, Paesi Bassi, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica Ex Jugoslava di Macedonia, Romania, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia e Ungheria.

INTRODUZIONE

Da diversi anni sono state riferite reazioni indesiderate alle proteine presenti nei prodotti in lattice con tassi di prevalenza variabili. Nella letteratura scientifica sono inoltre descritte reazioni indesiderate dovute ai prodotti chimici, ai lubrificanti, ai residui di sterilizzazione, ai pirogeni o ad altri residui. Le reazioni indesiderate più frequentemente riportate riguardano i guanti realizzati in lattice di gomma naturale, tuttavia è possibile osservare anche alcune reazioni attribuibili a guanti realizzati in altri polimeri.

La EN ISO 10993 specifica i requisiti e i metodi di prova per la valutazione biologica dei dispositivi medici. Essa non tratta comunque in modo specifico le reazioni indesiderate che possono essere provocate dall'utilizzo dei guanti medicali (per esempio le allergie di tipo immediato). Tali reazioni indesiderate si manifestano nei confronti di allergeni specifici che possono essere presenti nei guanti. Alla reazione contribuiscono diversi fattori:

- a) la durata e la frequenza del contatto cutaneo con i guanti;
- b) l'esposizione agli allergeni attraverso il contatto diretto con le mucose e la cute (specialmente se non intatta) nonché attraverso l'inalazione di particelle;
- c) la natura occlusiva dell'interazione tra il guanto e la cute durante l'utilizzo dei guanti.

La presente parte della EN 455 fornisce i metodi di prova che permettono di valutare la sicurezza biologica dei guanti medicali come parte del processo di analisi del rischio, in conformità alla EN ISO 10993.

1

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente parte della EN 455 specifica i requisiti relativi alla valutazione della sicurezza biologica dei guanti medicali monouso. Essa fornisce i requisiti relativi all'etichettatura e alla divulgazione delle informazioni relative ai metodi di prova impiegati.

2

RIFERIMENTI NORMATIVI

I seguenti documenti, in tutto o in parte, sono richiamati con carattere normativo nel presente documento e sono indispensabili per la sua applicazione. Per quanto riguarda i riferimenti datati, si applica esclusivamente l'edizione citata. Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione del documento a cui si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

EN 1041:2008+A1:2013	Information supplied by the manufacturer of medical devices
EN ISO 10993-1:2009	Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (ISO 10993-1:2009)
EN ISO 10993-5:2009	Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009)
EN ISO 10993-10:2013	Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (ISO 10993-10:2010)
EN ISO 14971:2012	Medical devices - Application of risk management to medical devices (ISO 14971:2007, Corrected version 2007-10-01)
EN ISO 15223-1:2012	Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied - Part 1: General requirements (ISO 15223-1:2012)
EN ISO 21171:2006	Medical gloves - Determination of removable surface powder (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 TERMINI E DEFINIZIONI

Ai fini del presente documento, si applicano i termini e le definizioni seguenti.

3.1 prodotti chimici: Sostanze aggiunte e costituite in una qualsiasi fase del processo di fabbricazione, oppure durante la conservazione, che possono essere presenti nel prodotto finale.

Nota 1 Tali sostanze possono comprendere i lubrificanti, i rivestimenti chimici e gli agenti sterilizzanti. Durante il trattamento dei guanti si utilizzano diversi ingredienti chimici, alcuni dei quali sono noti per causare reazioni allergiche di tipo IV. Il tipo e la quantità di prodotti chimici residui aggiunti e presenti alla fine sono variabili.

3.2 endotossine: Lipopolisaccaridi che originano dalla membrana cellulare esterna dei batteri Gram-negativi.

Nota 1 Le endotossine sono un tipo di pirogeni. Tra le fonti di provenienza delle endotossine possono essere incluse la contaminazione batterica delle materie prime, specialmente l'acqua impiegata durante il processo di fabbricazione e la manipolazione manuale dei guanti.

3.3 polvere: Tutti i materiali non solubili in acqua sulla superficie di un guanto che sono rimossi mediante lavaggio alle condizioni di prova.

[Fonte: EN ISO 21171:2006, punto 3.1]

Nota 1 Ciò include sia la polvere aggiunta deliberatamente sia altri supporti al trattamento o materiali presenti accidentalmente che possono essere prontamente staccati dalla superficie del guanto. Ai fini della presente norma europea qualsiasi guanto contenente una quantità minore o uguale a 2 mg di polvere è un guanto privo di polveri e con una quantità maggiore di 2 mg è un guanto trattato con polvere (per i requisiti vedere punto 4.4).

3.4 limite di processo: Quantità massima che si prevede di riscontrare in un processo di fabbricazione validato.

3.5 proteine, allergeniche: Proteine in grado di causare reazione allergica di tipo I.

3.6 proteine, soggette a rilascio: Proteine e pepidi estraibili in mezzo acquoso dal prodotto finale.

3.7 pirogeni: Sostanze capaci di provocare febbre nel coniglio, la quale può essere correlata a febbre ed altre reazioni indesiderate negli esseri umani.

4 REQUISITI

4.1 Generalità

La EN ISO 10993-1:2009 descrive i principi generali che governano la valutazione biologica dei dispositivi medici e deve essere utilizzata per selezionare le prove appropriate descritte nelle altre parti della serie. Sulla base della EN ISO 10993-1:2009 i guanti medicali sono classificati come dispositivi superficiali con periodi di contatto limitato e richiedono conformità alle EN ISO 10993-5:2009 ed EN ISO 10993-10:2013.

La classificazione di guanti medicali secondo la EN ISO 10993-1:2009 non dovrebbe essere confusa con le definizioni fornite nelle Direttive relative ai dispositivi medici per questi prodotti. Deve essere istituito un processo di gestione del rischio in conformità alla EN ISO 14971:2012.

4.2 Prodotti chimici

I guanti non devono essere trattati con polvere di talco (silicato di magnesio).

Il fabbricante deve rendere noto su richiesta un elenco dei componenti chimici, sia aggiunti durante la fabbricazione, sia notoriamente presenti nel prodotto, quali acceleranti, antiossidanti e biocidi che, sulla base dei dati attualmente disponibili, siano noti per la loro capacità di provocare effetti indesiderati sulla salute.

Su richiesta il fabbricante deve fornire evidenza delle azioni intraprese per ridurre il rischio per l'utilizzatore finale di esposizione a prodotti chimici utilizzati nel processo di fabbricazione che, sulla base dei dati attualmente disponibili, siano noti per la loro capacità di provocare effetti indesiderati sulla salute.

I fabbricanti possono dichiarare l'assenza di una sostanza soltanto se tale sostanza non è utilizzata in alcuna parte del processo di fabbricazione. Nessun composto deve essere utilizzato nella fabbricazione del prodotto che sia notoriamente in grado di formare una sostanza soggetta a tale dichiarazione.

4.3 Endotossine

Se i guanti sono contrassegnati con la dicitura "a basso contenuto di endotossine", il fabbricante deve sottoporre a controllo sistematico la contaminazione da endotossine dei guanti sterili utilizzando il metodo di prova specificato al punto 5.1. Nei guanti contrassegnati nel modo suddetto, il contenuto di endotossine non deve essere maggiore di 20 unità per ogni paio di guanti.

4.4 Guanti privi di polveri

Per guanti privi di polveri la quantità totale di residui di polvere determinata secondo il metodo di prova di cui al punto 5.2 non deve essere maggiore di 2 mg per guanto. Qualsiasi guanto contenente più di 2 mg di polvere è un guanto trattato con polvere.

4.5 Proteine, soggette a rilascio

Il fabbricante deve sforzarsi di ridurre al minimo il livello delle proteine soggette a rilascio. Il fabbricante deve sottoporre a controllo sistematico il limite di processo delle proteine soggette a rilascio che sono presenti nei guanti finiti contenenti lattice di gomma naturale, applicando il metodo specificato al punto 5.3 e descritto nell'appendice A. La documentazione che riporta questi risultati deve essere conservata. I risultati della prova ed il metodo di prova applicato devono essere resi disponibili su richiesta.

Nota Proteine, allergeniche: la presente norma europea specifica un metodo di misurazione ad ampia approssimazione per il contenuto allergenico, per esempio proteine soggette a rilascio. Non vi è alcuna correlazione diretta tra il contenuto di proteine soggette a rilascio e allergeni. I metodi quantitativi per misurare le proteine allergeniche sono descritti nell'appendice B.

4.6 Etichettatura

Oltre a quanto specificato per l'etichettatura nella EN 1041:2008+A1:2013 e i simboli pertinenti indicati nella EN ISO 15223-1:2012, si applicano i requisiti seguenti:

a) I guanti medicali contenenti lattice di gomma naturale devono riportare un'etichetta sulla confezione almeno sulla più piccola unità di confezionamento con il simbolo del lattice (numero di riferimento 5.4.5) della EN ISO 15223-1:2012.

L'etichettatura deve anche comprendere le dichiarazioni di avvertimento seguenti o simili con il simbolo: Il (prodotto) contiene lattice di gomma naturale capace di indurre reazioni allergiche, comprese reazioni anafilattiche.

b) L'etichettatura deve comprendere una indicazione ben visibile che indichi se il guanto è trattato con polvere o privo di polveri.

c) I guanti sterili trattati con polvere devono recare un'etichetta contenente la seguente dicitura o una dicitura equivalente:

"ATTENZIONE: La polvere presente sulla superficie del guanto deve essere rimossa in modo asettico prima di intraprendere qualsiasi operatorie, per minimizzare il rischio di reazioni indesiderate a carico dei tessuti."

Nota 1 Questa attenzione può essere indicata sull'involucro interno.

d) Per qualsiasi guanto medicale contenente lattice di gomma naturale l'etichettatura del prodotto non deve comprendere:

- nessun termine che suggerisca una sicurezza relativa, come bassa allergenicità, ipoallergenicità o scarso contenuto di proteine;
- nessuna indicazione ingiustificata della presenza di allergeni.

e) Se il fabbricante indica sull'etichetta il contenuto di proteine nei guanti, deve essere indicato anche il limite di processo, misurato come specificato al punto 5.3.

Nota 2 Quanto sopra non consente di riportare in etichetta un contenuto di proteine minore di 50 µg/g. Dichiarazioni più basse non sono considerate affidabili data la variazione di processo prevista nella fabbricazione e nelle prove interlaboratorio.

5 METODI DI PROVA

5.1 Endotossine

Ad eccezione dei casi in cui siano presenti delle interferenze con le procedure LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) tali da non poter essere eliminate, la selezione, la validazione e l'utilizzo della tecnica devono essere come descritto nella Farmacopea Europea, Monografia 2.6.14, "Endotossine batteriche". I risultati devono essere espressi in unità di endotossine (U.E.) per paio di guanti.

Nota 1 Se presenti delle interferenze con il procedimento LAL tali da non poter essere eliminate, il livello di endotossine batteriche non può essere misurato in modo accurato.

Il numero minimo di paia di guanti che si raccomanda di sottoporre a prova in rapporto al numero di pezzi che compone il lotto è di due paia di guanti per i lotti aventi numerosità minore di trenta paia, tre paia di guanti per i lotti aventi numerosità da 30 paia a 100 paia ed il 3% della quantità totale per i lotti aventi numerosità maggiore di 100 paia di guanti, fino ad un massimo di dieci paia di guanti per lotto.

La superficie esterna di un paio di guanti è sottoposta a procedimento di estrazione con 40 ml di acqua esente da endotossine (Acqua LAL, Farmacopea Europea) per un tempo non minore di 40 min e non maggiore di 60 min e ad una temperatura compresa tra 37 °C e 40 °C, in modo da assicurare che tutte le superfici siano a contatto con il mezzo di estrazione. Se necessario, l'estratto è centrifugato per 15 min a 2 000 g, per rimuovere le particelle, quindi la fase liquida si fa decantare ed immediatamente dopo si sottopone a prova per determinare l'eventuale presenza di endotossine.

Nota 2 Esistono altri metodi convalidati per l'analisi delle endotossine, e si possono utilizzare tali metodi per il controllo di qualità di routine, purché siano stati validati e purché la loro correlazione con il metodo di riferimento specificato nella presente norma europea sia stata stabilita.

5.2 Polvere

Si deve utilizzare il metodo di prova per la determinazione dei residui di polvere descritto nei punti 7 e 9 della EN ISO 21171:2006.

5.3 Proteine, soggette a rilascio

Il metodo di prova per la determinazione analitica delle proteine soggette a rilascio deve essere il metodo di Lowry modificato, indicato nell'appendice A, oppure un qualsiasi altro metodo adeguatamente validato di cui sia stata dimostrata la correlazione con il suddetto metodo di Lowry modificato.

Nota 1 Un esempio di metodo analitico validato è indicato nell'appendice C.

Nota 2 I metodi immunologici nell'appendice B attualmente non sono validati rispetto al metodo Lowry modificato ma possono essere correlati ai dati della risposta clinica.

6 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve riportare almeno le seguenti informazioni:

- il riferimento della presente parte della EN 455;
- il tipo di guanti e il codice del lotto di fabbricazione;
- il nome e l'indirizzo del fabbricante o del distributore e del laboratorio di prova, se diversi;
- la data in cui viene effettuata la prova;
- la descrizione del metodo di prova applicato;
- i risultati della prova.

APPENDICE A METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE ESTRAIBILI IN MEZZO ACQUOSO DAI GUANTI IN GOMMA NATURALE UTILIZZANDO IL METODO DI LOWRY MODIFICATO

A.1 Scopo e campo di applicazione

Scopo del presente metodo è determinare la quantità di proteine estraibili in mezzo acquoso dai guanti per uso medico realizzati in gomma naturale (GN). Il presente metodo è stato validato nell'ambito di prove interlaboratorio. Il limite inferiore di quantificazione è di circa 10 µg di proteine per grammo di guanto (ovvero 2 µg di proteine per millilitro di estratto), a seconda del peso del guanto.

I prodotti chimici quali i tensioattivi, gli acceleranti e gli antiossidanti aggiunti al lattice di gomma naturale durante la fabbricazione dei guanti possono interferire con lo sviluppo della colorazione nel corso della determinazione, alcuni materiali possono ridurre lo sviluppo della colorazione mentre altri possono aumentarla. Se il metodo di prova fornisce dei risultati erranei a causa delle sostanze interferenti, si può utilizzare qualsiasi metodo di analisi degli amminoacidi validato (per esempio il metodo indicato nell'appendice C).

Le persone che utilizzano questo metodo dovrebbero avere familiarità con le normali pratiche di laboratorio.

Nota Questo metodo non comporta la trattazione degli eventuali problemi relativi alla sicurezza correlati al suo impiego. L'utilizzatore ha la responsabilità di stabilire delle regole adeguate di salute e sicurezza, per assicurare la conformità con le legislazioni vigenti a livello nazionale.

A.2 Principio

Le proteine solubili in acqua sono estratte in una soluzione tampone e quindi precipitate con acidi in presenza di desossicolato di sodio per concentrarle e separarle dalle altre sostanze solubili in acqua che possono interferire con la determinazione. Le proteine precipitate sono ridissolte in alcali e quantificate mediante colorimetria con una versione modificata del metodo di Lowry. La prova si basa sulla reazione delle proteine con il rame e con il reagente di Folin in un mezzo alcalino con produzione di una colorazione blu caratteristica. Le misurazioni spettrofotometriche sono effettuate ad una lunghezza d'onda fissa, compresa tra 600 nm e 750 nm.

A.3 Reagenti**A.3.1 Generalità**

In tutti i casi in cui è necessario utilizzare dell'acqua, si dovrebbe impiegare acqua bidistillata o acqua di qualità equivalente. Tutti gli altri reagenti dovrebbero essere di qualità analitica.

A.3.2 Solvente di estrazione**A.3.2.1** Acido N-tris-[Idrossimetil]-metil-2-amminoetansolfonico (TES), sale semisodico.**A.3.2.2** Tampone di estrazione, quantità 0,1 M, preparato sciogliendo 24 g di TES (punto A.3.2.1) in 1 l di acqua. È possibile utilizzare qualsiasi altro sistema tampone equivalente purché la soluzione sia caratterizzata da una capacità di tamponamento tale da sopportare un pH di $7,4 \pm 0,2$ negli estratti di guanto.

Preparare una quantità sufficiente per l'estrazione delle proteine dal guanto (punto A.6.2), la preparazione delle soluzioni proteiche di riferimento (punto A.6.3.2) e del bianco.

A.3.2.3 Soluzione colorante, blu di bromofenolo, soluzione di sale sodico preparata sciogliendo 100 mg di bromofenolo in 1 l d'acqua. Preparare una nuova soluzione ogni quattro settimane.

- A.3.3 Reagenti per il metodo di Lowry per la determinazione delle proteine**
- Nota I seguenti reagenti possono essere preparati a partire da prodotti chimici di serie [1] oppure essere acquistati in apposite confezioni disponibili in commercio. Il metodo relativo alla presente norma è stato validato con l'impiego di una confezione disponibile in commercio.¹⁾
- A.3.3.1** Reagente A, reagente rameico (tartrato alcalino di rame o soluzione di citrato di rame).
- A.3.3.2** Reagente B, reagente di Folin diluito.
- A.3.4** Idrossido di sodio, in soluzione acquosa 0,1 M.
- A.3.5** Desossicolato di sodio (DOC), 3,47 mM, preparato sciogliendo 0,15 g di desossicolato di sodio in acqua e diluendo con acqua sino a raggiungere i 100 ml. Non utilizzare questa soluzione oltre quattro settimane dopo la sua preparazione.
- A.3.6** Acido tricloroacetico (TCA), 4,4 mM in acqua, preparato sciogliendo 72 g di TCA in acqua e diluendo con acqua sino a raggiungere i 100 ml.
- A.3.7** Acido fosfotungstico (PTA), preparato dissolvendo 72 g di PTA in acqua e diluendo con acqua sino a raggiungere i 100 ml. Non utilizzare questa soluzione oltre quattro settimane dopo la sua preparazione.
- A.3.8** Ovalbumina, derivata da uova di gallina²⁾ liofilizzate e prive di sali.

A.4 Apparecchiatura

- A.4.1** Guanti sintetici, privi di polveri.
- A.4.2** Centrifuga, in grado di raggiungere almeno i 6 000 g.
- A.4.3** Provette per centrifuga, realizzate in polipropilene ed aventi la capacità di 30 ml o 50 ml caratterizzate da scarsa capacità di legare le proteine, dell'ordine di 10 µg di proteine legate per provetta o meno. Non utilizzare vetreria, in quanto caratterizzata dalla capacità di legare le proteine alla superficie.
- Nota Un metodo per la determinazione della capacità di legare le proteine è descritto al punto A.5.
- A.4.4** Filtro, monouso, dotato di pori da 0,22 µm di diametro e avente una bassa capacità di legare le proteine, dell'ordine di 10 µg per filtro o meno.
- Nota Un metodo per la determinazione della capacità di legare le proteine è descritto al punto A.5.
- A.4.5** Siringhe, tipo monouso, da 20 ml, realizzate in polietilene o polipropilene.
- A.4.6** Microprovette, da 2 ml, realizzate in polipropilene.
- A.4.7** Cuvette al quarzo, da 10 mm di lunghezza di percorso.
- A.4.8** Piastre per microtitolazione, dotate di 96 pozzetti, a fondo piano, realizzate in polistirolo, oppure cuvette monouso (punto A.4.9).

1) Lowry Micro DC Protein Assay Kit (codice catalogo 500-0116), disponibile presso BioRad Laboratories, 2 000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 9456547, USA. Questa informazione viene comunicata per comodità di coloro che utilizzano la presente norma e non costituisce alcuna sorta di adozione del prodotto summenzionato da parte del CEN.

2) Questa ovalbumina si prepara a partire da albumi di uova di gallina fresche mediante frazionamento con solfato di ammonio e cristallizzazione ripetuta a pH 4,5; per esempio, l'albumina d'uovo di gallina Sigma A 5503, di Grado V, disponibile presso Sigma Chemical Co. P.O. Box 14506, St Louis, MO 63178, USA è adatta. Questa informazione viene comunicata per comodità di coloro che utilizzano la presente norma e non costituisce alcuna sorta di adozione del prodotto summenzionato da parte del CEN.

- A.4.9** Cuvette monouso, da 1,5 ml semi-micro, 10 mm di lunghezza di percorso, realizzate in polistirolo.
- A.4.10** Lettore di micropiastre, funzionante a lunghezza d'onda compresa tra 600 nm e 750 nm.
- A.4.11** Spettrofotometro, funzionante a lunghezza d'onda compresa tra 230 nm e 750 nm.
- A.4.12** Agitatore tipo Vortex.
- A.4.13** Micropipette, dotate di punte in polipropilene di tipo monouso.
- A.4.14** Fermagli, per sigillare i guanti in modo da impedire l'ingresso dell'acqua durante l'estrazione. Si consiglia l'impiego di coppie di barrette in alluminio rivestite con gomma spugnosa che possono essere avvitate insieme (vedere figura A.1) oppure di fermagli di plastica per emodialisi da 170 mm di lunghezza.
- A.4.15** Agitatore.

A.5 Misurazione della capacità di legare le proteine

A.5.1 Generalità

Si raccomanda l'impiego di attrezzatura da laboratorio monouso in polipropilene (che è notoriamente caratterizzata da scarsa capacità di legare le proteine) nel corso dell'intero procedimento. La capacità di legare le proteine deve essere verificata con i seguenti metodi prima di utilizzare provette per centrifuga o filtri provenienti da un nuovo lotto. La prova deve essere effettuata entro un giorno.

A.5.2 Capacità di legare le proteine nelle provette per centrifuga

A.5.2.1 In una provetta per centrifuga (punto A.4.3) preparare 30 ml di una soluzione di riferimento contenente 10 µg/ml di ovalbumina mediante diluizione della soluzione proteica madre (punto A.6.3.1) con il tampone di estrazione (punto A.3.2.2).

A.5.2.2 Prelevare due provette per centrifuga nuove e trasferire 10 ml della porzione di prova della soluzione di ovalbumina (punto A.5.2.1) in ciascuna di esse, agitando in un agitatore (punto A.4.15) ed assicurandosi che l'intera superficie sia bagnata dalla soluzione. Dopo 30 min, trasferire le soluzioni in altre due provette ed agitarle. Ripetere il procedimento sino a che ciascuna delle due porzioni da 10 ml sia stata esposta a cinque provette. Conservare le soluzioni di prova rimanenti.

A.5.2.3 Determinare la concentrazione proteica nella soluzione di riferimento e nelle due soluzioni di prova in triplo utilizzando il metodo indicato nei punti da A.6.4 ad A.6.6.

A.5.2.4 Calcolare il valore medio della quantità di ovalbumina assorbita con la seguente espressione:

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

$$= 2(R - T)$$

dove:

O è la quantità di ovalbumina assorbita, in µg/provetta;

R è il valore medio di tre determinazioni del contenuto di ovalbumina nella soluzione di riferimento, in µg/ml;

T è il valore medio del contenuto di ovalbumina nella soluzione di prova in seguito al passaggio attraverso le provette (ovvero la media di sei valori), in µg/provetta.

Il valore relativo alla quantità di ovalbumina assorbita (*O*) deve risultare minore di 10 µg per provetta, altrimenti le provette sono da ritenersi non adatte per la determinazione.

A.5.3 Capacità di legare le proteine del filtro

A.5.3.1 In una provetta per centrifuga (punto A.4.3) preparare 30 ml di una soluzione di riferimento contenente 10 µg/ml di ovalbumina mediante diluizione della soluzione proteica madre (punto A.6.3.1) con il tampone di estrazione (punto A.3.2.2).

A.5.3.2 Preparare due pile di cinque filtri (punto A.4.4) ciascuna. Filtrare 10 ml di soluzione di riferimento attraverso ognuna delle due pile di filtri in una provetta per centrifuga (punto A.4.3).

A.5.3.3 Determinare la concentrazione proteica nella soluzione di riferimento e nelle due soluzioni di prova in triplo utilizzando il metodo indicato nei punti da A.6.4 a A.6.6.

A.5.3.4 Calcolare il valore medio della quantità di ovalbumina assorbita con la seguente espressione:

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

$$= 2(R - T)$$

dove:

O è la quantità di ovalbumina assorbita, in µg/provetta;

R è il valore medio di tre determinazioni del contenuto di ovalbumina nella soluzione di riferimento, in µg/ml;

T è il valore medio del contenuto di ovalbumina nella soluzione di prova in seguito al passaggio attraverso il filtro (ovvero la media di sei valori), in µg/provetta.

Il valore relativo alla quantità di ovalbumina assorbita (*O*) deve risultare minore di 10 µg per filtro, altrimenti i filtri sono da ritenersi non adatti per la determinazione.

A.6 Procedimento**A.6.1 Generalità**

Il procedimento comprende l'esposizione dei guanti ad estrazione, seguita da purificazione e concentrazione dell'estratto per un fattore cinque. La determinazione dell'estratto è effettuata mediante riferimento ad una curva di taratura preparata utilizzando delle soluzioni proteiche di riferimento che siano state concentrate in modo analogo.

Il procedimento di estrazione utilizzato comporta che l'interno di un guanto e l'esterno di un secondo guanto siano simultaneamente sottoposti ad estrazione. Tale procedimento consente che il volume di estrazione sia ridotto al minimo 25 ml e previene la perdita di proteine verso le superfici del contenitore poiché il tampone di estrazione è esposto solamente ai guanti.

Nota È possibile utilizzare dei procedimenti di estrazione alternativi purché questi ultimi siano convalidati in relazione al metodo suddetto. Una prova interlaboratorio condotta presso laboratori selezionati in Europa e negli Stati Uniti d'America ha rivelato risultati equivalenti con la norma ASTM D5712:1995 [2] nel sottoporre ad estrazione pezzi tagliati da guanti per 2 h a 25 °C in tampone TES a pH 7,4.

A.6.2 Procedimento di estrazione

A.6.2.1 Utilizzare dei guanti sintetici (punto A.4.1) per manipolare i campioni dei guanti impiegati per l'estrazione.

Prelevare otto provini di guanti delle stesse dimensioni e dello stesso lotto e suddividerli in quattro paia. In caso di guanti specificamente conformati per ciascuna delle due mani, scegliere come campioni quattro guanti per la mano destra e quattro guanti per la mano sinistra e suddividerli in due paia di guanti per la mano destra e due paia di guanti per la mano sinistra.

Contrassegnare il polsino di un guanto di ciascun paio a (200 ± 10) mm di distanza dalla punta del dito medio e pesare il guanto (*m*₁) arrotondando la pesata al decigrammo per eccesso o per difetto. Per ciascun paio, inserire il secondo guanto all'interno del guanto contrassegnato in modo tale che l'uno si sovrapponga rispetto all'altro, come indicato nella figura A.1 a).

Nota Il metodo per introdurre un guanto nell'altro non riveste un'importanza critica, fermo restando che i guanti devono essere manipolati il meno possibile. Un modo possibile per ottenere il risultato voluto consiste nel far scivolare un'asticella all'interno del pollice e del mignolo del guanto interno per favorirne l'introduzione all'interno delle corrispondenti dita del secondo guanto. Utilizzare le stesse asticelle per inserire le altre tre dita.

A.6.2.2 Versare nel guanto interno una quantità di soluzione colorante (punto A.3.2.3) sufficiente a riempire tutte e cinque le dita. Introdurre 25 ml di tampone di estrazione (punto A.3.2.2) alla temperatura di (25 ± 5) °C tra il guanto interno e quello esterno. Per i guanti più grossi, tale volume può essere incrementato sino ad un massimo di 50 ml. Rimuovere il più possibile le bolle d'aria e sigillare i guanti con il fermaglio (punto A.4.14) in corrispondenza del contrassegno a 20 cm dalla punta del dito medio, in modo tale da impedire l'ingresso dell'acqua, come indicato nella figura A.1 b).

A.6.2.3 Assicurare i guanti all'agitatore (punto A.4.15) ed agitare per (120 ± 5) min alla temperatura di (25 ± 5) °C.

A.6.2.4 Rimuovere il fermaglio e separare i guanti con cura. Prestare attenzione per non contaminare l'estratto con la soluzione colorante. Se l'estratto presenta una colorazione blu, è necessario scartarlo e ripetere l'estrazione con nuovi guanti.

A.6.2.5 Trasferire con cautela l'estratto in una provetta per centrifuga (punto A.4.3) e chiarificare l'estratto o mediante centrifugazione a non meno di 2 000 *g* per 15 min o mediante filtrazione attraverso un filtro monouso (punto A.4.4), oppure attuando entrambi i provvedimenti, se opportuno. Conservare la soluzione chiarificata così ottenuta in frigorifero a temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C ed eseguire la determinazione entro le successive 48 h oppure, in alternativa, è possibile congelare delle aliquote della soluzione ad una temperatura minore o uguale a -18 °C per un periodo non maggiore di 2 mesi prima dell'analisi.

A.6.2.6 Prelevare il guanto esterno sottoposto ad estrazione e tagliare la sezione del polsino al di sopra del contrassegno posto a 20 cm dalla punta del dito medio, asportare con un panno l'eccesso di liquido presente sulla superficie, lasciar asciugare a temperatura ambiente e pesare il guanto (m_2) arrotondando la pesata al decigrammo per eccesso o per difetto. Calcolare la massa (m) della parte del guanto sottoposta ad estrazione come segue:

$$m = m_1 - m_2$$

A.6.3 Riferimenti di proteine

A.6.3.1 Soluzione proteica madre

Preparare una soluzione di ovalbumina (punto A.3.8) con una concentrazione nominale di 1 mg/ml sciogliendo 25 mg di ovalbumina in 25 ml di tampone di estrazione (punto A.3.2.2). Filtrare la soluzione attraverso un filtro da 0,22 µm (punto A.4.4) e determinare la concentrazione effettiva di ovalbumina utilizzando uno spettrofotometro a raggi ultravioletti per misurare l'assorbimento a 280 nm utilizzando una cuvetta al quarzo (punto A.4.7). Se l'assorbimento è diviso per 0,715³⁾ si otterrà l'esatta concentrazione in mg/ml. La soluzione è stabile per 2 giorni se conservata in frigorifero o per due mesi se congelata a -18 °C. Per scongelare è necessario riscaldare a 45 °C per 15 min.

A.6.3.2 Soluzioni proteiche di riferimento

Preparare delle diluizioni in serie della soluzione proteica madre (punto A.6.3.1) utilizzando il tampone di estrazione (punto A.3.2.2), per ottenere delle soluzioni caratterizzate da concentrazioni nominali di circa 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml e 2 µg/ml. Utilizzare il tampone di estrazione come bianco. Le soluzioni sono stabili per 2 giorni se conservate in frigorifero o per due mesi se congelate a -18 °C. Per scongelare è necessario riscaldare a 45 °C per 15 min.

3) Assumendo una massa molecolare di 43000 Dalton ed un'estinzione molare di 30745 a 280 nm ed a pH 7,4, l'estinzione di 1 mg/ml di ovalbumina in un tampone 0,1 M di TES a pH 7,4 è pari a 0,715 utilizzando un percorso ottico di 1 cm [3].

- A.6.4 Precipitazione e concentrazione delle proteine**
- A.6.4.1** Effettuare il procedimento in doppio alla temperatura di (25 ± 5) °C.
- A.6.4.2** Trasferire all'interno di microprovette (punto A.6.3.2) esattamente 1 ml di soluzione di bianco, 1 ml delle soluzioni proteiche di riferimento (punto A.6.2.5) e gli estratti di tre guanti (punto A.4.6). Aggiungere 0,1 ml di DOC (punto A.3.5), miscelare con movimento vorticoso e lasciar riposare per 10 min. Aggiungere 0,1 ml di TCA (punto A.3.6) e 0,1 ml di PTA (punto A.3.7), miscelare con movimento vorticoso e lasciar riposare per ulteriori 30 min.
- A.6.4.3** Centrifugare a 6 000 g per 15 min. Far decantare la fase liquida surnatante e drenare per 5 min rovesciando ciascuna provetta per centrifuga su una carta assorbente.
- A.6.4.4** Aggiungere 0,2 ml di soluzione 0,1 M di soluzione di idrossido di sodio (punto A.3.4) in ciascuna provetta, compresa quella contenente il bianco. Miscelare con un miscelatore tipo vortex per ridisciogliere le proteine precipitate. Assicurarsi che le proteine siano completamente ridissolte in soluzione limpida. A seconda del tipo di guanto, per ottenere questo risultato è a volte necessario lasciare la soluzione in frigorifero, a (5 ± 3) °C per tutta una notte. Nel caso in cui rimanga del precipitato, aggiungere un'ulteriore quantità nota della soluzione di idrossido di sodio ad incrementi di 0,2 ml ciascuno fino ad un massimo di 1 ml ed utilizzare un'aliquota di 0,2 ml per le fasi successive. Può essere utile diluire l'estratto di tali campioni prima della precipitazione.
- Nota Il processo di concentrazione delle proteine mediante precipitazione e ridiscioglimento serve per purificare le proteine e per liberarle dalle sostanze interferenti. È inevitabile che, durante il processo in questione, una certa quantità di proteine si perda e si assume ai fini della prova che la stessa percentuale si perda dalle soluzioni proteiche di riferimento e dagli estratti dai campioni. Si dovrebbe mantenere la perdita al minimo, in quanto delle perdite di forte entità non sarebbero riproducibili.
- A.6.5 Sviluppo della colorazione**
- A.6.5.1** Il metodo descritto è stato adattato alla confezione disponibile in commercio che è stata utilizzata per la validazione. Altri kit o reagenti preparati a partire da prodotti chimici di serie possono richiedere altri volumi ed altri tempi di incubazione.
- A.6.5.2** Aggiungere 0,125 ml di reagente A (punto A.3.3.1) in ciascuna microprovetta contenente le soluzioni con le proteine ridissolte, compreso il bianco. Miscelare bene. Aggiungere 1 ml di reagente B (punto A.3.3.2), tappare la provetta, agitare con movimento vorticoso e consentire alla colorazione di raggiungere il pieno sviluppo per un periodo di 30 min. Se in questa fase si dovesse verificare una precipitazione, centrifugare o filtrare per rimuovere il precipitato prima di misurare l'assorbanza.
- A.6.6 Misurazione**
- A.6.6.1 Lettore di micropiastre**
- Trasferire con pipetta un adeguato volume di soluzione (punto A.6.5.2) nel pozzetto di una piastra per microtitolazione (punto A.4.8) in modo tale da riempire quasi completamente il pozzetto, per esempio in un pozzetto da 500 µl trasferire con pipetta 490 µl. Misurare l'assorbanza rispetto al bianco ad una lunghezza d'onda specifica, compresa tra 600 nm e 750 nm.
- Nota Per ottenere dei risultati uniformi, è importante che le soluzioni di riferimento, nonché gli estratti dai guanti, siano analizzati insieme entro 1 h dal momento in cui si osserva lo sviluppo di una colorazione stabile.
- A.6.6.2 Spettrofotometro**
- Trasferire la soluzione (punto A.6.5.2) in una cuvetta (punto A.4.9) e misurare l'assorbanza rispetto al bianco ad una lunghezza d'onda specifica, compresa tra 600 nm e 760 nm.
- Nota Per ottenere dei risultati uniformi, è importante che le soluzioni di riferimento, nonché gli estratti dai guanti, siano analizzati insieme entro 1 h dal momento in cui si osserva lo sviluppo di una colorazione stabile.

A.7 Espressione dei risultati

A.7.1 Calcolo

A.7.1.1 Curva di taratura

Calcolare l'assorbanza media delle due determinazioni. Se i singoli valori differiscono in misura maggiore del 20%, ripetere la determinazione. Preparare la curva di taratura con la rappresentazione grafica dei valori misurati di assorbanza media in rapporto alle concentrazioni effettive delle soluzioni proteiche di riferimento originali, come indicato nella figura A.2. La curva di taratura dovrebbe avere un andamento lineare nell'intervallo compreso tra 0 µg e 100 µg di proteine per millilitro nelle soluzioni proteiche di riferimento originali.

Nota Una parte di proteine si perde durante il processo di concentrazione. Si assume che la stessa percentuale si perda dalle soluzioni di riferimento e dai campioni di prova durante il processo di concentrazione.

A.7.1.2 Concentrazione dell'estratto

Per ciascuno dei quattro estratti, calcolare l'assorbanza media in base alle due determinazioni (vedere punto A.6.4.1). Se i singoli valori differiscono in misura maggiore del 20%, ripetere la determinazione. Determinare le concentrazioni dei campioni estratti (*C*) da esprimersi in µg/ml di estratto, leggendole direttamente dalla porzione lineare della curva.

Nota Nel caso in cui la curva di taratura non risulti lineare, il valore può essere calcolato mediante regressione quadratica. Per la costruzione della curva ed il calcolo delle concentrazioni non conosciute, si consiglia per praticità l'impiego di un software disponibile in commercio.

A.7.2 Risultati

Il contenuto proteico di ciascun campione è dato dalla seguente formula:

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

dove:

P è la proteina soggetta a rilascio, in µg/g di guanto;

V è il volume del mezzo di estrazione impiegato, in ml;

C è la concentrazione proteica dell'estratto, in µg/ml;

F è il fattore di diluizione;

Nota *F* è il volume effettivo della soluzione di idrossido di sodio, in millilitri, utilizzato per ridisciogliere le proteine diviso per 0,2.

m è la massa del guanto sottoposto ad estrazione, in grammi (punto A.6.2.6).

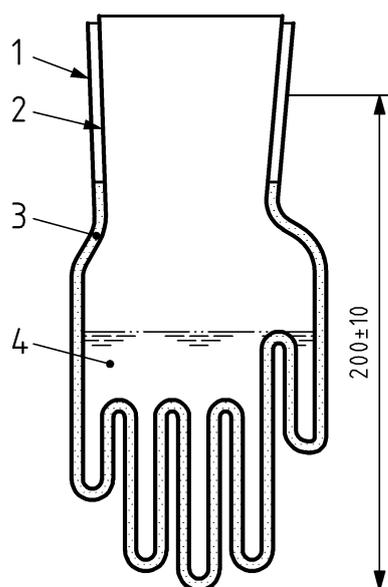
Riportare il contenuto proteico medio delle quattro determinazioni degli estratti di guanto.

figura A.1 Estrazione dai guanti (sezione trasversale)

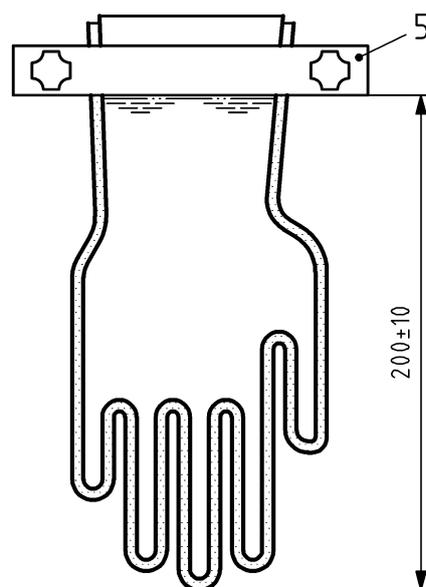
Legenda

- 1 Guanto esterno (guanto 1)
- 2 Guanto interno (guanto 2)
- 3 Tampone di estrazione
- 4 Soluzione colorante
- 5 Fermaglio del guanto

Dimensioni in millimetri



a)



b)

figura A.2

Curva di riferimento tipica misurata in uno spettrofotometro a 750 nm con lunghezza del cammino ottico di 1 cm

Legenda

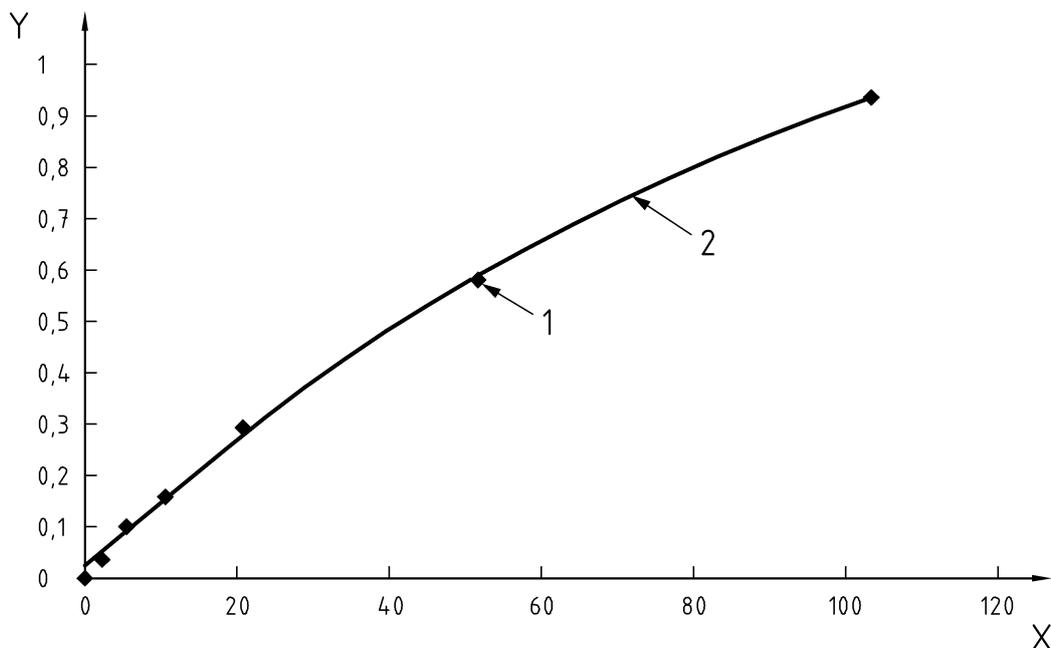
Y Assorbanza a 750 nm

X Concentrazione di ovalbumina ($\mu\text{g/ml}$)

1 Assorbanza

2 Polinomio relativo alla più appropriata costruzione della curva, elaborata dal computer

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



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

A.7.3**Informazioni statistiche**

Novi laboratori hanno partecipato a un esercizio interlaboratorio nel contesto di uno studio scientifico supportato dalla UE dal 1996 al 1998 e pubblicato nel rapporto finale MAT 1 - CT 940060 della Direzione generale XII della Commissione europea. In questo esperimento sono state sottoposte a prova sia la precisione del metodo Lowry sia la precisione dell'intero procedimento compresa l'estrazione. Il metodo completo comprende inoltre la variazione del contenuto proteico da guanto a guanto, che in alcuni casi è molto più alta rispetto alla variazione del metodo. I risultati sono riassunti nel prospetto A.1.

prospetto A.1 **Informazioni statistiche**

	Numero di misurazioni	Numero di estratti	Numero di giorni	Media in $\mu\text{g/ml}$	Coefficiente di ripetibilità della variazione in % (all'interno dei laboratori)	Coefficiente di riproducibilità della variazione in % (tra un laboratorio e l'altro)
Estratto di guanto	8 triplicati	1 utilizzato da tutti i partecipanti	1	63,9	4,9	9,6
Estratto di guanto	15 triplicati		5	61,7	6,8	6,3
Guanto A	5 triplicati	5	1	88,8	7,9	22,5
Guanto A	5 triplicati	5	5	84,5	6,1	20,3
Guanto B	3 triplicati	3	1	109	20,2	23,3
Guanto C	3 triplicati	3	1	727	8,3	23,0
Guanto D	3 triplicati	3	1	46,5	10,1	31,8
Media estratta senza procedimento di estrazione					5,0	8,0
Media procedimento completo (guanto da A a D)					10,5	24,2

Il limite di quantificazione è stato impostato a $10 \mu\text{g/g}$ perché è dipendente dallo spessore (peso) dei guanti. È stato riscontrato che era compreso tra $1 \mu\text{g/g}$ e $5 \mu\text{g/g}$.

A.8**Riferimenti**

- [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

APPENDICE B METODI IMMUNOLOGICI PER LE MISURAZIONI DEGLI ALLERGENI DEL LATTICE DI GOMMA NATURALE
(informativa)

B.1 Introduzione

Le reazioni allergiche di tipo immediato alle proteine del lattice di gomma naturale (NRL) sono riconosciute come un importante problema di salute medico e occupazionale. La principale fonte di sensibilizzazione è stata individuata nelle proteine o peptidi derivati per eluizione dai guanti protettivi di NRL [1].

Benché la quantità di proteine totali estraibili in genere sia ragionevolmente correlata al contenuto di allergeni dei guanti di NRL misurato mediante prove allergologiche di inoculazione cutanea (SPT) o prove basate sulle IgE umane [2], [3], [4], [5], i metodi di proteine totali misurano anche le proteine non allergeniche che è improbabile siano rilevanti nell'allergia da NRL. Pertanto esiste una crescente necessità di metodi in grado di misurare in modo specifico e accurato gli allergeni nei manufatti di NRL. Si è concordi nel riconoscere che prove specifiche degli allergeni fornirebbero delle informazioni molto più accurate e affidabili sia per scopi di regolamentazione sia per il monitoraggio dei processi di fabbricazione. La disponibilità di prove specifiche è tuttavia esigua. Inoltre, le conoscenze ancora incomplete sulla significatività complessiva dell'ampio spettro di allergeni di NRL ha reso difficile decidere quali dei numerosi allergeni presenti nel materiale d'origine dell'NRL dovrebbero essere misurati.

I metodi semiquantitativi, quali l'inibizione RAST e l'inibizione IgE ELISA, basati sull'utilizzo degli anticorpi IgE umani sono stati disponibili per parecchi anni nei laboratori di ricerca. Gli svantaggi di questi metodi consistono nel fatto che sono difficili da standardizzare e soffrono di limitata disponibilità di sieri umani contenenti anticorpi IgE specifici del lattice clinicamente rilevanti. Inoltre si dovrebbe tener presente che i riferimenti utilizzati non sono equiparabili alle proteine dei guanti. Il principio che una prova ideale per valutare il potenziale allergenico dei prodotti di NRL dovrebbe essere basata su una quantificazione di allergeni specifica è stato recentemente adottato e sostenuto nell'opera di standardizzazione in corso sia in Europa [6], [7] sia negli Stati Uniti [8], [31].

Di recente sono stati fatti notevoli progressi nello sviluppo di prove specifiche e quantitative per la quantificazione dei singoli allergeni di NRL [9], [10], [30]. Queste nuove prove, basate sul principio (EIA) delle prove immunologiche a cattura enzimatica e sull'utilizzo di anticorpi monoclonali e di allergeni purificati o ricombinanti, sono specifiche; esse possono essere standardizzate in modo adeguato e sono di sensibilità e riproducibilità sufficienti. Nella presente appendice informativa sono esaminati i metodi correnti per la misurazione di allergeni di NRL.

B.2 Allergeni del lattice di gomma naturale nei manufatti di gomma

Delle circa 250 diverse proteine o polipeptidi identificati nel materiale di origine dell'NRL, ossia il lattice liquido dell'albero della gomma *Hevea brasiliensis*, grosso modo da un quarto a un quinto hanno dimostrato di legarsi con le IgE e rappresentano degli allergeni [11], [12]. La miscela di proteine vegetali nel materiale di origine riflette la reazione allo stress dell'albero della gomma alle ferite meccaniche subite (il procedimento delle incisioni praticate sulla corteccia). Molte di queste proteine sono proteine di difesa che sono state ben conservate nella pianta nel corso dell'evoluzione. Le omologie strutturali condivise da queste proteine forniscono la base molecolare per le comuni reazioni crociate delle IgE dei pazienti allergici al lattice verso le varie proteine della pianta. Molto probabilmente tutti gli allergeni significativi sono verosimilmente presenti nell'NRL liquido ma, come riferito sopra, può darsi che la maggioranza delle proteine e dei polipeptidi presenti nel materiale di origine dell'NRL sia irrilevante per la valutazione delle proprietà allergeniche dei manufatti di NRL. Il Comitato per la Nomenclatura degli Allergeni WHO/IUIS (febbraio 2013) fornisce una lista di 14 allergeni di NRL che caratterizzano il livello molecolare (www.allergen.org), la maggior parte dei quali sono stati clonati e prodotti mediante la tecnologia DNA ricombinante.

Si dovrebbe progettare una prova ottimale per misurare in modo accurato tutti gli allergeni che possono essere presenti nei manufatti di gomma. Essa dovrebbe comprendere gli epitopi presenti sulle proteine naturali, nonché i nuovi epitopi sui prodotti di degradazione risultanti dai processi di fabbricazione della gomma rigida. Finora è stato identificato un numero limitato di allergeni nei manufatti di NRL. La letteratura esistente supporta la tesi che almeno gli Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 ed Hev b 6.02 e/o frammenti o loro polimeri che trasportano epitopi che si legano alle IgE possono essere presenti nei manufatti [13], [14], [15], [16], [17], [18]. Resta ancora da confermare se altri allergeni, come gli Hev b2, Hev b7 Hev b13 [19] o Hev b14 [32] possano rivelarsi importanti allergeni specifici dei manufatti di gomma.

B.3 Metodi per misurare gli allergeni del lattice di gomma naturale

B.3.1 Metodi qualitativi

I metodi di immuno-elettroforesi e le tecniche di immunoimpronte, utilizzati in maniera estensiva agli inizi degli anni '90, hanno identificato e tentato di caratterizzare numerose proteine di NRL alle quali si legano le IgE dai sieri di pazienti allergici a NRL. Oggi si conviene tuttavia che non si possano utilizzare solo questi metodi per un'identificazione affidabile degli allergeni [11], [12], [20], [21].

B.3.2 Metodi semiquantitativi

B.3.2.1 Prove allergologiche di inoculazione cutanea in soggetti volontari allergici al lattice

L'allergenicità degli estratti di NRL può essere valutata in modo semiquantitativo mediante prove allergologiche di inoculazione cutanea (SPT) in un numero statisticamente rilevante di pazienti allergici a NRL. L'entità della reazione è dipendente e proporzionale alla quantità di allergeni contro i quali il paziente possiede anticorpi di classe IgE [2]. Da un punto di vista biologico le SPT sarebbero una prova ideale per valutare l'allergenicità clinicamente rilevante, ma a causa di limiti etici questo approccio non può essere utilizzato come prova di routine per il monitoraggio del contenuto di allergeni nei guanti di NRL.

B.3.2.2 Inibizione IgE-ELISA (anche nota come Inibizione RAST)

L'inibizione ELISA (prova di immunoassorbimento enzimatico di riferimento) può essere utilizzata a partire da prove disponibili in commercio o preparate dall'utilizzatore per la determinazione degli anticorpi IgE specifici. In precedenza era comune la RAST (prova radio-allergologica di assorbimento) che utilizzava anticorpi di identificazione marcati radioattivamente anziché con enzimi.

L'inibizione ELISA è stata utilizzata per valutare gli allergeni di NRL in vari prodotti medicali e di consumo [3], [4], [22], [23].

Nel procedimento, quantità ottimali di allergeni di NRL sono legate alla fase solida (per esempio carta o polistirolo). Campioni e riferimenti non noti sono incubati con siero IgE miscelato da individui con allergia a NRL confermata. Quando l'anticorpo IgE si lega all'allergene solubile, è impossibilitato a legarsi all'allergene di fase solida. Dopo l'incubazione la miscela è trasferita alla preparazione dell'allergene immobilizzato in cui gli anticorpi IgE liberi sono legati agli allergeni sulla fase solida. Si misura quindi il legame specifico utilizzando un anticorpo anti-IgE marcato con un enzima. Il grado di inibizione è proporzionale alla quantità di allergeni solubili nell'estratto.

I reagenti critici sono gli allergeni immobilizzati, la miscela di siero umano e l'allergene di riferimento.

Nella prova preparata dall'utilizzatore, utilizzata nel riferimento 4, è stato utilizzato NRL non ammoniacato nativo come rivestimento e come allergene di riferimento. La concentrazione proteica di 10 mg per ml nella soluzione di riferimento è stata impostata a 100 000 unità arbitrarie. Sono state incubate diluizioni in serie di estratti di guanto e diluizioni di NRL di riferimento con miscela di siero IgE diluita in modo ottimale composta da sieri ad alta titolazione caratterizzati con cura da pazienti allergici a NRL [4].

B.3.3 Metodi quantitativi specifici

B.3.3.1 Prove di cattura immunoenzimatiche (EIA) per la quantificazione degli allergeni di NRL

B.3.3.2 Contesto

Si riconosce il principio che una prova ottimale dovrebbe essere progettata in modo da identificare solo quegli allergeni di NRL che sono effettivamente presenti nei manufatti. Sono quattro gli allergeni di NRL, ovvero Hev b 1, Hev b3, Hev b5 e Hev b6.02, la cui presenza è stata finora identificata in modo inequivocabile negli estratti dei guanti di NRL [13], [15], [16], [17], [24]. I due allergeni più importanti per i soggetti adulti sono Hev b 5 e Hev b 6.02 (proevina) [15], [17], [25]. Hev b 1 e Hev b 3 sono allergeni importanti per i bambini con spina bifida [26], [27]. Di recente sono state sviluppate delle prove di cattura immunoenzimatiche allergene-specifiche (EIA) per quantificare questi quattro allergeni di NRL e da dicembre 2001 sono disponibili in commercio delle confezioni per misurare tali allergeni. È pertanto possibile acquistare anche separatamente i reagenti e l'attrezzatura.

B.3.3.3 Descrizione dei metodi di cattura EIA⁴⁾

Le EIA di cattura fanno uso di anticorpi monoclonali specifici e di allergeni purificati o proteine prodotti mediante tecnologia DNA ricombinante come riferimenti. I pozzetti di microtitolazione sono rivestiti in ciascuna prova con un anticorpo monoclonale specifico che lega l'allergene desiderato dal campione. Dopo l'incubazione, il materiale non legato è rimosso mediante lavaggio. Nella seconda incubazione, l'anticorpo monoclonale allergene-specifico a marcatore enzimatico [generalmente l'enzima Horseradish perossidasi (HRP)] si lega alle molecole di allergene legate sulla piastra di microtitolazione nella prima incubazione. Dopo il lavaggio si aggiunge il substrato per l'enzima. Dopo l'interruzione della reazione, si misura l'assorbanza a una lunghezza d'onda idonea. L'intensità della colorazione prodotta è direttamente proporzionale alla concentrazione di allergene del campione.

B.3.3.4 Prestazione delle EIA di cattura rispetto alle prove di allergeni basate sulle IgE

Attualmente si utilizzano prove di allergeni specifici in innumerevoli serie di studi per valutare l'allergenicità dei guanti medicali. La miglior verifica del potenziale allergenico di un determinato estratto sarebbe riflessa nella rispettiva reattività sulla cute del paziente allergico a NRL. In uno studio di 22 guanti di NRL sono emerse correlazioni altamente significative quando la somma di questi 4 allergeni (misurati mediante l'impiego di una confezione disponibile in commercio di cattura EIA) è stata correlata ai risultati ottenuti dalle prove di inibizione basate sulle IgE [10]. La correlazione più alta è stata osservata tra la somma dei 4 allergeni nei guanti e l'SPT in 20 volontari allergici a NRL ($r = 0,95$) seguita dalla somma e dai risultati dell'inibizione IgE ELISA ($r = 0,90$). La correlazione alle proteine totali misurate con il metodo Lowry modificato era molto bassa ($r = -0,11$). In un'altra serie di 58 guanti di NRL è stato riportato nella stessa comunicazione [10] che la correlazione tra la somma dell'attività dei 4 allergeni e l'attività totale mediante l'inibizione IgE ELISA era 0,84. I risultati di un recente studio multicentrico internazionale [28] organizzato dalla FDA ed effettuato presso sette laboratori per misurare gli allergeni di NRL in 30 guanti ha similmente dimostrato che la somma dei quattro allergeni misurati mediante le prove EIA monoclonali mostravano la più alta correlazione ($r^2 = 0,91 - 0,95$) con le prove utilizzando l'inibizione RAST/ELISA basata sulle IgE umane. Al momento sono ancora necessari studi approfonditi su un ampio numero di guanti per assicurare ulteriormente l'applicabilità delle EIA allergene-specifiche ma sembra già che la somma dei quattro allergeni rifletta il contenuto allergenico totale degli estratti di guanto in modo biologicamente significativo. Gli studi attualmente in corso sono volti a chiarire se siano necessari allergeni aggiuntivi e se essi influenzerebbero l'esito delle valutazioni.

4) Secondo le informazioni fornite dal fabbricante delle confezioni disponibili in commercio (FITkit® Foglietti illustrativi, www.quattromed.com) il limite di rivelazione per i 4 allergeni è compreso tra 0,1 µg/l (Hev b6.02) e 2,3 µg/l (Hev b3). Il coefficiente di ripetibilità della variazione si è dimostrato compreso tra 2,8% e 5,8%, e il coefficiente di riproducibilità della variazione tra 2,6% e 7,6%. Questa informazione viene comunicata per comodità di coloro che utilizzano la presente norma e non costituisce alcuna sorta di adozione del prodotto summenzionato da parte del CEN.

Un altro studio di 208 guanti [30] che ha utilizzato la prova immunologica disponibile in commercio (FitKit, Icosagen AS, Tartu, Estonia) conforme ai criteri della norma ASTM D7427-08 ha fornito una forte correlazione tra la somma dei quattro allergeni clinicamente rilevanti e la prova immunologica basata sulle IgE validata mediante prova allergologica di inoculazione cutanea [4]. Al momento sono ancora necessari studi approfonditi, su un ampio numero di guanti per assicurare ulteriormente l'applicabilità delle EIA allergene-specifiche ma sembra già che la somma dei quattro allergeni rifletta il contenuto allergenico totale degli estratti di guanto in modo biologicamente significativo sebbene non sia possibile presentare indicazioni di sicurezza. Gli ulteriori studi attualmente in corso sono volti a chiarire se siano necessari allergeni aggiuntivi e se essi influenzerebbero gli esiti delle valutazioni.

B.4

Conclusione

La misurazione delle proteine totali estraibili non è ritenuta un metodo ideale per controllare il contenuto di allergeni di NRL dei guanti medicali. Tuttavia, al momento della pubblicazione della norma, i metodi basati sulle IgE umane per misurare gli allergeni non sono validati, mancano di normazione e soffrono per carenza di reagenti richiesti. Per questo è ancora il metodo prescritto nella parte normativa della presente norma. I metodi di cattura EIA per la qualificazione degli allergeni di NRL superano molte delle limitazioni dei precedenti metodi utilizzando allergeni caratterizzati e altamente purificati e anticorpi monoclonali specifici rispetto agli allergeni di NRL che è noto che sono presenti nei manufatti di NRL. Le prove hanno alta specificità, nonostante la presa di altre proteine o sostanze chimiche derivate dal processo di fabbricazione dei manufatti di NRL, nonché alta sensibilità. Le prove tecnicamente sono relativamente facili da eseguire e i risultati possono essere ottenuti in tempi di prova brevi (<2 h). Gli svantaggi comprendono i costi attualmente alti e il fatto che non sia ancora possibile stabilire con certezza quali dei tanti allergeni di NRL noti siano necessari per stabilire le raccomandazioni e i limiti di sicurezza. Inoltre può essere necessario un ampio numero di anticorpi monoclonali per assicurare l'individuazione di tutti gli allergeni pertinenti. Attualmente sono disponibili in commercio prove e/o reagenti per la misurazione dei quattro singoli allergeni di NRL mediante metodi di cattura basati sulle prove EIA. Qualora ulteriori allergeni dovessero dimostrarsi presenti in quantità significative nei manufatti di gomma, è possibile sviluppare nuovi reagenti e kit basati sulle strutture esistenti.

Un esperimento interlaboratorio riguardante la valutazione di tre metodi di prova che trattano la quantificazione delle proteine e degli allergeni di NRL nei guanti medicali è stato effettuato dal CEN/TC205/WG3 nell'anno 2002. Sono stati valutati i tre metodi di prova seguenti:

- Misurazione di allergeni specifici (vedere nota 4 al punto B.3.3.3).
- ASTM D 6499 (proteine antigeniche) [29].
- Analisi degli aminoacidi (proteina totale).

Da questo esperimento non è stato possibile trarre conclusioni in grado di raccomandare l'inserimento dei metodi di prova sopra menzionati nella presente norma europea come metodi normativi.

Sono necessari ulteriori studi approfonditi su una quantità rappresentativa dei guanti attualmente commercializzati in Europa e campioni di riferimento con concentrazioni accuratamente quantificate degli allergeni di interesse per poter validare le prestazioni e l'utilità delle nuove prove allergene-specifiche.

B.5

Riferimenti

- [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., 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

APPENDICE C ANALISI DEGLI AMMINOACIDI (AAA) MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)

(informativa)

C.1 Contesto

Di solito, la determinazione delle proteine si basa su reazioni colorimetriche a elementi strutturali particolari, che sono distribuiti in modo regolare nelle diverse proteine [1], [2], [3], [4], [5]. Pertanto il fattore di risposta differisce in modo considerevole da proteina a proteina [2], [4]. Inoltre, una certa quantità di sostanze interferisce nelle prove colorimetriche, sia reagendo in modo aspecifico con il colorante, sia inibendo lo sviluppo della colorazione.

L'analisi degli amminoacidi consente di superare i suddetti problemi. Questo dato di fatto è stato confermato dai risultati dello studio "Determinazione dei composti allergologicamente rilevanti nei guanti monouso - Correlazione dei dati chimici, allergologici e immunologici" condotto nell'ambito del programma "Misurazione e Prove" della Commissione Europea (MATI-CT 940060) [8]. In tale studio, la migliore correlazione tra i dati clinici (prova di inoculazione) e l'analisi chimica è stata rilevata nel caso in cui la concentrazione proteica si misurava con l'analisi degli amminoacidi [6].

Pur tuttavia, il metodo di Lowry dovrebbe essere utilizzato come metodo di riferimento da utilizzare per la determinazione delle proteine nei guanti di gomma naturale, poiché l'analisi degli amminoacidi sembra essere troppo poco comune e troppo complessa per un procedimento di riferimento. L'analisi degli amminoacidi può essere utilizzata per chiarire dei risultati dubbi ottenuti con il metodo di Lowry modificato. L'analisi degli amminoacidi non deve essere utilizzata ai fini della dichiarazione del contenuto di proteine, ma dovrebbe essere di aiuto per il fabbricante per evitare quelle sostanze che portano ad una determinazione delle proteine non corretta con il metodo di riferimento.

C.2 Principi di determinazione delle proteine mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione

Nella prima fase, le proteine sono idrolizzate con acido cloridrico 6 M. Gli amminoacidi liberi ottenuti sono quindi separati e identificati mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione [7]. La quantificazione con un riferimento interno (norvalina) e la successiva somma dei singoli amminoacidi indicano il contenuto totale di proteine. A causa di questo procedimento, il metodo è indipendente da qualsiasi caratteristica strutturale della molecola polimerica originale. Fino ad oggi non sono state rinvenute sostanze interferenti, ma la presenza di sali del TES sembra prevenire la perdita di amminoacidi (per esempio mediante effetti parete).

C.3 Materiale**C.3.1** DL-Norvalina.**C.3.2** HCl ultrapuro al 30%.**C.3.3** Riferimento di amminoacido (contenente L-alanina, cloruro di ammonio, L-arginina, L-acido aspartico, L-acido glutammico, glicina, L-istidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina in quantità pari a 0,5 mM ciascuno e L-cistina in quantità pari a 0,25 mM).**C.3.4** Proteina di metanolo di grado di sequenza.**C.3.5** o-Ftaldialdeide (OPA).**C.3.6** Acido bórico.**C.3.7** Acido etilendiamminotetraacetico, sale bisodico (EDTA).

- C.3.8** Potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4).
- C.3.9** Sodio fosfato bibasico (Na_2HPO_4).
- C.3.10** Sodio fosfato monobasico (NaH_2PO_4).
- C.3.11** Acido 3-mercaptopropionico.
- C.3.12** Colonna di separazione: Hypersil ODS 3 μm , 150 \times 4,6 mm, pre-testata per applicazione di OPA.
- C.3.13** Precolonna: Hypersil ODS, 3 μm , 5 \times 4,6 mm.
- C.3.14** Acqua almeno di qualità Milli-Q o di qualità equivalente.
- C.3.15** Filtro con dimensione pori 0,2 μm .
- C.3.16** Tetraidrofurano (THF) di grado a gradiente per cromatografia liquida.
- C.3.17** Acetonitrile di grado a gradiente per cromatografia liquida.
- C.3.18** Contenitori di polipropilene con tappo a vite di 2 ml.
- C.3.19** Carbonato di sodio.
- C.3.20** Pellet di idrossido di sodio o idrossido di potassio.

C.4 Tamponi e soluzioni

Nota Il solvente 1 e il solvente 2 sono preparati per una colonna di OPA-1 di Grom, Herrenberg, Germania. Qualora si utilizzi una colonna diversa possono essere necessarie delle modifiche.

C.4.1 Norvalina-100

11,7 mg di norvalina (punto C.3.1) in 1 ml d'acqua (punto C.3.14) = 100 mM di norvalina.

C.4.2 Norvalina-1

100 μl di norvalina-100 (punto C.4.1) in 10 ml d'acqua (punto C.3.14) = 1 mM di norvalina, conservare a meno 8 $^\circ\text{C}$ non oltre 4 settimane.

C.4.3 o-Ftaldialdeide (OPA)

50 mg di o-Ftaldialdeide (punto C.3.5), 4,5 ml di metanolo (punto C.3.4), 50 μl di acido mercaptopropionico (punto C.3.11).

C.4.4 Tamponi borati

400 mM di sodio borato, 5 mM di EDTA, pH 10,4.

1,24 g di acido borico e 85 mg di EDTA in 30 ml d'acqua (punto C.3.14), regolare a pH 10,4 con 2 M di NaOH e aggiungere acqua (punto C.3.14) aggiungere 50 ml. Filtrare attraverso un filtro da 0,2 μm (punto C.3.15), conservare a temperatura ambiente non oltre due settimane. Evitare la refrigerazione che provocherebbe un precipitato insolubile.

C.4.5 Soluzione di arresto

1,36 g di KH_2PO_4 (punto C.3.8) in acqua (punto C.3.14), filtrare attraverso un filtro da 0,2 μm (punto C.3.15) e conservare a temperatura ambiente non oltre 4 settimane.

C.4.6 Tampone di fosfato

7,15 g di Na_2HPO_4 (punto C.3.8) e 3,45 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (punto C.3.9) in 1,5 l d'acqua (punto C.3.14).

- C.4.7 Solvente 1**
20 ml di tetraidrofurano (punto C.3.16) più 1 l di tampone di fosfato (punto C.4.6).
- C.4.8 Solvente 2**
250 ml di acetonitrile (punto C.3.17) 100 ml di tetraidrofurano (punto C.3.16) aggiungere 1 l con tampone di fosfato (punto C.4.6).
- C.4.9 Soluzione di carbonato di sodio (0,1 M)**
2,12 g di carbonato di sodio (punto C.3.19) in 10 ml d'acqua (punto C.3.14).
-
- C.5 Idrolisi**
- C.5.1 Campioni**
400 µl di estratto (in tampone TES) + 10 µl norvalina-1 (punto C.4.2) + 700 µl di HCl (punto C.3.3).
- C.5.2 Riferimenti**
380 µl d'acqua (punto C.3.14) + 20 µl di riferimento amminoacido (punto C.3.3) + 10 µl di norvalina-1 (punto C.4.2) + 700 µl di HCl (punto C.3.2).
- C.5.3 Incubazione (idrolisi)**
Incubare simultaneamente campioni e riferimenti per 48 h a 100 °C in contenitori di PP sigillati con tappo a vite (punto C.3.18). I contenitori dovrebbero essere fissati all'interno di una rastrelliera chiusa per evitare lo scoppio dei tappi. È molto importante che l'idrolisi dei riferimenti e dei campioni avvenga simultaneamente al fine di avere uguali condizioni di tempo e di temperatura.
Lasciare raffreddare i campioni e i riferimenti, essicarli in una centrifuga concentratrice da vuoto o in un essiccatore su NaOH o KOH sotto vuoto.
L'HCl deve essere rimosso completamente; altrimenti la capacità del tampone di borato per la derivatizzazione potrebbe non essere sufficiente.
- C.5.4 Amminoacidi liberi**
Preparare da ciascun estratto e dal riferimento un campione non idrolizzato.
- 400 µl di estratto + 10 µl di norvalina 1 (punto C.4.2);
 - 380 µl d'acqua (punto C.3.14) + 20 µl di riferimento di amminoacidi (punto C.3.3) + 10 µl di norvalina 1 (punto C.4.2).
-
- C.6 Analisi (HPLC)**
- C.6.1 Preparazione del campione**
- Aggiungere 20 µl di soluzione di carbonato di sodio ai campioni essiccati (punto C.4.9);
 - mescolare bene o sonicare;
 - incubare per 15 min a temperatura ambiente, mescolare di nuovo per rimuovere la CO₂;
 - aggiungere 180 µl di tampone borato (punto C.4.4).
- C.6.2 Derivatizzazione**
La fase di derivatizzazione è dipendente dal tempo e dalla temperatura; dovrebbe essere effettuata in un campionatore automatico a temperatura costante compresa tra 20 °C e 25 °C. Mescolare 25 µl di tampone borato (punto C.4.4), 12 µl di OPA (punto C.4.3) e 8 µl di campione.
Dopo 2,5 min terminare la reazione aggiungendo 25 µl di soluzione di arresto (punto C.4.5).

C.6.3 HPLC

L'analisi HPLC può essere effettuata in qualsiasi attrezzatura per HPLC utilizzando un sistema a gradiente e un rivelatore di fluorescenza.

Di seguito è riportato un esempio riuscito, ma queste condizioni devono essere adattate al sistema e alla colonna utilizzati.

Esempio:

Da 0 min a 2,5 min	0% di solvente 2	100% di solvente 1
Da 2,5 min a 3,0 min	Da 0% a 12,5% di solvente 2	Da 87,5% a 100% di solvente 1
Da 3,0 min a 9,0 min	12,5% di solvente 2	87,5% di solvente 1
Da 9,0 min a 13,0 min	Da 12,5% a 42% di solvente 2	Da 58% a 87,5% di solvente 1
Da 13,0 min a 24,0 min	42% di solvente 2	58% di solvente 1
Da 24,0 min a 26,0 min	Da 42% a 80% di solvente 2	Da 20% a 58% di solvente 1
Da 26,0 min a 30,0 min	80% di solvente 2	20% di solvente 1
Da 30,0 min a 31,0 min	Da 0% a 80% di solvente 2	Da 20% a 100% di solvente 1

C.6.4 Calcolo

La concentrazione dei singoli amminoacidi deve essere effettuata mediante un metodo riferimento interno con sottrazione degli amminoacidi liberi. La somma degli amminoacidi equivale al contenuto di proteina totale.

C.7 Esempi**C.7.1 Soluzione di riferimento**

Nella figura C.1 a) è illustrato un cromatogramma tipico di una soluzione di riferimento idrolizzata con 19 amminoacidi in concentrazione equimolare. Gli amminoacidi previsti sono elencati nel prospetto C.1. L'asparagina e la glutammina, che si convertono completamente in acido aspartico ed in acido glutammico, non sono incluse nella soluzione di riferimento. La norvalina, che non si evidenzia in modo naturale, è stata utilizzata come riferimento interno. Il triptofano e la cisteina erano presenti nella soluzione di riferimento non idrolizzata, ma sono stati distrutti dall'idrolisi in acido cloridrico. La prolina non reagisce con l'OPA/MPA a causa della mancanza di un gruppo amminico primario e pertanto non ha potuto essere individuata in queste condizioni di derivatizzazione. La lisina spesso produce due picchi, poiché uno o due dei suoi gruppi amminici possono reagire con l'OPA/MPA. Il rapporto tra questi due picchi è funzione delle condizioni di reazione (temperatura, invecchiamento della soluzione di OPA) e pertanto varia da un'esecuzione all'altra, il che non influenza i risultati purché si tenga conto di entrambe le aree dei picchi.

C.7.2 Estratto di quanto

Nella figura C.1 b) è illustrato un cromatogramma di un estratto idrolizzato di quanto (preparato come descritto nell'appendice A). Tale idrolisi delle proteine del lattice ha rivelato l'intera gamma di amminoacidi previsti (prospetto C.1). Alle scadenze di 14,23 min ed a 24,08 min sono stati rilevati degli ulteriori picchi che sono stati identificati come prodotti derivati dal TES. Tali picchi sono stati completamente separati rispetto a quelli di tutti gli amminoacidi e non hanno influenzato l'analisi.

C.8 Vantaggi e svantaggi del metodo con HPLC**C.8.1 Vantaggi**

- Non dipende dalla struttura polimerica della proteina.
- Rivela la miglior correlazione con i dati clinici (prova di inoculazione).
- Non si conosce l'esistenza di alcuna sostanza interferente.
- È più sensibile rispetto alle determinazioni colorimetriche.
- È altamente specifico per le proteine.

C.8.2 Svantaggi

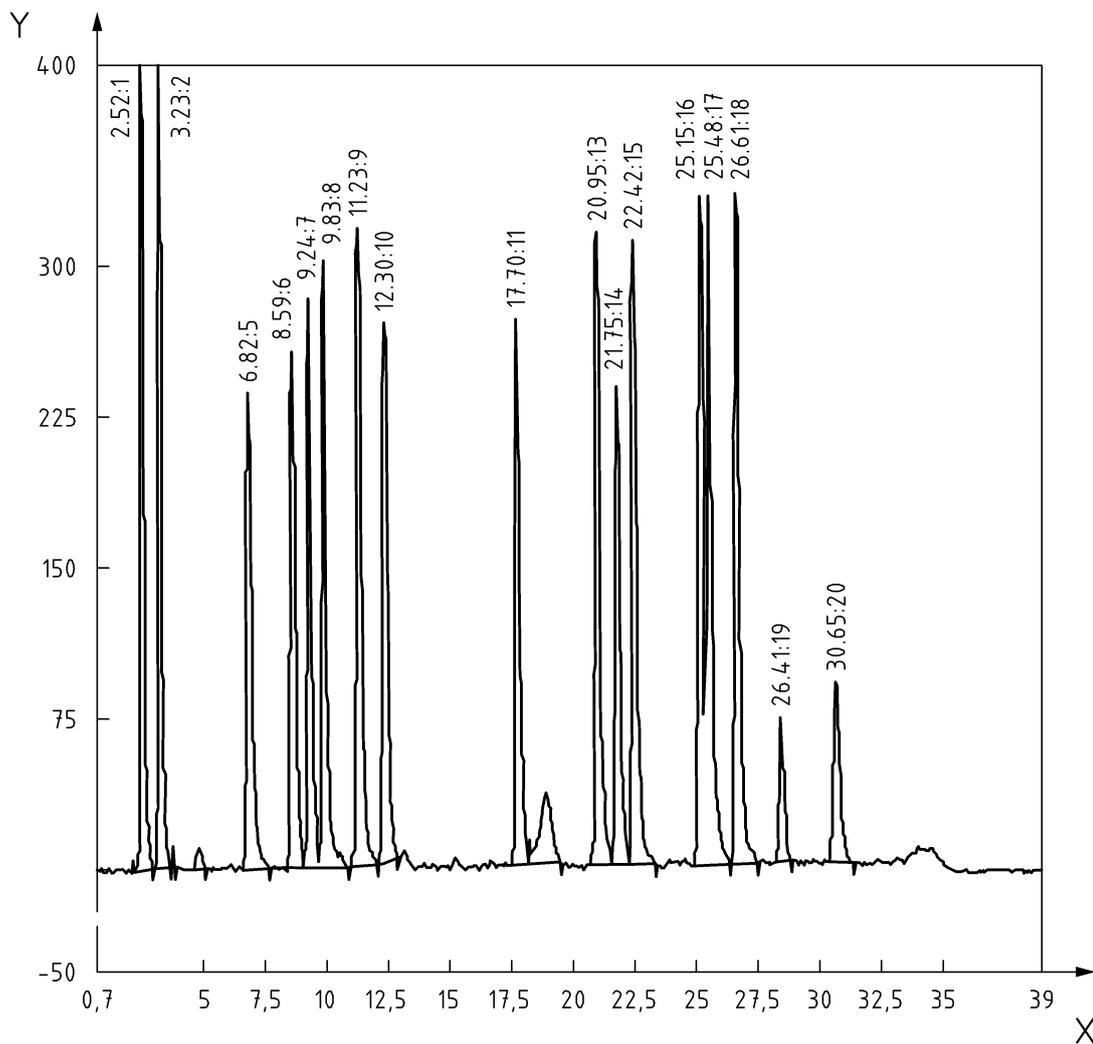
- È un metodo non comune, utilizzato solo in pochi laboratori.
- Richiede molto tempo.
- La valutazione molto complessa dei dati richiede parecchia esperienza.

prospetto C.1

Elenco degli aminoacidi ottenuti con HPLC di una soluzione di riferimento [figura C.1 a)] e con l'idrolisi di un estratto di guanto [figura C.1 b)]

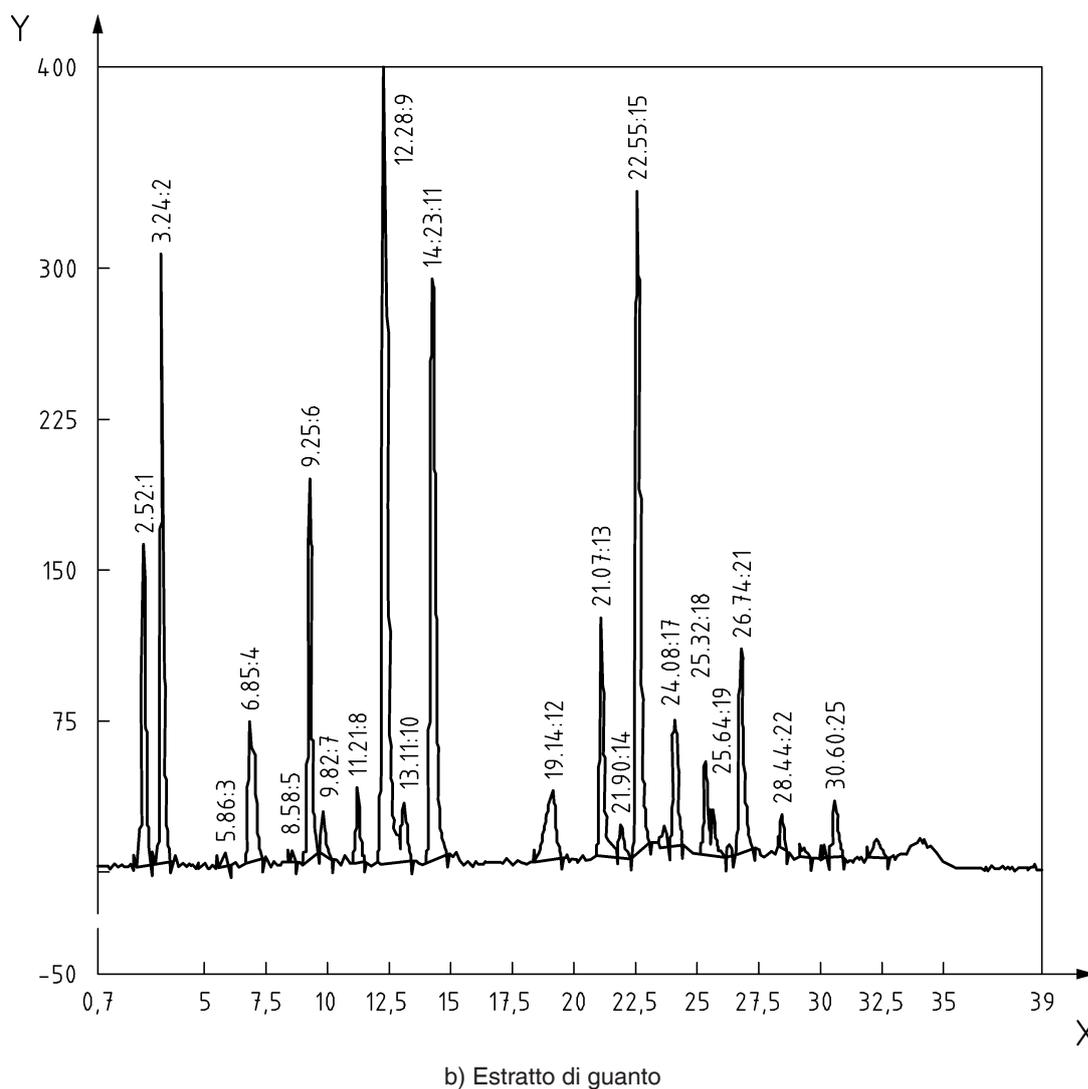
Aminoacido	Tempo di ritenzione, in min		Commenti
	Soluzione di riferimento	Analisi	
Acido aspartico (ASP)	2,52	2,52	
Asparagina (ASN)			Convertito in ASP
Acido glutammico (GLU)	3,23	3,24	
Glutamina (GLN)			Convertito in GLU
Serina (SER)	6,83	6,85	
Istidina (HIS)	8,60		
Glicina (GLY)	9,25	9,25	
Treonina (THR)	9,84	9,82	
Arginina (ARG)	11,24	11,21	
Alanina (ALA)	12,30	12,29	
		14,23	TES (tampone di estrazione)
Tirosina (TYR)	17,7		
Valina (VAL)	20,95	21,07	
Metionina (MET)	21,75	21,90	
Norvalina (NORVAL)	22,42	22,55	Riferimento interno
		24,08	TES (tampone di estrazione)
iso-Leucina (ILE)	25,15	25,32	
Fenilalanina (PHE)	25,48	25,64	
Leucina (LEU)	26,61	26,74	
Lisina (LYS)	28,41 30,65	28,44 30,60	
Triptofano (TRY)			Distrutto per idrolisi
Cistina o Cisteina (CYS)			Distrutto per idrolisi
Prolina (PRO)			Non individuabile

figura C.1 **Cromatogrammi tipici di una soluzione di riferimento di aminoacidi e di un'analisi di un estratto di guanto (35 µg di proteina)**



a) Soluzione di riferimento di aminoacidi

figura C.1 Cromatogrammi tipici di una soluzione di riferimento di aminoacidi e di un'analisi di un estratto di guanto (35 µg di proteina) (Continua)



C.9

Riferimenti

- [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

APPENDICE ZA RAPPORTO FRA LA PRESENTE NORMA EUROPEA E I REQUISITI ESSENZIALI DELLA DIRETTIVA UE 93/42/CEE CONCERNENTE I DISPOSITIVI MEDICI

(informativa)

La presente norma europea è stata elaborata nell'ambito di un mandato conferito al CEN dalla Commissione Europea e dall'Associazione Europea di Libero Scambio per fornire un mezzo per soddisfare i requisiti essenziali della Direttiva del Nuovo Approccio 93/42/CEE concernente i dispositivi medici.

Una volta che la presente norma è stata citata nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea come rientrante in quella Direttiva e che è stata adottata come norma nazionale in almeno uno Stato membro, la conformità ai punti della presente norma elencati nel prospetto ZA.1 conferisce, entro i limiti dello scopo e campo di applicazione della presente norma, una presunzione di conformità con i corrispondenti requisiti essenziali di quella Direttiva e regolamenti EFTA associati.

prospetto ZA.1

Corrispondenza tra la presente norma europea e la Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici

Punto(i)/sottopunto(i) della presente EN	Requisiti essenziali (RE) della Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici	Osservazioni/note qualificative
4	6, 7.1, 7.2, 7.5	
4.6	2, 13.1, 13.3	

Per i dispositivi destinati dal fabbricante al doppio uso in conformità all'Articolo 1(6) della Direttiva 93/42/CEE, il seguente prospetto ZA.2 fornisce nel dettaglio i requisiti essenziali pertinenti della Direttiva 89/686/CE Dispositivi di protezione individuali e i corrispondenti punti della presente norma europea. Il prospetto ZA.2, tuttavia, non implica alcuna citazione nella GUUE nella direttiva DPI e pertanto non fornisce la presunzione di conformità per la direttiva DPI.

prospetto ZA.2

Requisiti essenziali pertinenti della Direttiva 89/686/CEE Dispositivi di protezione individuali trattati dalla presente norma europea

Punto(i)/sottopunto(i) della presente EN	Requisiti essenziali (RE) della Direttiva 89/686/CEE concernente i dispositivi di protezione individuali	Osservazioni/note qualificative
4.2	1.2.1.1	

AVVERTENZA - Altri requisiti e altre Direttive UE possono essere applicabili al(ai) prodotto(i) che rientra(rientrano) nello scopo e campo di applicazione della presente norma.

