



IPA-Report 4

Abschätzung des allergisierenden Potenzials
von Naturlatexprodukten

Impressum

IPA-Report

Ausgabe 4

1. Auflage, Dezember 2010

Herausgeber

Institut für Prävention und Arbeitsmedizin
der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA)

Redaktion

Dr. Monika Zaghaw

Gestaltung

Bernd Naurath

Titelbild

Bernd Naurath

Druck

Druckzentrum Ruhr-Universität Bochum

Auflage:

50 Exemplare

ISSN

ISSN 2190-6785

Kontakt

IPA

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1

44789 Bochum

Telefon: (0234) 302-4501

Fax: (0234) 302-4505

E-Mail: oeff@ipa-dguv.de

Internet: www.ipa-dguv.de

IPA-Report 4

Abschätzung des allergisierenden Potenzials von Naturlatexprodukten – Abschlussbericht –

Erstellt durch

Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung,
Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA)

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1
44789 Bochum
D-44789 Bochum

Tel.: +49 234 3024501
Fax.: +49 234 3024505
E-Mail: ipa@ipa-dguv.de

im Rahmen der Diplomarbeit vorgelegt zur Erlangung des Grades einer Diplom-Biologin an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie der Ruhr-Universität Bochum von Yvonne von der Gathen

Beteiligte Wissenschaftler in alphabetischer Reihenfolge:

Prof. Dr. Monika Raulf-Heimsoth
Dr. Ingrid Sander
Dipl.-Biol. Yvonne von der Gathen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
2.1	Kautschuklatex	9
2.2	Naturlatexallergie als Beispiel für allergische Erkrankungen.....	9
2.3	Allergene Komponenten des natürlichen Kautschuklatex	11
2.3.1	Das Allergen Hev b 1.....	12
2.3.2	Das Allergen Hev b 3.....	13
2.3.3	Das Allergen Hev b 5.....	13
2.3.4	Das Allergen Hev b 6.02	14
2.4	Nachweisverfahren für Latexallergene	14
2.5	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Latexspezifischer IgE-Serumpool	17
3.1.2	Untersuchungsmaterialien	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Extraktionen.....	18
3.2.1.1	Extraktion nach IPA-Methode.....	18
3.2.1.2	Extraktion nach europäischer Norm (DIN EN 455-3)	18
3.2.2	Proteinbestimmung.....	19
3.2.2.1	Herstellen der Proteinamplifikation.....	19
3.2.2.2	Messung der Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen und Einmalfiltern	19
3.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach modifizierter Lowry-Methode	19
3.2.3	Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels IgE-Inhibitionstest	20
3.2.4	Entwicklung des Gesamtlatex-Sandwich-ELISA	20
3.2.5	Optimierung des Hev b 1-Sandwich-ELISA	21
3.2.6	Einzelallergenquantifizierung mittels FITkit®	22
3.2.7	Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.2.7.1	Auftrennen verschiedener Proben mittels SDS-PAGE	22
3.2.7.2	Silberfärbung der SDS-Gele nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine	23
3.2.8	Westerntransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen (IgG-Immunoblot).....	23
3.2.8.1	Westerntransfer (Westernblot)	23
3.2.8.2	IgG-Immunoblot zum immunologischen Nachweis von Proteinen.....	23
3.2.8.3	India-Ink-Färbung des Proteinstandards auf der Blot-Membran	23
3.2.9	Charakterisierung von Antikörpern mittels Dot-Blot	23
3.2.10	Auswertung und Statistik.....	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Proteinbestimmung.....	25
4.1.1	Proteinbindungskapazität der Zentrifugenröhrchen und der Einmalfilter	25
4.1.2	Bestimmung der Proteingehalte der untersuchten Latexextrakte	25

4.1.2.1	Bestimmung der Proteingehalte in den Extrakten der Drogerieartikel	25
4.1.2.2	Proteingehalte in Handschuhen	26
4.2	Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels IgE-Inhibition.....	28
4.2.1	Charakterisierung der für den IgE-Inhibitionstest verwendeten Antikörper.....	28
4.2.2	Bestimmung des Latexallergengehaltes der Drogerieartikel mittels IgE-Inhibitionstest	28
4.2.3	Bestimmung des Latexallergengehaltes der Handschuhe mittels IgE-Inhibition.....	28
4.3	Bestimmung des Latexgehaltes der Proben mittels Gesamtlatex-Sandwich-ELISA.....	30
4.3.1	Charakterisierung der für den Gesamtlatex-ELISA verwendeten Antikörper	31
4.3.2	Bestimmung des Latexantigengehaltes der Drogerieartikel mittels Gesamtlatex-ELISA	31
4.3.3	Bestimmung des Latexantigengehaltes in den Handschuhen mittels Gesamtlatex-ELISA.....	32
4.4	Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes mittels Hev b 1-ELISA in den Proben.....	33
4.4.1	Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes in den Drogerieartikeln.....	34
4.4.2	Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes in den Handschuhen.....	34
4.5	Einzelallergenquantifizierung mittels FITkit®	35
4.5.1	FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung	35
4.5.1.1	FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten.....	35
4.5.1.2	FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung in den Handschuhextrakten.....	36
4.5.2	FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung.....	36
4.5.2.1	FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten	36
4.5.2.2	FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung in den Handschuhextrakten	37
4.5.3	FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung.....	37
4.5.3.1	FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten	37
4.5.3.2	FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung in den Handschuhextrakten.....	38
4.5.4	FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung.....	40
4.5.4.1	FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten	40
4.5.4.2	FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung in den Handschuhextrakten	40
4.6	Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Latexprodukte mittels SDS-PAGE und IgG-Immunoblot	40
4.6.1	Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Drogerieartikel.....	40
4.6.2	Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Handschuhe	42
4.7	Vergleich zwischen den Protein- und Allergenbestimmungsmethoden	43
5	Diskussion	47
5.1	Weiterentwicklung der Sandwich-ELISA	47
5.2	Genereller Vergleich der verwendeten Methoden	49
5.3	Latexallergengehalt in aktuell verwendeten Untersuchungs- und Operationshandschuhen	50
5.4	Latexallergengehalt in aktuell verwendeten Haushalts- und Drogerieartikeln	53
5.5	Unterschiede der Latexallergengehalte zwischen Handschuhen und Drogerieartikeln	55
	Anhang	57
	Literaturverzeichnis.....	58
	Abkürzungsverzeichnis	63

1 Zusammenfassung

Allergene sind für Gesunde harmlose Umweltstoffe, die als Ausdruck einer Fehlregulation des Immunsystems eine allergische Erkrankung induzieren bzw. auslösen können. Klassischerweise lassen sich Allergene aufgrund ihrer Herkunft einteilen: natürliche Allergene pflanzlichen, tierischen, mikrobiellen Ursprungs im Gegensatz zu Chemikalien (z.B. Isocyanate) androgenen Ursprungs. Im Berufsleben kommt der Mensch mit zahlreichen Fremdstoffen in Berührung und weit über 250 Stoffe der Arbeitswelt können unterschiedlichste Arten von Allergien (Fließschnupfen, Augentränen, Kontakturtikaria, Asthma bronchiale) auslösen. Berufsbedingte allergische Erkrankungen sind die fünfthäufigste Berufskrankheit in Deutschland.

Die Naturlatexallergie war vor allem ein Phänomen des ausgehenden 20. Jahrhunderts, da hier infolge der AIDS-Prophylaxe der Gebrauch von gepuderten Latex-Einmalhandschuhen in den Krankenhäusern und Arztpraxen stark anstieg. Im Zeitraum von 1984-1993 vervielfachte sich der Verbrauch von latexhaltigen Einmalhandschuhen in Großkliniken erheblich. Etwa 10% der Beschäftigten im Gesundheitswesen waren von der Latexallergie betroffen, aber auch Patienten insbesondere mit häufigen Operationen (z.B. Spina bifida Patienten). Die Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung über die Allergenität der Latexproteine sowie die Bedeutung des Puders als Träger von Latexallergenen und Vermittler der aerogenen Allergenbelastung haben zu zahlreichen präventiven Maßnahmen geführt (z.B. latexfreie Operationssäle). Seit 1998 gilt die Austauschpflicht für gepuderte Latexhandschuhe, d.h. gepuderte sind durch puderfreie, latexallergenarme zu ersetzen. Diese rechtsverbindliche Austauschpflicht und das besondere Engagement aller Akteure im Gesundheitsschutz haben dazu geführt, dass bereits 1999 ein Absinken der gemeldeten Verdachtsanzeigen von Berufskrankheiten als Folge von Latexallergien mit fortgesetztem Positivtrend zu verzeichnen war.

Nach wie vor kann die Verwendung von Produkten aus Naturlatex bei exponierten und entsprechend empfänglichen Personen zu Sensibilisierungen führen beziehungsweise bei bereits sensibilisierten auch IgE-vermittelte Allergien hervorrufen. Ziel dieser Arbeit war es, das allergisierende Potenzial von aktuell verfügbaren Latexprodukten mit Hilfe verschiedener Bestimmungsmethoden abzuschätzen, die teilweise im Rahmen dieser Arbeit zunächst entwickelt und optimiert wurden. Zur Abschätzung des allergisierenden Potenzials wurden mit verschiedenen Messmethoden der Protein- und Gesamtlatexallergengehalt sowie der Gehalt an vier Latexhauptallergenen bestimmt. Dabei handelt es sich um die Hauptallergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02, die eine Bedeutung für die beiden Risikogruppen Beschäftigte im Gesundheitswesen und Spina bifida-Patienten haben.

Teilziele dieser Arbeit waren die Etablierung bzw. Optimierung zweier immunologischer Messverfahren:

- Entwicklung eines Sandwich-ELISA auf Basis von Kaninchenpolyklonalen Antikörpern (pAK) zur Quantifizierung der Gesamt-latexallergene bzw. Antigene
- Optimierung eines am IPA bereits entwickelten Sandwich-ELISA zur Quantifizierung des Latexallergens Hev b 1 auf Basis von monoklonalen Antikörpern (mAK)

Beide Teilziele konnten erreicht werden. Der neu entwickelte Gesamt-latex-ELISA weist einen Messbereich zwischen 5 - 996 ng/ml auf. Durch die Charakterisierung der pAK wurde festgestellt, dass in diesem Test einige wichtige Latexallergene in rekombinanter Form, vor allem Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 5, nur schlecht erkannt werden. Zusätzlich werden aber Proteine detektiert, die nicht als Allergene identifiziert sind. Der Gesamt-latex-ELISA kann damit eher als Nachweismethode für Antigene als für Allergene gesehen werden.

Der Hev b 1-ELISA konnte erfolgreich auf die heutigen Laborbedingungen umgestellt werden. Vor allem die Umstellung auf das verstärkend wirkende Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erhöhte die Sensitivität des Hev b 1-ELISA, so dass dieser damit eine um den Faktor 20-25 höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu dem ursprünglichen Testverfahren erreichte.

Neben diesen beiden Verfahren wurden sechs weitere Quantifizierungsmethoden für Latexproteine bzw. Allergene eingesetzt:

- Proteinbestimmung mittels modifizierter Lowry-Methode
- IgE-Inhibitionstest mit einem Serumpool latexsensibilisierter Patienten im ImmunoCAP-System zur Bestimmung von Gesamt-latexallergenen
- Nachweis der vier Einzelallergene Hev b 1, 3, 5 und 6.02 mittels kommerzieller ELISA (FITkits), wobei es sich um immunologische Nachweisverfahren auf der Basis von Maus mAK handelt

Insgesamt 18 Handschuhe aus dem Gesundheitsbereich und 15 unterschiedliche Drogerieartikel wurden mit den acht Testverfahren gemessen. Dabei wurden die Handschuhe mit zwei verschiedenen Verfahren extrahiert: zum einen nach der europäischen Norm DIN EN 455-3, nach der nur die innere und äußere Oberfläche eines Handschuhs extrahiert wird, und zum anderen nach einer Methode des IPA, bei der der Handschuh in kleine Stücke zerschnitten wird.

Die mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse wurden miteinander verglichen und zeigten zum Teil sehr hohe Korrelationen:

- Die Extrakte nach EN- und IPA-Methode ergaben bei fast allen Latexquantifizierungsmethoden Ergebnisse mit hoher Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen $r=0,83$ und $r=0,98$). Im Durchschnitt lieferte die IPA-Methode höhere Werte.
- Ein Vergleich der durch IgE-Inhibitionstest bzw. mit Gesamt-latex-ELISA ermittelten Latexallergengehalte zeigte ähnlich hohe Werte mit hoher Korrelation (nach Spearman: $r=0,73$, $p<0,05$; nach Pearson: $r=0,547$, $p<0,05$).
- Zwischen dem Protein- und Latexgesamtallergengehalt zeigte sich nur eine schwache Korrelation.

Die Messergebnisse der in der Arbeit untersuchten Latexartikel lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Ergebnisse der Handschuhe für den professionellen Einsatz im Gesundheitswesen:
 - Der für Handschuhe empfohlene Richtwert von $30 \mu\text{g}$ Protein pro Gramm Handschuh wurde in fünf von 18 Handschuhen (EN-Methode) teilweise deutlich überschritten.
 - Drei Handschuhe fielen in fast allen Methoden durch ihren hohen Gehalt an Protein und Latexallergenen auf.
 - Kein Einzelallergen kam in den Handschuhen vorrangig vor.
- Ergebnisse der Drogerieartikel für den privaten Gebrauch:
 - Der Luftballon wies besonders hohe Protein- und Latexallergengehalte auf, die höher als in hochbelasteten Handschuhen waren.
 - Die meisten Kondome enthielten sehr hohe Gehalte an Protein, Gesamtlatexallergen, wie auch Einzelallergenen.
 - Die Säuglingsartikel waren nicht so stark belastet und ein Abkochen führte zu einer erheblichen Reduktion der Protein- und Latexallergengehalte. Proteine und das Allergen Hev b 1 konnten jedoch nicht komplett entfernt werden.

Bei den Drogerieartikeln dominierte das Allergen Hev b 1. Von den vier gemessenen Einzelallergenen konnte dieses am häufigsten und in höheren Konzentrationen bestimmt werden.

Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass das allergisieren-

de Potenzial der gegenwärtig auf dem Markt befindlichen Latexprodukte auch heute teilweise noch sehr hoch ist. Da nicht nur im Gesundheitswesen Beschäftigte oder Patienten mit häufigen Operationen exponiert sind, sondern auch Verbraucher, kann dieser durch Artikel wie Luftballons, Kondome oder sogar Säuglingsartikel (z.B. Sauger) mit Latexallergenen in Kontakt kommen. Da ein Sensibilisierungspotenzial nicht ausgeschlossen werden kann, ist zu fordern, dass die Herstellung der Latexprodukte von den Produzenten in dieser Hinsicht auch in Zukunft verbessert und stärker kontrolliert wird. Für Latexallergiker sollten sicher latexfreie Produkte zur Verfügung stehen.

2 Einleitung

2.1 Kautschuklatex

Es gibt etwa 2500 Pflanzenspezies, die Naturgummi produzieren. Naturgummi ist eines der wichtigsten, natürlich von Pflanzen produzierten Polymere, da es als Rohmaterial für mehr als 40000 Produkte verwendet wird [Mooibroek & Cornish, 2000]. Dazu zählen zahlreiche medizinische Gebrauchsgegenstände, allen voran Untersuchungs- und Operationshandschuhe aber auch Katheter, Drainageschläuche, Verbände und Injektionsspritzen. Außerdem werden zahlreiche Gebrauchsartikel des Alltags, wie zum Beispiel Luftballons, Spielzeug, Schuhe, Kondome, Säuglingsartikel (Sauger), die Klebmasse von Briefmarken und Pflastern, Gummidichtungen sowie Autoreifen aus Naturgummi hergestellt [Deval et al., 2008; Wrangsjö et al., 1988; Breiteneder & Scheiner, 1998].

Bereits 1600 vor Christus wurden von den Einwohnern Mittelamerikas Produkte, vor allem Bälle für Ballspiele, welche in der alten mittelamerikanischen Gesellschaft eine zentrale rituelle Bedeutung hatten, aus Gummi hergestellt. Dafür wurde hauptsächlich Gummi von *Castilla elastica*, einem Baum aus der Familie der Maulbeergewächse, verwendet, welches mit dem Milchsaft von *Ipomoea alba* (einer Kletterpflanze aus der Gattung der Prunkwinden) gemischt wurde [Hosler et al., 1999]. Ab dem 15. Jahrhundert wurde von südamerikanischen Indianern, neben anderen Latexquellen, Gummi vom Kautschukbaum *Hevea brasiliensis* (Parakautschukbaum) zur Herstellung von Bällen, Schuhen und Flaschen genutzt [Raulf-Heimsoth, 2000].

Heutzutage wird Naturkautschuk fast ausschließlich aus dem brasilianischen Kautschukbaum *Hevea brasiliensis* gewonnen, der zu der Familie der *Euphorbiaceae* gehört [Mooibroek & Cornish, 2000; van Beilen & Poirier, 2007; Breiteneder, 1998] und ursprünglich in der Amazonas-Region Südamerikas beheimatet war [Pumphrey, 1994]. Dadurch hatte Brasilien bis 1876 ein Monopol in der Kautschukproduktion und weder Pflanzen noch Samen durften exportiert werden.

Dann wurden einige Samen von dem Briten Wickham nach London gebracht, aber nur wenige Pflanzen konnten daraus herangezüchtet werden. Als der Gummibedarf durch die Auto-, Elektro- und Fahrradindustrie nach 1919 gewaltig anstieg, wurden diese wenigen Pflanzen als Grundlage der Kautschukplantagen in Malaysia und Indonesien (Abb. 1) genutzt [Lieberei & Reisdorff, 2007]. Zur kommerziellen Latexproduktion wird *Hevea brasiliensis* mittlerweile in einigen tropischen Ländern, darunter Malaysia, Thailand, Indonesien und Indien, angebaut [Dennis & Ownby, 2002].



Abb. 1: Kautschukbaumplantage zur Latexgewinnung

Bei dem von den Parakautschukbäumen produzierten Naturgummilatem handelt es sich um eine milchige Flüssigkeit, die in spezialisierten pflanzlichen Zellen, den Latiziferzellen, gebildet

wird. Die Flüssigkeit ist das milchige Zytoplasma der Latiziferzellen und enthält die cis-1,4-Polyisopreneinheiten, woraus Naturlatex synthetisiert wird. Durch die Latiziferzellen wird ein röhrenartiges Netzwerk durch die ganze Pflanze aufgebaut. Bei der Ernte des Naturlatex wird die Borke der Parakautschukbäume angeschnitten, wodurch die Latiziferzellen verletzt werden und ihr Zytoplasma gewonnen werden kann [Breiteneder, 1998]. Die Latexmilch fließt für ein bis zwei Stunden langsam aus den angeschnittenen Latiziferzellen in ein Auffanggefäß (Abb. 2), bis an der Schnittstelle die Latiziferzellkanäle durch koagulierendes Latex verstopft werden [Paardekooper, 1989]. Die Koagulation der ausgetretenen Latexmilch wird durch Zugabe von Ammoniak in unterschiedlichen Konzentrationen (0,2-16 %) verhindert [Raulf-Heimsoth, 2000]. Die Parakautschukbäume können fünf bis sieben Jahre nach dem Auspflanzen das erste Mal und dann 30 Jahre lang angeschnitten werden. Der Schnitt wird täglich oder alle zwei bis drei Tage, allerdings mit Ruhepausen, erneuert [Lieberei & Reisdorff, 2007]. Die Latexmilch besteht zu 34 % aus Polyisopreneinheiten, also Gummi, zu 2-3 % aus Proteinen, zu 1,5-3,5 % aus Harzen, zu 1-2 % aus Zucker, zu weniger als jeweils 1 % aus Asche bzw. Sterolglykosiden und zu 55-65 % aus Wasser [Deval et al., 2008].



Abb. 2: Anschnitt eines Parakautschukbaumes zur Gewinnung von Rohlatex

2.2 Naturlatexallergie als Beispiel für allergische Erkrankungen

Der Begriff „Allergie“ leitet sich aus dem Altgriechischen von den Worten allos (anders, fremd) und ergon (die Arbeit, Reaktion) ab. Erstmals wurde der Begriff „Allergie“ 1906 von Clemens von Pirquet geprägt, der Allergie als eine veränderte Reaktivität eines Individuums bei Exposition gegen einen harmlosen Fremdstoff definierte [Roitt et al., 1995]. Wenn ein Individuum nach dem Kontakt mit einem Antigen oder Allergen Immunglobulin E-Antikörper (IgE-AK) produziert (Sensibilisierungsphase) und dann erneut mit dem gleichen Allergen in Kontakt kommt, so treten allergische Reaktionen auf. Immunglobulin E (IgE) ist unter normalen Umständen hauptsächlich für die Abwehr parasitärer Krankheitserreger, u.a. Nematoden, verantwortlich. In den Industrienationen überwiegen allerdings IgE-Reaktionen auf harmlose Umweltantigene. In der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung kommt es zu einer zunehmenden Anzahl an Sensibilisierungen [Weißbuch Allergie 2010]. Heute wird Allergie als „Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird“ definiert [Janeway et al., 2002]. Typische allergische Symptome sind zum Beispiel atopische Dermatitis, Heuschnupfen oder Asthma bronchiale. Coombs und Gell (1975) nahmen erstmals eine schematische Einteilung der Überempfindlichkeitsreaktionen in vier Typen (I-IV) vor, welche in der klinischen Praxis jedoch häufig als Mischformen beobachtet werden. Bei Typ I-Reaktionen handelt es sich um IgE-vermittelte Reaktionen vom Soforttyp, welche durch die Aktivierung der Mastzellen hervorgerufen werden. Typ

IV-Reaktionen zeigen verzögerte Überempfindlichkeitsreaktionen. Bei diesem Typ setzen spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten Zytokine frei und verursachen so Entzündungsreaktionen, wie allergische Kontaktekzeme.

Bei der „Naturlatexallergie“ wird eine Allergie durch Naturlatex (NRL) hervorgerufen. Latexallergien treten als Typ IV-Überempfindlichkeitsreaktionen oder als solche vom Typ I auf. Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV sind die eigentlichen Auslöser allerdings die Gummi-Zusatzstoffe, wie Vulkanisierungsmittel, Thiurame, Antioxidantien oder Konservierungsstoffe [Frosch et al., 1987; Heese et al., 1995; Fuchs et al., 1995]. Dabei kommt es bis zu 72 Stunden nach dem Kontakt mit Latex zu Rötungen, Juckreiz und Bläschenbildung auf der Haut. Der Allergie vom Soforttyp kam insbesondere im letzten Jahrzehnt des vergangenen Jahrtausends die größere Bedeutung zu. Hier liegen spezifische IgE-Antikörper gegen Naturlatexproteine eines sensibilisierten Menschen zu Grunde [Axelsson et al., 1987].

Bereits 1927 wurden von Stern bei einem Patienten erstmals allergische Reaktionen gegen Naturlatex beschrieben. Nach dem Kontakt mit Naturlatex bei einer zahnärztlichen Behandlung litt er an Urtikaria und Quinckeschem Ödem. Ebenfalls im Jahr 1927 berichtete Grimm über einen Patienten, bei dem asthmatische Symptome durch den Rauch eines schmorenden Elektrokabels, das eine Gummiummantelung aufwies, auftraten. Die IgE-vermittelte Soforttyp-Reaktion gegen Naturlatex stellte allerdings zu dieser Zeit kein großes medizinisches Problem dar, weshalb sie zunächst in Vergessenheit geriet [Raulf-Heimsoth et al., 2004]. 52 Jahre später, 1979, wurde von Nutter ein klarer Fall von latexinduzierter Allergie vom Soforttyp bei einem sensibilisierten Patienten beschrieben. Dieser reagierte bei einem Hauttest (Skin Prick Test, SPT) mit einem Extrakt aus Latexhandschuhen. In den folgenden Jahren entstanden zahlreiche Berichte über allergische und anaphylaktische Reaktionen, ausgelöst durch Naturlatexkontakt. Es wurden dabei Reaktionen wie Kontakturtikaria, Rhinitis, Konjunktivitis und Asthma bronchiale, sowie der unter Umständen, durch Blutdruckabfall und blockierte Atemwege, lebensbedrohliche anaphylaktische Schock beschrieben. Dabei scheint es zu einem Fortschreiten der Symptome zu kommen [Sussman et al., 1991; Heese et al., 1995].

Durch den Anstieg an viralen Infektionen, vor allem HIV und Hepatitis, wurden ab Ende der 80er Jahre vermehrt Handschuhe zum Schutz vor Ansteckung benutzt. Der Verbrauch an gepuderten Latexhandschuhen im medizinischen Bereich stieg an, da Handschuhe aus synthetischen Kunststoffen mechanische wie preisliche Nachteile aufwiesen [Dennis & Ownby, 2002]. Außerdem wurde durch die steigende Nachfrage an Naturgummi die Produktion verändert. So wurden zum Beispiel Waschschriffe nicht mehr durchgeführt, um die Produktivität an Latexprodukten zu steigern. Dadurch wiesen die Handschuhe einen sehr hohen Protein- sowie Latexallergengehalt auf, wodurch das Sensibilisierungspotenzial erhöht wurde.

Auch heute gibt es Personengruppen, die einem besonderen Risiko ausgesetzt sind, an einer Latexallergie zu erkranken. Dazu zählen

Personen, die berufsbedingt sehr häufig mit Naturlatex in Berührung kommen, wie Beschäftigte des Gesundheitswesens, Laboratorien aber auch Reinigungskräfte, Friseure und Beschäftigte in der kautschukverarbeitenden Industrie [Garabrant & Schweitzer, 2002]. Die Sensibilisierung gegenüber Naturlatex erfordert nicht immer den direkten Kontakt zur Haut, wie bei Handschuhen, sondern kann auch über Schleimhäute oder parenteral ablaufen. Einer der wichtigsten Sensibilisierungswege ist die Aufnahme der Allergene durch die Luft. Besonders gepuderte Latexhandschuhe geben beim An- und Ausziehen die an den Puder gekoppelten Allergene in die Luft ab, wodurch sie von in der Nähe befindlichen Personen eingeatmet werden [Deval et al., 2008]. Eine weitere Risikogruppe stellen Personen dar, die sich zahlreichen Operationen unterziehen müssen. Besonders gefährdet sind Spina bifida-Patienten, also Kinder mit einem Defekt des Neuralrohrs. Aber auch Kinder mit einer Harnblasenekstrophie oder anorektalen Anomalien zeigen ein erhöhtes Risiko an einer Latexallergie zu erkranken [Spartà et al., 2004]. Die wichtigsten Sensibilisierungswege sind hier der direkte Blutkontakt und der mucosale Kontakt mit dem Naturlatex [Deval et al., 2008].

Die Art des Allergenkontaktes spiegelt sich dabei oft in den Symptomen der Latexallergie wieder. Der Hautkontakt mit Naturlatex durch das Tragen von Latexhandschuhen verursacht Urtikaria. Ist die Exposition einer Person gegenüber Latexallergenen aerogener Natur, so treten allergisch-entzündliche Veränderungen der Schleimhäute der oberen und unteren Atemwege auf. Betroffene Personen leiden dann zum Beispiel an einer Rhinitis oder an allergischem Asthma. Kommen die Allergene während einer Operation direkt mit der Blutbahn in Berührung, so kann die Folge ein anaphylaktischer Schock sein [Raulf-Heimsoth et al., 2004].

Eine Zusammenfassung verschiedener internationaler Studien aus dem Jahre 2003 ergab folgende Sensibilisierungsraten für unterschiedliche Risikogruppen: bei Spina bifida-Patienten traten Sensibilisierungen gegen Naturlatex in bis zu 72 % der Fälle auf, bis zu 30 % der Beschäftigten im Gesundheitswesen wiesen Latexsensibilisierungen auf. Bei Beschäftigten, welche beruflich mit Latex exponiert aber nicht im Gesundheitswesen beschäftigt waren, konnten bis zu 11 % Sensibilisierungen gegen Naturlatex gefunden werden. Bei atopischen latexexponierten Personen traten Sensibilisierungsraten von bis zu 36 % auf. In der Allgemeinbevölkerung mit und ohne atopischem Hintergrund wurden Sensibilisierungsraten von bis zu 8,6 % bzw. 2,3 % bestimmt [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003, Konz et al., 1995, Yassin et al., 1994, Tarlo et al., 1990, Vandenplas et al., 1995, Moneret-Vautrin et al., 1993, Porri et al., 1995].

Peixinho et al. (2008) beschrieben die Ergebnisse ihrer Studie zur Untersuchung unterschiedlicher Sensibilisierungsprofile in verschiedenen Risikogruppen. Ausschlaggebend für diese Studie war die Frage, warum die beiden Risikogruppen, Beschäftigte im Gesundheitswesen und Spina bifida-Patienten, unterschiedliche Sensibilisierungsprofile an Latexallergenen aufweisen, obwohl die Sensibilisierung in beiden Fällen in Kranken- und Pflegeeinrichtun-

gen stattfand. Für Beschäftigte im Gesundheitswesen gelten die Allergene Hev b 2, Hev b 5, Hev b 6.01 und Hev b 13 als Hauptallergene, während als Hauptallergene für Spina bifida-Patienten die Allergene Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 7 angegeben werden [Wagner et al., 2001, Bernstein et al., 2003, Chen et al., 1996, Chen et al., 1997a]. In einer aktuelleren Studie von Raulf-Heimsoth et al. (2007) wurde in Patientenseren die Konzentration allergenspezifischer IgE-Antikörper ermittelt. Untersucht wurden Seren von 104 Beschäftigten des Gesundheitswesens (51 Deutsche, 21 Portugiesische, 32 Amerikanische), 31 Spina bifida-Patienten (11 Deutsche, 20 Portugiesische) und zehn portugiesische Patienten mit mehreren Operationen. In dieser Studie wurden die Allergene Hev b 2, 5, 6.01 und 13 als Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen identifiziert. Die Allergene Hev b 2, 5 und 13 wurden außerdem zusammen mit den Allergenen Hev b 1 und Hev b 3 als Hauptallergene für Spina bifida-Patienten ermittelt. Es zeigte sich, dass die Sensibilisierungsmuster für Deutsche, Portugiesen und Amerikaner nicht unterschiedlich waren. Da die Allergene Hev b 1, 2, 5, 6.01 und 13 als Hauptallergene für die beiden Risikogruppen, Beschäftigte im Gesundheitswesen und Spina bifida-Patienten, identifiziert wurden, sollten diese z.B. in standardisierten Latextrakten vorhanden sein [Raulf-Heimsoth et al., 2007]. In der Studie von Peixinho et al. (2008) wurde die innere und äußere Oberfläche von Untersuchungs- und Operationshandschuhen auf ihren Gehalt an den Allergenen Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 untersucht, da nur für diese vier Hauptallergene kommerzielle Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Es wurde herausgefunden, dass die Hauptallergene für Spina bifida-Patienten, Hev b 1 und Hev b 3, hauptsächlich auf der äußeren Oberfläche der Handschuhe, die Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen, Hev b 5 und Hev b 6.02, hauptsächlich auf der inneren Oberfläche der untersuchten Handschuhe gefunden wurden. Diese Unterschiede in der Lokalisation der Allergene auf den Oberflächen der Handschuhe werteten die Autoren als Ursache für die Sensibilisierung der beiden Risikogruppen mit unterschiedlichen Allergenen. Als Grund für die unterschiedliche Verteilung der Latexallergene in den Handschuhen wurde die Produktionsmethode der Handschuhe angegeben. Dabei wird während der Vulkanisation das im Latex gebundene Wasser zu Dampf, der entweicht. Nach der Hypothese der Arbeitsgruppe transportiert der Dampf während er den Latexfilm passiert rückständige Nitrate und wasserlösliche Proteine mit. Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass die äußere Oberfläche der frisch hergestellten Handschuhe, die später die Innenseite der Handschuhe darstellt, somit reich an diesen Komponenten ist [Peixinho et al., 2008].

Obwohl seit 1999 in Deutschland die gemeldeten Verdachtsanzeigen auf Berufskrankheiten als Folge von Latexallergien sinken, werden heute weiterhin für die Latexallergie relevante Erkenntnisse erarbeitet. Die Abnahme an Latexsensibilisierungen ist auf die Umsetzung der Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung zur Allergenität von Latexprodukten und die Bedeutung des Puders als Träger der Latexallergene zurückzuführen [Raulf-Heimsoth et al., 2004]. Begründet darauf, konnten zahlreiche präventive Maß-

nahmen zum Schutz vor Latexsensibilisierungen eingeleitet werden. Nach den Technischen Regeln für Gefahrstoffe (TRGS) 540, die den Umgang mit sensibilisierenden Stoffen beschreiben, sind gepuderte Handschuhe durch puderfreie, latexallergenarme oder andere geeignete Handschuhe zu ersetzen [TRGS 540, 2000]. Aufgrund der Empfehlungen des „Task Force Committee on Allergic Reaction of Latex“ von 1993 finden seither in zahlreichen Kliniken die operativen Eingriffe an Spina bifida-Patienten in latexfreien Operationsräumen statt. Auch die medizinischen Untersuchungen werden mit latexfreien Materialien durchgeführt. Dadurch hat sich die Latexsensibilisierung bei Spina bifida-Patienten reduziert [Raulf-Heimsoth et al., 2004]. Im Jahr 2007 waren bei der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege (BGW) 70 Verdachtsmeldungen auf eine berufsbedingte Latexallergie eingegangen. Dies waren nur noch etwa 5 % der zur Zeit des Höhepunktes der Latexallergie (1998) gemeldeten 1262 Fälle [BGW-Presse-Info, 2008]. Da eine Latexallergie allerdings nicht heilbar ist und schwere Formen annehmen kann, ist eine weitere Erforschung der Latexallergie notwendig, um neue Sensibilisierungen zu vermeiden und bereits bestehende Allergien in ihrer Ausprägung eindämmen zu können. Anzumerken bleibt, dass die Präventionsmaßnahmen noch nicht in allen Ländern umgesetzt wurden. Crippa et al. (2006) schlossen aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass alle Produkte aus Naturlatex systematisch mit „enthält Naturlatex“ gekennzeichnet werden sollten. Außerdem sollte zusätzlich eine Warnung vor dem Auslösen allergischer Reaktionen bei sensibilisierten Personen die Kennzeichnung ergänzen.

2.3 Allergene Komponenten des natürlichen Kautschuklatex

Weniger als 3 % der Latexmilch von *Hevea brasiliensis* sind Proteine. Von den über 250 identifizierten Proteinen wurden 13 von der International Union of Immunological Societies (IUIS) als Allergene anerkannt [Yeang et al., 2006]. Die Proteine in der Latexmilch sind nicht homogen verteilt [Yeang et al., 2002], sondern können durch Ultrazentrifugation in drei Hauptfraktionen unterteilt werden.

Diese sind nach Moir (1959):

1. weiße obere Schicht aus Gummipartikeln
2. wässrige Schicht, die das Zytoplasma der Latiziferzellen enthält und als C-Serum bezeichnet wird, sowie
3. der Bodensatz, welcher hauptsächlich aus Lutoiden (lysosomale Mikrovakuolen [d'Auzac et al., 1995]) besteht und als B-Serum bezeichnet wird.

Nach Yeang und Moir [Yeang et al., 2002; Moir, 1959] sind die Lokalisation der charakterisierten Latexallergene und die Verteilung der Proteingehalte in Abb. 3 gezeigt. Es zeigt sich, dass in den drei Fraktionen der ammoniakfreien Latexmilch die meisten Proteine im B- und C-Serum vorkommen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um wasserlösliche Proteine. Nur zwei unlösliche Proteine, welche 25-30 % der Gesamtproteine ausmachen [Posch et al., 1998], sind in der Schicht aus Latexpartikeln lokalisiert. Die Latexallergene können folglich in zwei Gruppen eingeteilt werden, die partikel-

assoziierten, nahezu wasserunlöslichen Latexallergene und die löslichen Latexallergene im B- und C-Serum. Das C-Serum enthält Proteine aus mehr als 200 einzelnen Komponenten mit Molekulargewichten zwischen 5 und 100 kDa. Im zweidimensionalen Immunoblot, mit Seren von Latexallergikern aus dem Gesundheitswesen, zeigen etwa 60 Polypeptide IgE-bindende Eigenschaften [Posch et al., 1997a; Posch et al., 1997b; Raulf-Heimsoth, 2000]. Die Proteine des B-Serums weisen Molekularmassen eines etwas schmalen Bereichs auf. Diese sind zwischen etwa 14 und 45 kDa groß [Yip & Cacioli, 2002].

Zu den Proteinen des C-Serums gehören die vier charakterisierten Latexallergene Hev b 5, Hev b 7.02, Hev b 8 und Hev b 9. Das B-Serum beinhaltet eine Gruppe von neun charakterisierten Latex-

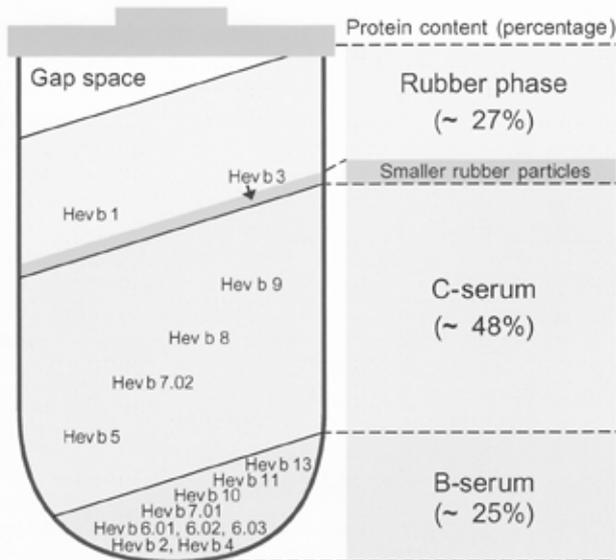


Abb. 3: Lokalisation der charakterisierten Naturlatexallergene und Verteilung des Proteingehaltes in Naturlatexmilch, ohne Ammoniakzusatz nach Zentrifugation bei 53000 x g [modifiziert nach Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]

allergenen, Hev b 2, Hev b 4, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 10, Hev b 11 und Hev b 13 [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]. Die Allergene sind mit ihren biochemischen Namen und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermittelten Molekulargewichten in Tab. 1 zusammengefasst [IUIS, 2009; Raulf-Heimsoth, 2000].

Die Allergene wurden nach einer 1994 veröffentlichten Empfehlung der International Union of Immunological Societies (IUIS) benannt. In die Allergenbezeichnung gehen demnach die ersten drei Buchstaben des Gattungsnamens und der Anfangsbuchstabe des Artnamens, sowie eine der Reihenfolge der Erstbeschreibung entsprechende arabische Zahl ein [King et al., 1994].

Obwohl nur ein geringer Teil des Kautschuklatex (<3 %) aus Proteinen besteht, handelt es sich dabei um die allergenen Kompo-

Tab. 1: *Hevea brasiliensis*-Allergene. Aus der Allergenliste der International Union of Immunological Societies inklusive der biochemischen Namen und der mittels SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichte [IUIS, 2009; Raulf-Heimsoth, 2000].

Allergen	Biochemischer Name/ biologische Funktion	Molekulargewicht [kDa]
Hev b 1	Rubber elongation factor (REF), partikelgebunden; Funktion bei der Synthese des Kautschuks	14,6
Hev b 2	Beta-1,3-glucanase; Pathogenese-related (PR)-Protein, beteiligt an Abwehr von Mikroorganismen	34
Hev b 3	Small rubber particle protein; Sequenzhomologie zu Hev b 1, partikelgebunden	24
Hev b 4	Lecithinase-Homolog (Komponente eines Mikrohelix-Proteinkomplexes)	53-55
Hev b 5	saures Strukturprotein, Funktion unbekannt	16
Hev b 6.01	Prohevein; besteht aus zwei Domänen, welche translational gespalten werden	20
Hev b 6.02	Hevein; Homologie zu unterschiedlichen Chitin-bindenden Proteinen	4,7
Hev b 6.03	C-terminale Domäne des Prohevein	14
Hev b 7	Patatin-ähnliches Protein (Patatine sind-Speicherproteine der Solanaceae)	42
Hev b 8	Profilin (in der Zytosolfraction des Rohlatex)	15
Hev b 9	Enolase; im Pflanzenreich häufig vorkommende Enzym	51
Hev b 10	Superoxiddismutase (Mn)	26
Hev b 11	Class I chitinase	30
Hev b 12	unspezifisches Lipidtransferprotein 1	9
Hev b 13	Esterase	42

nenten des natürlichen Kautschuklatex. Von den 13 identifizierten Allergenen (Tab. 1) des Parakautschukbaumes wurden vier in dieser Arbeit mittels auf monoklonalen Antikörpern basierenden Nachweisverfahren quantifiziert. Bei den vier Allergenen handelte es sich um die beiden Hauptallergene für Spina bifida-Patienten, Hev b 1 und Hev b 3, sowie um die Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen, Hev b 5 und Hev b 6.02, für die kommerzielle Nachweisverfahren existieren. Aus diesem Grund wird im Folgenden genauer auf diese vier Hauptallergene eingegangen.

2.3.1 Das Allergen Hev b 1

Eines der partikelgebundenen Allergene ist Hev b 1. Hev b 1 ist das erste Protein, das Ende der 80er Jahre aus dem komplexen Proteingemisch der Latexmilch von *Hevea brasiliensis* durch Dennis und Light isoliert und charakterisiert wurde. Es wurde als ein aus 137

Aminosäuren bestehendes unglykosyliertes Protein beschrieben, mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa. Die Aminosäuren Methionin, Histidin, Tryptophan und Cystein, und damit Disulfidbrücken, fehlen in diesem Protein. Der Amino-Terminus (N-Terminus) enthält nur saure Aminosäuren und liegt nach posttranslationaler Modifikation acetyliert vor [Dennis & Light, 1989]. Das stark hydrophobe Protein besitzt die Möglichkeit Tetramere zu bilden und ist zu einem hohen Prozentsatz an Gummipartikel gebunden. Dieses Protein war das erste molekularbiologisch charakterisierte Latexprotein und wurde aufgrund der Untersuchungen von Dennis et al. als „rubber elongation factor“ (REF) bezeichnet, da dieses Protein an der Synthese des Gummis wesentlich beteiligt ist. Das Enzym Prenyltransferase benötigt REF als Kofaktor, um multiple cis-1,4-Isopreneinheiten zu Gummi zu synthetisieren [Dennis und Light, 1989; Dennis et al., 1989].

Vier Jahre später entdeckten Czuppon et al. (1993) die sensibilisierende Wirkung dieses Proteins und identifizierten REF als erstes Latexallergen von *Hevea brasiliensis*. Gemäß der internationalen Allergennomenklatur wurde es als Hev b 1 benannt. Bei Hev b 1 handelt es sich um ein latexspezifisches Allergen, welches keine relevanten Homologien zu anderen Pflanzenproteinen aufweist [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]. Untersuchungen aus dem Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA) konnten die Bedeutung von Hev b 1 als Allergen belegen [Chen et al., 1996; Chen et al., 1997b]. Mittels synthetischer Peptide und Bindungsstudien mit humanen und murinen Antikörpern (AK), sowie AK aus Kaninchen, haben Chen et al. (1996) herausgefunden, dass die Hauptepitope in der Region der Aminosäuren 31 bis 64 sowie im Bereich des Carboxyl-Terminus zwischen den Aminosäuren 122 und 134 liegen. Ein Jahr später konnten Chen et al. (1997b) zeigen, dass 81 % der Spina bifida-Patienten sowie 50 % der Beschäftigten im Gesundheitswesen mit Latexallergie IgE-Antikörper gegenüber diesem Protein besitzen. Hev b 1 wurde zusammen mit Hev b 3 auch von anderen Arbeitsgruppen als wichtiges Allergen für Spina bifida-Patienten beschrieben [Kurup et al., 2000; Bernstein et al., 2003]. In den Untersuchungen von Alenius et al. wiesen 67 % der Spina bifida-Patienten Hev b 1-spezifische Antikörper auf [Alenius et al., 1993; Alenius et al., 1996]. Neuere Studien, bei denen natives sowie rekombinantes Hev b 1 benutzt wurde, zeigen deutlich, dass Hev b 1 für Spina bifida-Patienten eines der Hauptallergene aus Hevea-Latex darstellt. Die IgE-Reaktivität von Spina bifida-Patienten mit Latexallergie liegt bei 54 % bis 100 %. Weniger bedeutend scheint dieses Allergen für Beschäftigte im Gesundheitswesen und andere latexallergische Personen zu sein, da dort die IgE-Reaktivität mit Hev b 1 nur bei 13 % bis 32 % liegt [Kurup et al., 2000; Raulf-Heimsoth et al., 2002; Bernstein et al., 2003]. Diese Ergebnisse wurden 2007 in einer Studie des IPA bestätigt. Raulf-Heimsoth et al. (2007) untersuchten das Serum von 145 Patienten aus den Risikogruppen: Beschäftigte im Gesundheitswesen, Spina bifida-Patienten, sowie Patienten mit vielen Operationen aus den Industrienationen Deutschland, Portugal und Amerika. Sie fanden heraus, dass es sich bei Hev b 1 neben Hev b 3, (aber auch den

Allergenen Hev b 2, 5 und 13) um die Hauptallergene für Spina bifida-Patienten handelt, während die Relevanz bei Beschäftigten im Gesundheitswesen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (< 20 % der Beschäftigten im Gesundheitswesen zeigen positive IgE-Antikörper Antworten gegenüber Hev b 1). Zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangen die Studien zum Beispiel durch andere Nachweismethoden und dadurch, dass unterschiedliche Patienten auch Unterschiede des spezifischen IgEs aufweisen.

2.3.2 Das Allergen Hev b 3

Bei Hev b 3 („small rubber particle protein“) handelt es sich um das zweite partikelgebundene Protein des Hevea-Latex. Erstmals wurde die sensibilisierende Wirkung des 23 kDa Proteins Hev b 3 von Alenius et al. (1993) beschrieben. Das 204 Aminosäuren große Protein zeigt eine 47-prozentige Sequenzhomologie zu Hev b 1 [Wagner et al., 1999] und ist frei von posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]. Durch die hohe Sequenzähnlichkeit der beiden Allergene Hev b 1 und Hev b 3 kommt es zu einer Kreuzreaktivität zwischen diesen Proteinen, welche ebenfalls von Wagner et al. (1999) beschrieben wurde. Von Antikörpern aus dem Serum von Spina bifida-Patienten mit Latexallergie wird Hev b 3 zu 58 % bis 100 % erkannt, bei Beschäftigten im Gesundheitswesen nur zwischen 6 % und 32 % [Kurup et al., 2000; Raulf-Heimsoth et al., 2002; Raulf-Heimsoth et al., 2007; Bernstein et al., 2003; Yip et al., 2000].

2.3.3 Das Allergen Hev b 5

Hev b 5 ist das wichtigste Allergen aus der Gruppe der C-Serumproteine. Es handelt sich um ein saures (pH 3,5) und hitzestabiles 16-24 kDa großes Protein, welches reich an den Aminosäuren Glutaminsäure und Prolin ist [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]. Wie die Allergenliste der International Union of Immunological Societies [IUIS, 2009] zeigt, ist die physiologische Funktion von Hev b 5 bis heute nicht bekannt. Das Allergen ist 151 Aminosäuren lang. Das native Hev b 5 wurde von Akasawa et al. 1996 charakterisiert, während Slater et al. (1996) das erste rekombinante Hev b 5 (rHev b 5) beschrieben. Letztere setzten das rekombinante Hev b 5 in serologischen Tests ein, in denen 56 % der latexallergischen Spina bifida-Patienten und 92 % der Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen mit rHev b 5 reagierten. Es wurden weitere Studien mit rHev b 5 durchgeführt. So zeigten sich in Hauttests Reaktionen bei 62 % der Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen bzw. bei 65 % der Spina bifida-Patienten [Bernstein et al., 2003; Yip et al., 2000]. Außerdem wurden von Raulf-Heimsoth et al. (2002) die Sensibilisierungsprofile von Spina bifida-Patienten und Beschäftigten im Gesundheitswesen untersucht. Dazu wurden die Seren der latexallergischen Patienten im ImmunoCAP auf ihre Reaktivität mit Einzelallergenen, unter anderem rHev b 5, untersucht. Für Hev b 5 zeigte sich bei den Spina bifida-Patienten bei 33 % der Proben eine Reaktion, bei den Beschäftigten im Gesundheitswesen bei 68 %. Während aufgrund dieser Ergebnisse Hev b 5 lange Zeit nur als Hauptallergen für Beschäftigte im Gesundheitswesen beschrieben wurde, zeigten die neuesten Ergebnisse der Studie von Raulf-Heimsoth et al. (2007), dass bei 50 % der Spina bifida-Patienten

spezifische IgE-Antikörper gegen rekombinantes Hev b 5 im untersuchten Serum nachgewiesen werden konnten. Beschäftigte im Gesundheitswesen wiesen eine IgE-Reaktivität von bis zu 75 % auf. Damit ist Hev b 5 nicht nur ein wichtiges Allergen für Beschäftigte im Gesundheitswesen, sondern auch für Spina bifida-Patienten.

2.3.4 Das Allergen Hev b 6.02

Das 187 Aminosäuren lange, 20 kDa Vorstufenprotein Prohevein (Hev b 6.01) wird posttranslational geschnitten, wodurch zwei Proteine generiert werden. Dabei handelt es sich um das 4,7 kDa große Hevein (Hev b 6.02) und die 14 kDa große C-terminale Domäne (Hev b 6.03) [Wagner & Breiteneder, 2005; Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003]. Alle drei Allergene kommen im Hevea-Latex vor [Yeang et al., 2002]. Von Banerjee et al. (1997) wurden die drei Proteine rekombinant hergestellt und basierend auf ELISA-Experimenten demonstriert, dass die meisten wichtigen IgE-bindenden Epitope des Proheveins nach der Spaltung auf dem kleinen Protein Hev b 6.02 liegen. Das Hevein zeigt homologe Strukturen zu Lektin und Endochitinasen und ist am Koagulationsprozess des Latex beteiligt, indem es die räumliche Annäherung der einzelnen Latexpartikel erleichtert [Raulf-Heimsoth, 2000]. Da Hev b 6.02-spezifische IgE-Antikörper in den Seren latexsensibilisierter Personen so häufig vorkommen, wird Hevein als Hauptallergen eingeordnet [Alenius et al., 1995; Chen et al., 1997a]. Neben Hev b 5 ist Hev b 6.01/6.02 das wichtigste Allergen für Beschäftigte im Gesundheitswesen und andere erwachsene Personen mit Latexallergie. Je nach Studie lag der prozentuale Anteil der mit dem Allergen reagierenden Patienten zwischen 40 % und 88 % [Kurup et al., 2000; Raulf-Heimsoth et al., 2002; Raulf-Heimsoth et al., 2007; Bernstein et al., 2003; Yip et al., 2000; Banerjee et al., 1997]. Zusätzlich spielt Hev b 6.02 bei dem Latex-Frucht Syndrom eine Rolle. Hevein zeigt zu 50 % Sequenz-übereinstimmungen zu Hevein-Domänen von Klasse-I-Chitinasen von Früchten [Wagner & Breiteneder, 2005]. Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Klasse-I-Chitinasen aus Früchten, wie Banane und Avocado, und Hev b 6.02 wurden bereits beschrieben [Wagner & Breiteneder, 2002; Chen et al., 1998; Posch et al., 1999]. Die Homologien könnten auch für Kreuzreaktionen mit zahlreichen anderen Pflanzen und Lebensmitteln verantwortlich sein [Yeang et al., 2002].

Neben den vier beschriebenen Einzelallergenen Hev b 1, 3, 5 und 6.02, für deren Nachweis kommerzielle Testmethoden verfügbar sind, wurden in dieser Arbeit Nachweismethoden genutzt, die den Gehalt an Gesamtlatexallergenen bzw. -antigenen bestimmen. Die Bestimmung des Latexallergen- bzw. -antigengehaltes erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden, deren Prinzip im folgenden Kapitel beschrieben wird.

2.4 Nachweisverfahren für Latexallergene

Neben der Proteinbestimmung wurden verschiedene Testverfahren auf Antikörperbasis benutzt, welche die Erkennung von Allergenen des menschlichen Immunsystems simulieren. Die Basis dieser Verfahren bilden die Antikörper, wobei man zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern unterscheidet. Unter polyklonalen

Antikörpern versteht man ein Gemisch aus Einzelantikörpern, die in der Lage sind verschiedene Bindungsstellen eines oder mehrerer Antigene zu erkennen. Im Gegensatz dazu liefern monoklonale Antikörper spezifische und identische Einzelantikörper für eine Bindungsstelle eines Antigens [Sander & Raulf-Heimsoth, 2001].

Die Bestimmung des Latexallergen- bzw. -antigengehaltes erfolgte nach zwei verschiedenen auf Antikörpern basierenden Methoden. Die erste Methode ist die Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels eines IgE-Inhibitionstestes. Bei dieser Methode handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren. Im Gegensatz dazu ist der Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), welcher zur Bestimmung des Latexantigengehaltes genutzt wurde, ein direktes Nachweisverfahren.

Die Bestimmung des Latexallergengehaltes durch IgE-Inhibitionstests erfolgte mit einem Serumpool latexsensibilisierter Patienten im ImmunoCAP-System von Phadia (Uppsala, Schweden) [Baur et al., 1997]. Bei einem ImmunoCAP handelt es sich um eine Kunststoffkapsel, die eine schwammartige Festphase mit großer Oberfläche zur Kopplung von Allergenen enthält. Wird ein Serum mit

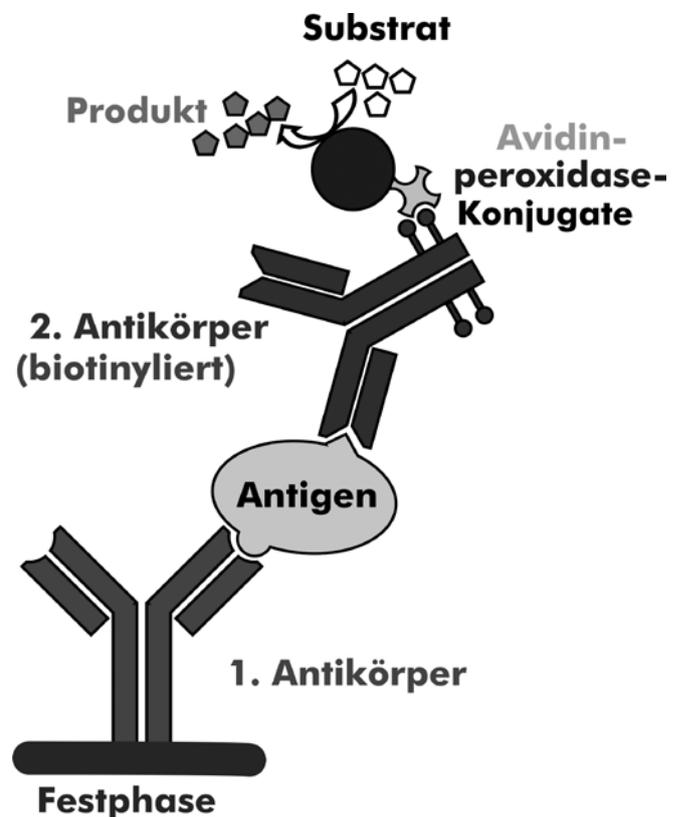


Abb. 4: Prinzip eines Sandwich-ELISA.

In der Darstellung sind schematisch die einzelnen Komponenten eines Sandwich-ELISA gezeigt. Das Antigen wird an verschiedene Epitope von zwei Antikörpern gebunden. Der 1. Antikörper ist mit der Festphase gekoppelt, der 2. Antikörper ermöglicht die Substratumsatzung durch die Kopplung mit einem Streptavidin-Enzym-Konjugat [modifiziert nach Sander & Raulf-Heimsoth, 2001].

spezifischen IgE-AK gegen dieses Allergen dazugegeben, binden die AK an die gebundenen Allergene auf der Festphase. Bei dem Prinzip der IgE-Inhibition wird das Serum zunächst mit einem kompetitiven Inhibitor zusammengebracht und erst im Anschluss auf die Festphase gegeben. Bei dem Inhibitor handelt es sich um die Verdünnungen des Proteinstandards, die zur Erstellung der Standardkurve benötigt werden, oder die untersuchten Proben. In diesem Fall binden die in dem Inhibitor (Standard oder Probe) enthaltenen Allergene die spezifischen AK aus dem Serumpool. An die Festphase können in diesem Fall nur noch freie AK binden. Nachdem die noch freien AK des Serumpools an die Allergene der Festphase gebunden haben, wird anti-human IgE, welches mit β -Galaktosidase markiert ist, dazu gegeben. Im nächsten Schritt wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactosid durch die β -Galactosidase in β -D-Galaktose und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon umgesetzt. Mit Zugabe der Stopplösung wurde die Substratumsetzung gestoppt und die Ergebnisse automatisch ermittelt. Je weniger AK durch Bindung aus dem Serum gefangen werden, desto mehr AK können an die Allergene der Festphase binden, das heißt umso größer wird das Signal. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch die Intensität der Fluoreszenz des 4-Methylumbelliferon.

Für den Aufbau eines Sandwich-ELISA (Abb. 4), für die Quantifizierung von Antigenen, benötigt man zwei Antikörper [Sander & Raulf-Heimsoth, 2001]. Diese müssen in der Lage sein, verschiedene, nicht überlappende und auf dem Antigen weit genug voneinander entfernte Epitope zu erkennen. Ist diese Bedingung erfüllt, so wird eine gegenseitige sterische Behinderung der beiden AK während der Bindung an das Antigen ausgeschlossen. Als Ausgangsbasis für die Entwicklung eines Sandwich-ELISA können polyklonales Kaninchenserum oder zwei monoklonale AK (mAK) dienen. Im Sandwich-ELISA wird ein AK als Fang-AK, der zweite als Detektor- oder Nachweis-AK eingesetzt. Der Fang-AK wird an eine Festphase, z.B. Mikrotiterplatten, gekoppelt und bindet das Antigen. Zusätzlich bindet an dieses der Nachweis-AK. Dieser wird häufig in biotinylierter Form eingesetzt und vermittelt über die Bindung eines Streptavidin-Enzym-Konjugats die Substratumsetzung in ein farbiges Produkt. Bei dem Enzym handelt es sich häufig um eine Meerrettich-Peroxidase, welche als Substrat ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) umsetzt. Durch die Biotinylierung des Nachweis-AK wird ein Multiplikationseffekt erzielt, welcher zu einer Verstärkung des Detektionssignals führt. Bei der Substratumsetzung entsteht ein blaugrünes Produkt. Die Intensität der Farbreaktion wird im Photometer gemessen und steigt mit der Menge an gebundenem Antigen. Dies bedeutet, je stärker die Farbreaktion ausfällt, desto mehr Antigen ist in der Probe vorhanden.

2.5 Zielsetzung

Da Proteine aus dem Milchsaft des Parakautschukbaumes *Hevea brasiliensis* in der Lage sind, bei exponierten Personen IgE-vermittelte Allergien, sogenannte Typ-I-Allergien, zu induzieren, stellen Naturlatexprodukte eine potenzielle Sensibilisierungsquelle dar. Das Ziel dieser Arbeit ist die Abschätzung des sensibilisierenden Potenzials von aktuell verfügbaren Latexprodukten mit unter-

schiedlichen Methoden. Dabei ist ein wichtiger Aspekt der Arbeit die Entwicklung bzw. Optimierung zweier Sandwich-ELISA, sowie ein Vergleich der verwendeten Methoden.

Von den verschiedenen Herstellern der Latexhandschuhe werden heute in der Regel nur Angaben zum Gesamtproteingehalt gemacht, die zum Vergleich der Latexhandschuhe herangezogen werden. Allerdings erlaubt diese Bestimmung des Proteingehaltes nur eine indirekte Abschätzung des tatsächlichen Allergengehaltes, da die Proteinangabe unabhängig davon ist, ob das Protein aus Naturkautschuk oder aus anderen Quellen stammt. Der Gesamtproteingehalt der untersuchten Handschuhe wird entsprechend der Vorschrift nach der Norm ASTM-D5712 und DIN EN 455-3 mit der modifizierten Lowry-Methode bestimmt. In der Norm DIN EN 455-3 ist eine Methode zur Extraktion der Proteine aus den Handschuhen eingeschlossen. Des Weiteren wurde eine am IPA verwendete Extraktionsmethode genutzt. In der Praxis sollten nur Handschuhe verwendet werden, welche einen geringen Anteil an Proteinen enthalten, die aus dem Naturkautschuk entstammen. Zurzeit gilt ein in der TRGS 406 empfohlener Richtwert von 30 μ g Protein/g Handschuhmaterial. Des Weiteren sollten die verwendeten Latexhandschuhe puderfrei sein, um eine Verbreitung des mit Allergenen beladenen Puders zu minimieren (TRGS 540).

Die Verwendung von allergenspezifischen, immunologischen Nachweisverfahren liefert dagegen wesentlich sicherere Informationen im Hinblick auf das allergisierende Potenzial der Latexprodukte. Zum Einsatz kommt zum einen ein IgE-Inhibitionstest, bei welchem im Latex-ImmunoCAP der Latexallergengehalt mit Hilfe eines Serumpools von Latexallergikern bestimmt wird. Außerdem wird der Latexantigengehalt mit einem Sandwich-ELISA auf Basis polyklonaler Antikörper bestimmt, dessen Entwicklung ein Teilziel dieser Diplomarbeit ist. Das Prinzip beider Methoden ist unter Kapitel 3.4 beschrieben. Neben diesen beiden Methoden, welche den Gesamtgehalt an Latexallergenen bzw. -antigenen bestimmen, wird der Gehalt der vier Latexhauptallergene Hev b 1, 3, 5 und 6.02 mit kommerziellen auf monoklonalen Antikörpern basierenden Nachweisverfahren quantifiziert (FITkit®). Für das Hauptallergen Hev b 1 existiert am IPA zusätzlich ein Sandwich-ELISA, dessen Optimierung und Standardisierung ein weiteres Teilziel dieser Arbeit ist. Unterstützend werden einige ausgewählte Produkte mit Hilfe der SDS-PAGE und IgG-Immunoblots auf Protein- und Allergenzusammensetzung untersucht.

Durch diese Untersuchungen soll eine Abschätzung des allergisierenden Potenzials der aktuell im Gebrauch befindlichen Latexprodukte ermöglicht werden. In dieser Arbeit werden 18 gegenwärtig im Gesundheitswesen verwendete Latexuntersuchungs- und -operationshandschuhe untersucht, die aus der von der BGW aufgestellten Liste an empfohlenen Handschuhen [BGW Themen, 2006] ausgewählt wurden. Zusätzlich werden im Haushalt verwendete Naturlatexprodukte (14 Drogerieartikel) untersucht, die mit der Haut und Schleimhäuten in Kontakt kommen. Ausgewählt wurden Beruhigungssauger, Trinksauger und Kondome verschiedener Mar-

ken, sowie Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und Luftballons. Neben diesen definitiv latexhaltigen Produkten wird ein als latexfrei deklariertes Übungsband in die Bestimmung des allergisierenden Potenzials einbezogen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Latexspezifischer IgE-Serumpool

Der sogenannte Serumpool setzte sich aus Ficollplasmen (gewonnen nach Separation von Lymphocyten, Monocyten und Basophilen mittels Ficollgradientenzentrifugation) zwölf latexsensibilisierter Patienten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zusammen, die in Tab. 2 aufgeführt sind. Die Ficollplasmen wiesen alle Konzentrationen an spezifischem IgE gegen Latexproteine zwischen 7,19 kU/L und 44,80 kU/L auf. Das gepoolte Plasma wurde im ImmunoCAP der Firma Phadia auf seine Konzentration an Antikörpern (AK) gegen Latexproteine insgesamt sowie diverse rekombinante und native Einzelallergene ausgetestet (im Ergebnisteil unter Kapitel 4.2.1).

3.1.2 Untersuchungsmaterialien

Zu den Untersuchungsmaterialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zählten verschiedene Produkte aus Latex. Zum einen wurden 17 verschiedene gegenwärtig im Gesundheitswesen verwendete Marken an Untersuchungs- und Operationshandschuhen untersucht. Bei den 17 verschiedenen Handschuhmodellen war ein Doppelhandschuh-System dabei, welches aus zwei Handschuhen besteht, die übereinander angelegt werden müssen. Da diese beiden Handschuhe separat untersucht wurden, kam es zu der Gesamtanzahl von 18 untersuchten Handschuhen. Die Auswahl der Handschuhe wurde mit Hilfe der von der BGW veröffentlichten Liste getroffen. Danach wurden gezielt puderfreie Handschuhe mit hohem, mittlerem und niedrigem Proteingehalt ausgewählt. Es

Tab. 2: Verwendete Untersuchungsmaterialien. Es sind die nachfolgend verwendeten Abkürzungen, die Beschreibung und der Hersteller des jeweiligen Produktes angegeben.

Artikel-abkürzung	Beschreibung	Marke/Anbieter
HS01	Guayule-Handschuhe, unsteril (Negativkontrolle)	Yulex Corp., Maricopa, Nordamerika
HS02	Handschuhe aus Malaysia, unsteril (Positivkontrolle)	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich
HS03	Comfort, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich
HS04	Contact, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich
HS05	Derma Skin, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich
HS06	„Micro-Thin NuTex®, puderfreie Latex-OP-Handschuhe“	Ansell GmbH, München
HS07	Micro-Touch Powder Free	Ansell GmbH, München
HS08	Biogel® Super-Sensitive™, chirurgische OP-Handschuhe	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath
HS09/1	Biogel® Eclipse Indicator™ (innerer HS)	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath
HS09/2	Biogel® Eclipse Indicator™ (äußerer HS)	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath
HS10	Peha-soft Untersuchungshandschuhe unsteril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
HS11	Peha-soft powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
HS12	Peha-micron plus powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
HS13	Peha-taft plus powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
HS14	Gentle Skin® classic	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
HS15	Gentle Skin® Anatom	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
HS16	Gentle Skin® grip	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
HS17	Augustus polymer	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg
HS18	Augustus puderfrei	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg
HS19	Augustus-Gel	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg
DA01	Beruhigungssauger	babylove (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA02	Beruhigungssauger	nip, Georgensgmünd
DA03	Beruhigungssauger	NUK; Mapa GmbH, Zeven
DA04	Trinksauger Anti-Kolik Tee	babylove (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik Milch	nip, Georgensgmünd
DA06	Trinksauger Anti-Kolik Milch	NUK; Mapa GmbH, Zeven
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht; Mapa GmbH, Zeven
DA08	Kondome	chaps classic natur (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA09	Kondome	Durex love; SSL Healthcare Deutschland GmbH & Co KG, Maintal
DA10	Kondome	Ritex Intensiv; Ritexgummiwaren GmbH, Bielefeld
DA11	Luftballon	Adic B.V., Doorn, Niederlande
DA12	Einmalhandschuhe Mittel	Profissimo (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA13	Haushandshandschuhe mit Baumwollbeflockung Mittel	Profissimo (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus (dm-drogerie markt, Karlsruhe)
DA15	Übungsband (latexfrei)	Thera-Band® GmbH, Dornburg

wurden je zwei bis vier verschiedene Modelle von sechs verschiedenen Anbietern (Ansell, Augustus, Hartmann, Mölnlycke, Rösner-Mautby und Unigloves) ausgewählt. Als Positivkontrolle (HS02) wurde ein gepudertes Handschuh aus alten Beständen des IPA verwendet, da gepuderte Handschuhe vermehrt mit dem Puder verbundene Allergene freisetzen. Der Handschuh ist von der Firma Unigloves. Als Negativkontrolle (HS01) wurde ein Handschuh der Firma Yulex verwendet, welcher aus Guayulekautschuk hergestellt wurde. Guayule (*Parthenium argentatum*) ist ein zu der Familie der Asteraceae gehörender Strauch, welcher in trockenen Gebieten des Südwestens der USA sowie Nordmexiko vorkommt [Yulex; Lloyd, 1911]. Des Weiteren wurde eine Auswahl an Haushaltsartikeln, die im Drogeriemarkt oder im Spielwarengeschäft erworben werden können und mit der Haut und Schleimhäuten in Kontakt kommen, untersucht. Dabei handelte es sich um Kondome („Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“), Trink- und Beruhigungssauger („babylove“, „nip“ und „NUK“), Pflaster („das gesunde Plus“), Einmal- und Haushaltshandschuhe (beide „Profissimo“) und Luftballons („Adic B.V.“). Zusätzlich wurde ein als latexfrei deklariertes Übungsband der Firma Thera-Band untersucht.

Nachfolgend sind die Handschuhproben mit HS und die Drogerieartikelproben mit DA abgekürzt. Bei den Drogerieartikeln tragen einige Proben das Suffix „a“. Diese mit dem Suffix „a“ beschriebenen Produkte wurden vor der Extraktion abgekocht, ansonsten handelt es sich um die gleichen Produkte, wie die ohne „a“.

In Tab. 2 sind die verwendeten Untersuchungsmaterialien mit den im folgenden Text verwendeten Abkürzungen noch einmal zusammengefasst.

3.2 Methoden

Vor der Bestimmung der Protein- und Latexallergengehalte wurden von den Latexprodukten zunächst Extrakte hergestellt. Die Extraktion erfolgte bei den Handschuhen nach zwei Methoden. Zum einen wurde nach der europäischen Norm DIN EN 455-3 von

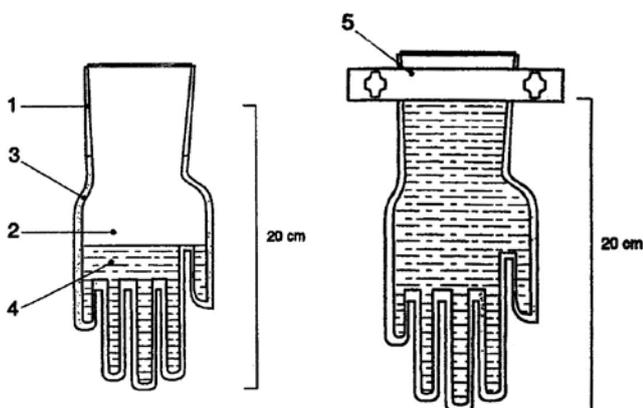


Abb. 5: Extraktion nach europäischer Norm.

Dargestellt ist die Extraktionsmethode, die in der Vorschrift DIN EN 455-3 beschrieben ist. 1 Äußerer Handschuh, 2 Innerer Handschuh, 3 Extraktionspuffer, 4 Farbstofflösung und 5 Handschuhklammer

1999 und zum anderen nach einer am IPA entwickelten und verwendeten Methode extrahiert [Baur et al., 1997]. In den hergestellten Extrakten wurde der Proteingehalt mittels modifizierter Lowry-Methode bestimmt. Anschließend wurde mit einem IgE-Inhibitionstest sowie einem Sandwich-ELISA die Latexallergenkonzentration in den Extrakten gemessen. In einem letzten Schritt wurde dann die Konzentration der Haupteinzelallergene, Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02, mit auf monoklonalen Antikörpern basierenden Sandwich-ELISA quantifiziert.

3.2.1 Extraktionen

3.2.1.1 Extraktion nach IPA-Methode

Die nachfolgend beschriebene Extraktionsmethode basiert auf der von Baur et al. (1997) beschriebenen Methode, wobei es zu Modifikationen kam. Damals wurden 8-10 g des Materials in A. dest extrahiert und die Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit war etwas geringer als bei der aktuell verwendeten Variante.

Aktuell wurden 3 g der zu extrahierenden Latexprodukte in kleine Stücke (ca. 1 cm², Trink- und Beruhigungssauger ca. 0,1 cm²) geschnitten und mit 20 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C im Wasserbad auf hoher Stufe geschüttelt, wobei er zusätzlich alle 15 min auf dem Vortex-Mixer gemischt wurde. Im Anschluss wurden die groben Latexstücke durch Überführen der Lösung in ein neues Zentrifugenröhrchen entfernt und die Extraktionslösung bei 3600 x g und Raumtemperatur (RT) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter der Größe 0,22 µm filtriert, in Portionen von 1 ml geteilt und bei -70 °C gelagert.

3.2.1.2 Extraktion nach europäischer Norm (DIN EN 455-3)

Zur Extraktion nach der Vorschrift der europäischen Norm DIN EN 455-3 [DIN EN 455-3, 1999] (EN-Methode) wurde für jeden Extrakt ein Handschuhpaar benötigt (Abb. 5). Bei handspezifischen Handschuhen mussten jeweils zwei rechte bzw. zwei linke Handschuhe als „Paar“ verwendet werden. Vom Mittelfinger des einen Handschuhs wurden 20 cm abgemessen und eine Markierung an diese Stelle der Stulpe gesetzt. Dieser Handschuh wurde danach gewogen. Der zweite Handschuh wurde anschließend mit Hilfe des stumpfen Endes einer 20 ml-Pipette in den ersten Handschuh eingeführt, so dass sie genau ineinander passten. In den inneren Handschuh wurde soviel der Farbstofflösung eingefüllt, dass die Finger und ein Teil der Handfläche gefüllt waren. Zwischen den inneren und äußeren Handschuh wurden 25 ml Extraktionslösung gegeben und die Luftblasen so weit wie möglich entfernt. Anschließend wurden die Handschuhe mit Klammern an der 20 cm Markierung dicht verschlossen. Die Extraktion der löslichen Substanzen aus den Handschuhmaterialien erfolgte auf dem Horizontalschüttler für 2 h (200/min). Nach Entfernen der Klammern wurden die Handschuhe vorsichtig getrennt, so dass eine Verunreinigung des Extraktes mit der Farbstofflösung vermieden wurde. Kam es zu einer Verunreinigung war der Extrakt blau eingefärbt und die Extraktion musste mit einem neuen Paar Handschuhen wiederholt werden. Lag keine Blaufärbung vor, wurde der Extrakt aus dem Zwischenraum der

beiden Handschuhe in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3600 x g bei RT für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst durch Filtration durch einen 0,22 µm Filter geklärt, portioniert (1 ml Aliquots) und schließlich bei -70 °C gelagert. Die Stulpe des äußeren Handschuhs wurde an der 20 cm Markierung abgeschnitten, mit einem Papiertuch gesäubert, getrocknet und das Gewicht bestimmt. Dieses Gewicht wurde von dem zuvor bestimmten Gesamtgewicht subtrahiert, sodass das Gewicht des extrahierten Teils des Handschuhs bestimmt werden konnte.

3.2.2 Proteinbestimmung

Bei der modifizierten Lowry-Methode handelt es sich um eine kolorimetrische Testmethode, die zur Ermittlung des Proteingehaltes in Latexprodukten herangezogen werden kann. Die in den Extrakten enthaltenen wasserlöslichen Latexproteine werden dabei zunächst durch Fällung von störenden Substanzen befreit. Der Proteingehalt wird danach unter Verwendung eines Proteinstandards mittels modifizierter Lowry-Methode zur Proteinanalyse quantifiziert [ASTM, 1995]. Dabei handelt es sich um das in der Vorschrift DIN EN 455-3 vorgegebene Prüfverfahren zur biologischen Bewertung medizinischer Handschuhe. Der Test basiert auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupferlösung (Reagenz A) und dem Folin-Reagenz (Reagenz B). Die zweiwertigen Kupferionen bilden mit Proteinen unter alkalischen Bedingungen Komplexe, wodurch es zu einwertigem Kupfer reduziert wird, welches wiederum das Folin-Reagenz reduziert und somit eine Blaufärbung in der Lösung entsteht. Die Farbentwicklung findet hauptsächlich mit Tyrosin, Tryptophan und in geringerem Maße mit Cystein, Cystin und Histidin statt und wird bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen [Lowry et al., 1951; Lottspeich et al.; 1998].

3.2.2.1 Herstellen der Proteinammlösung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Ovalbumin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml benötigt [DIN EN 455-3, 1999]. Für die Herstellung wurden zunächst 25 mg Ovalbumin in 25 ml Extraktionslösung (Kapitel 2.1.3.1) gelöst und die Lösung durch einen 0,22 µm Filter filtriert. Die wahre Konzentration an Ovalbumin wurde im Spektralphotometer über die Extinktion bei 280 nm in einer UV-Küvette bestimmt. Um die exakte Konzentration in mg/ml zu erhalten wurde die Extinktion durch 0,715 dividiert, da Ovalbumin bei 280 nm und pH 7,4 mit einem Molekulargewicht von 43 kDa und einem molaren Extinktionskoeffizienten von 30745 bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine Extinktion von 0,715 aufweist [Kidwai et al., 1975]. Die Lösung wurde portioniert bei -20 °C eingefroren und blieb nach der Vorschrift DIN EN 455-3 bei dieser Temperatur für zwei Monate stabil. Zum Auftauen wurde die Lösung für 15 min bei 45 °C erwärmt.

3.2.2.2 Messung der Proteinbindungskapazität von Zentrifugenröhrchen und Einmalfiltern

Für die Bestimmung der Proteinbindungskapazität der Zentrifugenröhrchen wurden 30 ml einer Referenzlösung mit einer Ovalbuminkonzentration von 10 µg/ml, hergestellt durch Verdünnung der Proteinammlösung (1 mg/ml) mit Extraktionspuffer, benötigt. Es

wurden jeweils 10 ml der Ovalbuminlösung in zwei Zentrifugenröhrchen überführt. Damit die gesamte Oberfläche der Röhrchen mit der Testlösung benetzt werden konnte, wurden die Röhrchen auf dem Rollenschüttler inkubiert. Nach 30 min wurden die Lösungen in zwei neue Zentrifugenröhrchen überführt und diese ebenfalls gerollt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die beiden Testlösungen jeweils fünf Zentrifugenröhrchen passiert hatten. Danach wurde die Proteinkonzentration der Referenzlösung sowie der beiden Testlösungen in Dreifachbestimmung mit der unter 3.2.2.3 beschriebenen Methode gemessen.

Zur Bestimmung der Proteinbindungskapazität der Einmalfilter wurden 30 ml einer Referenzlösung benötigt, welche eine Ovalbuminkonzentration von 10 µg/ml aufwies. Jeweils 10 ml dieser Referenzlösung wurden durch zwei Säulen bestehend aus je fünf Einmalfiltern in ein Zentrifugenröhrchen filtriert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Referenzlösung und der beiden Testlösungen jeweils in Dreifachbestimmung bestimmt. Dazu wurde ebenfalls die unter 3.2.2.3 beschriebene Methode verwendet.

Mit folgender, in der Vorschrift DIN EN 455-3 beschriebenen Formel wurde die absorbierte Menge an Ovalbumin in µg/Röhrchen bzw. µg/Filter berechnet:

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

Dabei ist

- O absorbiertes Ovalbumin;
- R Mittelwert der Dreifachbestimmung der Ovalbuminkonzentration der Referenzlösung;
- T Mittelwert der Dreifachbestimmung der Ovalbuminkonzentrationen in den beiden Testlösungen nachdem alle Röhrchen bzw. alle Filter passiert wurden.

Die Zentrifugenröhrchen und Einmalfilter waren für diese Bestimmungsmethode nur verwendbar, wenn die absorbierte Ovalbuminmenge (O) von 10 µg je Röhrchen / je Filter nicht überschritten wurde.

Die Messung musste innerhalb eines Tages durchgeführt werden [DIN EN 455-3, 1999].

3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach modifizierter Lowry-Methode

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte musste zunächst eine Standardreihe mit Ovalbumin als Referenz hergestellt werden. Dazu wurden Verdünnungen verschiedener Konzentrationen aus der Proteinammlösung erzeugt. Zur Verdünnung wurde Extraktionspuffer verwendet und Konzentrationen von 0, 2, 5, 10, 20, 40, 80 und 100 µg/ml hergestellt. Die Proben sowie die Proteinstandardlösungen wurden in Doppelbestimmung eingesetzt. Vor der eigentlichen Farbentwicklung der Proteinbestimmung erfolgte

in den Extrakten eine Proteinfällung. Von den Standardverdünnungen sowie den zu untersuchenden Extrakte wurden jeweils 1 ml eingesetzt und diesen 100 µl einer 0,15 %igen Natriumdesoxycholat-Lösung (DOC) zugegeben. Nach dem Durchmischen und einer zehnmütigen Inkubation bei RT wurde den Proben 100 µl Trichloressigsäure-Lösung (TCA) und nach wiederholtem Mischen 100 µl Phosphorwolframsäure-Lösung (PTA) beigelegt. Die Ansätze wurden gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze bei RT und 6000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und die Pellets danach vollständig in 250 µl 0,1 N NaOH resuspendiert. Als Leerwert wurden 250 µl 0,1 N NaOH verwendet.

Alle Ansätze wurden mit 100 µl Reagenz A und nach Mixen auf dem Vortex-Mixer und 15 min Inkubationszeit bei RT mit 800 µl Reagenz B versetzt. Nach weiteren 5 min bei RT wurden jeweils 250 µl der Ansätze in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und die optische Dichte (OD) bei 750 nm bestimmt.

Für die Standardkurve wurden die Extinktionsmittelwerte der Doppelbestimmungen gegen die Konzentrationen der Proteinstandardlösungen aufgetragen und die Standardkurve mit Hilfe des Computerprogramms SoftMax Pro als quadratische Regressionsgleichung berechnet. Mit dieser Gleichung konnten die Proteingehalte der Proben berechnet werden. Die Nachweisgrenze lag bei 2 µg/ml.

Die Doppelwerte der Proteinstandardlösungen sowie der Extrakte durften nicht mehr als 20 % voneinander abweichen. Ansonsten musste die Messung wiederholt werden.

3.2.3 Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels IgE-Inhibitionstest

Die Bestimmung des Latexallergengehaltes erfolgte durch IgE-Inhibitionstests mit einem Serumpool latexsensibilisierter Patienten im ImmunoCAP-System von Phadia (Uppsala, Schweden). Das zugrundeliegende Verfahren ist in dem Kapitel 2.4 beschrieben.

Der Latex-Standard für das Inhibitionsexperiment bestand aus den Partikelproteinen einer mit 0,2 % Ammoniak stabilisierten Latexmilch. Für die Bestimmung des Latexallergengehaltes der Extrakte wurde eine Standardkurve benötigt. Dazu wurden durch Verdünnung mit Verdünnungspuffer aus der Standardstammlösung Lösungen mit Konzentrationen von 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 und 0,1 µg Allergen/ml hergestellt. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt, welche nur Verdünnungspuffer enthielt. Die Proben wurden einfach, die Standardverdünnungen in Doppelbestimmung eingesetzt. Für die Bestimmung wurden jeweils 20 µl des Inhibitors (Proben- oder Standardverdünnung) mit 40 µl Poolserum versetzt und im ImmunoCAP-System gemessen. Dort durchliefen die Ansätze automatisiert die in Kapitel 2.4 beschriebenen Inkubationsschritte, die durch Waschschriffe voneinander getrennt waren.

Mit Hilfe einer in einer Tabellenkalkulation (Excel) erstellten Standardkurve konnte von den Fluoreszenzsignalen auf den Latexal-

lergehalt der Proben zurückgerechnet werden. Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Signale der Standardlösungen in Prozent des Signals der Kontrolle umgerechnet und diese dann gegen die Allergenkonzentration (µg/20 µl) der Standardlösungen aufgetragen. Wurden auch die Signale der Extrakte in Prozent der Signale der Kontrolle umgerechnet, konnten die Allergenkonzentrationen dieser Proben anhand der Standardkurve ermittelt werden. Der für die Auswertung benutzte lineare Messbereich wurde zwischen 20 % und 83 % festgelegt. Die mittlere Nachweisgrenze lag bei 0,2 µg/ml.

3.2.4 Entwicklung des Gesamtlates-Sandwich-ELISA

Für die Latexantigenbestimmung mittels eines Gesamtlates-ELISA musste dieser zuvor als Teil dieser Arbeit neu entwickelt werden.

Für die Entwicklung des Gesamtlates-Sandwich-ELISA wurden die Kaninchen-Antikörper und ein Latexprotein-Standard von Herrn Dr. Gerd Doekes (IRAS, University Utrecht) zur Verfügung gestellt. Bei dem Standard handelte es sich um 12 mg Naturlatex-Protein, welches aus Rohlatex ohne Zusatz von Ammoniak extrahiert, dialysiert und lyophilisiert wurde. Die Proteinkonzentration wurde mittels modifizierter Lowry-Methode bestimmt. Bei den Antikörpern handelte es sich um Kaninchen anti-Latex IgG, von denen ein Teil biotinyliert war. Die biotinylierten AK fungierten als Nachweis-AK, während die nicht biotinylierten als Fang-AK verwendet wurden. Als Anhaltspunkt für die Entwicklung des Gesamtlates-ELISA wurde die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 100 ng anti-Latex IgG/Vertiefung herangezogen [Doekes et al., 2001]. Die optimalen Bedingungen dieses Tests wurden in dieser Arbeit erarbeitet.

Für die Entwicklung des Gesamtlates-ELISA wurde von einer Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 100 ng Kaninchen anti-Latex IgG pro Vertiefung (1 ng/µl) ausgegangen [Doekes et al., 2001]. Zusätzlich wurde die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 75 ng, 50 ng und 25 ng Fang-Antikörper pro Vertiefung getestet. Als Blockierungslösung wurde 2 % BSA in PBS gewählt. Der zur Verfügung gestellte Standard (lyophilisiertes NRL Protein in PBS mit einer Konzentration von 1 mg/ml) wurde von 1 µg/ml bzw. 500 ng/ml seriell mit PBS verdünnt. Zusätzlich wurde der für den IgE-Inhibitionstest verwendete Standard eingesetzt. Auch dieser wurde ausgehend von 1 µg/ml seriell verdünnt. Es wurden Verdünnungen des Nachweis-AK zwischen 1:100 und 1:3200 ausgetestet. Als Konjugat und Substrat wurden Streptavidin und 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) eingesetzt.

Die finalen Bedingungen für den Gesamtlates-ELISA wurden wie folgt festgelegt:

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Modules, F8 Maxisorp Loose) mit den Fang-AK erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Fang-AK wurden mit Kopplungspuffer auf eine Konzentration von 0,5 ng/µl gebracht. In die Vertiefungen wurden jeweils 100 µl gegeben (50 ng/Vertiefung). Im Anschluss wurde die AK-Lösung entfernt und für 2 h je 200 µl Blockierungslösung in die Vertiefungen

gegeben. Die Vertiefungen wurden dreimal mit 250 µl PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) im Plattenwascher gespült. Danach wurden je 100 µl der acht Verdünnungen des Standards (1000 ng/ml bis 7,8 ng/ml) und der zu untersuchenden Proben für 1 h bei RT in den Vertiefungen inkubiert. Es wurde der Standard, welcher für die IgE-Inhibition benutzt wird, ausgewählt. Die Standardverdünnungen wurden in Doppelbestimmung eingesetzt, die Proben in einer Verdünnungsreihe. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal mit 250 µl PBST gewaschen. Danach wurden 100 µl des Nachweis-AK (1:300 mit Antikörper -Verdünnungslösung verdünnt) für 1,5 h in die Vertiefungen gegeben. Anschließend folgte ein weiterer Waschschritt, in dem jede Vertiefung dreimal mit 250 µl PBST gewaschen wurde. Das Konjugat (Poly-HRP-80 Streptavidin) wurde 1:20000 mit PBST verdünnt und in jede Vertiefung 100 µl pipettiert. Nach einer Stunde bei RT wurde die Platte erneut dreimal mit 250 µl PBST und zweimal mit 250 µl PBS pro Vertiefung gespült, bevor 100 µl der Substratlösung dazu gegeben wurden. Die Farbreaktion wurde am Photometer bei 414 nm beobachtet und mit 100 µl der Stopplösung pro Vertiefung abgestoppt, wenn sie stark genug entwickelt war.

Für die Berechnung der Standardkurve wurde die bei 414 nm gemessene OD gegen die Konzentration der Standardlösungen aufgetragen. Die Konzentration wurde dabei auf einer logarithmischen Achse aufgetragen (4-Parameter Fit des Programms SoftMax Pro). Für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurde zu dem Hintergrund eine OD von 0,1 addiert. Es wurden 13 Tests in die Bestimmung einbezogen. Der mittlere Messbereich lag zwischen 5 ng/ml und 996 ng/ml (Abb. 6). Die Werte, die unter der Nachweisgrenze lagen, wurden auf 2/3 der Nachweisgrenze gesetzt. Mit diesen Werten wurden auch die Rechnungen durchgeführt. Die CV %-Werte der Doppelbestimmungen der Standardlösungen und der Verdünnungsreihen der Proben durften nicht mehr als 30 % voneinander abweichen, sonst mussten die Messungen wiederholt werden.

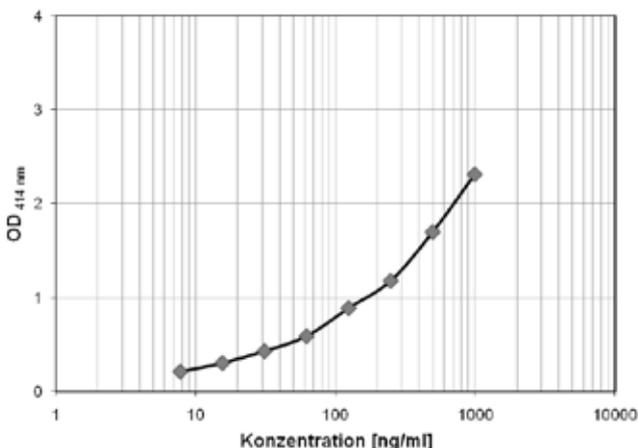


Abb. 6: Standardkurve des Gesamtlátex-ELISA.
Es wurde die optische Dichte (OD) bei 414 nm gegen die Konzentration der Standardverdünnungen halblogarithmisch aufgetragen. Der mittlere Messbereich lag zwischen 5 ng/ml und 996 ng/ml.

3.2.5 Optimierung des Hev b 1-Sandwich-ELISA

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Optimierung eines bereits vorhandenen Hev b 1-ELISA. Dieser Sandwich-ELISA basiert auf zwei unterschiedlichen monoklonalen AK gegen das Latexallergen Hev b 1. Der Fang-AK (II4F9) erkennt die Aminosäuren 46 bis 54, der Nachweis-AK (II4G9) die Aminosäuren 122 bis 134 des Proteins Hev b 1 (Abb. 7), wobei bei Raulf-Heimsoth et al. (2000) II4F9 als Nachweis-AK und II4G9 als Fang-AK verwendet wurde.

Als Standard wurde natives Hev b 1 der Partikelproteinfraktion einer Latexmilch aus Malaysia verwendet.

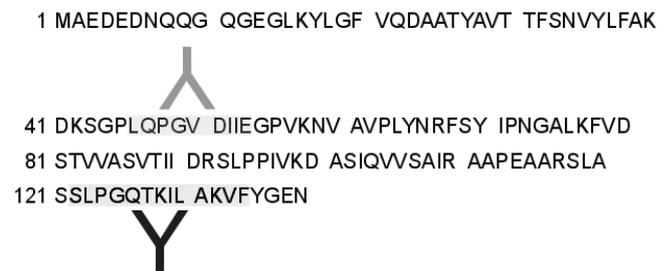


Abb. 7: Bindestellen der monoklonalen Hev b 1-Antikörper.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Allergens Hev b 1. Die beiden Epitope, welche durch die monoklonalen Antikörper erkannt werden, sind farbig dargestellt. Der Fang-Antikörper (grau) erkennt das Peptid der Aminosäuren 46 bis 54 (II4F9), der Nachweis-Antikörper (schwarz) die Sequenz zwischen den Aminosäuren 122 und 134 (II4G9) [Epitoplokalisierung nach Raulf-Heimsoth et al., 2000].

Für den zu optimierenden Hev b 1-ELISA wurden ursprünglich Mikrotiterplatten mit Oberflächenvergrößerung (Nunc-Immuno™ Modules, C8 Starwell Maxi) verwendet. Der Fang-AK wurde 1:150 mit Kopplungspuffer verdünnt. Blockiert wurden die noch freien Stellen mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA). Die Verdünnungen des Standards hatten Konzentrationen zwischen 1,56 und 1600 ng/1000 µl. Der Nachweis-AK wurde 1:3000 mit Verdünnungslösung (0,01 % BSA in PBST) verdünnt. Da das ursprünglich verwendete Konjugat Avidin-Peroxidase von DAKO nicht mehr verfügbar war, wurde das Konjugat Streptavidin/HRP von DAKO eingesetzt. Als Substrat wurde 1,2-Phenyldiamin verwendet und die Reaktion mit 1 M H2SO4 gestoppt. Die Inkubation fand ursprünglich bei 37 °C statt. Zwecks Optimierung des Tests wurden zahlreiche Varianten ausprobiert. So wurden zusätzlich Mikrotiterplatten ohne Oberflächenvergrößerung getestet, und verschiedene Blockierungslösungen (1 % Gelatine, 1,5 % Casein und 2 % BSA) sowie Inkubationszeiten der Blockierung ausprobiert. Die Beschichtung der Platte mit dem Fang-AK (1:75, 1:150, 1:300, 1:400 und 1:600 in 0,1M Kopplungspuffer) wurde ebenso variiert wie die Konzentration an Nachweis-AK (1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000). Zum Verdünnen des Nachweis-AK wurde neben der Antikörper-Verdünnungslösung PBST getestet. Zusätzlich wurde das Konjugat Poly-HRP-80 Streptavidin von Fitzgerald alternativ zum Avidin-Peroxidase-Konjugat und das Substrat ABTS eingesetzt.

Für den Test wurden nach der Optimierung folgende Parameter festgelegt:

Es wurden weiterhin die Mikrotiterplatten mit Oberflächenvergrößerung benutzt. Die Konzentration der Fang-AK wurde erhöht. Es wurde zur Beschichtung 100 µl einer mit Kopplungspuffer 1:400 verdünnten AK-Lösung in jede Vertiefung gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Blockierungslösung (je 100 µl 2% BSA in PBS pro Vertiefung) wurde für 2 h bei RT in den Vertiefungen gelassen. Es folgte ein Waschschritt (dreimal 250 µl PBST pro Vertiefung). Der Standard wurde mit PBS auf eine Konzentration von 250 ng/ml gebracht und dann seriell 1:2 verdünnt (acht Standards). Von dem Standard wurden Doppelbestimmungen gemessen, die Proben in Verdünnungsreihen eingesetzt (jeweils 100 µl pro Vertiefung). Die Inkubation fand bei RT für 1 h statt. Nach dreimaligen Waschen mit je 250 µl PBST pro Vertiefung mit dem Plattenwascher, wurde der Nachweis-AK in die Vertiefungen gegeben (je 100 µl des mit Antikörper-Verdünnungslösung 1:1500 verdünnten Nachweis-AK) und für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 250 µl PBST pro Vertiefung) konnte für 1 h bei RT das 1:20000 mit PBST verdünnte Konjugat Poly-HRP-80 Streptavidin in die Vertiefungen gegeben werden. Danach wurde die Platte erst dreimal mit 250 µl PBST im Anschluss zweimal mit 250 µl PBS pro Vertiefung gespült. Es wurde in jede Vertiefung 100 µl Substratlösung pipettiert und die Farbreaktion bei 414 nm mit dem Photometer beobachtet. Hatte der Standard mit der höchsten Konzentration ca. eine OD von 3 erreicht, wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung gestoppt. Ebenfalls gestoppt wurde die Reaktion, wenn der Hintergrund zu hoch wurde.

Für die Auswertung der Ergebnisse (Berechnung der Standardkurve, CV %-Werte und Ergebnisse unter der Nachweisgrenze) galten die gleichen Bedingungen wie unter 3.2.4 beschrieben.

Der mittlere Messbereich des Hev b 1-ELISA lag zwischen 15 ng/ml und 228 ng/ml (Abb. 8), wobei die Nachweisgrenzen von sieben Testen in die Berechnung eingingen.

3.2.6 Einzelallergenquantifizierung mittels FITkit®

Die Quantifizierung der Einzelallergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 erfolgte mittels der kommerziellen immunologischen Nachweisverfahren der Firma Quattromed (FITkit®). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben, wozu die zugehörigen Puffer nach Vorschrift verwendet wurden (FITkit®-Anleitung von Quattromed).

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden jeweils mit dem einzelallergenspezifischen murinen monoklonalen AK beschichtet, sodass das jeweilige Allergen (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 oder Hev b 6.02) aus den Proben gebunden werden konnte. Nach Inkubation wurde nicht gebundenes Material von der Platte gewaschen und ein weiterer einzelallergenspezifischer monoklonaler AK, markiert mit Meerrettich-Peroxidase, hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation und Entfernung überschüssigen Materials wur-

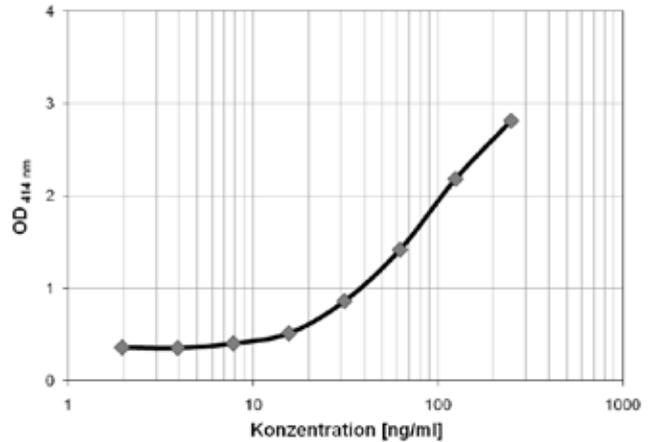


Abb. 8: Standardkurve des Hev b 1-ELISA.

Es wurde die optische Dichte (OD) bei 414 nm gegen die Konzentration der Standardverdünnungen halblogarithmisch aufgetragen. Der mittlere Messbereich lag zwischen 15 ng/ml und 228 ng/ml.

de Substratlösung in die Vertiefungen gegeben. Die Intensität der sich entwickelnden Färbung stieg mit dem Einzelallergengehalt der Proben. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde eine Standardkurve erstellt, indem die ODs gegen die Konzentrationen der Standardlösungen auf logarithmischen Achsen aufgetragen wurden. Die Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Allergengehalte erfolgte durch das Programm SoftMax Pro. Die Berechnungen der Nachweisgrenzen basieren auf drei (Hev b 3-FITkit®, Hev b 5-FITkit®) bzw. vier (Hev b 1-FITkit®, Hev b 6.02-FITkit®) Tests. Es wurde als untere Nachweisgrenze definiert, dass eine OD von 0,05 zum Hintergrund addiert wird. Die mittleren Nachweisgrenzen lagen bei 21 ng/ml (Hev b 1), 15 ng/ml (Hev b 3), 7 ng/ml (Hev b 5) und 5 ng/ml (Hev b 6.02).

Nach den originalen FITkit®-Anleitungen basiert die Kalibrierung der Standards auf der Analyse der Einzelallergene in der Umkehrphasen-Chromatographie und der N-terminalen Sequenzierung.

3.2.7 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.7.1 Auftrennen verschiedener Proben mittels SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können unter denaturierenden Bedingungen Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die Proteine und überdeckt so deren Eigenladung. Außerdem werden Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben und die Aggregatbildung der Proteine verhindert. Die Sekundärstruktur der Proteine wird aufgehoben. Durch den Zusatz von Dithiothreitol (DTT) werden die Polypeptide vollständig gestreckt, wodurch eine Fraktionierung nach den Molekulargewichten stattfindet [Westmeier, 1990]. Um das Molekulargewicht der nach der Auftrennung auftretenden Proteinbanden abschätzen zu können, muss zusätzlich zu den Proteinproben ein Proteinstandard (Marker) aufgetragen werden.

Die Proben wurden vor dem Beladen der Gele vorbereitet. Die Proben wurden 1:4 mit 4 x-Probenpuffer verdünnt und dann mit der höchst möglichen Proteinmenge eingesetzt. Der Marker (Protein Test Mixture 4 & Protein Test Mixture 5 von Serva) und die beiden eingesetzten Standardlösungen aus anderen Testverfahren wiesen so hohe Proteinkonzentrationen auf, dass sie nach der Zugabe des 4 x-Probenpuffers mit 1 x-Probenpuffer [Laemmli et al., 1970] auf ähnliche Proteinkonzentrationen wie die übrigen Proben gebracht wurden. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend jeweils 20 µl der Proben in die Taschen der SDS-Gele (NuPAGE 10% Bis-Tris Gel von Invitrogen, 10 Taschen) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für 42 min bei 200 Volt in XCell II Mini-Cell Kammern der Firma Novex.

3.2.7.2 Silberfärbung der SDS-Gele nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteinbanden mit einer nach Blum modifizierten Silberfärbung [Blum et al., 1987] angefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst für mindestens 1 h in Fixierlösung auf dem Wippschüttler inkubiert und im Anschluss dreimal für jeweils 20 min mit Waschlösung gewaschen. Das Gel wurde für 1 min in der Thio-sulfatlösung geschwenkt und dann dreimal 30 s mit A. dest gewaschen. Es folgte der Färbeschritt, indem das Gel für 20 min in die Färbelösung gegeben wurde. Danach wurde erneut zweimal für 20 s mit A. dest gespült und die Entwicklungslösung zugegeben. Diese blieb auf dem Gel bis eine Färbung der Proteinbanden eintrat. Durch Auswechseln der Lösung mit Stopplösung wurde die Farbreaktion gestoppt. Nach mindestens 5 min in der Stopplösung, konnte das Gel in A. dest aufbewahrt werden.

3.2.8 Westerntransfer und immunologischer Nachweis von Proteinen (IgG-Immunoblot)

3.2.8.1 Westerntransfer (Westernblot)

Unter Westerntransfer wird das Transferieren von Proteinen von einem Polyacrylamid-Gel auf eine geeignete Trägermatrix verstanden. In diesem Fall handelte es sich dabei um eine immobilisierende PVDF-Membran (Immobilon-P Membran) von Millipore. Dieser Vorgang erweitert die immunologischen Nachweismöglichkeiten mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine, da die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle für großmolekulare Liganden, wie z.B. Antikörper, zugänglich sind [Westmeier, 1990].

Der Proteintransfer fand in Blotting-Kammern der Firma Roth unter Verwendung eines Borsäure Blotting-Puffers für 1,5 h bei 0,8-1 mA/cm² Membran statt. Die Membran wurde vor der Verwendung kurz mit Methanol benetzt.

3.2.8.2 IgG-Immunoblot zum immunologischen Nachweis von Proteinen

Nach dem Blotten wurde die Membran viermal für jeweils 5 min mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und danach über Nacht bei RT in 50 ml der Blockierungslösung geschwenkt, so dass die noch unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Es folgten vier weitere fünfminütige Waschschriffe mit TBS. Im Anschluss wurde die Membran mit 20 ml des mit Antikörper-Verdünnungslösung 1:2000 verdünnten Kaninchenserums (1. AK) für 1,5 h inkubiert. Danach wurde die Membran für jeweils 5 min viermal mit TBST (0,1 % Tween in TBS) gewaschen, bevor der Anti-Kaninchen IgG (2. AK, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) dazu gegeben wurde. Es wurden 20 ml des mit Antikörper-Verdünnungslösung 1:20000 verdünnten 2. AK auf die Membran gegeben und für 2 h inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBST gewaschen. Alle vorangegangenen Inkubationsschritte fanden auf dem Schütteltisch statt. Die Farbreaktion wurde nicht geschüttelt. Für diese wurde im Dunkeln 20 ml NBT/BCIP-Lösung auf die Membran gegeben bis sich eine Färbung der Proteinbanden einstellte. Nach Einstellen einer ausreichenden Färbung wurde die Reaktion mit A. dest gestoppt und die Membran im Anschluss zwischen Filterpapier getrocknet.

3.2.8.3 India-Ink-Färbung des Proteinstandards auf der Blot-Membran

Die Färbung des Proteinstandards auf dem Blot erfolgte mit der India-Ink-Färbung. Dazu wurde die Spur mit dem Marker von der getrockneten PVDF-Membran abgetrennt und kurz mit Methanol benetzt. Die Membran wurde dann dreimal mit der Waschlösung gewaschen und danach für 1 h in der Färbelösung gefärbt. Nach der Inkubation wurde die Membran in A. dest gegeben und zwischen Filterpapier getrocknet. Die Färbelösung wurde vor der Benutzung durch einen Faltenfilter filtriert.

3.2.9 Charakterisierung von Antikörpern mittels Dot-Blot

Die für den in dieser Arbeit entwickelten Gesamtlax-ELISA verwendeten polyklonalen Kaninchen-Antikörper wurden mit Hilfe eines Dot-Blots charakterisiert, indem überprüft wurde mit welchen rekombinanten Allergenen diese eine Bindung eingehen.

Bei dem Dot-Blot wurden die eingesetzten Proben auf eine Proteinkonzentration von 0,05 µg/µl gebracht. Durch Pipettieren von 5 µl der jeweiligen Proben auf die Nitrocellulose-Membran (Cellulose-nitrat (E) von Schleicher & Schuell) wurden von jeder Probe jeweils 0,25 µg Protein aufgetragen. Die Membran wurde 1 h getrocknet und dann für 1 h bei RT mit 50 ml Blockierungslösung auf dem Schütteltisch inkubiert. Danach folgten vier fünfminütige Waschschriffe

und die Inkubation mit 10 ml des Kaninchenserums für 1,5 h. Das Kaninchenserum wurde mit Antikörper-Verdünnungslösung 1:1000 verdünnt. Es wurde dann viermal für 5 min mit PBST gewaschen. Der Nachweisantikörper (Anti-Kaninchen IgG mit alkalischer Phosphatase gekoppelt) wurde 1:20000 mit Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt und davon 10 ml auf die Nitrocellulose-Membran gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h. Nach viermaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min wurden 10 ml der NBT/BCIP-Lösung im Dunkeln auf die Membran gegeben und eine Farbreaktion abgewartet. Nach ausreichender Färbung der Proteinpunkte auf der Membran wurde die Farbreaktion gestoppt. Dazu wurde die Membran in A. dest gegeben. Im Anschluss wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet. Mit Ausnahme der Farbreaktion wurden alle Inkubationsschritte auf dem Wippschüttler durchgeführt.

3.2.10 Auswertung und Statistik

Die Graphiken dieser Arbeit wurden mit den Programmen Sigma Plot 8.0 von Systat Software Inc. und Prism 5.01 von GraphPad Software Inc. erstellt. Des Weiteren wurde das Programm SoftMax Pro 4.7.1 von Molecular Devices Inc. für die Anpassung und Berechnung der Standardkurven benutzt, um damit die Protein- oder Allergengehalte der Proben zu bestimmen. Zur Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde das Programm Excel von Microsoft verwendet. Für die Standardabweichung wurde die Funktion „STABW“, für den Mittelwert die Funktion „MITTELWERT“ benutzt. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie Spearman mit $r > 0,5$ und die Signifikanz der Korrelation ($p < 0,05$) wurde mit Hilfe des Programms Prism 5.01 ermittelt.

4 Ergebnisse

Zur Abschätzung des allergisierenden Potenzials der untersuchten 33 aktuell verfügbaren Latexprodukte, wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, welche in Abb. 9 schematisch dargestellt sind. Zunächst wurde der Proteingehalt der 15 im Haushalt verwendeten Produkte und 18 gegenwärtig im Gesundheitsdienst verwendeten Handschuhe mittels modifizierter Lowry-Methode bestimmt. Danach folgten immunologische Nachweisverfahren, mit denen der Latexallergengehalt bzw. spezielle Einzelallergene nachgewiesen werden konnten. Der Latexallergengehalt wurde mittels IgE-Inhibitionstest, sowie einem Sandwich-ELISA bestimmt. Außerdem wurden vier Einzelallergene aus *Hevea brasiliensis* mit Hilfe auf monoklonaler Antikörper basierender Nachweisverfahren quantifiziert. Hierbei handelte es sich um die Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen und Spina bifida-Patienten Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02.

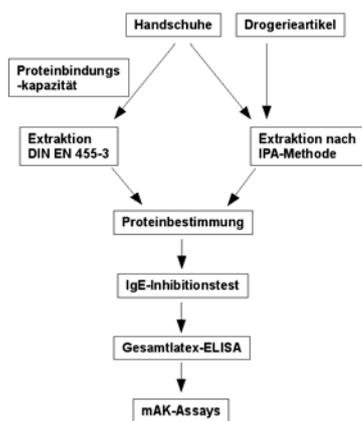


Abb. 9: Schema der verwendeten Untersuchungsmethoden.

Zur Abschätzung des allergisierenden Potenzials der untersuchten Handschuhe und Drogerieartikel wurden verschiedene Untersuchungsmethoden verwendet. Die Reihenfolge ihres Einsatzes ist hier schematisch dargestellt.

In den Tabellen dieser Arbeit wurden bei der Bestimmung des Protein- oder Allergengehaltes teilweise Mittelwerte aus mehreren Einzelwerten gebildet. Die folgende Kodierung ist für alle Tabellen dieser Arbeit gültig. Wenn alle Einzelwerte der gebildeten Mittelwerte unter der Nachweisgrenze lagen, sind diese mit einem Sternchen (*) markiert. Bei Werten, die mit zwei Sternchen (**) markiert sind, handelt es sich um Mittelwerte, von denen ein Teil der Einzelwerte unter der Nachweisgrenze lag.

4.1 Proteinbestimmung

4.1.1 Proteinbindungskapazität der Zentrifugenröhrchen und der Einmalfilter

Bevor die Konzentration an Proteinen in den Extrakten bestimmt werden konnte, musste die Proteinbindungskapazität der Zentrifugenröhrchen und der Einmalfilter getestet werden. Die bei der Extraktion der Proben verwendeten Zentrifugenröhrchen und Einmalfilter sollten laut Vorschrift (DIN EN 455-3) eine niedrige Protein-

bindungskapazität von maximal 10 µg je Röhrchen und Filter aufweisen. Ansonsten würde von diesen zu viel Protein aus den Proben absorbiert und das Ergebnis zu ungenau. Bei der Bestimmung der Proteinbindungskapazität der Zentrifugenröhrchen ergab sich für den Mittelwert der Testlösungsmessungen eine Ovalbuminkonzentration von 8,5 µg/ml. Die Referenzlösung hatte im Mittel eine Konzentration von 11,2 µg/ml. Damit ergab sich nach unter 3.2.2.2 beschriebenen Formel, dass die Zentrifugenröhrchen 5,4 µg Ovalbumin pro Röhrchen absorbiert hatten.

Bei der Bestimmung der Proteinbindungskapazität der Einmalfilter wies die Referenzlösung im Mittel eine Ovalbuminkonzentration von 10,7 µg/ml auf. Der Mittelwert der Messungen der beiden Testlösungen, welche die Filter passiert hatten, lag bei einer Konzentration von 10,0 µg/ml. Die Menge an absorbiertem Ovalbumin wurde nach der unter 3.2.2.2 beschriebenen Formel auf 1,3 µg pro Filter bestimmt. Damit wurde weder von den Zentrifugenröhrchen noch von den Einmalfiltern mehr als 10 µg Ovalbumin absorbiert, womit die Bedingungen für die Benutzung während der Extraktion der Extrakte im Vorfeld der Proteinbestimmung erfüllt wurden.

4.1.2 Bestimmung der Proteingehalte der untersuchten Latexextrakte

Die mittels des modifizierten Lowry-Testes bestimmten Proteinkonzentrationen wurden zur Berechnung des Proteingehaltes der einzelnen Extrakte verwendet. Dazu wurden das Gewicht des extrahierten Materials sowie die Menge an Extraktionslösung herangezogen. Die Nachweisgrenze bei der Bestimmung der Proteinkonzentration lag bei 2 µg/ml. Durch die unterschiedlichen Extraktionsmethoden der Handschuhe wurden unterschiedliche Mengen an Extraktionspuffer (20 ml und 25 ml) und an Material zur Herstellung der Extrakte benötigt. Dadurch variierte die Nachweisgrenze bei der Darstellung der Ergebnisse in µg Protein pro g Material.

4.1.2.1 Bestimmung der Proteingehalte in den Extrakten der Drogerieartikel

Bei den 21 Proben der 15 verschiedenen Drogerieartikel waren bei vier Extrakten die Proteinkonzentration und somit der Proteingehalt nicht messbar. Dabei handelte es sich um den abgekochten Beruhigungssauger von „NUK“, die abgekochten Trinksauger von „babylove“ und „NUK“, sowie ein Kondom von „Durex“. Die anderen Drogerieartikel wiesen einen Proteingehalt zwischen 14,46 und 444,35 µg Protein/g Material auf. Die Nachweisgrenze lag bei den Drogerieartikeln bei 13,3 µg Protein/g Material. Die genauen Werte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der Proteinbestimmung der untersuchten Haushaltsartikel in Abb. 10. In den Graphiken kann man deutlich die Abnahme der messbaren Proteingehalte nach dem Abkochen der Trink- und Beruhigungssauger erkennen. Nach dem Kochen der Sauger enthielten diese durchschnittlich nur noch etwa 30 % an Protein der nicht abgekochten Sauger. Außerdem wird die Varianz der Proteingehalte in den verschiedenen Proben deutlich. Bei den Kondomen liegt diese zwischen 0,9 µg/g und

Tab. 3: Proteingehalte der Drogerieartikel. Artikel, die vor der Extraktion abgekocht wurden, tragen die Kennzeichnung „a“.

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Proteingehalt [µg/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	121,69
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	49,47
DA02	Beruhigungssauger	nip	127,37
DA02a	Beruhigungssauger	nip	35,67
DA03	Beruhigungssauger	NUK	15,32
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	8,38(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	34,62
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	9,91(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	49,42
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	14,46
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	35,03
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	6,35(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	92,66
DA08	Kondome	chaps classic natur	109,97
DA09	Kondome	Durex love	0,90(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	202,91
DA11	Ballon	Adic B.V.	101,84
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	44,66
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	145,63
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	150,30
DA15	Übungsband	Thera-Band	444,35

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze (13,3 µg Protein/g Material)

202,9 µg/g Material. Bei den Diagrammen ist zu beachten, dass die Skalen der Diagramme unterschiedlich sind und zwischen 60 µg/g Material (Abb. 10 (B)) und 500 µg/g Material (Abb. 10 (D)) liegen.

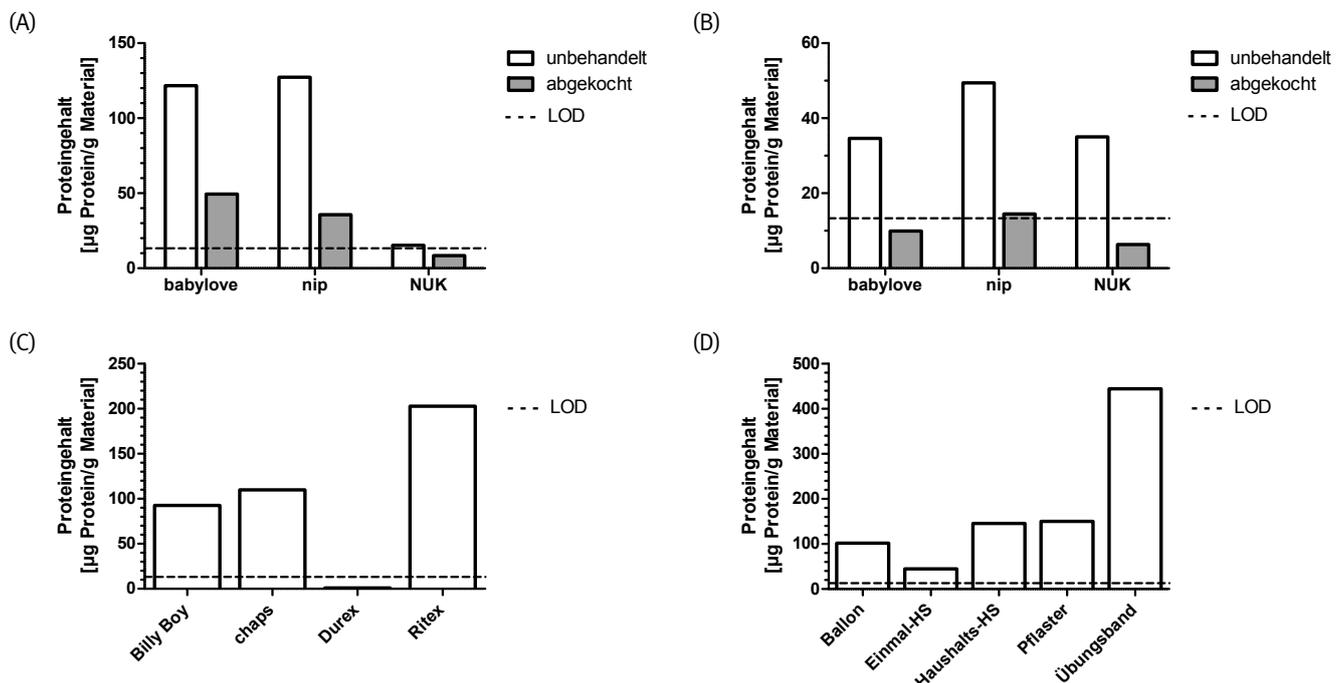
4.1.2.2 Proteingehalte in Handschuhen

Für die Bestimmung der Proteingehalte der untersuchten Handschuhe wurden nach Vorschrift DIN EN 455-3 vier separate Extrakte hergestellt, deren Proteinkonzentration jeweils in Doppelbestimmung gemessen wurde. Die Werte der Doppelbestimmung durften laut Vorschrift nicht mehr als 20 % voneinander abweichen. Von den erhaltenen vier Proteinmesswerten der Extrakte wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung in Prozent bestimmt (Variationskoeffizient = CV). Bei drei Extrakten (HS03, HS08 und HS13) lag die Abweichung knapp über 20 %, was für diese Arbeit toleriert wurde. Für die Extrakte der IPA-Methode wurden ebenfalls der Mittelwert der bestimmten Proteingehalte und die Standardabweichung dieser in Prozent angegeben (Tab. 4).

Insgesamt wurden 20 verschiedene Untersuchungs- und Operationshandschuhe untersucht, 18 davon werden auch aktuell in Deutschland verkauft. Ein gepudertes Handschuh aus alten Beständen des IPA (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) diente als Positivkontrolle (HS02), ein Handschuh aus Guayule als Negativkontrolle

Abb. 10: Proteingehalte der Drogerieartikel.

(A) Beruhigungssauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (B) Trinksauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (C) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“ und „Durex“ und „Ritex“. (D) Sonstige Drogerieartikel (Luftballon, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 13,3 µg Protein pro g Material.



(HS01). Der Guayule-Handschuh wies einen recht hohen Proteingehalt von 73,37 µg Protein/g Material auf. Der mit Abstand höchste Proteingehalt wurde bei der Positivkontrolle mit über 600 µg Protein/g Material ermittelt. Von den 18 aktuell verwendeten Latexhandschuhen konnte bei 13 zumindest teilweise Protein nachgewiesen werden. Der höchste Wert lag bei knapp 100 µg Protein/g Handschuh. Es lagen bei beiden Methoden die gleichen Handschuhe unter der Nachweisgrenze.

Zusätzlich wurden in Tab. 4 die von der BGW in ihrer Broschüre [BGW Themen (M621), 2006] angegebenen Proteingehalte dieser Untersuchungshandschuhe aufgeführt. Auf ihren Proteingehalt hin wurden zwar Handschuhe derselben Hersteller und Bezeichnungen untersucht, dabei handelte es sich allerdings um andere Chargen dieser Handschuhe. Die Proteingehalte aus der Broschüre lagen zwischen unter 10 µg Protein pro g Handschuh und 49,5 µg Protein/g Handschuh. Die von der BGW angegebenen Proteingehalte stimmen in einigen Fällen mit den in dieser Arbeit bestimmten Proteingehalten nicht überein. So enthielt der „Augustus polymer“ (HS17) in der aktuellen Bestimmung nur sehr wenig Protein (4,7 µg/g), hatte aber in der BGW-Liste einen Wert von 49,5 µg/g, während umgekehrt der „Gentle Skin® grip“ (HS16) aktuell 92,5 µg/g enthielt und in der BGW-Liste mit nur 11,5 µg/g geführt wurde. Bei anderen Handschuhen wurden Proteingehalte mit ähnlichen Ergebnissen gemessen. Die von der BGW und in dieser Arbeit untersuchten Chargen der Untersuchungsmaterialien sind im Anhang unter Tabelle 26 zu finden.

In der Abbildung 11 ist bei 30 µg/g Material der in der TRGS 406 (Technische Regeln für Gefahrstoffe 406) beschriebene Richtwert abgebildet; diesen Gehalt an Protein sollten Handschuhe nicht überschreiten. Der festgelegte Richtwert ist allerdings nur für die EN-Methode gültig, da er für diese Extraktionsmethode in der Vorschrift DIN EN 455-3 beschrieben wurde.

Wie man Abb. 11 entnehmen kann, lagen in der Regel die IPA-Werte höher, als die EN-Werte. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Extraktionsmethoden zeigte, dass immer entweder beide Ergebnisse unter der Nachweisgrenze oder beide im messbaren Bereich lagen. Außerdem fällt in dieser Darstellung der besonders hohe

Tab. 4: Proteingehalte der Untersuchungshandschuhe.

Es wurden Extrakte der Handschuhe nach der europäischen Norm (EN-Methode) und nach der IPA-Methode hergestellt. Der Mittelwert des Proteingehaltes wird aus n Einzelwerten gebildet und von diesen die Standardabweichung in Prozent (CV [%]) berechnet. Zusätzlich wurden die von der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege (BGW) in Handschuhen dieses Typs bestimmten Proteingehalte aufgeführt.

Artikel	Bezeichnung	IPA-Methode			EN-Methode			"Proteingehalt BGW [µg/g]"
		n	"Mittelwert Proteingehalt [µg/g]"	"CV [%]"	n	"Mittelwert Proteingehalt [µg/g]"	"CV [%]"	
HS01	Guayule	1	73,37					
HS02	gepudertes Handschuh	2	680,95	0,3	4	617,42	10,3	
HS03	Comfort	2	17,74	18,0	4	35,58	19,5	< 10
HS04	Contact	2	92,41	17,4	4	53,12	11,8	12,5
HS05	Derma Skin	2	19,05	8,0	4	21,97	32,9	12,3
HS06	Micro-Thin Nutex	2	59,18	8,2	4	35,11	28,2	41,9
HS07	Micro-Touch	2	44,13	25,1	4	28,55	20,4	31,2
HS08	Biogel Super Sensitive	2	21,13	27,4	4	11,87	5,7	23,0
HS09/1	Biogel Eclipse Indicator	2	25,61	1,0	4	22,14	39,5	22,0
HS09/2	Biogel Eclipse Indicator	2	23,75(**)	89,3	4	19,91	34,9	22,0
HS10	Peha-soft unsteril	2	7,79(*)	15,1	4	4,55(*)	23,2	17,6
HS11	Peha-soft steril	2	8,70(*)	4,8	4	6,90(*)	24,5	< 10
HS12	Peha-micron plus	2	36,70	6,3	4	32,84	17,0	14,6
HS13	Peha-taft plus	2	32,01	16,1	4	13,42	14,7	15,6
HS14	Gentle Skin classic	2	8,13(*)	51,7	4	4,32(*)	54,0	22,2
HS15	Gentle Skin Anatom	2	14,71	2,6	4	7,10	26,9	20,0
HS16	Gentle Skin grip	2	84,85	15,4	4	92,25	26,1	11,5
HS17	Augustus polymer	2	8,03	31,1	4	4,70	25,9	49,5
HS18	Augustus puderfrei	2	20,99	24,6	4	17,10	15,2	10,1
HS19	Augustus-Gel	2	9,24	11,4	4	2,70	35,8	< 10

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze, (**) Einzelwerte lagen teilweise unter der Nachweisgrenze, n = Anzahl der Einzelwerte

Proteingehalt der beiden Handschuhe HS04 und HS16 auf.

Zwischen den Messergebnissen des Proteingehaltes der IPA- und der EN-Methode konnte eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,876$ ($n=18$) festgestellt werden. Nach Bland-Altman trägt man die Mittelwerte der Proteingehalte gegen den Quotienten der beiden Proteingehalte auf. In diesem Fall wurde der Wert der EN-Methode durch den der IPA-Methode dividiert (Abb. 12).

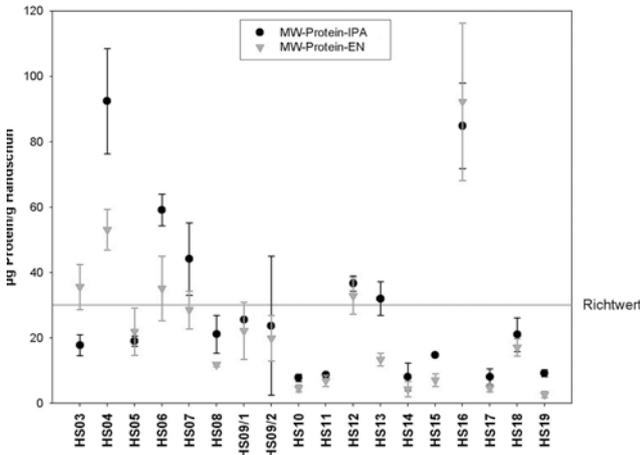


Abb. 11: Vergleich der Proteingehalte der Handschuhe in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode.

Die Mittelwerte (vier bzw. zwei Messungen) der Proteingehalte bei Extraktion nach der EN-Methode sind grau, die nach der IPA-Methode schwarz aufgetragen. Bei 30 µg Protein/g Handschuh liegt der nach der BGW für die EN-Methode festgelegte Richtwert. (MW=Mittelwert)

Die Quotienten lagen im Mittel bei 0,84 (n=13), mit einer Standardabweichung von 0,42. Diese Darstellung macht noch einmal deutlich, dass in 10 von 13 Fällen mit der IPA-Methode mehr Protein extrahiert wurde. Nur bei einem Handschuh lag der mit der EN-Methode extrahierte Proteingehalt in etwa doppelt so hoch wie der mit der IPA-Methode (HS03, siehe auch Tabelle 4). Für die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten wurden alle Handschuhe ohne die beiden Kontrollen (HS01 und HS02) verwen-

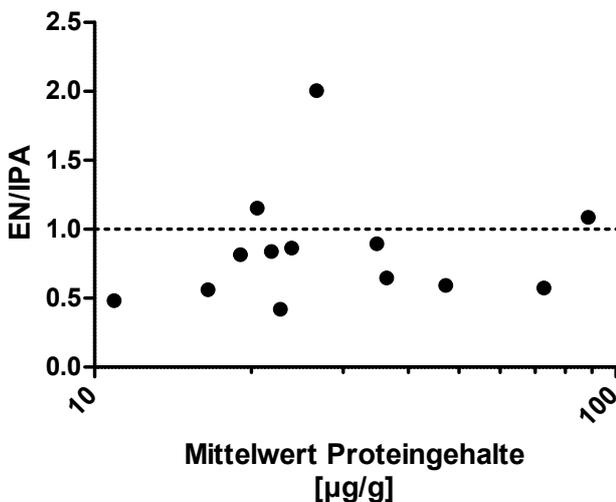


Abb. 12: Vergleich der Proteingehalte mittels Bland-Altman-Plot.

Aufgetragen wurde der Mittelwert der Proteingehalte von EN- und IPA-Methode gegen den Quotienten (EN/IPA) dieser Werte. Der Quotient, der sich bei identischen Werten beider Extraktionsverfahren ergeben würde, ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

det. Bei der statistischen Analyse nach Bland-Altman wurden nur die Werte berücksichtigt, welche über der Nachweisgrenze lagen.

4.2 Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels IgE-Inhibition

Neben der Proteinbestimmung, bei der alle Proteine quantifiziert wurden, unabhängig davon ob es sich um Latexproteine handelte oder nicht, wurde der Latexallergengehalt in allen untersuchten Latexprodukten nach zwei Methoden bestimmt, zum einen nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA und zum anderen mittels IgE-Inhibitionstest. Zunächst wurden die für den IgE-Inhibitionstest verwendeten Antikörper charakterisiert.

4.2.1 Charakterisierung der für den IgE-Inhibitionstest verwendeten Antikörper

Das für den IgE-Inhibitionstest verwendete gepoolte Serum latexsensibilisierter Patienten wurde im ImmunoCAP auf seine Konzentration an Antikörpern gegen Latexproteine insgesamt, sowie diverse rekombinante (r) und native (n) Einzelallergene ausgetestet. Dadurch konnten die in dem Serumpool enthaltenen IgE-AK charakterisiert werden.

Gegen das Gemisch an Latexproteinen (Gesamtlax-CAP k82 ohne zugesetztes rHev b 5) enthielt der Serumpool Antikörper mit einer Konzentration von 16,6 kU/L. Der höchste Messwert wurde mit rHev b 5 (13 kU/L) erzielt, gefolgt von den verschiedenen Varianten des Hev b 6. Für das Maltosebindeprotein (MBP) und die Allergene Hev b 2, Hev b 8 und Hev b 10 lagen die AK-Konzentrationen unter 0,35 kU/L und somit unter der Nachweisgrenze.

4.2.2 Bestimmung des Latexallergengehaltes der Drogerieartikel mittels IgE-Inhibitionstest

Bei der Bestimmung des Latexallergengehaltes mittels IgE-Inhibitionstest lieferten nur acht Produkte Latexallergengehalte im nachweisbaren Bereich. Die anderen 13 Extrakte lagen mit ihren Allergenkonzentrationen unter der Nachweisgrenze dieses Testes von 1,39 µg Allergen/g Material. Mit Ausnahme eines unbehandelten Saugers, der grenzwertig bestimmbar war, waren bei den Beruhigungs- und Trinksaugern keine messbaren Latexallergengehalte nachweisbar (Tab. 5). Von den Kondomen und sonstigen Drogerieartikeln lagen nur das Kondom von „Durex“ und das latexfreie Übungsband unter der Nachweisgrenze. Die anderen Produkte wiesen Latexallergengehalte von bis zu 21,49 µg Allergen/g Material bei den Luftballons auf. Die gemessenen Latexallergengehalte der im Haushalt verwendeten Produkte sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

4.2.3 Bestimmung des Latexallergengehaltes der Handschuhe mittels IgE-Inhibition

Bei der Bestimmung des Latexallergengehaltes der untersuchten Handschuhe wurden von jeder Extraktionsmethode jeweils nur zwei Extrakte untersucht, weshalb die angegebenen Mittelwerte und CV-Werte auf zwei Werten basieren. Wie oben definiert werden auch hier die Deklarationen (*) und (**) verwendet. Von den

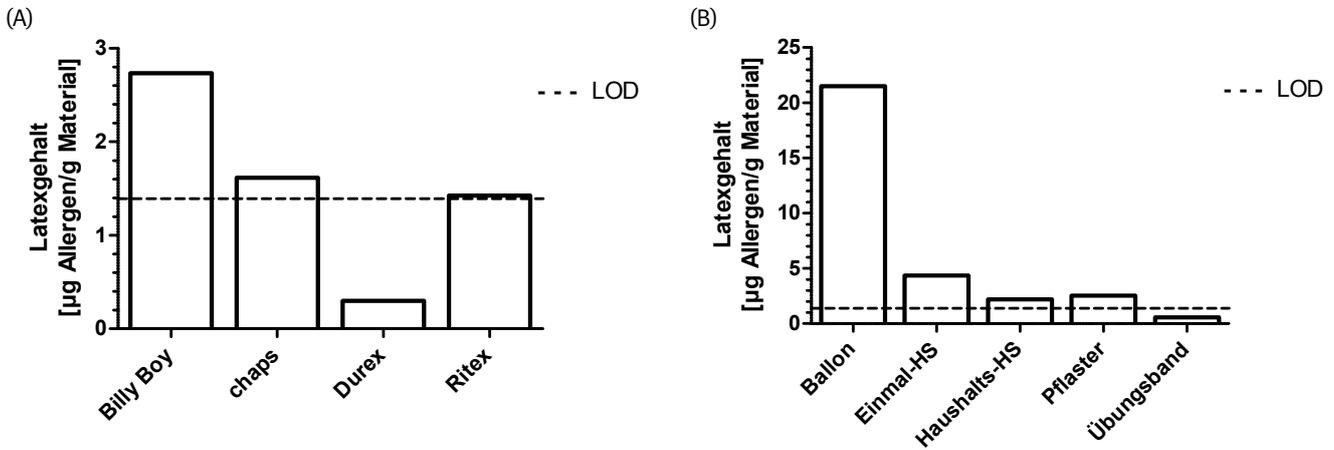


Abb. 13: Mittels IgE-Inhibitionstest ermittelter Latexallergengehalt der Drogerieartikel.

(A) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“.

(B) Sonstige Drogerieartikel (Luftballons, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband).

Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 1,39 µg Allergen/g Material.

Tab. 5: Mittels IgE-Inhibitionstest ermittelter Latexallergengehalt der Drogerieartikel.

Mit „a“ gekennzeichnete Artikel wurden vor der Extraktion abgekocht.

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Latexallergengehalt [µg/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	0,42(*)
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	0,48(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	1,39
DA02a	Beruhigungssauger	nip	0,76(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	0,23(*)
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	0,80(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	0,39(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	0,27(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	1,15(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	0,67(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	0,26(*)
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	0,11(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	2,73
DA08	Kondome	chaps classic natur	1,61
DA09	Kondome	Durex love	0,30(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	1,42
DA11	Ballon	Adic B.V.	21,49
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	4,36
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	2,18
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	2,53
DA15	Übungsband	Thera-Band	0,56(*)

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze (13,3 µg Protein/g Material)

Tab. 6: Mittels IgE-Inhibitionstest ermittelter Latexallergengehalt der Handschuhe, extrahiert nach IPA- bzw. EN-Methode.

Der Mittelwert des Latexallergengehaltes wurde aus je zwei Einzelwerten gebildet und von diesen die Standardabweichung in Prozent (CV [%]) berechnet.

Artikel	IPA-Methode		EN-Methode	
	Mittelwert Latexallergengehalt [µg/g]	CV [%]	Mittelwert Latexallergengehalt [µg/g]	CV [%]
HS03	0,92(*)	24,2	0,62(*)	6,1
HS04	27,09	20,3	14,99	12,9
HS05	1,79	26,0	1,42	6,7
HS06	0,83(*)	15,5	0,52(*)	19,4
HS07	3,83	17,4	1,79	24,6
HS08	3,21	10,0	1,18	14,8
HS09/1	1,31(**)	24,4	1,02	6,1
HS09/2	2,57	14,0	1,61	10,9
HS10	0,95(*)	18,1	0,4(*)7	45,3
HS11	1,20(*)	3,4	0,94(**)	14,8
HS12	14,09	9,2	11,32	27,5
HS13	3,50	21,3	2,69	0,5
HS14	1,00(*)	36,2	0,47(*)	20,1
HS15	0,74(*)	8,6	0,4(*)3	56,1
HS16	7,82	30,8	11,62	22,2
HS17	2,37	15,1	1,28	14,1
HS18	2,02	10,8	2,13	1,2
HS19	0,87(*)	20,1	0,38(*)	30,7

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze,

(**) Einzelwerte lagen teilweise unter der Nachweisgrenze

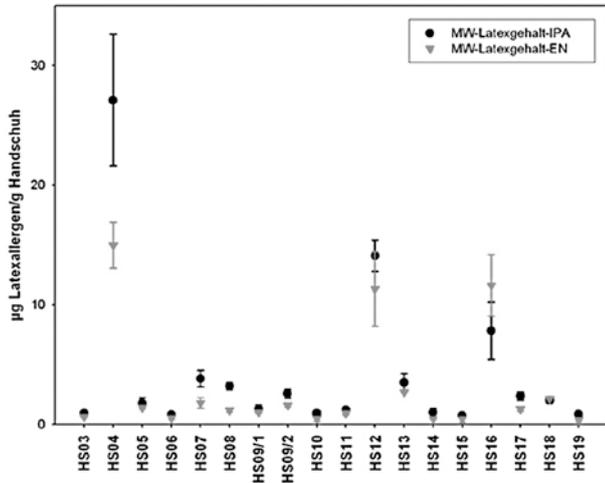


Abb. 14: Mittels IgE-Inhibitionstest ermittelte Latexallergengehalte der Handschuhe, extrahiert mit IPA- bzw. EN-Methode.

Die Mittelwerte (MW) der Latexallergengehalte bei Extraktion nach der EN-Methode sind grau, die nach der IPA-Methode schwarz aufgetragen.

Einzelwerten des Mittelwertes wurde auch hier die Standardabweichung (CV %) bestimmt.

Von den 18 Handschuhen lag der Latexallergengehalt bei sechs Handschuhen mit beiden Methoden unter der Nachweisgrenze. Bei zehn Handschuhen konnten Gehalte an Latexallergen gemessen werden. Der höchste Latexallergengehalt lag bei 27 µg Allergen/g Handschuh (Tab. 6, HS04).

Die CV-Werte der Mittelwerte der Allergenbestimmungen lagen zwischen 0,5 und 30,8 % bei Messungen über der Nachweisgrenze. Lagen die Einzelwerte alle oder auch nur teilweise unter der Nachweisgrenze, lagen die CV-Werte mit bis zu 56,1 % teilweise deutlich höher.

Die drei Proben HS04, HS12 und HS16 fallen in Abb. 14 mit besonders hohen Latexallergengehalten auf.

In den meisten Fällen lagen die Latexallergengehalte der Handschuhe bei beiden Methoden gleichzeitig unter der Nachweisgrenze oder waren bestimmbar. Auch bei den drei besonders hohen Latexallergengehalten stimmte dies überein. Es gab nur einen Handschuh, bei dem nicht übereinstimmend in beiden Methoden Protein gemessen werden konnte (HS11). In der Regel lagen auch hier die Werte der Extrakte, welche nach IPA-Methode hergestellt wurden, höher als die Werte, welche in den nach EN-Methode extrahierten Extrakten gemessen wurden.

Es zeigte sich zwischen den Mittelwerten der IPA- und EN-Methode eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,91$ ($n=18$). Für die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten wurden die Werte aller Handschuhe ohne die beiden Kontrollen (HS01 und HS02) herangezogen.

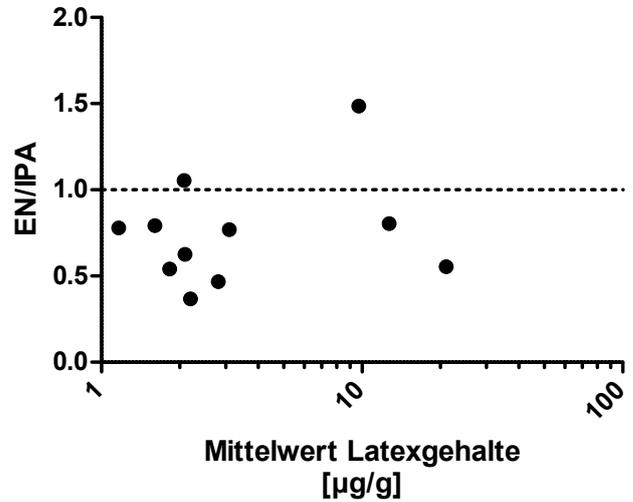


Abb. 15: Vergleich der mittels IgE-Inhibition ermittelten Latexallergengehalte mittels Bland-Altman-Plot.

Aufgetragen wurde der Mittelwert der Latexallergengehalte von EN- und IPA-Methode gegen den Quotienten (EN/IPA) dieser Werte. Der Quotient, der sich bei identischen Werten beider Extraktionsverfahren ergeben würde, ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt

Zum Vergleich der Werte beider Extraktionsmethoden wurden alle in beiden Methoden positiven Werte ($n=11$) im Bland-Altman Diagramm (Abb. 15) dargestellt. Es wurde der Mittelwert der Latexallergengehalte gegen den Quotienten der Werte der EN-Methode und der IPA-Methode aufgetragen. Der Mittelwert des Quotienten EN/IPA lag bei 0,75. Die Standardabweichung der Quotienten lag bei 0,31.

4.3 Bestimmung des Latexgehaltes der Proben mittels Gesamtlatex-Sandwich-ELISA

Neben der Bestimmung des Latexallergengehaltes in den untersuchten Latexprodukten mit dem IgE-Inhibitionstest, wurde der Latexantigengehalt mit dem auf polyklonalen Antikörpern (pAK) basierendem Sandwich-ELISA getestet, der auf Basis der von Doekes et al. [2001] eingesetzten pAK bezüglich Konjugat und Substrat modifiziert wurde. Die pAK dienen zum einen als Fang-AK, zum anderen, in biotinylierter Form, als Nachweis-AK. Da das Material an Antikörpern sehr beschränkt war, wurde versucht, die Konzentration dieser pro Test möglichst gering zu halten. Der Fang-AK konnte von 100 ng pro Vertiefung auf 50 ng pro Vertiefung herunter gesetzt werden. Der Nachweis-AK musste allerdings schwach verdünnt eingesetzt werden (1:300). Neben dem für diesen Test vorgesehenen Latexprotein-Standard, wurde der Latexprotein-Standard, welcher für den IgE-Inhibitionstest verwendet wird, ausprobiert. Der von den Niederländern mitgelieferte Latexprotein-Standard wies eine steiler verlaufende Kurve auf, was normalerweise von Vorteil ist, da kleinere Konzentrationsunterschiede detektiert werden können. Da der Standard des IgE-Inhibitionstestes allerdings besser zu den Verdünnungsreihen der Proben passte, was daran zu erkennen war, dass die CV %-Werte niedriger waren, wurde dieser Standard dem ursprünglich für diesen Test vorgesehenen vorgezogen. Der mittlere Messbereich des Testes lag zwischen 5 ng/ml und 996 ng/ml (Abb. 6, Kapitel 2.2.4). Die im ELISA eingesetzten

pAK wurden vor der Messung des Latexallergengehaltes in den Proben charakterisiert.

4.3.1 Charakterisierung der für den Gesamtlatex-ELISA verwendeten Antikörper

Die für den Gesamtlatex-ELISA verwendeten polyklonalen Antikörper wurden charakterisiert. Dazu wurden native und rekombinante Einzelallergene als Proben in den Gesamtlatex-ELISA eingesetzt um die Reaktivität der Einzelallergene, verglichen mit dem im Test verwendeten Standard, zu untersuchen.

Abbildung 16 zeigt, dass die rekombinanten Formen der Allergene Hev b 1, Hev b 5, Hev b 8, Hev b 11 und Hev b 12 von den polyklonalen Antikörpern, die für den Gesamtlatex-ELISA verwendet werden, nicht erkannt wurden. Die rekombinant hergestellten Allergene Hev b 6.02 und Hev b 7, sowie in geringem Maße Hev b 3, wurden bei hoher Konzentration von den pAK detektiert. Eine deut-

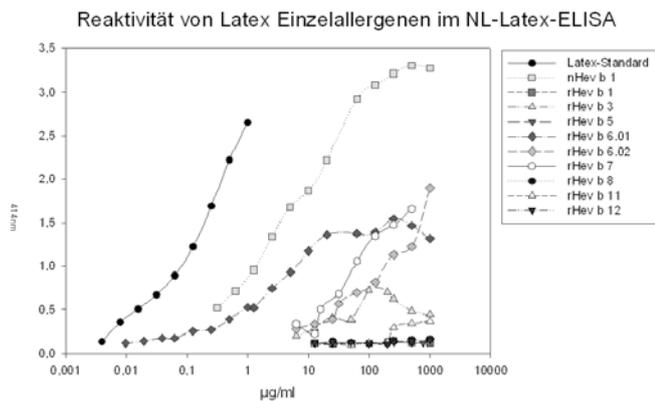


Abb. 16: Reaktivität von Latex-Einzelallergenen im Gesamtlatex-ELISA. Es wurde die Konzentration der Antigene bzw. des Latex-Standards in µg/ml gegen die optische Dichte, gemessen bei 414 nm, aufgetragen. Die Standardkurve (Latex-Standard) ist in schwarz abgebildet.

lich höhere Reaktivität im Gesamtlatex-ELISA zeigten die Allergene nHev b 1 und rHev b 6.01.

Zusätzlich wurde mittels Dot-Blot untersucht, welche rekombinanten Einzelallergene durch die Antikörper des Latex-ELISA erkannt werden. Den Scan des Dot-Blots zeigt Abb. 17.

Auf die Nitrocellulose-Membran wurden die rekombinanten Einzelallergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 11 und Hev b 12 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente das Protein MBP, welches aufgrund der Herstellungsweise als Fusionsprotein an die rekombinanten Einzelallergene gebunden ist und von den Gesamtlatex-Antikörpern nicht erkannt werden sollte. Für die Positivkontrolle wurde der aus den Niederlanden mitgelieferte Latexprotein-Standard eingesetzt. Da dieser zur Immunisierung eines Kaninchens (und somit zur Herstellung der AK) eingesetzt wurde, sollten die Antikörper diese Proteine erkennen.

Besonders stark, nämlich stärker als die Positivkontrolle, reagierte

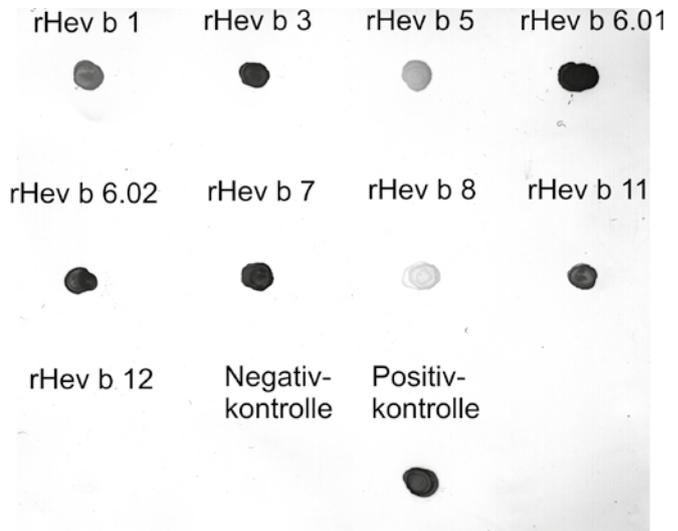


Abb. 17: Charakterisierung der polyklonalen Antikörper des Gesamtlatex-ELISA mittels Dot-Blot.

Es wurden rekombinante Einzelallergene, sowie Positiv- und Negativkontrolle auf eine Nitrocellulose-Membran pipettiert. Als Negativkontrolle fungierte das Maltosebindprotein (MBP), als Positivkontrolle der Latexprotein-Standard (aus den Niederlanden), der zur Immunisierung genutzt wurde.

das rekombinante Hev b 6.01. Etwa ebenso deutlich wie bei der Positivkontrolle fiel die Reaktion bei rHev b 3 und rHev b 6.02 aus. Die Intensität der Farbreaktion bei rHev b 1 und rHev b 11 war etwas schwächer als die der Positivkontrolle. Noch schwächer fielen die Punkte bei rHev b 5 und rHev b 8 aus. Bei Hev b 12, in rekombinanter Form, konnte man im Original einen ganz schwachen Punkt erkennen. Der Proteinpunkt der Negativkontrolle zeigte keine Farbreaktion.

Die rekombinante Form des Hev b 6.01 wurde in beiden Testmethoden gut von den pAK erkannt. Schwächer wurden in beiden Testverfahren rHev b 3, rHev b 6.02 und rHev b 7 detektiert. Die restlichen Allergene Hev b 1, Hev b 5 und Hev b 11, sowie in viel schwächerer bis zu kaum sichtbarer Färbung Hev b 8 und Hev b 12 (alle getestet in rekombinanter Form), wurden im Dot-Blot, nicht aber im Gesamtlatex-ELISA von den pAK erkannt.

Man kann eine recht gute Übereinstimmung der beiden Verfahren erkennen.

4.3.2 Bestimmung des Latexantigengehaltes der Drogerieartikel mittels Gesamtlatex-ELISA

Neben der Bestimmung des Latexgehaltes mittels IgE-Inhibitionstest wurde dieser mit dem entwickelten Gesamtlatex-ELISA bestimmt.

Die mittlere Nachweisgrenze lag bei den Drogerieartikeln bei 189 ng/g Material. Von den 21 untersuchten Proben der 15 verschiedenen Produkte wiesen zehn Drogerieartikel im Gesamtlatex-ELISA messbare Latexantigengehalte auf (Tab. 7, Abb. 18). Den mit Abstand höchsten Latexallergengehalt hatte das Pflaster mit

Tab. 7: Der mittels Gesamtlatax-ELISA ermittelte Latexantigengehalte der Drogerieartikel.

Die mit „a“ gekennzeichneten Artikel wurden vor der Extraktion abgekocht.

48 µg Allergen/g Material. Bei den Trink- und Beruhigungssaugern war nur bei jeweils einem unbehandelten, also nicht gekochten Produkt ein Gehalt an Latexallergenen quantifizierbar. Mit Ausnahme des Kondoms von „Durex“ wiesen dagegen alle sonstigen Haushaltsartikel und Kondome bestimmbare Latexantigengehalte auf.

4.3.3 Bestimmung des Latexantigengehaltes in den Handschuhen mittels Gesamtlatax-ELISA

Ebenso wie bei dem IgE-Inhibitionstest wurden von beiden Extraktionsmethoden nur zwei Extrakte auf ihren Latexantigengehalt im Gesamtlatax-Sandwich-ELISA hin untersucht. Dabei wurden die gleichen Extrakte wie bei dem IgE-Inhibitionstest verwendet. Von den 18 untersuchten Handschuhen, die gegenwärtig im Handel zu erwerben sind, konnte in zwölf Handschuhen Latexallergen nachgewiesen werden (Tab. 8). Der mit Abstand höchste Wert lag bei ca. 27 µg Allergen/g HS (HS04). Die CV-Werte lagen zwischen 2,3 und 63,8 %.

Zwei Handschuhe (HS04, HS12) fallen besonders durch ihre hohen Latexantigengehalte auf. Auch HS16 zeigt einen leicht erhöhten Latexantigengehalt. In den meisten Fällen lagen die Latexantigenkonzentrationen der nach IPA-Methode extrahierten Extrakte über der nach EN-Methode extrahierten Extrakte. In 94 % der Fälle lagen die ermittelten Werte entweder bei beiden Methoden unter der

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Latexallergengehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	128,36(*)
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	126,22(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	124,15(*)
DA02a	Beruhigungssauger	nip	124,15(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	385,07
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	35,22(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	125,80(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	124,97(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	122,15(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	35,37(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	1038,41
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	123,34(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	1922,79
DA08	Kondome	chaps classic natur	10955,47
DA09	Kondome	Durex love	122,94(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	9499,71
DA11	Ballon	Adic B.V.	13502,79
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	10940,91
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	8531,20
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	48047,67
DA15	Übungsband	Thera-Band	544,83

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 189 ng Latexallergen/g Material)

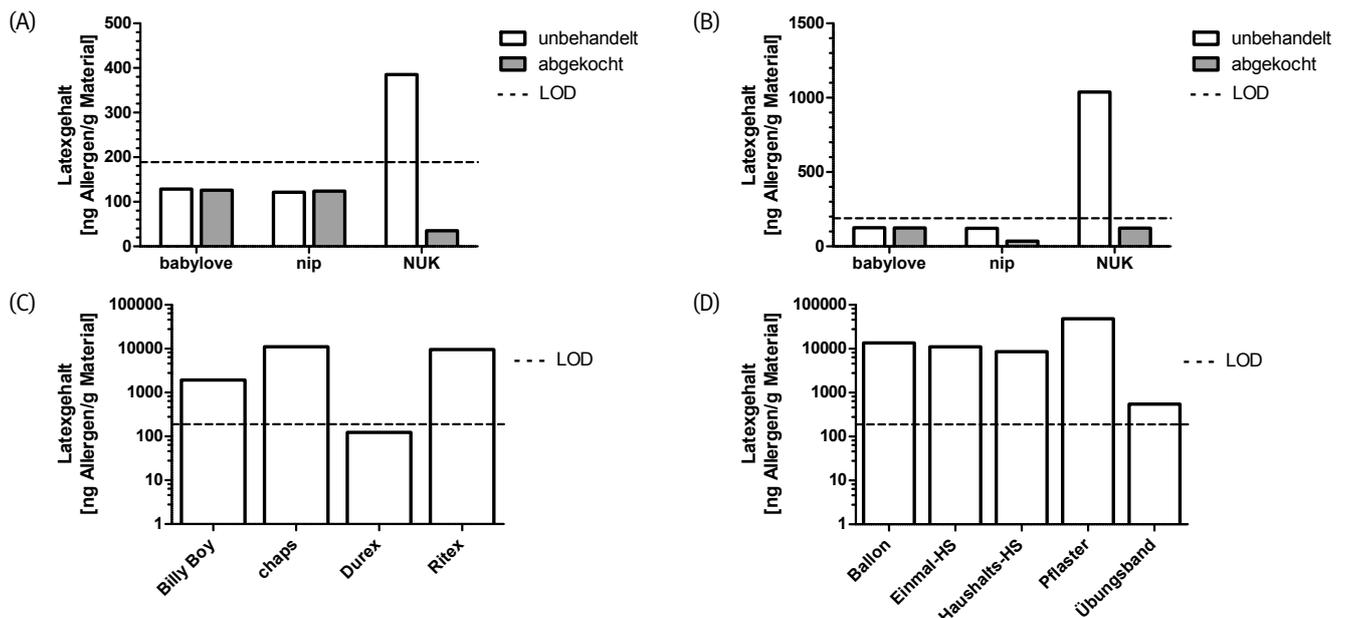


Abb. 18: Mittels Gesamtlatax-ELISA ermittelter Latexantigengehalt der Drogerieartikel.

(A) Beruhigungssauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (B) Trinksauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (C) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. (D) Sonstige Drogerieartikel (Luftballon, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 189 ng Latexallergen pro g Material.

Tab. 8: Die mittels Gesamtlax-ELISA ermittelten Latexgehalte der Handschuhe.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse für die IPA- und die EN-Methode. Es wurden jeweils der Mittelwert der Einzelwerte aus zwei Messungen sowie die Standardabweichung in Prozent (CV [%]) angegeben.

Artikel	IPA-Methode		EN-Methode	
	Mittelwert Latexgehalt [ng/g]	CV [%]	Mittelwert Latexgehalt [ng/g]	CV [%]
HS03	158,2	49,6	50,6(*)	16,6
HS04	26741,0	28,5	10551,1	30,7
HS05	89,2(**)	21,4	80,5	2,3
HS06	66,6(*)	17,4	36,9(*)	16,0
HS07	1631,1	4,2	880,3	10,4
HS08	1848,3	28,7	802,4	4,2
HS09/1	954,0	9,8	629,4	19,2
HS09/2	1570,9	32,2	759,2	51,6
HS10	291,3	33,0	92,8	58,8
HS11	174,6	5,0	83,7	12,9
HS12	6083,0	28,8	6845,6	63,8
HS13	2465,3	23,1	1077,1	31,9
HS14	44,5(*)	9,1	26,1(*)	10,1
HS15	44,2(*)	8,6	21,1(*)	13,9
HS16	3236,5	8,6	2548,9	34,5
HS17	339,9	24,5	182,0	25,7
HS18	395,1	11,1	331,7	32,9
HS19	39,0(*)	28,9	12,4(*)	33,7

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze,
 (**) Einzelwerte lagen teilweise unter der Nachweisgrenze

Nachweisgrenze, oder bei beiden im messbaren Bereich.

Zwischen den Latexantigengehalten, der nach IPA- und EN-Methode extrahierten Handschuhe, konnte eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,928$ festgestellt werden. Nach Bland-Altman wurden die Mittelwerte der Latexantigengehalte (EN- und IPA-Methode) gegen den Quotienten der Latexgehalte der EN-Methode und der IPA-Methode aufgetragen (Abb. 19). Die meisten Punkte befanden sich unter der Markierung bei eins, was eine genaue Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Methoden bedeuten würde, und es ergab sich ein Mittelwert der Quotienten von 0,75 mit $n=13$. Die Standardabweichung lag bei 0,28.

Für die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten wurden die Werte aller Handschuhe ohne die beiden Kontrollen (HS01 und HS02) herangezogen ($n=18$). Bei der Analyse nach Bland-Altman wurden nur die Werte berücksichtigt, die über der Nachweisgrenze lagen ($n=13$).

4.4 Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes mittels Hev b 1-ELISA in den Proben

Nach der Bestimmung des Gesamtlaxantigengehaltes der untersuchten Proben mit dem weiterentwickelten Gesamtlax-ELISA wurde ein weiterer am IPA entwickelter ELISA zur Untersuchung des allergisierenden Potenzials von Latexprodukten genutzt. Es

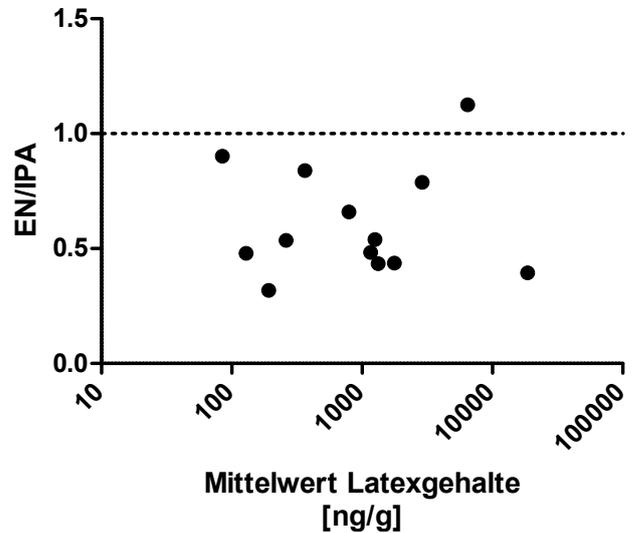


Abb. 19: Vergleich der mittels Gesamtlax-ELISA ermittelten Latexantigengehalte mittels Bland-Altman-Plot.

Aufgetragen wurde der Mittelwert der Latexallergengehalte von EN- und IPA-Methode gegen den Quotienten (EN/IPA) dieser Werte. Der Quotient, der sich bei identischen Werten beider Extraktionsverfahren ergeben würde, ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

handelte sich dabei um den Hev b 1-ELISA, der im Gegensatz zum Gesamtlax-ELISA auf monoklonalen Antikörpern basiert und gegen das erste charakterisierte Latexallergen REF (Hev b 1) gerichtet ist. Dieser ELISA war in dieser Arbeit für optimale Empfindlichkeit gegenüber der im Jahr 2000 von Raulf-Heimsoth et al. publizierten Version verändert worden (siehe auch Methodenteil Kapitel 3.2.5). Im Unterschied zu der publizierten Version, waren Fang- und Nachweis-AK gegeneinander ausgetauscht worden, bevor die Optimierung in dieser Arbeit eingeleitet wurde. Der Test wurde von den damaligen Bedingungen auf die heutigen Standardbedingungen des Labors umgestellt. So wurde das Testsystem erfolgreich von dem Avidin-Peroxidase-Konjugat auf das heute im Labor verwendete Streptavidin-Peroxidase-Konjugat von Fitzgerald umgestellt. Dadurch konnte auch die für viele ELISA verwendete Substratlösung und Stopplösung eingesetzt werden. Allerdings zeigte eine Umstellung von Mikrotiterplatten mit Oberflächenvergrößerung auf die standardmäßig verwendeten Mikrotiterplatten ohne Oberflächenvergrößerung keine Verbesserung des Tests, weshalb weiterhin diese Platten benutzt wurden. Auch der Versuch den Test durch eine andere Blockierungslösung zu verbessern blieb erfolglos, weshalb weiterhin mit 2 % BSA blockiert wurde. Die Verdünnungsreihe des Standards wurde auf die normalerweise im IPA üblichen acht Verdünnungen gebracht und diese statt mit 1250 ng/ml mit 250 ng/ml begonnen. Dadurch, sowie durch die Erhöhung der Konzentration an Fang-AK und dem Senken der Konzentration an Nachweis-AK, konnte der hohe Hintergrund dieses Testes zwar nicht stark verringert, der Hev b 1-ELISA aber empfindlicher gemacht werden.

Tab. 9: Mittels Hev b 1-ELISA ermittelte Hev b 1-Gehalte der Drogerieartikeln.

Die mit dem Buchstaben „a“ in der Abkürzung gekennzeichneten Artikel, wurden vor der Extraktion abgekocht.

4.4.1 Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes in den Drogerieartikeln

Die mittlere Nachweisgrenze des Hev b 1-ELISA lag bei den Drogerieartikeln bei 100 ng Hev b 1/g Material. Von den 21 verschiedenen Extrakten wiesen nur zwei Hev b 1-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze des Testes auf (Tab. 9, Abb. 20). Dies waren die Extrakte der Einmalhandschuhe und des Pflasters. Bei den Latexprodukten lag der höchste gemessene Hev b 1-Gehalt bei 14,35 µg Hev b 1/ g Material (DA08). Allerdings wies das latexfreie Übungsband (DA15) mit 67,39 µg Hev b 1/g Material einen deutlich höheren Wert auf.

Durch das Abkochen der Sauger zeigte sich eine deutliche Reduktion des messbaren Hev b 1-Gehaltes (Abb. 20). Es ist zu beachten, dass die Skalen der Diagramme unterschiedlich sind. Es existiert eine enorme Varianz der Werte. Die meisten Produkte lagen bei einem Hev b 1-Gehalt von etwa 200 ng/g bis 2000 ng/g. Es wurden aber auch Werte von bis zu 67393 ng/g gemessen (DA15, latexfreies Übungsband).

4.4.2 Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes in den Handschuhen

Bei der Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes der 18 Handschuhe wurden wie bei der Bestimmung des Latexgehaltes jeweils zwei Extrakte der beiden Extraktionsmethoden untersucht.

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Latexallergen-gehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	1986,81
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	496,07
DA02	Beruhigungssauger	nip	1649,72
DA02a	Beruhigungssauger	nip	354,67
DA03	Beruhigungssauger	NUK	478,90
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	346,86
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	361,95
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	302,84
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	830,10
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	327,94
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	639,88
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	295,17
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	6085,27
DA08	Kondome	chaps classic natur	14347,59
DA09	Kondome	Durex love	1489,12
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	9987,95
DA11	Ballon	Adic B.V.	1033,60
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	46,01
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	241,58
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	27,26
DA15	Übungsband	Thera-Band	67393,47

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze, (**) Einzelwerte lagen teilweise unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 100 ng Hev b 1/g Material)

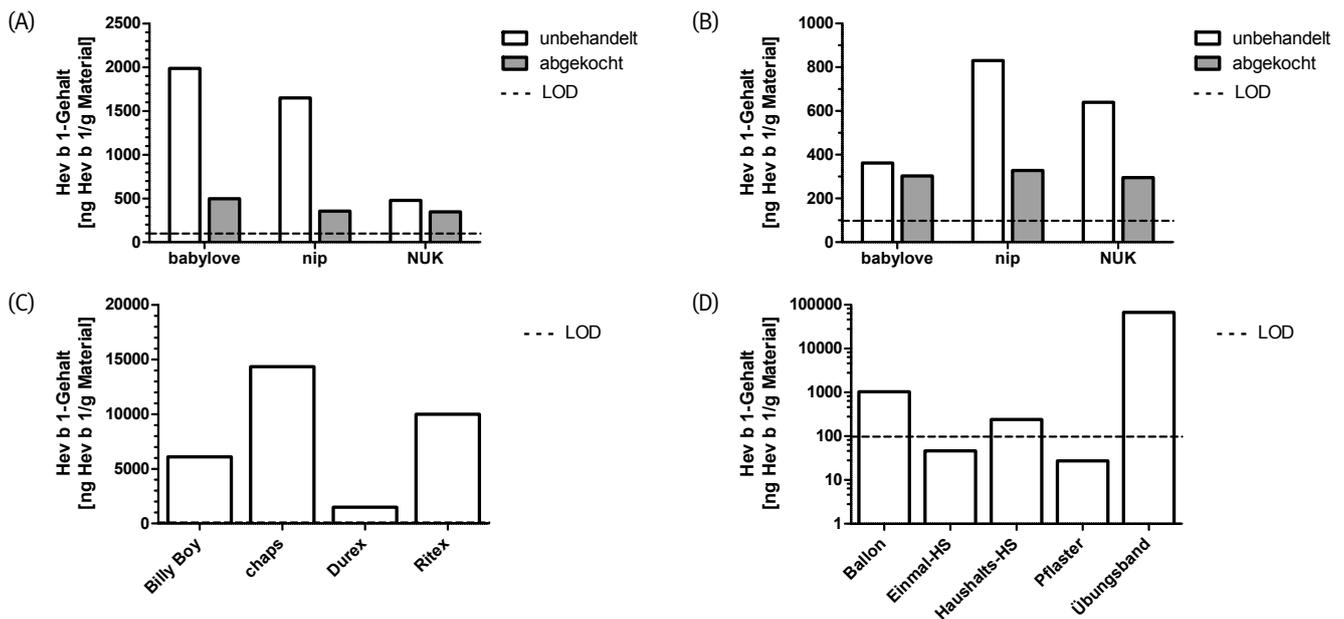


Abb. 20: Mittels Hev b 1-ELISA ermittelter Hev b 1-Gehalt der Drogerieartikel.

(A) Beruhigungssauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (B) Trinksauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (C) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. (D) Sonstige Drogerieartikel (Luftballons, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 100 ng Hev b 1/g Material.

Tab. 10: Mittels Hev b 1-ELISA ermittelter Hev b 1-Gehalt der Handschuhe.

Der Mittelwert des Hev b 1-Gehaltes wurde aus je zwei Einzelwerten gebildet und von diesen die Standardabweichung in Prozent (CV [%]) berechnet.

Artikel	IPA-Methode		EN-Methode	
	Mittelwert Hev b 1-Gehalt [ng/g]	CV [%]	Mittelwert Hev b 1-Gehalt [ng/g]	CV [%]
HS03	134,00	35,6	53,56(*)	23,2
HS04	2233,78	15,7	2566,00	8,5
HS05	172,37	47,2	96,42	6,4
HS06	737,09	9,6	471,32	28,5
HS07	174,71	6,1	72,43	21,8
HS08	55,57(*)	9,5	43,28(**)	55,6
HS09/1	55,53(*)	7,6	65,19(**)	89,0
HS09/2	261,16	42,9	238,17	28,6
HS10	293,47	51,4	229,53	24,9
HS11	365,27	30,9	221,48	31,9
HS12	1085,57	30,4	917,60	9,3
HS13	492,99	0,8	125,29	9,8
HS14	33,33(*)	18,1	19,56(*)	17,1
HS15	33,13(*)	18,6	15,71(*)	13,3
HS16	1141,83	38,0	950,32	9,7
HS17	71,20	31,4	54,02	23,2
HS18	74,87	26,5	41,30	22,9
HS19	102,33	31,3	10,44(*)	13,8

(*) alle Einzelwerte lagen unter der Nachweisgrenze,
 (**) Einzelwerte lagen teilweise unter der Nachweisgrenze
 n Anzahl der Einzelwerte

Nach jeder Methode konnten bei vier der 18 Handschuhe kein Hev b 1-Gehalt mittels Hev b 1-ELISA bestimmt werden (Tab. 10). Bei zwölf Handschuhen konnte bei beiden Methoden ein Gehalt an Hev b 1 gemessen werden. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung von 77 %, bei der entweder in beiden Methoden messbare Werte, oder Werte unter der Nachweisgrenze bestimmt wurden. Der höchste Gehalt lag bei ca. 2,5 µg Hev b 1/g Handschuh (HS04). Die CV-Werte lagen zwischen 6,1 % und 51,4 %, erreichten aber bei den Hev b 1-Gehalten, welche in Einzelwerten unter der Nachweisgrenze lagen, auch höhere Werte von bis zu 89 %.

Man erkennt deutlich, dass vor allem vier Handschuhe (HS04, HS06, HS12 und HS16) einen besonders hohen Hev b 1-Gehalt aufwiesen.

Bei den meisten Handschuhen lag der ermittelte Hev b 1-Gehalt bei den mittels IPA-Methode hergestellten Extrakten höher als bei den Extrakten, die nach EN-Methode hergestellt wurden.

Wurden die Mittelwerte der Hev b 1-Gehalte der beiden Extraktionen miteinander verglichen, so erhielt man eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,976$ ($n=18$). Im Bland-Altman-Diagramm wurden zum Vergleich der Werte beider Extraktionsmethoden die Mittelwerte der Hev b 1-Gehalte gegen

den Quotienten der Ergebnisse der EN-Methode durch die der IPA-Methode aufgetragen. Es wurden die in beiden Methoden positiven Werte ($n=12$) verwendet. Der Mittelwert der Quotienten lag bei 0,59 mit einer Standardabweichung von 0,33 (Abb. 21). Allerdings schien der Quotient mit steigendem Hev b 1-Gehalt zuzunehmen.

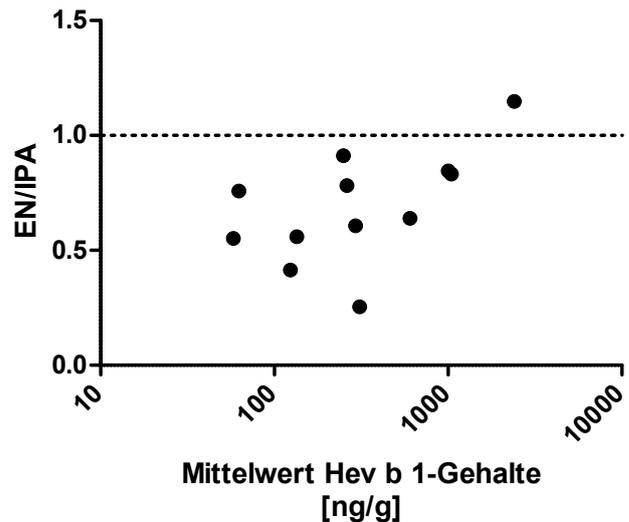


Abb. 21: Vergleich der Hev b 1-Gehalte in den Handschuhen mittels Bland-Altman-Plot.

Aufgetragen wurde der Mittelwert der Hev b 1-Gehalte von EN- und IPA-Methode gegen den Quotienten (EN/IPA) dieser Werte. Der Quotient, der sich bei identischen Werten beider Extraktionsverfahren ergeben würde, ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

4.5 Einzelallergenquantifizierung mittels FITkit®

Zunächst wurde der Proteingehalt und der Latexallergengehalt (nach zwei Methoden) der 33 aktuell auf dem Markt verwendeten Produkte untersucht. Danach wurde der Hev b 1-Gehalt mit einem am IPA entwickelten Sandwich-ELISA bestimmt. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der vier Hauptallergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 mittels der kommerziellen FITkits® der Firma Quattromed. Bei den FITkits® handelt es sich um Sandwich-ELISA, die auf der Basis monoklonaler Antikörper ein Einzelallergen detektieren. Für die Quantifizierung der Latexeinzelallergene wurde bei den Handschuhen allerdings von beiden Extraktionen nur jeweils eine Probe untersucht. Durch die Verwendung der vier verfügbaren kommerziellen Tests für die Allergene Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 konnten die Gehalte dieser Allergene in den Proben mit der gleichen Methode bestimmt werden.

4.5.1 FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung

4.5.1.1 FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten

Von den 21 Drogerieartikelproben konnte im Hev b 1-FITkit® nur bei fünf Extrakten ein Gehalt an Hev b 1 gemessen werden (Tab. 11). Dies waren der unabgekochte Beruhigungssauger von „babylove“, der unabgekochte Trinksauger von „NUK“, das Kondom von „chaps“, die Einmalhandschuhe und das Pflaster. Den höchsten

Tab. 11: Quantifizierung der Hev b 1-Gehalte in Drogerieartikeln mittels FITkit®.

Die mit dem Buchstaben „a“ abgekürzten Artikel wurden vor der Extraktion abgekocht.

Wert lieferte mit 511 ng/g Material ein Kondom (DA08). Die mittlere Nachweisgrenze lag für diesen Test bei 139 ng/g Material. In Abb. 22 wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt.

4.5.1.2 FITkit®-Hev b 1-Quantifizierung in den Handschuhextrakten

Bei der Quantifizierung von Hev b 1 mit dem kommerziellen Kit von Quattromed konnte nur von zwei Handschuhen ein Wert bestimmt werden (Tab. 12). Für HS04 nach Extraktion mit der EN-Methode lag der Wert oberhalb der Nachweisgrenze, während für HS14, extrahiert mit der IPA-Methode ein Wert oberhalb der Nachweisgrenze erhoben wurde, der zweite bei Extraktion nach IPA-Methode. Der höchste Wert lag bei 220 ng Hev b 1/g Material (HS04, EN-Methode).

4.5.2 FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung

4.5.2.1 FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung in den Drogerieartikelextrakten

Bei der Hev b 3-Quantifizierung mittels FITkit®, wurden bei den Drogerieartikeln nur zwei Produkte mit messbaren Hev b 3-Gehalten detektiert. Dies waren die beiden Kondome von „Billy Boy“ und „chaps“. Das Kondom von „chaps“ (DA08) lieferte mit 820 ng Hev b 3/g Material den höchsten Wert (Tab. 13).

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Hev b 1-Gehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	227,50
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	112,67(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	108,33(*)
DA02a	Beruhigungssauger	nip	110,82(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	109,74(*)
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	109,39(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	112,29(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	111,55(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	109,03(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	111,18(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	204,37
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	110,10(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	122,11(*)
DA08	Kondome	chaps classic natur	511,95
DA09	Kondome	Durex love	109,74(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	120,53(*)
DA11	Ballon	Adic B.V.	109,74(*)
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	239,51
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockug	Profissimo	109,39(*)
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	182,90
DA15	Übungsband	Thera-Band	123,32(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 139 ng Hev b 1/g Material)

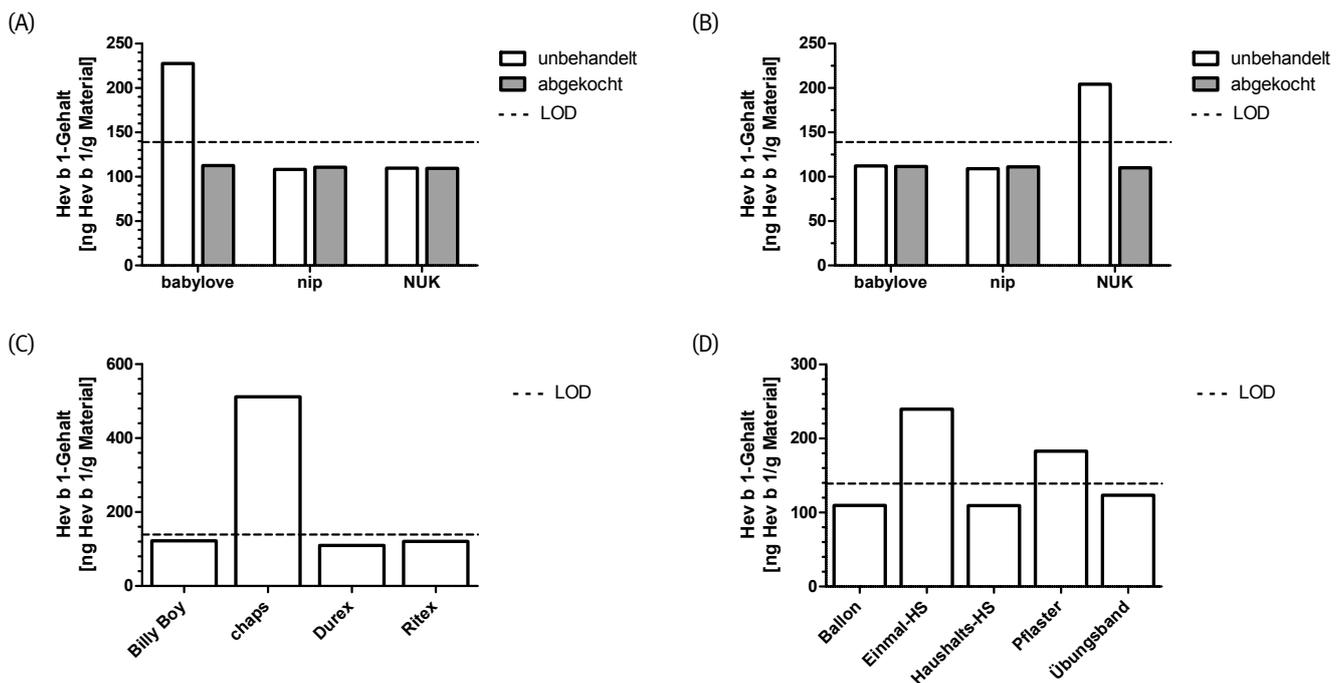


Abb. 22: Quantifizierung des Hev b 1-Gehalts in Drogerieartikeln mittels FITkit®.

(A) Beruhigungssauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und abgekocht. (B) Trinksauger der Marken „babylove“, „nip“ und „NUK“, jeweils unbehandelt und gekocht. (C) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. (D) Sonstige Drogerieartikel (Luftballons, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 139 ng Hev b 1/g Material.

Tab. 12: Quantifizierung der Hev b 1-Gehalte in den Handschuhen mittels FITkit®.

Es wurde von jedem Handschuh der Hev b 1-Gehalt in jeweils einem nach IPA-Methode und nach EN-Methode extrahierten Extrakt bestimmt.

Artikel	"Hev b 1-Gehalt IPA-Methode [ng/g]"	"Hev b 1-Gehalt EN-Methode [ng/g]"
HS03	109,03(*)	83,83(*)
HS04	110,82(*)	220,21
HS05	112,29(*)	75,18(*)
HS06	110,82(*)	60,97(*)
HS07	110,10(*)	53,89(*)
HS08	109,03(*)	50,90(*)
HS09/1	110,46(*)	46,53(*)
HS09/2	110,10(*)	48,45(*)
HS10	111,55(*)	71,73(*)
HS11	109,39(*)	72,84(*)
HS12	109,03(*)	64,11(*)
HS13	109,74(*)	50,18(*)
HS14	182,70	65,81(*)
HS15	110,10(*)	54,45(*)
HS16	109,03(*)	75,18(*)
HS17	112,29(*)	72,22(*)
HS18	109,03(*)	81,56(*)
HS19	110,46(*)	36,08(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze

In Abb. 23 sind die Hev b 3-Gehalte der Kondome graphisch dargestellt.

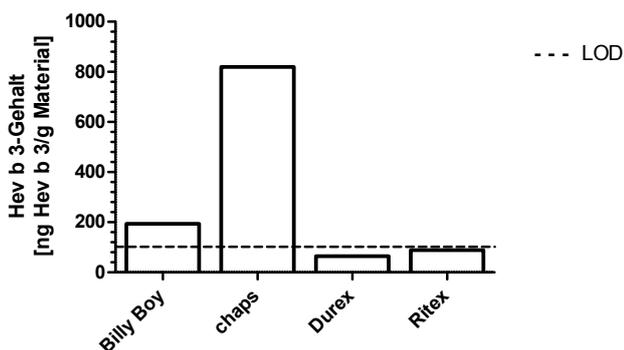


Abb. 23: Quantifizierung des Hev b 3-Gehaltes in den Drogerieartikel mittels FITkit®.

Gezeigt werden die Hev b 3-Gehalte der Kondome von den Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 102 ng Hev b 3/g Material.

4.5.2.2 FITkit®-Hev b 3-Quantifizierung in den Handschuhextrakten

Bei den 18 Handschuhextrakten konnte in fünf Extrakten, bei beiden Extraktionsmethoden, die Hev b 3-Konzentration gemessen werden (Tab. 14). In den restlichen Handschuhextrakten konnten

Tab. 13: Quantifizierung der Hev b 3-Gehalte in den Drogerieartikeln mittels FITkit®.

Die in der Abkürzung mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichneten Artikel wurden vor der Extraktion abgekocht.

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Hev b 3-Gehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	92,97(*)
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	66,45(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	87,90(*)
DA02a	Beruhigungssauger	nip	65,36(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	89,05(*)
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	64,51(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	66,23(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	65,79(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	64,30(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	65,57(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	63,48(*)
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	64,93(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	193,54
DA08	Kondome	chaps classic natur	819,94
DA09	Kondome	Durex love	64,72(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	88,76(*)
DA11	Ballon	Adic B.V.	64,72(*)
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	65,36(*)
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	88,76(*)
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	61,52(*)
DA15	Übungsband	Thera-Band	90,81(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 102 ng Hev b 3/g Material)

bei beiden Extraktionsmethoden keine Konzentrationen an Hev b 3 gemessen werden. Der höchste quantifizierte Wert lag bei knapp 5 µg Hev b 3/g HS (HS04).

Von den fünf messbaren Werten lagen vier Werte der Extrakte nach IPA-Methode höher als die der EN-Methode. Beim Vergleich der beiden Methoden konnte eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,98$ berechnet werden.

4.5.3 FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung

4.5.3.1 FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung in den Drogerieartikel-extrakten

Die Hev b 5-Quantifizierung in den Drogerieartikeln lieferte nur bei vier von 21 Proben messbare Werte (Tab. 15, Abb. 24). Die Trink- und Beruhigungssauger lagen mit ihrem Hev b 5-Gehalt alle unter der Nachweisgrenze. Auch bei den Kondomen wies nur das der Marke „Ritex“ einen Hev b 5-Gehalt auf. Den höchsten Hev b 5-Gehalt lieferte mit 3124,91 ng Hev b 5/g Material der Luftballon. Außerdem konnte bei den Einmal- und Haushaltshandschuhen ein Gehalt an Hev b 5 gemessen werden.

Tab. 14: Quantifizierung der Hev b 3-Gehalte in den Handschuhen mittels FITkit®.

Es wurde von jedem Handschuh der Hev b 3-Gehalt in jeweils einem nach IPA-Methode und nach EN-Methode extrahierten Extrakt bestimmt.

Artikel	"Hev b 3-Gehalt IPA-Methode [ng/g]"	"Hev b 3-Gehalt EN-Methode [ng/g]"
HS03	64,30(*)	49,44(*)
HS04	4685,34	2271,33
HS05	66,23(*)	44,34(*)
HS06	307,55	488,62
HS07	89,34(*)	43,73(*)
HS08	64,30(*)	41,30(*)
HS09/1	65,14(*)	27,44(*)
HS09/2	64,93(*)	28,58(*)
HS10	65,79(*)	42,30(*)
HS11	64,51(*)	42,96(*)
HS12	975,29	688,00
HS13	385,97	63,13
HS14	65,57(*)	38,81(*)
HS15	89,34(*)	32,11(*)
HS16	384,41	177,47
HS17	66,23(*)	42,59(*)
HS18	64,30(*)	48,10(*)
HS19	65,14(*)	21,28(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze

4.5.3.2 FITkit®-Hev b 5-Quantifizierung in den Handschuhextrakten

Auch in den Handschuhen wurde das Allergen Hev b 5 mittels FITkit® quantifiziert. Wurden die Handschuhe nach der IPA-Methode extrahiert, konnte der Hev b 5-Gehalt bei neun von 18 Handschuhen

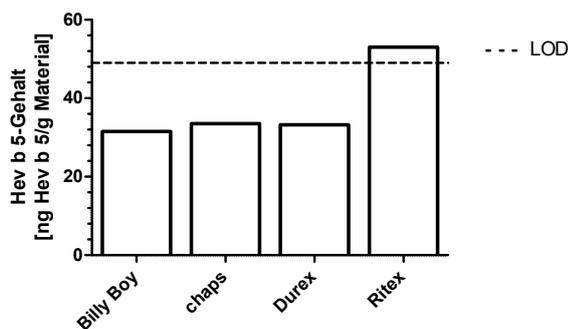
Tab. 15: Quantifizierung der Hev b 5-Gehalte in den Drogerieartikeln mittels FITkit®.

Die in der Abkürzung mit dem Buchstaben „a“ gekennzeichneten Artikel, wurden vor der Extraktion abgekocht.

Artikel	Bezeichnung	Marke	"Hev b 5-Gehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	34,68(*)
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	34,11(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	32,79(*)
DA02a	Beruhigungssauger	nip	33,55(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	33,22(*)
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	33,11(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	33,99(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	33,77(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	33,01(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	33,66(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	32,59(*)
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	33,33(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	31,54(*)
DA08	Kondome	chaps classic natur	33,55(*)
DA09	Kondome	Durex love	33,22(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	53,04
DA11	Ballon	Adic B.V.	3124,91
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	1065,19
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	172,27
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	31,58(*)
DA15	Übungsband	Thera-Band	33,88(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 102 ng Hev b 5/g Material)

(A)



(B)

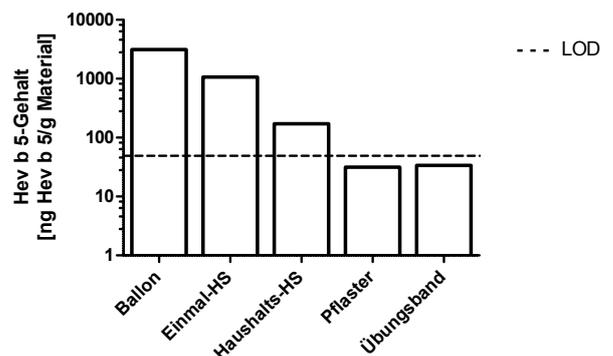


Abb. 24: Quantifizierung des Hev b 5-Gehaltes in den Drogerieartikel mittels FITkit®.

(A) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. (B) Sonstige Drogerieartikel (Luftballons, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 49 ng Hev b 5/g Material.

gemessen werden. Bei Extraktion nach EN-Methode, lagen die Werte bei zehn der 18 Handschuhe im messbaren Bereich des Tests. Der höchste ermittelte Hev b 5-Gehalt lag bei ca. 1 µg Hev b 5/g Material (Tab. 16, HS04).

Tab. 16: Quantifizierung der Hev b 5-Gehalte in den Handschuhen mittels FITkit®.

Es wurde von jedem Handschuh der Hev b 5-Gehalt in jeweils einem nach IPA-Methode und nach EN-Methode extrahierten Extrakt bestimmt.

Artikel	Hev b 5-Gehalt IPA-Methode [ng/g]"	Hev b 5-Gehalt EN-Methode [ng/g]"
HS03	33,01(*)	25,38(*)
HS04	1079,04	997,21
HS05	135,33	104,83
HS06	33,55(*)	18,46(*)
HS07	33,33(*)	16,31(*)
HS08	33,01(*)	15,41(*)
HS09/1	33,44(*)	14,09(*)
HS09/2	33,33(*)	14,67(*)
HS10	31,75(*)	34,24
HS11	91,39	50,22
HS12	306,05	979,47
HS13	120,17	78,78
HS14	33,66(*)	19,92(*)
HS15	33,33(*)	16,48(*)
HS16	270,53	580,61
HS17	74,66	68,74
HS18	474,62	346,88
HS19	54,38	39,09

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze

Bei 94 % der Werte stimmte es überein, dass bei den Extraktionsmethoden entweder beide Methoden messbare Hev b 5-Gehalte lieferten, oder bei beiden Methoden die Werte unter der Nach-

Tab. 17: Quantifizierung der Hev b 6.02-Gehalte in den Drogerieartikeln mittels FITkit®.

Die mit „a“ gekennzeichneten Artikel wurden vor der Extraktion abgekocht.

Artikel	Bezeichnung	Marke	Hev b 6.02-Gehalt [ng/g]"
DA01	Beruhigungssauger	babylove	27,67(*)
DA01a	Beruhigungssauger	babylove	27,21(*)
DA02	Beruhigungssauger	nip	26,17(*)
DA02a	Beruhigungssauger	nip	26,77(*)
DA03	Beruhigungssauger	NUK	26,51(*)
DA03a	Beruhigungssauger	NUK	26,42(*)
DA04	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	27,12(*)
DA04a	Trinksauger Anti-Kolik	babylove	26,94(*)
DA05	Trinksauger Anti-Kolik	nip	26,34(*)
DA05a	Trinksauger Anti-Kolik	nip	26,86(*)
DA06	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	26,00(*)
DA06a	Trinksauger Anti-Kolik	NUK	26,59(*)
DA07	Kondome	Billy Boy extra feucht	92,96
DA08	Kondome	chaps classic natur	260,92
DA09	Kondome	Durex love	26,51(*)
DA10	Kondome	Ritex Intensiv	319,38
DA11	Ballon	Adic B.V.	7726,15
DA12	Einmalhandschuhe	Profissimo	572,50
DA13	Haushaltshandschuhe mit Baumwollbeflockung	Profissimo	399,13
DA14	Pflaster elastisch	Das gesunde Plus	544,34
DA15	Übungsband	Thera-Band	27,03(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze (mittlere Nachweisgrenze: 35 ng Hev b 6.02/g Material)

weisgrenze lagen. Der Vergleich der beiden Methoden zeigte eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von r=0,83 (n=18).

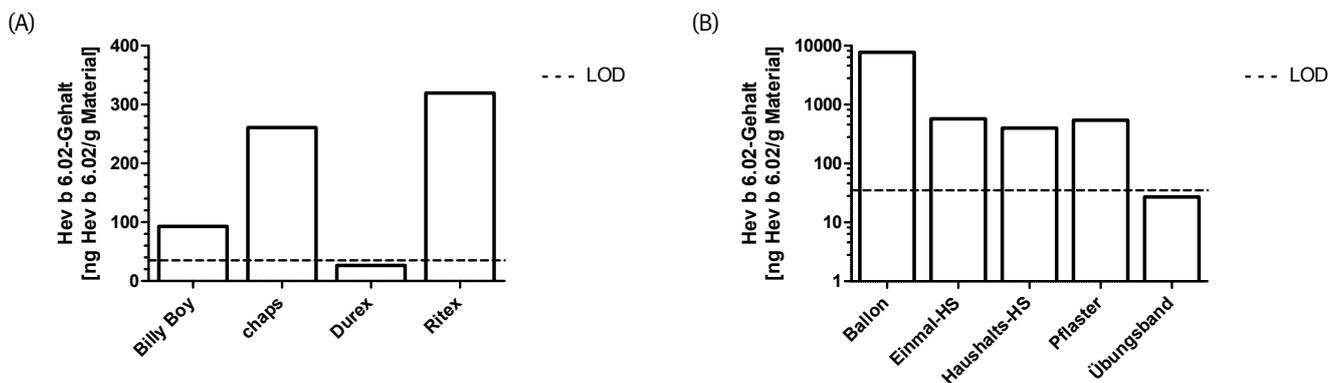


Abb. 25: Quantifizierung des Hev b 6.02-Gehaltes in den Drogerieartikel mittels FITkit®.

(A) Kondome der Marken „Billy Boy“, „chaps“, „Durex“ und „Ritex“. (B) Sonstige Drogerieartikel (Luftballons, Einmalhandschuhe, Haushaltshandschuhe, Pflaster und ein latexfreies Übungsband). Die mittlere Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) lag bei 35 ng Hev b 6.02/g Material.

Tab. 18: Quantifizierung der Hev b 6.02-Gehalte in den Handschuhen mittels FITkit®.

Es wurde von jedem Handschuh der Hev b 6.02-Gehalt in jeweils einem nach IPA-Methode und nach EN-Methode extrahierten Extrakt bestimmt.

Artikel	Hev b 6.02-Gehalt IPA-Methode [ng/g]"	Hev b 6.02-Gehalt EN-Methode [ng/g]"
HS03	26,34(*)	20,25(*)
HS04	26,77(*)	19,40(*)
HS05	27,12(*)	18,16(*)
HS06	26,77(*)	14,73(*)
HS07	449,05	245,99
HS08	303,36	55,45
HS09/1	64,16	88,49
HS09/2	205,49	197,03
HS10	26,94(*)	17,33(*)
HS11	26,42(*)	17,59(*)
HS12	323,69	442,81
HS13	152,12	74,14
HS14	26,86(*)	15,90(*)
HS15	26,59(*)	13,15(*)
HS16	1149,74	1936,75
HS17	27,12(*)	17,44(*)
HS18	26,34(*)	19,70(*)
HS19	26,68(*)	8,71(*)

(*) Wert lag unter der Nachweisgrenze

In der Regel wiesen die Extrakte nach IPA-Methode höhere Hev b 5-Konzentrationen auf als die Extrakte nach EN-Methode. Vier Handschuhe (HS04, HS12, HS16 und HS18) zeigten in einem deutlich höheren Hev b 5-Gehalt als die anderen Handschuhe.

4.5.4 FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung

4.5.4.1 FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung in den Drogerieartikel-extrakten

Bei den Drogerieartikeln konnte bei sieben Proben ein Gehalt an Hev b 6.02, mittels kommerziellem FITkit®, bestimmt werden. In den Trink- und Beruhigungssaugern konnten keine Hev b 6.02-Gehalte gemessen werden. Außerdem lagen die Hev b 6.02-Gehalte des Kondoms von „Durex“ und des latexfreien Übungsbandes unter der Nachweisgrenze (Tab. 17, Abb. 25). Der höchste Messwert lag bei knapp 8 µg Hev b 6.02/g Material.

4.5.4.2 FITkit®-Hev b 6.02-Quantifizierung in den Handschuh-extrakten

Von den 18 untersuchten Handschuhen wiesen sieben einen Hev b 6.02-Gehalt auf, der im nachweisbaren Bereich des Tests (FITkit® Hev b 6.02) lag. In diesen sieben Handschuhen waren die Hev b 6.02-Gehalte mit beiden Methoden gleichermaßen quantifizierbar (Tab. 18). Der mit Abstand höchste quantifizierbare Wert lag bei knapp 2 µg Hev b 6.02/g HS (HS16), die anderen Handschuhe wiesen deutlich niedrigere Hev b 6.02-Gehalte auf. Keine der Extraktionsmethoden lieferte unter den messbaren Hev b 6.02-Gehalten durchgängig höhere Werte. Die Werte für die Extraktion nach IPA- und EN-Methode korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,95$ bei $n=18$.

4.6 Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Latexprodukte mittels SDS-PAGE und IgG-Immunoblot

4.6.1 Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Drogerieartikel

Einige Drogerieartikel wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und zusätzlich ein IgG-Immunoblot durchgeführt. Es wurden die Extrakte folgender Produkte analysiert: Einmalhand-

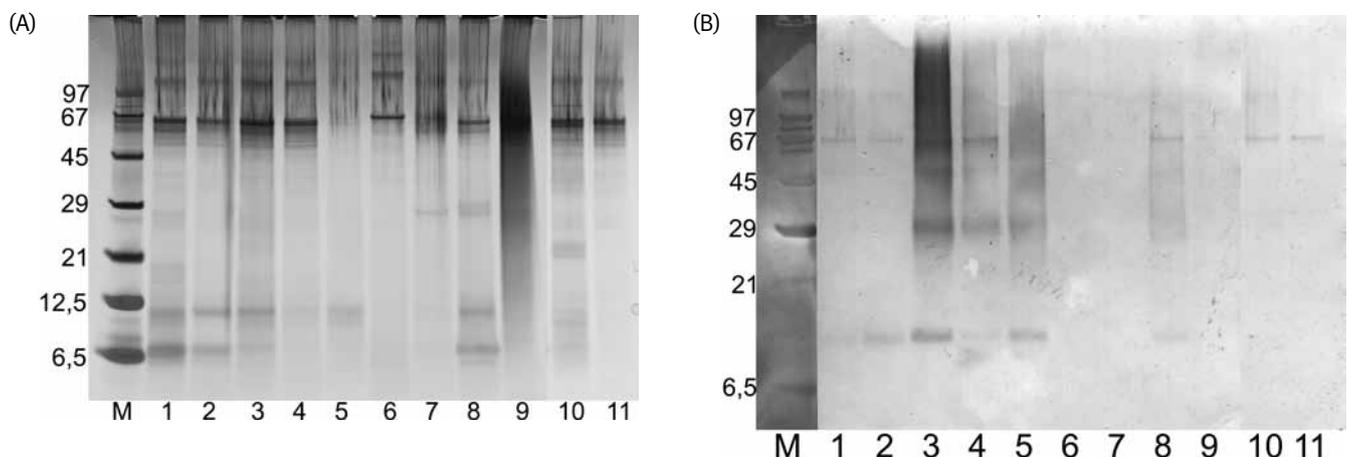


Abb. 26: Silbergefärbtes Gel und Immunoblot einiger Drogerieartikel.

(A) zeigt das silbergefärbte Gel, (B) zeigt den IgG-Immunoblot. In den Spuren wurde aufgetragen: M Marker [kDa], 1 Haushaltshandschuh (DA13), 2 Einmalhandschuh (DA12), 3 und 4 Kondom der Marke „chaps“ (DA08), 5 Kondom der Marke „Billy Boy“ (DA07), 6 Trinksauger der Marke „nip“ (DA05), 7 Pflaster (DA14), 8 Luftballon (DA11), 9 latexfreies Übungsband (DA15), 10 unbehandelter Beruhigungssauger der Marke „babylove“ (DA01), 11 abgekochter Beruhigungssauger der Marke „babylove“ (DA01)

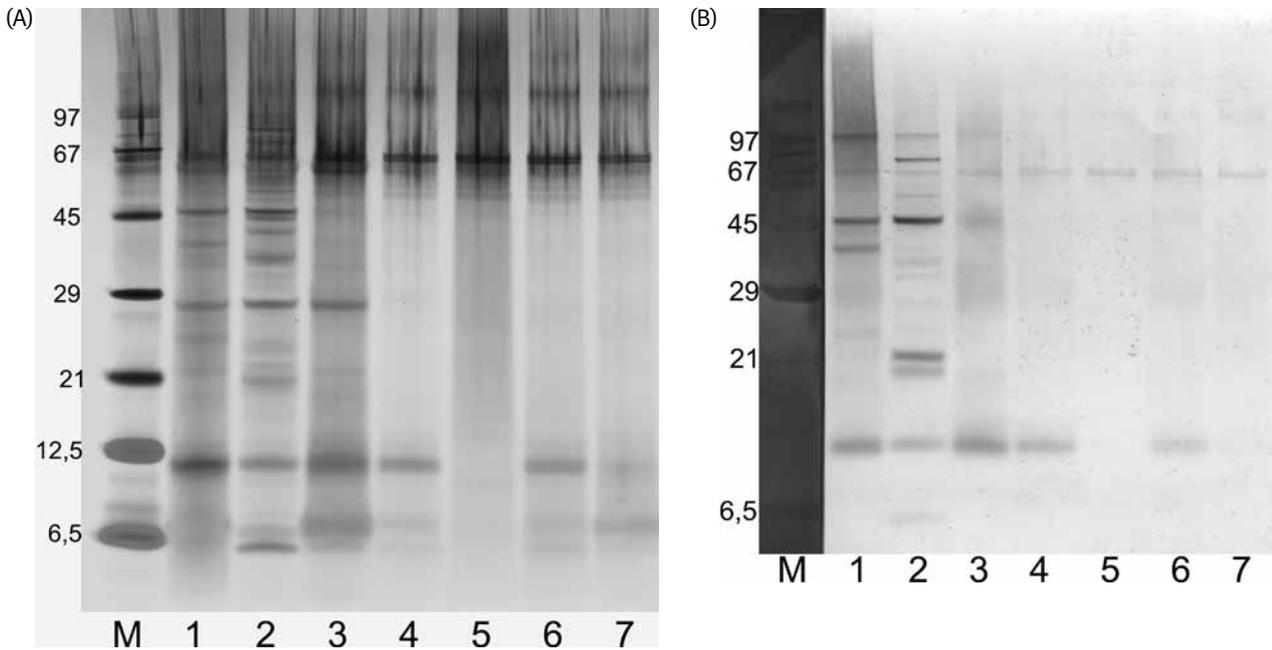


Abb. 27: Silbergefärbtes Gel und Immunoblot einiger Handschuhe und Standards.

(A) zeigt das silbergefärbte Gel, (B) den IgG-Immunoblot. In den Spuren wurde aufgetragen: M Marker [kDa], 1 Standard des IgE-Inhibitionstest, 2 ursprünglicher Standard des Gesamtlatax-ELISA, 3 HS02, 4 HS04, 5 HS09/1, 6 HS12, 7 HS16

Tab. 19: Korrelation nach Pearson der verschiedenen Methoden.

Es werden die Proteingehalte, die Latexallergengehalte mittels Sandwich-ELISA und IgE-Inhibitionstest und die Einzelallergengehalte (Hev b 1: Sandwich-ELISA des IPA und FITkit, Hev b 3: FITkit, Hev b 5: FITkit und Hev b 6.02: FITkit) mittels Pearson-Korrelation verglichen. Korrelationskoeffizienten von $r > 0,5$ sind dunkel dargestellt und deuten auf eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen dieser beiden Methoden hin.

Pearson	Protein [ng/ml]	Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	Latex (ELISA) [ng/ml]	Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]	Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	Summe Einzelallergene (FITkit)	Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)
Protein [ng/ml]										
Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	0,814									
Latex (ELISA) [ng/ml]	0,311	0,007								
Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]"	0,149	-0,037	0,547							
Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	0,177	0,162	0,309	0,060						
Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	0,088	0,028	0,532	0,695	0,242					
Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	0,131	-0,036	0,417	0,836	0,090	0,397				
Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	0,206	-0,027	0,229	0,539	-0,032	-0,034	0,789			
Summe Einzelallergene (FITkit)	0,206	-0,010	0,494	0,865	0,143	0,522	0,942	0,824		
Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)	0,840	0,981	0,102	0,132	0,181	0,128	0,148	0,135	0,185	

schuh (Spur 2), Haushaltshandschuh (Spur 1), Pflaster (Spur 7), Luftballon (Spur 8), Übungsband (Spur 9), das Kondom von „Billy Boy“ (Spur 5) und das von „chaps“ (Spur 3 und 4) sowie der Trinksauger von „nip“ (Spur 6) und der Beruhigungssauger von „babylove“ sowohl unbehandelt (Spur 10), als auch abgekocht (Spur 11). Zusätzlich wurde ein Proteinmarker mit Banden bei definierten Molekulargewichten aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel mit Silber gefärbt (Abb. 26 A). In fast allen Spuren, außer Spur 5 und 9, waren bei etwa 67 kDa Banden zu erkennen. In Spur 7 und 8 konnte man Banden bei etwa 29 kDa erkennen. Bei etwa 21 kDa lag in Spur 10 eine Doppelbande. Viele Produkte wiesen eine Bande knapp unter 12 kDa auf (Spur 1, 2, 3, 4 (leicht), 5, 8, 10 (leicht)). Außerdem wurden in den Spuren 1, 2, 3, 8 und 10 Banden bei ca. 6,5 kDa deutlich. In Spur 9, in der der Extrakt des Übungsbandes aufgetragen wurde, waren schwache Banden bei 29 und 67 kDa durch einen Schleier, der die ganze Spur ausfüllte, überdeckt.

Im IgG-Immunoblot werden nur die Banden sichtbar, bei denen die Proteine durch die Antikörper im Kaninchenserum erkannt werden (Abb. 26 B). Es handelte sich dabei um die pAK, die für den Aufbau des Gesamtlatex-ELISA verwendet wurden. In den Spuren 1, 2, 3, 4, 8, 10 und 11 konnten bei etwa 67 kDa Banden detektiert werden. Weiterhin wurden Banden bei ca. 29 kDa in den Spuren 3, 4 und 5 sichtbar. Auf ungefähr der Höhe von 12,5 kDa wurden

Banden in den Spuren 2, 3, 4, 5 und 8 erkannt. Die Banden, die im Silbergel bei ca. 6,5 kDa angefärbt wurden, konnten im IgG-Immunoblot nicht wiedergefunden werden. Bei den Banden, die in den Spuren 3, 4 und 5 im IgG-Immunoblot bei ca. 29 kDa angefärbt wurden, konnte man im Silbergel nur leichte Schatten erkennen. Allergene mit ähnlichen Molekulargewichten wären zum Beispiel Hev b 11 mit 30 kDa, Hev b 1 und Hev b 6.03 mit ca. 14 kDa oder Hev b 12 mit 9 kDa.

4.6.2 Untersuchung der Allergenzusammensetzung der Handschuhe

Fünf Handschuhextrakte (Spuren 3-7), der Standard des IgE-Inhibitionstestes (Spur 1) und des Gesamtlatex-ELISA, sowie der ursprünglich für den Gesamtlatex-ELISA vorgesehene Standard (Spur 2) wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch (Abb. 27 A) aufgetrennt und zusätzlich ein IgG-Immunoblot (Abb. 27 B) durchgeführt.

Nach der Silberfärbung waren vor allem in den ersten beiden Spuren, welche die beiden Standards enthielten, viele Proteinbanden zu erkennen. Besonders deutliche Banden lagen bei ca. 67, 45, 29 und 12 kDa. In Spur 2 waren zusätzlich noch Banden bei ca. 21 und 6 kDa deutlich ausgeprägt. In den Spuren 3-7, die die Handschuhextrakte enthielten, waren deutlich weniger Banden zu erkennen. Die Handschuhextrakte wiesen alle eine Doppelbande bei ca. 67 kDa auf. In Spur 3 wurde zusätzlich noch eine Bande bei ca.

Tab. 20: Signifikanz der Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Ist $p < 0,05$ sind die Korrelationskoeffizienten signifikant. Diese Werte sind dunkel dargestellt.

Signifikanz Pearson	Protein [ng/ml]	Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	Latex (ELISA) [ng/ml]	Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]	Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	Summe Einzelallergene (FITkit)	Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)
Protein [ng/ml]										
Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	0,00000									
Latex (ELISA) [ng/ml]	0,01835	0,95815								
Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]"	0,26789	0,78247	0,00001							
Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	0,18875	0,22774	0,01939	0,65619						
Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	0,51579	0,83538	0,00002	0,00000	0,07007					
Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	0,33161	0,78964	0,00126	0,00000	0,50760	0,00221				
Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	0,12508	0,84129	0,08696	0,00002	0,81374	0,80074	0,00000			
Summe Einzelallergene (FITkit)	0,12362	0,94376	0,00009	0,00000	0,28772	0,00003	0,00000	0,00000		
Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)	0,00000	0,00000	0,45182	0,32714	0,17837	0,34179	0,27087	0,31713	0,16725	

29 kDa deutlich. Die Spuren 3, 4, 6 und 7 lieferten Banden knapp unter der 12,5 kDa-Bande des Markers. In diesen Spuren wurden zusätzlich bei etwas über und unter der Marker-Bande von 6,5 kDa Banden angefärbt.

Im IgG-Immunoblot (Abb. 27 B) nahm die Anzahl der Banden ab, weil nur noch Proteine detektiert wurden, die von den im IgG-Immunoblot verwendeten AK erkannt wurden. Bei den AK handelte es sich um die AK, mit denen der Gesamtlatax-ELISA aufgebaut wurde. In den ersten beiden Spuren nahm die Anzahl der Banden deutlich ab. In Spur 1 waren noch fünf Banden bei ca. 97, 67, 45, 40 und 12 kDa deutlich zu erkennen. Spur 2 wies noch 13 Banden auf, die mehr oder weniger stark gefärbt waren. Deutliche Banden lagen bei etwa 97, 70, 45, 21, 12 und 6,5 kDa. Die Handschuhextrakte wiesen alle eine Bande bei ungefähr 67 kDa auf. In Spur 3 lag bei ca. 45 kDa eine Bande. Die Spuren 3, 4 und 6 wiesen Banden bei etwa 12 kDa auf. Die Banden, welche im Silbergel bei ca. 6,5 kDa angefärbt wurden, wurden im IgG-Immunoblot nicht detektiert. Allergene mit ähnlichen Molekulargewichten, wie den im IgG-Immunoblot (Abb. 27 B) erkannten Antigenen, wären zum Beispiel Hev b 7 oder Hev b 13 mit jeweils 42 kDa, Hev b 1 und Hev b 6.03 mit ca. 14 kDa oder Hev b 12 mit 9 kDa. Das Allergen Hev b 6.02 ist 4,7 kDa, das Prohevein (Hev b 6.01) 20 kDa groß.

4.7 Vergleich zwischen den Protein- und Allergenbestimmungsmethoden

Bei dem Vergleich der Gehalte an Protein, Latexallergen und der Einzelallergene, muss bedacht werden, dass es sich bei der Bestimmung um komplett unterschiedliche Nachweisverfahren handelt. Der Proteingehalt wurde mittels modifiziertem Lowry-Test bestimmt. Der Latexallergen- bzw. -antigengehalt wurde unter Einsatz eines IgE-Inhibitionstest (ImmunoCAP, Phadia) sowie eines auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern (AK) basierenden Sandwich-ELISA quantifiziert. Die Bestimmung der Einzelallergengehalte (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02) erfolgte mit Hilfe von Sandwich-ELISA, welche auf der Basis monoklonaler Antikörper aufgebaut wurden.

Zum Vergleich der Protein- und Allergenbestimmungsmethoden wurden Analysen zur Korrelation der Ergebnisse verschiedener Nachweisverfahren nach Pearson und Spearman durchgeführt. Zur Analyse wurden die Werte der Proteinbestimmung, die Werte der beiden Latexallergen- bzw. -antigenbestimmungsmethoden, die Werte des Hev b 1-ELISA, sowie jeweils die Werte der Einzelallergenbestimmungen in den kommerziellen FITkits® herangezogen. Zusätzlich wurde die Summe der quantifizierten Einzelallergene mit einbezogen. Dabei wurde einmal die Summe der vier mittels FITkits® ermittelten Einzelallergene gebildet und einmal

Tab. 21: Korrelation nach Spearman der verschiedenen Methoden.

Es werden die Proteingehalte, die Latexallergengehalte mittels Sandwich-ELISA und IgE-Inhibitionstest und die Einzelallergengehalte (Hev b 1: Sandwich-ELISA des IPA und FITkit, Hev b 3: FITkit, Hev b 5: FITkit und Hev b 6.02: FITkit) mittels Spearson-Korrelation verglichen. Rangkorrelationskoeffizienten von $r > 0,5$ sind fett dargestellt und deuten auf eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen dieser beiden Methoden hin

Spearman	Protein [ng/ml]	Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	Latex (ELISA) [ng/ml]	Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]	Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	Summe Einzelallergene (FITkit)	Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)
Protein [ng/ml]										
Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	0,523									
Latex (ELISA) [ng/ml]	0,594	0,332								
Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]"	0,399	0,072	0,730							
Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	0,402	0,242	0,311	-0,007						
Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	0,578	0,585	0,462	0,396	0,193					
Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	0,147	0,066	0,389	0,598	-0,080	0,225				
Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	0,504	0,120	0,759	0,703	0,116	0,345	0,250			
Summe Einzelallergene (FITkit)	0,577	0,258	0,751	0,795	0,276	0,604	0,602	0,692		
Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)	0,745	0,819	0,657	0,426	0,395	0,653	0,289	0,473	0,659	

die Summe der Einzelallergene, bei denen die mit dem FITkit® ermittelten Hev b 1-Gehalte gegen die mit dem am IPA entwickelten Hev b 1-ELISA bestimmten Werte ausgetauscht wurden.

Für die Berechnung der Korrelation wurden die Ergebnisse der Drogerieartikel und der Handschuhe einbezogen. Bei den Handschuhen wurde sowohl ein nach IPA-Methode extrahierter, als auch ein nach EN-Methode extrahierter Handschuh, in der Analyse berücksichtigt (Tab. 19-22).

Als gut korrelierende Methoden werden diejenigen gewertet, die sowohl einen Pearson-Korrelationskoeffizienten größer 0,5 ($r > 0,5$) als auch einen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von über 0,5 ($r > 0,5$) aufwiesen. Außerdem sollten diese Korrelationen signifikant sein ($p < 0,05$). Die Methoden, die die eben beschriebenen Vorgaben erfüllten, werden jeweils gesondert noch einmal als Diagramme dargestellt. Es wurden für zehn „Methodenpaare“ solche Übereinstimmungen gefunden.

Die Korrelationen der Proteinbestimmung und des IgE-Inhibitionstests mit jeweils einer anderen Methode sind in Abb. 28 dargestellt. Abb. 29 zeigt die Korrelationen von Hev b 3-, Hev b 5- und Hev b 6.02-Gehalten gegen die Summe an mittels FITkit® ermittelter Einzelallergene (Abb. 29 A-C). Außerdem wurde in einem

Diagramm der mit dem optimierten Hev b 1-ELISA des IPA gemessene Hev b 1-Gehalt gegen die Summe der Einzelallergene (Hev b 1: Hev b 1-ELISA des IPA; Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02: FITkits®) aufgetragen (Abb. 29 D).

Nach den Abbildungen sowie den Korrelationskoeffizienten wiesen drei „Methodenpaare“ besonders gute Übereinstimmungen ihrer Ergebnisse auf.

Die Summen der Einzelallergene (Hev b 1: Sandwich-ELISA des IPA, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02: FITkits®) korrelierten sehr gut mit den Proteingehalten (Pearsonkorrelationskoeffizient von 0,84 ($p < 0,05$), Rangkorrelationskoeffizient von 0,745 ($p < 0,05$)).

Ebenfalls eine gute Korrelation zeigte der mittels IgE-Inhibitionstest ermittelte Latexallergengehalt mit der Summe der Einzelallergene, wenn diese alle vier mittels der kommerziellen FITkits® quantifiziert wurden. Allerdings wurden in diesen kaum Gehalte an Hev b 1 und Hev b 3 gemessen. Die Korrelationskoeffizienten waren nach Pearson $r=0,865$ und nach Spearman $r=0,795$. Die Korrelationen waren beide signifikant ($p < 0,05$).

Die dritte Korrelation mit besonders hohen Korrelationskoeffizienten zeigt die Abbildung 29 (D). Hier wurden die Gehalte an Hev b 1

Tab. 22: Signifikanz der Korrelationskoeffizienten nach Spearman.

Ist $p < 0,05$ sind die Korrelationskoeffizienten signifikant. Diese Werte sind fett dargestellt.

Signifikanz Spearman	Protein [ng/ml]	Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	Latex (ELISA) [ng/ml]	Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]	Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	Summe Einzelallergene (FITkit)	Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)
Protein [ng/ml]										
Hev b 1 (IPA) [ng/ml]	0,00003									
Latex (ELISA) [ng/ml]	0,00000	0,01159								
Latex (IgE-Inhibition) [ng/ml]"	0,00209	0,59205	0,00000							
Hev b 1 (FITkit) [ng/ml]	0,00194	0,06995	0,01835	0,95969						
Hev b 3 (FITkit) [ng/ml]	0,00000	0,00000	0,00029	0,00231	0,14942					
Hev b 5 (FITkit) [ng/ml]	0,27381	0,62421	0,00281	0,00000	0,55400	0,09285				
Hev b 6.02 (FITkit) [ng/ml]	0,00007	0,37569	0,00000	0,00000	0,38904	0,00863	0,06104			
Summe Einzelallergene (FITkit)	0,00000	0,05306	0,00000	0,00000	0,03766	0,00000	0,00000	0,00000		
Summe Einzelallergene (FITkit+IPA)	0,00000	0,00000	0,00000	0,00096	0,00237	0,00000	0,02917	0,00020	0,00000	

(mit dem am IPA entwickelten Hev b 1-ELISA gemessen) mit der Summe der Einzelallergene verglichen (Hev b 1: IPA-ELISA; Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02: FITkit®). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson war $r=0,981$, der Rangkorrelationskoeffizient war $r=0,819$.

Die Koeffizienten waren mit $p < 0,05$ signifikant. Diese hohen Korrelationskoeffizienten sind allerdings wahrscheinlich mit darauf zurückzuführen, dass bei der Summe der Einzelallergene der mit dem am IPA entwickelten Sandwich-ELISA ermittelte Hev b 1-Gehalt

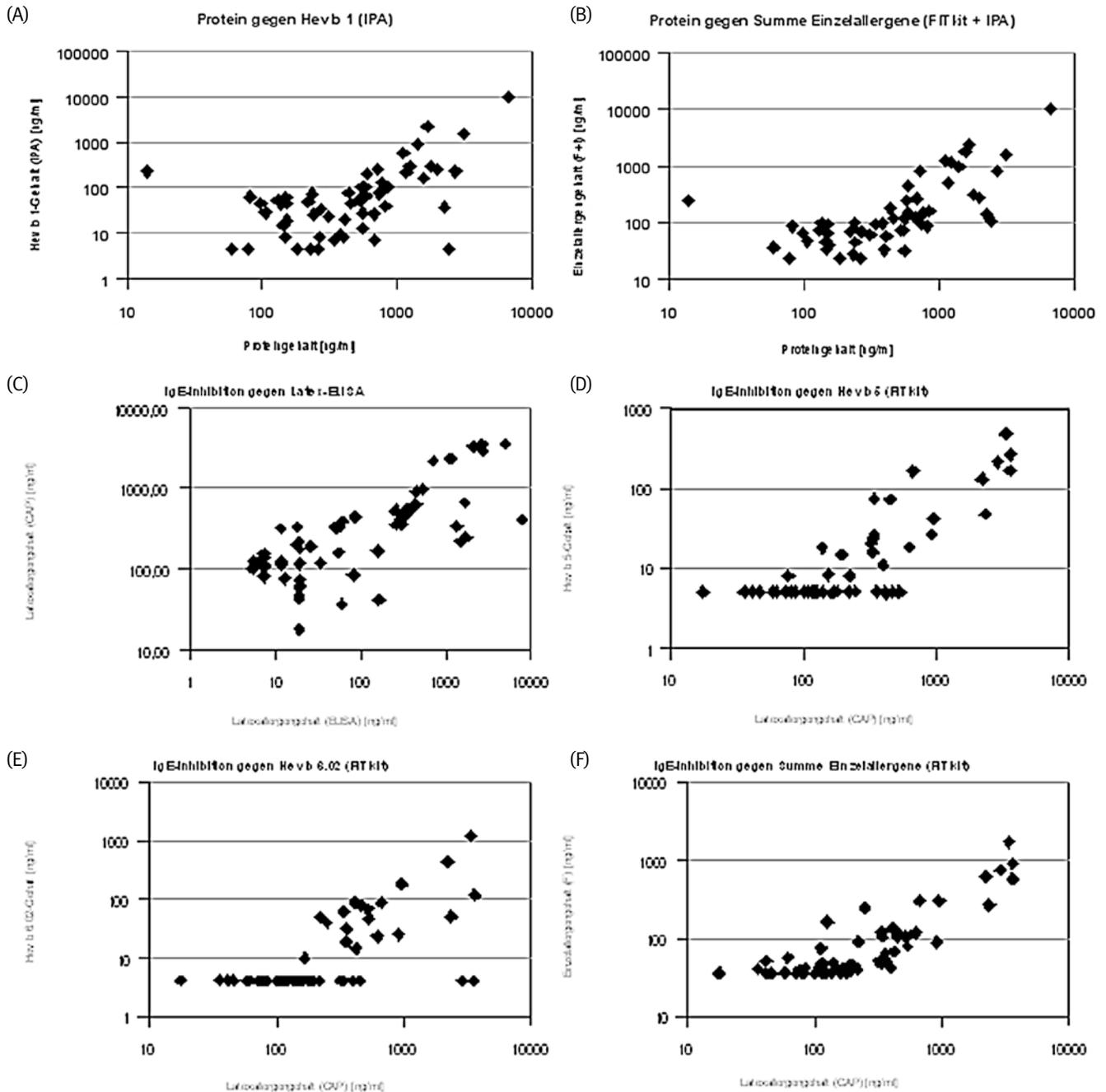


Abb. 28: Korrelationen nach Pearson.

Abgebildet sind Korrelationen, welche Korrelationskoeffizienten von $r > 0,5$ mit $p < 0,05$ aufweisen. Die ersten beiden Diagramme zeigen den Gehalt an Protein verglichen mit dem Hev b 1-Gehalt (Hev b 1-ELISA des IPA) (A), und der Summe der vier Einzelallergene (B), wobei der Hev b 1-Gehalt mit dem IPA-ELISA, die restlichen Allergene mit den FITkits® quantifiziert wurden. In den anderen vier Diagrammen ist der mittels IgE-Inhibitionstest ermittelte Latexallergengehalt mit dem mittels Gesamtlater-ELISA ermittelten Latexallergengehalt (C), mit dem Hev b 5-Gehalt (D), dem Hev b 6.02-Gehalt (E) und der Summe der Einzelallergene (mittels FITkits® quantifiziert) (F) dargestellt.

einbezogen wurde. Dadurch waren sich die Werte so ähnlich und lassen die Korrelation deshalb so positiv ausfallen.

Die Werte der Latexallergen- bzw. -antigenbestimmung mittels IgE-Inhibitionstest und Gesamtlatex-ELISA korrelierten. Der Rangkorrelationskoeffizient betrug $r=0,73$. Der Korrelationskoeffizient bei der Korrelation der Werte nach Pearson fiel mit $r=0,547$ etwas geringer aus. In beiden Fällen war $p < 0,05$, so dass die Werte als signifikant galten. Beim Vergleich der beiden Methoden zeigte sich, dass sich die Werte der beiden Messmethoden in der Größenordnung nicht stark unterschieden. Der mittlere Quotient (IgE-Inhibitionstestes/ Gesamtlatex-ELISA) lag bei 3,3 mit einer Spannbreite von 0,14 bis 17,75. In die Berechnung wurden nur Werte einbezogen, die in beiden Nachweisverfahren über der Nachweisgrenze lagen ($n=19$).

Wurden die Methoden zur Bestimmung des Proteingehaltes und des Gehaltes an Gesamtlatex verglichen, so zeigte sich nach Pearson nur eine sehr geringe Korrelation der Werte beider Latexallergen- bzw. -antigenbestimmungsmethoden mit den Proteingehalten. Die schwache Korrelation ($r=0,311$) des Proteingehaltes mit dem Latexgehalt gemessen im Gesamtlatex-ELISA war signifikant. Die sehr geringe Korrelation des Proteingehaltes mit dem im IgE-Inhibitionstest ermittelten Gesamtlatexgehalt ($r=0,149$) war nicht signifikant. Nach Spearman zeigten sich schwache aber signifikante Korrelationen des mittels IgE-Inhibitionstest ($r=0,594$, $p < 0,05$) und Gesamtlatex-ELISA ($r=0,399$, $p < 0,05$) ermittelten Latexallergen- bzw. -antigengehalt mit dem Proteingehalt.

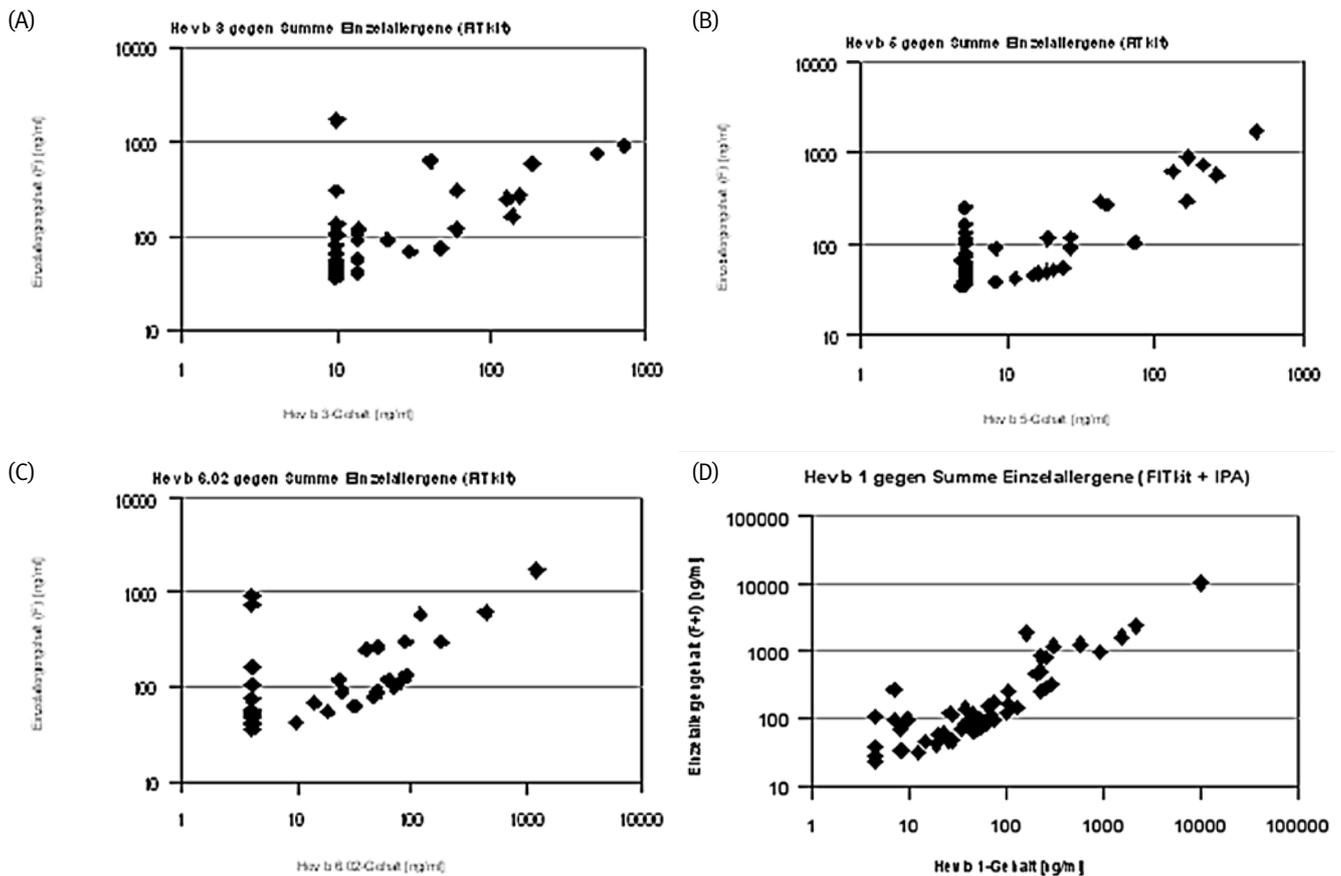


Abb. 29: Korrelationen nach Pearson zwischen Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.02 bzw. Hev b 1 und jeweils der Summe der Einzelallergene. Abgebildet sind Korrelationen, bei denen die Korrelationskoeffizienten $r > 0,5$ und $p < 0,05$ waren. (A) zeigt den Hev b 3-Gehalt, (B) den Hev b 5-Gehalt und (C) den Hev b 6.02-Gehalt jeweils gegen die Summe der mit den FITkits® gemessenen Einzelallergenen (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02), (D) zeigt den im IPA-ELISA bestimmten Hev b 1-Gehalt verglichen mit der Summe der vier Einzelallergene, wobei der Hev b 1-Gehalt mit dem IPA-ELISA, die restlichen Allergene mit den FITkits® quantifiziert wurden.

5 Diskussion

Dreizehn der über 250 identifizierten Proteine des Parakautschukbaumes *Hevea brasiliensis* wurden von der International Union of Immunological Societies (IUIS) als Allergene anerkannt [Yeang et al., 2006]. Diese Allergene, Hev b 1 bis Hev b 13, aus der Milch des Parakautschukbaumes sind in der Lage, bei exponierten Personen IgE-vermittelte Allergien, sogenannte Typ-I-Allergien, zu induzieren. Aus diesem Grund stellen Produkte, die aus Naturlatex hergestellt werden, eine potenzielle Sensibilisierungsquelle dar. Es gibt verschiedene Personengruppen, die besonders gefährdet sind an einer Latexallergie zu erkranken. Dazu zählen Personen, welche berufsbedingt sehr häufig mit Naturlatex in Berührung kommen, wie Beschäftigte des Gesundheitswesens und Laboratorien aber auch Reinigungskräfte, Friseur und Beschäftigte in der kautschukverarbeitenden Industrie [Garabrant et al., 2002]. Eine weitere Risikogruppe stellen Personen dar, die während zahlreicher Operationen und der Nachbehandlungen in Kontakt mit Naturlatex kommen. Besonders gefährdet sind Spina bifida-Patienten, also Kinder mit einem Defekt des Neuralrohrs. Aber auch Kinder mit einer Harnblasenekstrophie oder anorektalen Anomalien zeigen ein erhöhtes Risiko an einer Latexallergie zu erkranken [Spartà et al., 2004].

Für die oben aufgeführten Berufsfelder sowie Spina bifida-Patienten, spielte die Sensibilisierung gegen Naturlatex durch Untersuchungs- und Operationshandschuhe aus Naturlatex eine erhebliche Rolle. Allerdings wird auch eine Vielzahl an alltäglichen Gebrauchsartikeln aus Naturlatex gefertigt, sodass auch im häuslichen Umfeld Sensibilisierungen gegen Naturlatex nicht ausgeschlossen werden können. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Untersuchungen eine Abschätzung des sensibilisierenden Potenzials von aktuell verfügbaren Latexprodukten vorzunehmen. Dazu wurden 14 im Haushalt verwendete Naturlatexprodukte, wie Beruhigungs- und Trinksauger, Luftballons, Einmal- und Haushaltshandschuhe, Kondome und Pflaster, sowie 18 gegenwärtig im Gesundheitswesen verwendete, puderfreie Latexuntersuchungs- und -operationshandschuhe und ein latexfreies Übungsband, untersucht. Die Handschuhe wurden dabei aus der von der BGW aufgestellten Liste an empfohlenen Handschuhen ausgewählt [BGW, 2006].

Zur Abschätzung des allergisierenden Potenzials der Latexprodukte wurden verschiedene Protein- und Allergenbestimmungsmethoden genutzt und die darin gemessenen Werte verglichen. Neben dem Proteingehalt wurde speziell der Gehalt an Gesamtlatexallergenen bzw. -antigenen bestimmt, wozu ein IgE-Inhibitionstest, sowie der in dieser Arbeit entwickelte Gesamtlatex-ELISA genutzt wurde. Zusätzlich wurden die Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen, Hev b 5 und Hev b 6.02, und für Spina bifida-Patienten, Hev b 1 und Hev b 3, mit kommerziellen FITkits[®] quantifiziert. Der Gehalt an Hev b 1 wurde außerdem mit einem am IPA entwickelten und zu optimierenden Hev b 1-ELISA gemessen.

Als Ziel dieser Arbeit stand nicht nur die Bestimmung der Protein- und Allergengehalte im Vordergrund, sondern vor allem die Entwick-

klung und Optimierung der beiden ELISA, sowie der Vergleich der darin gemessenen Ergebnisse mit denen der anderen Methoden. Die Weiterentwicklung und Optimierung der beiden Sandwich-ELISA des IPA werden im folgenden Kapitel diskutiert.

5.1 Weiterentwicklung der Sandwich-ELISA

Ein Ziel dieser Arbeit war die Optimierung und Standardisierung des am IPA vorhandenen Hev b 1-Sandwich-ELISA. Dieser wurde 2000 von Raulf-Heimsoth et al. erstmals beschrieben, wobei im Unterschied zu der publizierten Version Fang- und Nachweis-AK gegeneinander ausgetauscht worden waren, bevor die Optimierung in dieser Arbeit eingeleitet wurde. Durch die Umstellung des Testsystems auf die heutigen Standardbedingungen des Labors, und somit auf bereits im Labor vorhandene häufig eingesetzte Materialien, ist eine einfachere Handhabung des Testes gewährleistet, woraus eine Kosten- und Zeitersparnis resultiert.

Es gelang die Empfindlichkeit des Hev b 1-ELISA zu steigern, ohne dabei den Hintergrund weiter zu erhöhen. Damit war ein wichtiges Teilziel dieser Arbeit erreicht. Die erfolgreiche Optimierung der Empfindlichkeit lag vermutlich hauptsächlich an der Umstellung von dem früher verwendeten Avidin-Peroxidase-Konjugat auf das heute im Labor verwendete Streptavidin-Peroxidase-Konjugat von Fitzgerald. Bei diesem Konjugat werden an ein Streptavidin-Molekül anstatt ein oder zwei Enzymmoleküle, wie bei konventionellen Konjugaten, ca. 80 Enzymmoleküle (Meerrettich-Peroxidasen) gebunden. Durch diesen verstärkenden Effekt ist es möglich, eine erhöhte Sensitivität eines Testsystems zu erreichen. Die Erhöhung der Sensitivität zeigt sich in einer Verschiebung des linearen Bereiches des Testsystems. Während der lineare Bereich vor der Optimierung noch zwischen 500 ng/ml und 4000 ng/ml lag, liegt er nach der Optimierung zwischen 20 ng/ml und 200 ng/ml, wodurch viel kleinere Hev b 1-Gehalte in den untersuchten Proben gemessen werden können. Die Sensitivität wurde somit etwa um einen Faktor von 20-25 erhöht. Der mittlere Messbereich des Testes lag nach der erfolgreichen Optimierung zwischen 15 und 228 ng/ml. Die mittlere Nachweisgrenze des kommerziellen Hev b 1-FITkit[®] lag mit 21 ng/ml geringfügig über der des optimierten Hev b 1-ELISA des IPA.

Ein weiteres Teilziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Gesamtlatex-Sandwich-ELISA aus polyklonalen AK (pAK) und einem Latexprotein-Standard aus den Niederlanden. Aufgrund der geringen Menge an verfügbaren Antikörpern wurde versucht, die Konzentration der AK pro Test möglichst gering zu halten. Die einzige Angabe zum Aufbau des Testes war die Konzentration des Fang-AK. Diese konnte bei der Entwicklung des Testes um die Hälfte reduziert werden. Durch den Austausch des ursprünglich für diesen Test vorgesehenen Latexprotein-Standard gegen den Standard, welcher für den IgE-Inhibitionstest verwendet wird, wurde der Kurvenverlauf an den flacheren Verlauf der Probenverdünnungsreihen angepasst. Dafür wurde in Kauf genommen, dass höhere Messwerte als mit dem Latexprotein-Standard ausgegeben wurden. Ein großer Vorteil der Umstellung des Standards war, dass für den Gesamtlatex-ELISA

und den IgE-Inhibitionstest der gleiche Standard verwendet wurde und somit die Ergebnisse der Bestimmungen des Gesamtlaxengehaltes besser verglichen werden konnten.

Die mittlere Nachweisgrenze des entwickelten Gesamtlaxen-ELISA liegt bei 5 ng/ml. Damit wurde eine nominell nur geringfügig schlechtere Sensitivität zu dem von Doekes et al. (2001) beschriebenen Gesamtlaxen-Sandwich-ELISA erlangt, die mit 1-4 ng/ml angegeben wurde. Eine deutlich höhere Nachweisgrenze weist zum Beispiel der ELISA von Shim und Wanasundara (2008) mit 0,3 µg/ml auf. Dieser auf polyklonalen AK basierende ELISA dient zum Nachweis von Sin a 1, einem Protein des weißen Senfs (*Sinapis alba*). Im Gegensatz dazu ist der am IPA entwickelte ELISA für fungale α -Amylase viel sensitiver. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,13 ng/ml [Sander & Raulf-Heimsoth, 2001]. Durch die Entwicklung des Gesamtlaxen-ELISA können niedrige Gehalte an Laxantigenen ab 5 ng/ml gemessen werden. Die Nachweisgrenze des IgE-Inhibitionstests zum Nachweis von Allergenen liegt mit 200 ng/ml vergleichsweise hoch. Vorteile des Gesamtlaxen-ELISA sind, dass man kein Patientenserum laxesensibilisierter Personen benötigt wie bei dem IgE-Inhibitionstest. Darüber hinaus ist das Sandwich-ELISA-Verfahren günstiger als der IgE-Inhibitionstest, da die dafür benötigten kommerziellen ImmunoCAPs sehr teuer sind. Der Nachteil des Sandwich-ELISA ist, dass er relativ zeitintensiv ist.

Beim Vergleich des mit dem Sandwich-ELISA des IPA gemessenen Hev b 1-Gehaltes mit dem Laxallergengehalt fällt auf, dass manche Drogerieartikel höhere Hev b 1-Gehalte als Laxallergengehalte aufweisen. Allerdings sollte der Laxallergengehalt eine Vielzahl an Einzelallergenen detektieren, so dass man erwarten würde, dass der Gehalt an Gesamtlaxen höher liegt als der eines Einzelallergens. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Hev b 1 im Gesamtlaxen-ELISA nicht oder nicht vollständig detektiert wird. Nach Abb. 16 zeigt der Gesamtlaxen-ELISA allerdings eine gute Reaktivität mit dem nativen Hev b 1 (nHev b 1), während das rekombinante Hev b 1 (rHev b 1) nicht erkannt wird. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass das als Fusionsprotein mit MBP exprimierte rHev b 1 eine andere Struktur als das native Protein hat und Bindestellen der Antikörper nicht mehr erkannt werden können. Das Ergebnis der Dot-Blot-Untersuchung (Abb. 17) zeigt, dass rekombinantes Hev b 1 sehr viel schwächer als rekombinantes Hev b 6.01 und Hev b 6.02 erkannt wird. Da es sich bei dem nHev b 1 um den Standard des Hev b 1-ELISA des IPA handelt, welcher nach Tabelle 25 neben Hev b 1 auch die Allergene Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 enthält, und der Gesamtlaxen-ELISA die Allergene Hev b 6.01 und Hev b 6.02 in rekombinanter Form gut erkennt, liegt die Vermutung nahe, dass der Gesamtlaxen-ELISA das Allergen Hev b 1 nur in geringem Maße erkennt. Auch die rekombinante Form des Allergens Hev b 3 zeigt in diesem Test einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf. Möglicherweise enthält das Proteingemisch, das zur Immunisierung eines Kaninchens und damit zur Herstellung der Antikörper eingesetzt wurde, die Allergene Hev b 1 und Hev b 3 nur in geringen Konzentrationen enthielt. Eventuell wurden diese stark hydrophoben Proteine bei

der Herstellung des Proteingemisches nicht gut extrahiert. Auch der IgG-Immunoblot (Abb. 33 B) lässt vermuten, dass der Laxprotein-Standard aus den Niederlanden (Proteingemisch der Immunisierung) einen hohen Gehalt an Hev b 6.01, Hev b 6.02 und Hev b 6.03 aufweist, da auf Höhe der Molekulargewichte dieser drei Allergene (Hev b 6.01 20 kDa, Hev b 6.02 4,7 kDa und Hev b 6.03 14 kDa) deutliche Banden zu erkennen sind.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Gesamtlaxen-ELISA anscheinend einige wichtige Laxallergene nach rekombinanter Herstellung (Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 5) nur schlecht detektiert, und daher diese Einzelallergene separat quantifiziert werden müssten. Allerdings wird Hev b 7 (getestet in rekombinanter Form) im Gesamtlaxen-ELISA gut erkannt (Abb. 16) und auch im Immunoblot des Laxprotein-Standards aus den Niederlanden (Abb. 33 B) zeigt sich eine Bande bei circa 42 kDa, wobei es sich um Hev b 7 handeln könnte. Die rekombinant hergestellte Variante des Hevein (Hev b 6.02) und des Vorstufenproteins Prohevein (Hev b 6.01) werden gut von den Antikörpern des Gesamtlaxen-ELISA erkannt. Für die Bestimmung des Gehaltes an Gesamtlaxen mit dem IgE-Inhibitionstest kann festgehalten werden: das für die IgE-Inhibition verwendete Patientenserum enthält Antikörper gegen die Hauptallergene für Spina bifida-Patienten, Hev b 1 und Hev b 3, sowie gegen die beiden Hauptallergene für Beschäftigte des Gesundheitswesens, Hev b 5 und Hev b 6.02 (Tab. 6; getestet in rekombinanter Form). Neben dem Patientenserum spielen aber auch die an die Laxen-CAPs gekoppelten Allergene eine große Rolle.

Im Gegensatz zu den Werten des Gesamtlaxen-ELISA, welche kaum mit Werten der anderen Methoden korrelierten, zeigten die Ergebnisse der Einzelallergene Hev b 5 und Hev b 6.02, sowie die Summe der mittels FITkits® bestimmten Allergene, ebenfalls Korrelationen zu den Ergebnissen des IgE-Inhibitionstest (Abb. 34 D-F).

Möglicherweise detektiert der Gesamtlaxen-ELISA nicht nur Allergene, sondern auch Proteine, bei denen es sich nicht um identifizierte Allergene handelt (Abb. 32 und 33). In fast allen Spuren der Immunoblots ist auf der Höhe von ca. 67 kDa eine Bande zu erkennen. Allerdings ist laut der Allergenliste der IUIS (Tab. 1) kein Allergen mit diesem Molekulargewicht charakterisiert. Die Antikörper, aus denen der Gesamtlaxen-ELISA aufgebaut ist, erkennen daher möglicherweise Epitope von Proteinen, die nicht als Allergene identifiziert sind, so dass der neu entwickelte Gesamtlaxen-ELISA eher als Bestimmungsmethode für Antigene statt Allergene gesehen werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beiden Teilergebnisse erreicht wurden. Aus der Entwicklung des Gesamtlaxen-ELISA auf Basis von Kaninchen pAK resultierte ein Sandwich-ELISA mit einem Messbereich zwischen 5 - 996 ng/ml. Die Charakterisierung der pAK zeigte, dass in diesem Test einige wichtige Laxallergene in rekombinanter Form, vor allem Hev b 1, 3 und 5, nur schlecht erkannt werden. Da der Gesamtlaxen-ELISA zusätzlich Proteine er-

kennt, die bislang nicht als Allergene identifiziert sind, kann der Test eher als Nachweismethode für Antigene als für Allergene gesehen werden.

Aus der erfolgreichen Umstellung des Hev b 1-ELISA auf die heutigen Laborbedingungen, vor allem das verstärkend wirkende Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, resultierte eine um den Faktor 20–25 höhere Empfindlichkeit gegenüber des ursprünglichen Tests.

5.2 Genereller Vergleich der verwendeten Methoden

Zunächst werden die beiden Methoden zur Bestimmung des Gesamtlatexallergen- bzw. -antigengehaltes verglichen. Die Ermittlung des Latexallergengehaltes, mittels IgE-Inhibitionstest, und des Latexantigengehaltes, mittels Gesamtlatex-ELISA, zeigte eine signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=0,547$) der gemessenen Werte (siehe Kapitel 4.7, Abb. 28 C). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studien von Renström et al. (1997) und Hollander et al. (1999), in denen Messmethoden für Rattenallergene verglichen wurden, unterschieden sich die Werte der beiden Messmethoden in der Größenordnung nicht stark. Der mittlere Quotient der Latexallergengehalte (IgE-Inhibitionstest/Gesamtlatex-ELISA) lag bei 3,3 (Spannbreite: 0,14 – 17,75). Der von Renström et al. (1997) durchgeführte Vergleich der beiden Messmethoden, Inhibitionstest versus Sandwich-Verfahren, zur Quantifizierung des Rattenallergens Rat n 1.02 zeigte zwar eine Korrelation der logarithmierten Messergebnisse beider Methoden ($r_2=0,72$, $p < 0,0001$), dabei wurden jedoch um Größenordnungen unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Die Messergebnisse der gleichen Proben in den beiden Tests ergaben im Inhibitionstest Werte, die in etwa um einen Faktor von 300 größer waren als die Ergebnisse des Sandwich-ELISA. Hollander et al. (1999) erhielten sogar Ergebnisse, die im RAST-Inhibitionstest um Faktoren von 1700 bis 3000 höher lagen als in einem Sandwich-Verfahren auf Basis von pAK gegen Allergene aus dem Rattenurin. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die korrelierenden Resultate zwischen zwei verschiedenen Sandwich-Methoden (mit monoklonalen versus polyklonalen AK) nur um einen Faktor von 2,2. Die monoklonalen Antikörper waren gegen das Rattenallergen Rat n 1.02 gerichtet. Ein Grund für die auftretenden Unterschiede könnte die Basis der Testmethoden, die Antikörper, sein. Außerdem wurden in diesen Studien in den Nachweisverfahren unterschiedliche Standards eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche Standard sowohl im Sandwich-ELISA als auch im IgE-Inhibitionstest eingesetzt. Dies könnte ein Grund für die vergleichsweise gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus Inhibitionstest und Sandwich-ELISA sein.

Bei dem IgE-Inhibitionstest binden die im Serumpool latexsensibilisierter Patienten enthaltenen Antikörper an passende Epitope der Proteine, die in den Produktextrakten vorhanden sind. Die verbleibenden Antikörper können dann an die Antigene des Latex-CAP binden. Je mehr Antikörper mit den Allergenen der Extrakte aus dem Serum gebunden wurden, desto weniger Antikörper können im ImmunoCAP die Grundlage für die Farbreaktion legen.

Eine Probe enthält viel Allergen, wenn das Fluoreszenzsignal des ImmunoCAP-Systems klein ist. Bei dem IgE-Inhibitionstest spielen drei Faktoren eine große Rolle:

- die Zusammensetzung des polyklonalen Serumpools,
- die Zusammensetzung der Allergene in den Proben bzw. des Standards und
- die Zusammensetzung der Allergene der ImmunoCAP-Festphase.

Bei immunologischen Testverfahren kann es leicht zur Detektion auch kreuzreagierender Proteine kommen. Ein polyklonales Serum weist nicht die Spezifität eines monoklonalen AK auf, da es Antikörper gegen alle immunogenen Epitope des zur Immunisierung eingesetzten Antigens oder Antigengemisches enthalten kann. Basiert der Sandwich-ELISA hingegen auf mAK, kann die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion durch gezielte Auswahl und Kombination spezifischer mAK herabgesetzt werden. Selbst wenn der Fang-AK ein kreuzreagierendes Epitop auf einem anderen Protein erkennt, als dem, gegen welches er hergestellt wurde, so wird dieses Protein in der Regel von dem Nachweis-AK nicht mehr erkannt. Dass beide Bindungsepitope spezifischer mAK auf einem völlig anderen Protein vorhanden sind, ist unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass in einem Extrakt enthaltene Proteine aufgrund von Produktionsbedingungen zu einem gewissen Teil denaturiert oder fragmentiert vorliegen und deshalb der Detektion im Sandwich-ELISA entgehen, da die Bindungsepitope zum Beispiel auf verschiedenen Fragmenten liegen, oder eine Bindung durch Deformation nicht mehr zugänglich ist. Ein weiterer Grund, warum ein Sandwich-ELISA nicht funktionieren könnte, ist, dass die Epitope zu nah beieinander liegen und dadurch die Bindung der Antikörper an das nachzuweisende Allergen behindert würde.

Diese Gründe könnten auch die Ursache dafür sein, dass die beiden Sandwich-ELISA auf Basis verschiedener mAK für das Allergen Hev b 1 so unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Während im Hev b 1-ELISA des IPA 33 der 39 Proben (19 Drogerieartikel, 14 Handschuhe) einen nachweisbaren Gehalt an Hev b 1 aufwiesen, konnte mit dem Hev b 1-FITkit® nur bei sechs Proben (fünf DA, ein HS) der Gehalt dieses Allergens quantifiziert werden (bei Extraktion nach EN-Methode). Da die Nachweisgrenzen nicht wesentlich unterschiedlich sind und nicht bekannt ist an welche Epitope des Hev b 1 die mAK des Hev b 1-FITkits® binden, liegt die Vermutung nahe, dass die Epitope der mAK des Hev b 1-FITkits® zu eng beieinanderliegen und damit ein gleichzeitiges Binden der Fang- und Nachweis-mAK an Hev b 1 nicht möglich ist. Da das Latexallergen Hev b 1 mit 14,6 kDa ein relativ kleines Protein ist, gibt es nicht viele Möglichkeiten für Epitope die weit genug von einander entfernt liegen. Ähnlich wie Hev b 1, konnte ebenso das Allergen Hev b 3 mit dem Hev b 3-FITkit® nur in sieben der 39 Proben detektiert werden. Auch Peixinho et al. beschrieben in der 2008 publizierte Studie, dass die beiden hydrophoben Allergene Hev b 1 und Hev b 3 schwer zu detektieren waren. Diese Gruppe untersuchte 41 Handschuhmarken, die im Jahre 2006 in portugiesischen Gesundheitseinrichtungen benutzt wurden, auf

ihren Gehalt an den Einzelallergenen Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02. Dazu wurden ebenfalls die kommerziellen FITkits® benutzt. Hev b 1 konnte dabei in elf Handschuhen gar nicht und in 20 Handschuhen nur in sehr geringen Konzentrationen (0,05 µg/g) detektiert werden. Auch das Allergen Hev b 3 wurde in über der Hälfte der Handschuhe nicht detektiert (22 von 41). Die gemessenen Hev b 1- und Hev b 3-Gehalte lagen in ihrer Studie zwischen nicht nachweisbar und 0,17 µg/g. Hev b 5 und Hev b 6.02 waren mit Werten zwischen 0,4 µg/g und 3,82 µg/g bei allen Handschuhen messbar. In der vorliegenden Arbeit waren zwar nicht in allen Handschuhen Hev b 5 und Hev b 6.02-Gehalte quantifizierbar, allerdings konnten auch hier diese beiden Allergene öfter nachgewiesen werden. Auch die Hev b 6.02-Gehalte lagen mit bis zu 7726 ng/g (DA11) deutlich höher als die Hev b 1-Gehalte mit bis zu 511 ng/g (DA08). Die Allergene Hev b 3 und Hev b 5 lagen mit 4685 ng/g (HS04) bzw. 3124 ng/g (DA11) ungefähr in einem ähnlichen Größenbereich. Im Vergleich mit den Ergebnissen von Peixinho et al. (2008) wurden in der vorliegenden Arbeit also teilweise deutlich höhere Gehalte an Einzelallergenen in den Handschuhen und Drogerieartikeln gemessen. Auch in der Studie von Palosuo et al. (2007) wurden die kommerziellen ELISA (FITkit®) benutzt um die Allergene Hev b 1, 3, 5 und 6.02 in Handschuhen zu quantifizieren. Es wurden 208 medizinische Handschuhmarken untersucht, die in den Jahren 1999, 2001 und 2003 in Finnland auf dem Markt waren. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit und der Studie von Peixinho et al. (2008) konnte Hev b 1 nur in wenigen Handschuhen in geringer Menge gemessen werden.

In der angeführten Studie von Palosuo et al. (2007) wurden die Summen der vier Einzelallergene mit den Ergebnissen eines auf humanen IgE basierenden ELISA-Inhibitionstestes verglichen, wobei sich eine hohe Korrelation der Werte nach Spearman ($r=0,87$) ergab. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Summen der Ergebnisse der FITkits® mit den Ergebnissen des IgE-Inhibitionstest verglichen. Der Inhibitionstest basierte ebenfalls auf humanen IgE, es handelte sich allerdings nicht um einen ELISA-Inhibitionstest, sondern um einen Inhibitionstest der mit Hilfe des ImmunoCAP-Systems der Firma Phadia (Uppsala, Schweden) durchgeführt wurde. Ein Vergleich der Ergebnisse (Summe der FITkits® vs. IgE-Inhibitionstest) ergab eine hohe signifikante Korrelation nach Spearman ($r=0,751$, $p < 0,05$) sowie nach Pearson ($r=0,865$, $p < 0,05$).

Die Bestimmung des Proteingehaltes und des Gehaltes an Gesamtlatexallergenen zeigte nach Spearman eine schwache, aber signifikante Korrelation. Die Korrelation nach Pearson fiel noch schwächer aus, und war in einem Fall (Proteingehalt vs. Latexallergengehalt nach IgE-Inhibition) nicht signifikant (siehe Kapitel 4.7). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bestimmung des Proteingehaltes nicht gut auf den Gehalt an Gesamtlatexallergenen schließen lässt. Zum Ergebnis, dass zwischen Protein- und Allergenkonzentration nur eine geringe Korrelation besteht, kamen verschiedene Autoren bereits im Jahr 1997. Baur et al. (1997) untersuchten 62 latexhaltige Produkte auf ihren Proteingehalt und Latexallergengehalt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels modi-

fizierter Lowry-Methode und der Latexallergengehalt wurde durch den IgE-Inhibitionstest im ImmunoCAP-System von Phadia ermittelt. Das Ergebnis ihrer statistischen Analyse zeigte keine signifikante Korrelation zwischen den messbaren Protein- und Latexallergengehalten der untersuchten Latexprodukte ($r=0,40$). In der Studie von Lundberg et al. (1997) wurden über drei Jahre hinweg insgesamt 92 Chargen von Katheterballons der Firma Nolato Polymer AB (Torekov, Schweden) auf ihren Proteingehalt und Latexallergengehalt hin untersucht. Es wurde zur Proteinbestimmung ebenfalls die modifizierte Lowry-Methode verwendet. Der Latexallergengehalt wurde mit einem Latex IgE-Antikörper Inhibitionstest (latex EAI assay) ebenfalls im ImmunoCAP-System der Firma Phadia bestimmt. Es wurde keine Korrelation zwischen den Werten der Proteinbestimmung und der EAI-Inhibition gefunden ($r=0,085$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Proteingehalt wenig Schlüsse auf den Latexallergengehalt zulässt. Er erlaubt allerdings Rückschlüsse auf die Summe der Einzelallergene (Hev b 1: IPA, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02: FITkits®) und den Gehalt an Hev b 1, wenn dieser mit dem Sandwich-ELISA des IPA bestimmt wurde. Dabei hat ein Produkt mit hohem Proteingehalt tendenziell auch einen hohen Gehalt an Hev b 1 und eine hohe Summe der Einzelallergene. Allerdings haben die Produkte mit dem höchsten Proteingehalt nicht zwangsläufig auch den höchsten Gehalt an Einzelallergenen. Die Methode des Gesamtlatex-ELISA zeigt nur mit dem IgE-Inhibitionstest gut korrelierende Werte. Der IgE-Inhibitionstest liefert zusätzlich auch mit den Einzelallergenen Hev b 5 und Hev b 6.02 gut korrelierende Werte, sowie mit der in den FITkits® ermittelten Summe an Einzelallergenen. Da die FITkits® für die Allergene Hev b 1 und Hev b 3 selten Werte oberhalb der Nachweisgrenze liefern und deshalb bei der Summe der Einzelallergene nur eine geringe Rolle spielen, erklärt sich die gute Übereinstimmung zwischen Inhibitionstest und Einzelallergensumme anhand der guten Korrelation zu den Allergenen Hev b 5 und Hev b 6.02. Im Hev b 1-ELISA werden, im Gegensatz zum Hev b 1-FITkit®, in deutlich mehr Proben Hev b 1-Gehalte gemessen. Die Bestimmung des Proteingehaltes reicht deswegen nicht aus, um definitiv zutreffende Aussagen über den Latexallergengehalt und den Gehalt an Einzelallergenen verschiedener Proben zu machen.

5.3 Latexallergengehalt in aktuell verwendeten Untersuchungs- und Operationshandschuhen

Laut der TRGS 540 wird für Latexhandschuhe momentan empfohlen, dass diese proteinarm und puderfrei sein sollten. Der Proteingehalt der Handschuhe soll möglichst unter 30 µg Protein pro g Handschuh liegen, da ansonsten betriebsärztliche Untersuchungen notwendig werden (TRGS 406). Bei 12 bzw. 13 der untersuchten 18 aktuell im Gebrauch befindlichen Handschuhe wurden Proteingehalte unter 30 µg/g Handschuh gemessen. Davon lag der Proteingehalt bei fünf Handschuhen unter der Nachweisgrenze. Diese Handschuhe dürften ohne besondere betriebsärztliche Untersuchung der Hand-schuhtragenden Beschäftigten in Einrichtungen des Gesundheitswesens und Laboratorien eingesetzt werden. Bei zwei Handschuhen wurden allerdings sehr hohe Proteingehalte von

bis zu 90 µg/g Handschuh detektiert. Dies entspricht dem Dreifachen des Richtwertes. Bei den beiden Handschuhen handelt es sich um den Handschuh „Contact“ von Unigloves (HS04) und den „Gentle Skin® grip“ der Firma Meditrade (HS16).

Die europäische Norm DIN EN 455-3 liegt der Extraktion von Handschuhe vor der Proteinbestimmung zugrunde. Diese enthält Prüfungen und Anforderungen für die biologische Untersuchung medizinischer Handschuhe. Neben dieser Methode (EN-Methode) wurde für die Extraktion der Handschuhe eine schon zuvor am IPA genutzte Methode eingesetzt. Wie die Ergebnisse der Analysen nach Bland-Altman zeigen, werden nach der Extraktion nach IPA-Methode nicht nur bei der Proteinbestimmung höhere Werte erzielt, als nach der Extraktion nach EN-Methode, sondern auch bei den Latexallergenbestimmungen und der Bestimmung des Hev b 1-Gehaltes. Ein Grund dafür könnte in der Durchführung der Extraktion liegen. Während bei der EN-Methode gleichzeitig die Innen- und Außenseite durch Ineinanderstecken zweier Handschuhe extrahiert wurde, so wurde bei der IPA-Methode durch das Zerschneiden der Produkte in kleine Stücke die extrahierte Oberfläche noch vergrößert. Neben Innen- und Außenseite kamen hier die Schnittkanten dazu, sodass eine Vergrößerung der Oberfläche zu durchschnittlich höheren extrahierten Proteinmengen führte. Ein Vorteil der IPA-Methode im Gegensatz zur EN-Methode ist, dass diese von der Durchführung her nicht so aufwendig ist. Das Zerkleinern der Produkte ist zwar zeitaufwendig, allerdings ist die Durchführung der Extraktion bei weitem nicht so kompliziert wie bei der EN-Methode. Dabei müssen die Handschuhe ineinander gesteckt werden, ohne diese zu beschädigen, man benötigt mehrere Lösungen und die Handschuhe lassen sich schlecht durch die Klammern dicht verschließen. Laufen die Lösungen während der Extraktion aus, oder wird die Extraktionslösung durch Farbstofflösung verunreinigt, muss die Extraktion wiederholt werden. Dadurch kann es mit dieser Methode sehr lange dauern, bis die vier benötigten Extrakte einer Handschuhmarke hergestellt wurden. Ein weiterer Vorteil der IPA-Methode ist, dass fast immer die gleiche Masse an Produkten (ca. 3 g) extrahiert wurde, während das Gewicht der Handschuhe bei der EN-Methode stark variierte. Da von den Konzentrationen an Protein und Allergenen der Extrakte auf den Gehalt pro Gramm Material bzw. Handschuh umgerechnet wurde, variierte bei der EN-Methode die Nachweisgrenze bezogen auf Gramm Material von Handschuh zu Handschuh. Bei der IPA-Methode unterscheidet sie sich nur geringfügig. Dies ist besonders gut in Tab. 14 zu erkennen. Obwohl die IPA-Methode bei fast allen Bestimmungsmethoden höhere Werte lieferte, konnten in den meisten Fällen gute Korrelationen zwischen der IPA-Methode und der EN-Methode gefunden werden. Die Pearson-Korrelationskoeffizienten lagen zwischen $r=0,83$ bei den Gehalten des Einzelallergens Hev b 5 und $r=0,98$ bei Hev b 6.02. Nur bei dem Hev b 1-FITkit® wurde keine Korrelation berechnet, da hier insgesamt nur zwei Handschuhe überhaupt messbare Hev b 1-Gehalte aufwiesen, und darüber hinaus die positiven Werte mit jeweils unterschiedlichen Extraktionsmethoden erzielt wurden.

Des Weiteren gab es teilweise starke Unterschiede zwischen den von der BGW angegebenen Proteingehalten und den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten, obwohl die gleichen Handschuhmarken untersucht wurden. Allerdings handelte es sich dabei um verschiedene Chargen der Produkte (siehe Anhang, Tab. 23). Da es sich bei den Latexhandschuhen um ein aus dem Naturprodukt Naturkautschuk hergestelltes Produkt handelt, kann es in unterschiedlichen Chargen zu starken Schwankungen in der Zusammensetzung kommen, falls z.B. die der Produktion zugrunde liegende Latexmilch durch geänderte Umweltbedingungen in ihrer Zusammensetzung variiert.

Da nicht alle Proteine zwangsläufig Allergene sind, wurde neben dem Proteingehalt der Latexallergen- bzw. -antigengehalt bestimmt. Wurde der Latexallergengehalt mit dem IgE-Inhibitionstest ermittelt, konnten Werte von knapp 30 µg/g (HS04 27,09 µg/g) gemessen werden. Das ist in etwa ein Drittel des in diesem Handschuh bestimmten Proteingehaltes (HS04 92,41 µg/g). Auch im Gesamtlatex-ELISA wurden Werte bis zu dieser Größenordnung bestimmt (HS04 26,7 µg/g). Wie oben beschrieben sollten Handschuhe möglichst proteinarm (< 30 µg Protein pro g Handschuh) sein, um die Belastung des Benutzers mit Allergenen zu minimieren. Drei der 18 Handschuhe (HS04, HS12 und HS16) wiesen in beiden Allergenbestimmungsmethoden im Vergleich zu den restlichen Handschuhen einen erhöhten Gehalt an Gesamtlatexallergen bzw. -antigen auf.

Diese drei Handschuhe wiesen auch einen hohen Gehalt an den vier einzeln quantifizierten Allergenen Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 auf (Abb. 30). Die Summe der Einzelallergene dieser Handschuhe lagen mit bis zu 6000 ng/g Handschuh deutlich über den Gehalten der restlichen Handschuhe (< 1000 ng/g). Für eine Übersicht der bestimmten Einzelallergengehalte wurden die Ergebnisse der Einzelallergenquantifizierungen in einem Säulendiagramm dargestellt. Dabei wurden alle Werte einbezogen. Lag der Gehalt eines Einzelallergens unter der Nachweisgrenze, wurde dieser wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben als Zweidrittel der Nachweisgrenze einbezogen. Für den Hev b 1-Gehalt wurden die Ergebnisse der Messung mit dem in dieser Arbeit optimierten Sandwich-ELISA herangezogen, die anderen drei Einzelallergene wurden mit den ELISA (FITkits®) der Firma Quattromed quantifiziert.

Die Allergenprofile zeigen, dass die drei Handschuhe, die hoch belastet sind (HS04, HS12 und HS16), große Mengen an allen vier bzw. zumindest drei Einzelallergenen aufwiesen. Dies kann man anhand der Silbergele nicht erkennen. Dort ist nur bei zwei der aufgetragenen vier Handschuhextrakte bei ca. 12 kDa eine Bande zu erkennen. Da nicht genau bekannt ist, wie die Proteine im Gel laufen, könnte es sich bei den Banden um das Allergen Hev b 1 (14,7 kDa) handeln, da dieses in den Handschuhen 04 und 12 sehr stark vertreten ist. Gegebenenfalls ist die aufgetragene Proteinmenge zu gering, um andere Allergene im Silbergel nachzuweisen. Nicht nur Hev b 1, sondern auch die drei anderen Einzelallergene konnten in vielen Handschuhen nachgewiesen werden. Es konnte allerdings nicht ermittelt werden, dass eines der Einzelallergene

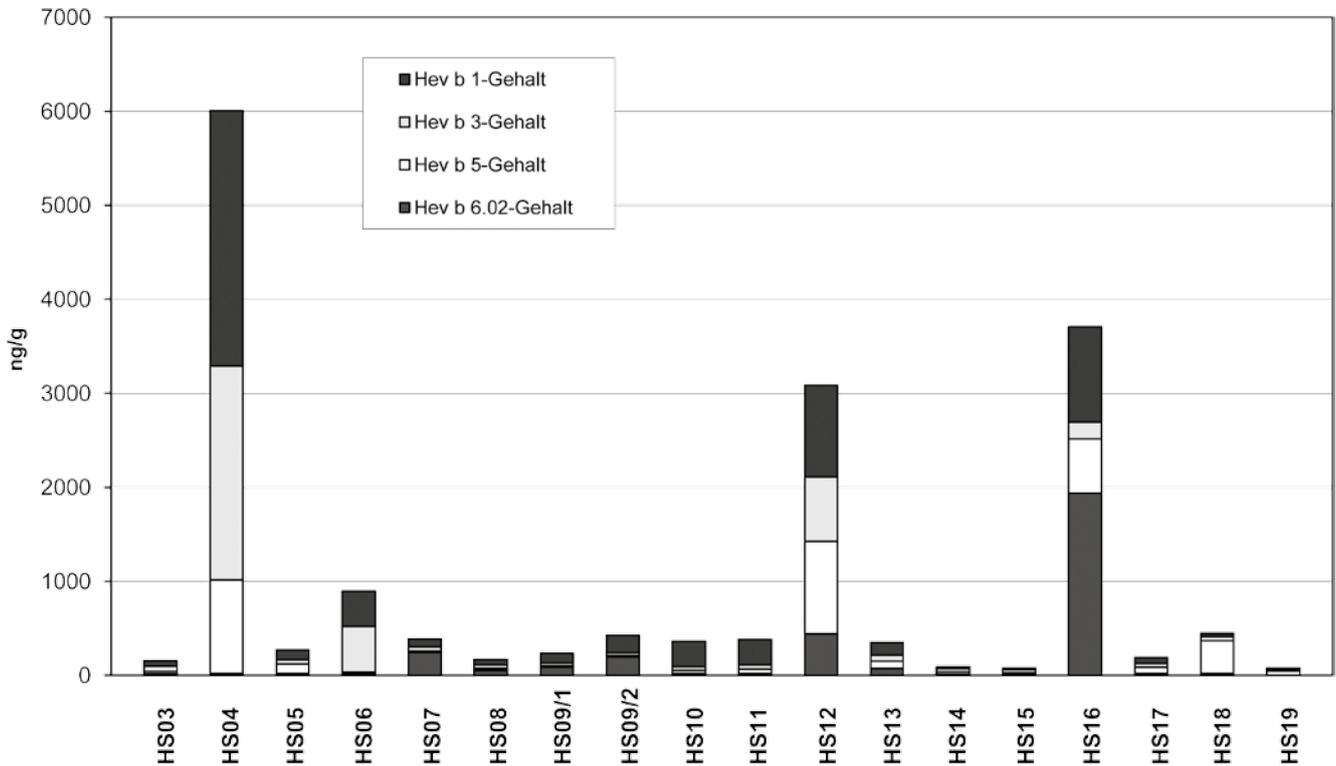


Abb. 30: Allergenzusammensetzung der Handschuhe.

Dargestellt sind die Einzelallergengehalte (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02) der untersuchten Handschuhe. Der Hev b 1-Gehalt wurde mit dem am IPA entwickelten ELISA quantifiziert, die Gehalte der anderen drei Allergene mit den kommerziellen ELISA (FITkit®).

in den Handschuhen vorrangig vorkam. Welches Allergen mengenmäßig am stärksten vorhanden war, war Handschuh-spezifisch.

Daraus kann gefolgert werden, dass es sowohl für Spina bifida-Patienten, die besonders oft gegen die Allergene Hev b 1 und Hev b 3, als auch für die Beschäftigten im Gesundheitswesen, die hauptsächlich gegen die Allergene Hev b 5 und Hev b 6.02 sensibilisiert sind, weiterhin gefährlich ist, mit Latexhandschuhen in Berührung zu kommen. Denn aus den Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, ist nicht ersichtlich, ob zum Beispiel hauptsächlich die Hauptallergene für Spina bifida-Patienten, oder hauptsächlich die Hauptallergene für Beschäftigte im Gesundheitswesen in den Handschuhen vorkommen, da dies von Handschuh zu Handschuh variiert.

Die Handschuhe „Contact“ von Unigloves (HS04), „Peha-micron plus“ von Hartmann (HS12) und „Gentle Skin® grip“ von Meditrade (HS16) sind in allen Testen mit sehr hohen Protein- und Allergengehalten aufgefallen. Auch die Gehalte an Einzelallergenen waren sehr hoch. In zwei dieser drei Handschuhe (HS12 und HS16) traten alle vier Allergene in großer Menge auf. Auch der dritte Handschuh (HS04) zeigte große Gehalte der drei Allergenen Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 5. Positiv, mit sehr geringen in fast allen Fällen unter der Nachweisgrenze liegenden Protein- und Latexallergengehalten sowie Einzelallergengehalten sind ebenfalls drei Handschuhe aufgefallen.

Dabei handelt es sich um die Handschuhe „Gentle Skin® classic“ (HS14) und „Gentle Skin® Anatom“ (HS15) von Meditrade sowie den Handschuh „Augustus-Gel“ (HS19) von der Firma Augustus. Es sind also gegenwärtig Handschuhe mit sehr hohem Protein- und/oder Latexallergengehalt, aber auch sehr wenig belastete Handschuhe auf dem Markt. Auch von der BGW wurden sehr unterschiedliche Proteingehalte in ihrer Broschüre angegeben [BGW Themen (M621), 2006]. In einigen Fällen wurden in dieser Arbeit und in den Proteinbestimmungen der BGW für eine Marke ähnliche Proteingehalte erzielt, bei manchen Marken wurden stark unterschiedliche Proteingehalte gemessen (HS04, HS17). Es ist nicht bekannt, ob Hersteller der Handschuhe versucht haben, einen hohen Proteingehalt ihrer Handschuhe zu senken, und deswegen der Proteingehalt bei der Proteinbestimmung der BGW höher lag als in der vorliegenden Arbeit. Es ist ebenfalls nicht bekannt, ob Hersteller durch den von der BGW angegebenen Proteingehalt annahmen, dass ihre Handschuhe einen niedrigen Proteingehalt aufweisen und deshalb z.B. die Produktion nicht mehr so stark kontrolliert wurde. Dies könnte dann zu einem höheren Proteingehalt in der vorliegenden Arbeit geführt haben. Möglicherweise lag der Unterschied in der Untersuchung verschiedener Chargen und es wurde an der Produktion nichts geändert, sondern die Zusammensetzung der zur Produktion verwendeten Latexmilch unterlag natürlichen Schwankungen.

Als Fazit dieses Abschnittes kann festgehalten werden, dass ge-

genwärtig Handschuhe mit hohem Protein- und/oder Latexallergengehalt, aber auch sehr wenig belastete Handschuhe auf dem Markt sind. Bei fünf der 18 Handschuhen (EN-Methode) wurden Proteingehalte teilweise weit über dem empfohlenen Richtwert (30 µg/g Handschuh) gemessen. Drei Handschuhe fielen in fast allen Methoden durch ihre hohen Protein- und Latexallergengehalte auf. Keines der vier quantifizierten Einzelallergene kam in den Handschuhen vorrangig vor. Da es allerdings Handschuhe gibt, die bei den Angaben der BGW und in dieser Arbeit niedrige Proteingehalte und Allergengehalte aufwiesen, ist es möglich, Handschuhe mit einem möglichst geringen allergisierenden Potenzial herzustellen. Dieses Ziel muss von den Herstellern der Handschuhe weiterhin verfolgt werden.

5.4 Latexallergengehalt in aktuell verwendeten Haushalts- und Drogerieartikeln

Während im Bereich der medizinischen Handschuhe für Beschäftigte im Gesundheitswesen viele Untersuchungen vorliegen, ist über die zahlreichen im Haushalt verwendeten latexhaltigen Produkte nur wenig bekannt. Deshalb sollten auch diese im Bezug auf ihr sensibilisierendes Potenzial untersucht werden. Bei den 15 Haushalts- und Drogerieartikeln handelt es sich hauptsächlich um Säuglingsartikel (Trink- und Beruhigungssauger) und Kondome. Die Sauger werden sehr oft und wiederholt benutzt und kommen dabei die ganze Zeit direkt mit der Mundschleimhaut des Kindes in Berührung. Bei den Säuglingsartikeln wird wahrscheinlich darauf geachtet, dass diese gut verarbeitet sind, da bei Produkten für Säuglinge vermehrt darauf geachtet wird, dass diese für den Säugling „gesund“ und unschädlich sind. Aber wie sieht dies bei den Kondomen und den anderen untersuchten Drogerieartikeln aus? Untersucht wurden zusätzlich folgende Produkte: Haushaltshandschuh, Einmalhandschuh, Pflaster, Luftballon sowie ein als latexfrei deklariertes Übungsband. Diese Produkte kommen in der Regel nicht oder nur in sehr geringem Maße mit Schleimhäuten in Berührung und treten mit Ausnahme des Pflasters nicht langfristig mit der Haut in Kontakt.

In fast allen Proben waren Proteingehalte messbar, welche in 15 von 21 Fällen deutlich über dem für die Handschuhe empfohlenen Richtwert von 30 µg/g Material lagen. Sogar die abgekochten Sauger wiesen teilweise noch Werte in dieser Größenordnung auf. Den mit Abstand größten Proteingehalt lieferte das latexfreie Übungsband mit ca. 0,4 mg Protein/g Material. Von diesem Produkt ist nicht bekannt, aus welchem Material es hergestellt wurde. Es könnte sich sowohl um speziell behandelten Naturkautschuk aus *Hevea brasiliensis*, als auch alternative Kautschukquellen oder synthetisches Material handeln. Das Kochen der Sauger, was vor ihrer Benutzung in der Regel erfolgt, verringerte ihren Proteingehalt um 70 %, so dass sich Proteingehalte zwischen „unter der Nachweisgrenze“ und 50 µg/g ergaben. Die Reduktion des Proteingehaltes könnte daran liegen, dass das ca. fünfminütige Abkochen der Sauger in kochendem Wasser der Extraktion ähnlich ist und somit ein Großteil der Proteine bzw. Allergene bereits vor der eigentlichen Extraktion aus den Saugern gewaschen wurde. Eine Untersuchung des

Kochwassers wäre interessant, um zu untersuchen, ob in diesem Allergene gefunden werden können. Diese Untersuchung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt. Außerdem führt das Erhitzen der Proteine bei dieser Temperatur zur Denaturierung. Die Kondome kommen jedoch direkt mit den recht hohen Proteingehalten von ca. 100 µg/g bis 200 µg/g mit der Haut und Schleimhäuten in Berührung. Nur der Proteingehalt des Kondoms von „Durex“ blieb unter der Nachweisgrenze.

Wurden die Trink- und Beruhigungssauger vor der Extraktion wie empfohlen abgekocht, so lagen die Latexallergen- bzw. -antigengehalte der Sauger mit beiden Bestimmungsmethoden (IgE-Inhibitionstest, Gesamtlatex-ELISA) alle unter der Nachweisgrenze. In den Kondomen konnte bei beiden Bestimmungsmethoden für den Latexallergengehalt, mit Ausnahme des Kondoms von „Durex“, ein Gehalt an Latexallergenen nachgewiesen werden. Dieser variierte zwischen 1,4 µg/g und 2,7 µg/g im IgE-Inhibitionstest und 1,9 und 11 µg/g im Gesamtlatex-ELISA. Die höchsten Latexallergengehalte wiesen das Pflaster und der Luftballon auf. Im Gesamtlatex-ELISA konnte auch in dem latexfreien Übungsband ein Gesamtlatexgehalt (0,5 µg/g) detektiert werden.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelallergene in den Drogerieartikeln wurden die Ergebnisse der Einzelallergenquantifizierungen zusammengefasst (Abb. 31). Der Hev b 1-Gehalt wurde mit dem in dieser Arbeit optimierten Hev b 1-ELISA quantifiziert, die anderen Einzelallergene (Hev b 3, 5 und 6.02) mit den FITkits®. In den meisten Fällen war die Summe der Einzelallergene gering, bei drei der vier Kondome und dem Luftballon wurden jedoch sehr hohe Summen der Einzelallergengehalte festgestellt (bis 15 µg/g). Das latexfreie Übungsband wies einen so hohen Hev b 1-Gehalt auf (67 µg/g), dass es in der Abb. 31 nicht mit abgebildet wurde. Die anderen Einzelallergengehalte lagen in diesem Produkt unter der Nachweisgrenze.

Bei den vier Produkten Luftballons, Einmal- bzw. Haushaltshandschuhe und Pflaster war Hev b 1 nicht das anteilmäßig stärkste Allergen. Hier waren teilweise auch die Gehalte an Hev b 5 und Hev b 6.02 hoch. Bei den Säuglingsartikeln und Kondomen war Hev b 1 das Einzelallergen, das den höchsten Gehalt aufwies. Im Gegensatz zu den Handschuhen waren die Hev b 1-Gehalte bei elf von 15 Drogerieartikeln deutlich höher als die Gehalte der anderen drei Einzelallergene. Bei den Trink- und Beruhigungssaugern waren nur Hev b 1-Gehalte messbar. Durch Abkochen der Sauger und damit Entfernung und Denaturierung von Proteinen konnte der Gehalt an Hev b 1 reduziert werden, so dass er im Schnitt bei 300-400 ng/g lag.

Die Kondome enthalten nach den Untersuchungen dieser Arbeit, mit Ausnahme des „Durex“-Kondoms, einen deutlich höheren Gehalt an Einzelallergenen (bis 15 µg/g bei DA08), welcher hauptsächlich aus Hev b 1 besteht. Im Silbergel der Drogerieartikel wiesen die beiden untersuchten Kondome DA07 und DA08 starke Banden bei etwa 12 kDa auf, wobei es sich um das 14 kDa große

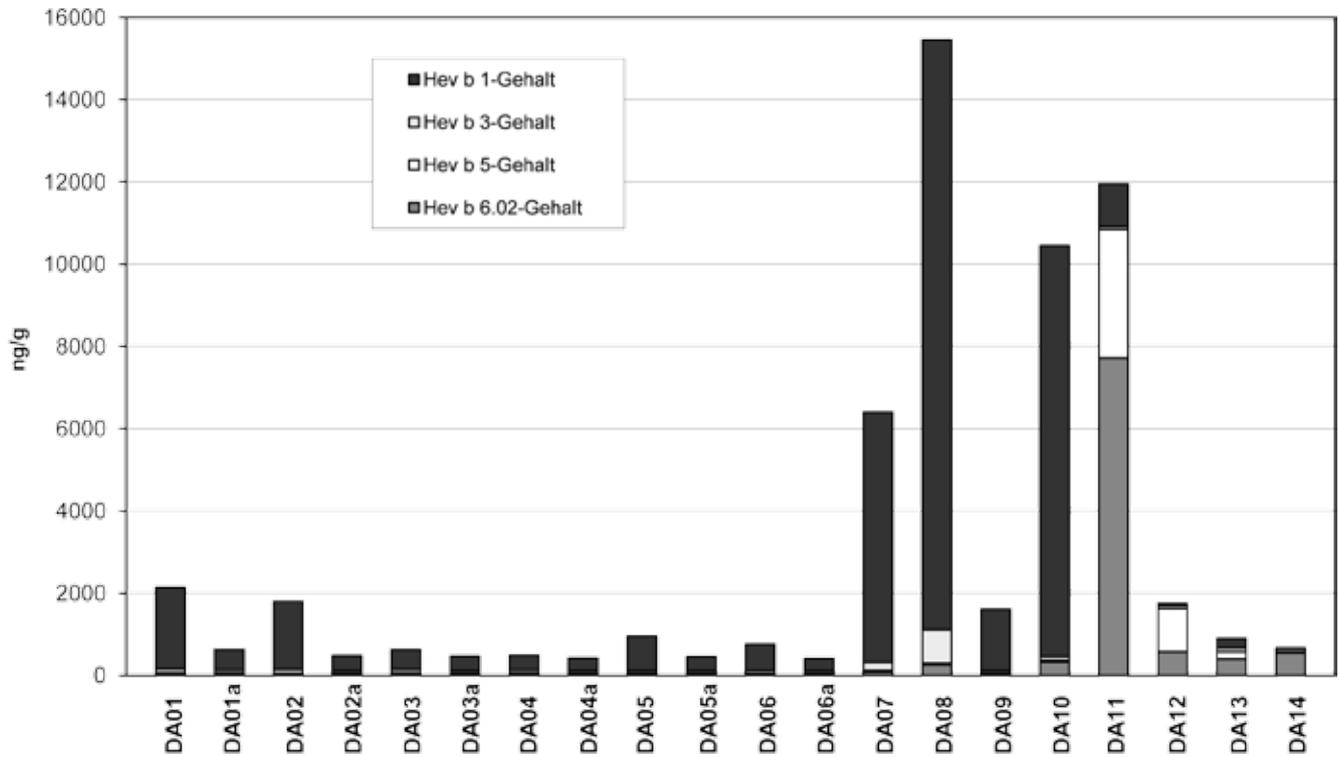


Abb. 31: Allergenzusammensetzung der Drogerieartikel.

Dargestellt sind die Einzel-allergengehalte (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02) der untersuchten Haushalts- und Drogerieartikel. Der Hev b 1-Gehalt wurde mit dem am IPA entwickelten ELISA quantifiziert, die Gehalte der anderen drei Allergene mit den kommerziellen ELISA (FITkit®). Die sonstigen Artikel sind: Luftballon (DA11), Einmalhandschuh (DA12), Haushaltshandschuh (DA13) und Pflaster (HS14).

Allergen Hev b 1 handeln könnte. Außerdem wurden Proteine bei einem Molekulargewicht von 30 kDa detektiert (Immunoblot), wobei es sich wahrscheinlich um das Allergen Hev b 11 handelt, das in dieser Arbeit nicht einzeln quantifiziert wurde. Die sonstigen Drogerieartikel wiesen mit Ausnahme des Luftballons, der einen Gehalt an Einzelallergenen von ca. 12 µg/g aufwies, deutlich niedrigere Einzelallergengehalte auf.

Die Trink- und Beruhigungssauger, die mit den Schleimhäuten von Säuglingen und Kleinkindern langfristig in Berührung kommen, wiesen zwar Proteingehalte auf, die Gehalte an Gesamtlatexallergenen und den Einzelallergenen Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 lagen aber alle unter der Nachweisgrenze. Die Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Sauger wie auf der Packung empfohlen vor der Verwendung 5 Minuten abgekocht werden. Obwohl der Gehalt an Gesamtlatexallergenen unter der Nachweisgrenze lag, konnte in den Saugern ein Gehalt an Hev b 1 mit dem optimierten Hev b 1-ELISA gemessen werden. Sowohl der Gehalt an Protein als auch an Hev b 1 nahm durch das Abkochen ab. Bei den meisten Kondomen wurden sehr hohe Protein- und Gesamtlatexallergengehalte detektiert. Auch die quantifizierten Gehalte der vier Einzelallergene waren teilweise sehr hoch. Das Kondom der Marke „chaps“ (DA08), einer Hausmarke des Drogeriemarktes „dm“, lieferte in allen Testen sehr hohe Werte. Ob dies daran liegt, dass es sich um ein Kondom einer günstigeren Hausmarke handelt, deren Produktion mögli-

cherweise nicht so stark kontrolliert wird, ist nicht bekannt. Nur das Kondom von „Durex“ lag bei allen Bestimmungsmethoden unter der Nachweisgrenze und wäre dadurch ein empfehlenswertes Kondom. Auch Docena et al. (2000) haben in Kondomen mittels modifizierter Lowry-Methode Proteingehalte von bis zu 740 µg/g Produkt (in dieser Arbeit bis 200 µg/g Material) gemessen und die Präsenz verschiedener allergener Proteine nachgewiesen. Bei den sonstigen Drogerieartikeln fielen besonders das Pflaster und der Luftballon durch teilweise sehr hohe Werte auf, während der Einmal- sowie der Haushaltshandschuh meistens im mittleren Bereich der Messwerte lagen. Das latexfreie Übungsband wies einen außerordentlich hohen Proteingehalt auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es gegebenenfalls aus anderem pflanzlichen Material hergestellt wurde. Allerdings konnte auch mit dem Gesamtlatex-ELISA und dem Hev b 1-ELISA des IPA Antigen gemessen werden. Es könnte sein, dass wenn dieses Übungsband aus pflanzlichem Kautschuk hergestellt wurde, homologe Proteine in diesen beiden Testverfahren kreuzreagieren. Im Hev b 1-FITkit® wurde dagegen kein Hev b 1 detektiert, was daran liegen könnte, dass diese AK Epitope erkennen, die nicht in den homologen Bereichen liegen. Da Hev b 1 allerdings ein sehr spezielles Latexallergen ist, das keine relevanten Homologien zu anderen Pflanzenproteinen aufweist [Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003], wäre es möglich, dass das als latexfrei deklarierte Übungsband aus speziell behandeltem Naturkautschuk besteht und deshalb als latexfrei gilt. Dieses Übungsband wurde

innerhalb des Zeitraumes der Diplomarbeit aus dem Sortiment des Vertreibers genommen, da es laut Herstellerangaben zu Komplikationen kam, über die allerdings nichts bekannt ist. Die Verwendung von Übungsbändern aus Naturlatex im Hinblick auf das Risiko für Latexallergiker wurde von Untermayr et al. (2008) untersucht. Die dort untersuchten drei Übungsbänder zeigten in Inhibitionstests das Vorkommen der Latexallergene Hev b 1, 3, 5 und 8.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass unter den Drogerieartikeln insbesondere der Luftballon hohe Protein- und Latexallergengehalte aufwies. Auch die meisten Kondome enthielten hohe Gehalte an Protein, Gesamtlatexallergen wie auch Einzelallergenen. Die Säuglingsartikel waren dagegen nicht so stark belastet und ein Abkochen führte zu einer erheblichen Reduktion der Protein- und Latexallergengehalte. Nur Protein und Hev b 1 konnten nicht komplett entfernt werden. Das Allergen Hev b 1 dominierte in den Drogerieartikeln. Von den vier Einzelallergenen konnte dieses am häufigsten und in größter Menge gemessen werden.

5.5 Unterschiede der Latexallergengehalte zwischen Handschuhen und Drogerieartikeln

Beim Vergleich der Allergenprofile der Handschuhe und der Drogerieartikel waren Unterschiede zu erkennen. Während bei den Saugern und Kondomen (DA01-DA10) der Allergengehalt an Hev b 1 in allen Produkten am größten war, ist bei den Handschuhen und den vier sonstigen Drogerieartikeln Luftballon, Einmalhandschuh, Haushaltshandschuh und Pflaster (DA11-DA14) kein einheitliches Einzelallergen auszumachen, dessen Gehalt immer am höchsten war. Bei Spina bifida-Patienten treten vermehrt Latexallergien auf, wenn sie mit Latexhandschuhen operiert werden. Ein Hauptallergen dabei ist das in vielen Produkten quantifizierte Hev b 1. Es könnte also sein, dass die Spina bifida-Kinder, die schon kurze Zeit nach der Geburt mehrfach operiert werden müssen, durch diese Operationen gegen Latexallergene sensibilisiert werden und die dauerhafte Verwendung von Saugern in diesem Fall zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führen könnte, da das Immunsystem der Säuglinge noch in der Entwicklung ist und dadurch noch empfindlicher auf die Latexallergene reagiert.

Obwohl die Sauger und Kondome hauptsächlich Hev b 1 enthalten, gibt es unter den Drogerieartikeln doch Produkte, die wie die Handschuhe nicht immer den größten Gehalt an dem gleichen Einzelallergen aufweisen. Also sind sowohl die Beschäftigten des Gesundheitsdienstes und die Spina bifida-Patienten als auch die „Normalbevölkerung“ allen Einzelallergenen ausgesetzt. Dabei unterscheidet sich jedoch die Konzentration an Proteinen und Allergenen in den Produkten, aber auch die Expositionsdauer. Während beispielsweise die Kondome teilweise deutlich mehr Einzelallergene enthalten und damit in direkten Kontakt zu Schleimhäuten kommen, werden die Handschuhe dafür möglicherweise deutlich länger getragen.

Auch der untersuchte Luftballon wies einen hohen Proteingehalt, vor allem aber Latexallergengehalt und einen sehr hohen Gehalt an Einzelallergenen auf. Zusätzlich sind viele Luftballons mit einem Puder beschichtet, um ein Verkleben zu vermeiden. Wie bei den Handschuhen werden wahrscheinlich Allergene an den Puder gebunden und dann mit dem Puder in die Luft abgegeben. Personen, die sich in der Nähe des Luftballons befinden, der zum Beispiel durch Ablassen der Luft den mit Allergenen belasteten Puder in die Luft ausstößt, nehmen die Allergene über die Atemluft auf. Baker und Hourihane beschrieben 2008 den Fall eines zweijährigen Jungen mit Spina bifida und Latexallergie. Bis zu seinem fünften Geburtstag kam es zu keinen Zwischenfällen, weil nur noch latexfreie Untersuchungsmaterialien eingesetzt wurden. Am fünften Geburtstag des Jungen wurde eine latexfreie Hüpfburg sowie ein Clown bestellt, der an alle Kinder außer den latexallergischen Jungen Luftballons verteilen sollte. Eines der Kinder brachte seinen Ballon neben dem Jungen zum Platzen, woraufhin dieser den Latexstaub einatmete. Der Junge bekam sofort Atemnot und musste zur Behandlung in eine Klinik gebracht werden. Auch hier stellt sich die Frage, warum die Latexprodukte nicht generell stärker kontrolliert werden und einen niedrigeren Latexallergengehalt aufweisen müssen, während dies bei Handschuhen bereits durchgesetzt wurde. Denn gepuderte Handschuhe sollen schon lange durch puderfreie, latexallergenarme oder andere geeignete Handschuhe ersetzt werden (TRGS 540). Bereits ab 1995 konnte in Belgien ein starker Rückgang an gepuderten und eine Zunahme an puderfreien Latexhandschuhen verzeichnet werden. Dadurch konnte dort nach einem Maximum im Jahre 1998 eine Abnahme der Fälle an berufsbedingtem Asthma verzeichnet werden [Vandenplas et al., 2008]. Ebenso wurde in Deutschland ab 1995 ein starker Rückgang an gepuderten Latexhandschuhen und eine Zunahme an puderfreien Latexhandschuhen beobachtet. Auch in Deutschland stieg die Zahl der Verdachtsfälle einer berufsbedingten Latexallergie bis 1998 an und nahm ab dann stetig ab. Zwischen dem Beginn der Reduktion an verwendeten gepuderten Handschuhen und der Abnahme der Verdachtsfälle einer berufsbedingten Latexallergie lagen in Deutschland zwei bis drei Jahre [Allmers et al., 2002].

In dieser Arbeit wurden viele verschiedene Artikel (Handschuhe, Säuglingsartikel, Kondome, Pflaster Ballons) untersucht, so dass ein breites Spektrum an Latexprodukten abgedeckt wurde. Die Ergebnisse liefern Hinweise, dass zahlreiche Produkte allergene Latexproteine enthalten. Die starke Variabilität der Handschuhe sowie der Drogerieartikel im Bezug auf Protein-, Gesamtlatex- und Einzelallergengehalt wird in dieser Arbeit verdeutlicht. Diese Variabilität kann viele Ursachen haben: So spielen die unterschiedliche Zusammensetzung der Latexrohextrakte sowie die verschiedenen Produktionsabläufe eine große Rolle. Wichtige Punkte bei den Produktionsabläufen sind die Anzahl, Qualität und Temperatur der Auslaug-Bäder. Außerdem ist die Qualität des Naturkautschuk vom Einsatz von Vulkanisationsbeschleunigern und Konservierungstoffen abhängig, ebenso wie von der Lagerzeit sowohl der Rohmate-

rialien als auch der fertigen Produkte [Kamath & Abraham, 1992; Leynadier et al., 1990]. Der Zusatz proteinabbauender Enzyme oder die Bestrahlung der Produkte mit Gammastrahlung zur Sterilisation kann den Proteingehalt und somit den Allergengehalt reduzieren [Bradley et al., 1994]. Auch die verschiedenen Oberflächen der Produkte könnten zu Unterschieden im Protein-, Gesamtlatex- und Einzelallergengehalt der Produkte führen.

Es zeigt sich durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich bei der Kontrolle des Latexallergengehaltes sowie Proteingehaltes nicht ausschließlich auf die im Gesundheitswesen verwendeten Handschuhe beschränkt werden sollte, sondern auch die latexhaltigen Produkte des alltäglichen Gebrauchs berücksichtigt werden müssen. Neben den Handschuhen und den im Gesundheitswesen verwendeten Latexprodukten ist es sinnvoll auch für den privaten Bereich latexärmere Produkte herzustellen, deren allergisierendes Potenzial durch niedrige Protein-, Gesamtlatex- und Einzelallergengehalte minimiert wurde. Für Operations- und Untersuchungshandschuhe wird seit Anfang Dezember 2008 von einem Hersteller geworben, dass die auch in dieser Arbeit verwendeten FITkit[®]-Teste in einer von ihm produzierten Handschuhreihe einen nicht nachweisbaren Gehalt an Latexallergenen belegen. Die Reduktion beruht nach Herstellerangaben auf veränderten Herstellungsverfahren, in denen auch eine gründliche Nachwäsche und Bleichung enthalten ist. Nicht nur bei Operations- und Untersuchungshandschuhen, sondern bei der Produktion sollten von den Herstellern möglichst allergenarme Latexprodukte angestrebt werden.

Anhang

Tab. 23: Untersuchte Chargen der Handschuhe.

Bei den von der BGW und in dieser Arbeit untersuchten Handschuhe handelt es sich um die gleichen Marken, allerdings wurden unterschiedliche Chargen untersucht.

Nr in Diplomarbeit	Bezeichnung	Marke	von der BGW untersuchte Charge	in dieser Arbeit untersuchte Charge
HS01	"Negativkontrolle Guayule-Handschuhe unsteril"	Yulex Corp., Maricopa, Nordamerika	nicht untersucht	/
HS02	"Positivkontrolle Handschuhe Malaysia unsteril"	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich	nicht untersucht	963346
HS03	Comfort, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich	UH615W23	MH363Z94
HS04	Contact, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich	10503012	RH147T21
HS05	Derma Skin, unsteril, puderfrei	Unigloves GmbH, Troisdorf-Spich	UH586R45	MH223B37
HS06	Micro-Thin NuTex®, puderfreie Latex-OP-Handschuhe, steril	Ansell GmbH, München	65762/66213	0804451004
HS07	Micro-Touch Powder Free, steril	Ansell GmbH, München	013031/2002-01	0805014021
HS08	Biogel® Super-Sensitive™, chirurgische OP-Handschuhe, steril	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath	01E4014	08E221
HS09	Biogel® Eclipse Indicator™, steril	Mölnlycke Health Care GmbH, Erkrath	01E4024	08C113
HS10	"Peha-soft Untersuchungs-Handschuhe unsteril"	Paul Hartmann AG, Heidenheim	11708921	82214792
HS11	Peha-soft powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim	11740202	82720472
HS12	Peha-micron plus powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim	04991714	747048570
HS13	Peha-taft plus powderfree steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim	10303762	809110075
HS14	Gentle Skin® classic, unsteril	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden	10414413	M 80503501
HS15	Gentle Skin® Anatom, unsteril	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden	80529142	M 70219204
HS16	Gentle Skin® grip, unsteril	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden	041087	841020
HS17	Augustus polymer, unsteril	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg	616R65	E/26/00042
HS18	Augustus puderfrei, unsteril	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg	464V45	MH104Z16
HS19	Augustus-Gel, unsteril	Augustus Vertriebsges. mbH, Augsburg	B00612	522085

Literaturverzeichnis

- Akasawa A, Hsieh LS, Martin BM, Liu T, Lin Y: A novel acidic allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterisation. *J Biol Chem* 1996; 271: 25389-25393
- Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Yip E, Palosuo T: Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995; 24: 659-665
- Alenius H, Kalkkinen N, Yip E, Hasmin H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T: Significance of rubber elongation factor as a latex allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 362-368
- Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Fink J: IgE-reactivity to 14-kDa and 27-kDa natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 103: 61-66
- Allmers H, Schmengler J, Skudlik C: Primary prevention of natural rubber latex allergy in the German health care system through education and intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 318-323
- ASTM - American Society for Testing and Materials: The standard test method for analyzing proteins in natural rubber and its products: ASTM D 5712-95. *Annual Book of ASTM Standards*, 14.02, 1995
- Axelsson JG, Johansson SG, Wrangsjö K: IgE-mediated anaphylactoid reactions to rubber. *Allergy* 1987; 42: 46-50
- Baker L, Hourihane J: Latex allergy: Two educational cases. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 477-481
- Banerjee B, Wang X, Kelly KJ, Fink JN, Sussman GL, Kurup VP: IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *J Immunol* 1997; 159: 5724-5732
- Baur X, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Degens P: Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy* 1997; 52: 661-664
- Beezhold D: LEAP: Latex ELISA for antigenic protein. A preliminary report. *Guthrie J* 1992; 61: 77-81
- BGW-Presse-Info (Presse-Service der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege): Latexallergien: Gefahr gebannt. Oktober 2008: 1 (<http://www.bgw-online.de>)
- BGW Themen- Achtung Allergiegefahr (M621). Stand 03/ 2006, 3. Auflage (<http://www.bgw-online.de>)
- BGW: Achtung Allergiegefahr. 2006, 3. Auflage
- Bernstein DI, Biagini RE, Karnani R, Hamilton R, Murphy K, Bernstein C, Arif SA, Berendts B, Yeang HY: In vivo sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 610-616
- Blum H, Beier H, Gross H: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93-99
- Bradley D, Gromelsky S, Beezhold D: Reduction of antigenic protein levels in latex gloves after gamma radiation. *Biomed Instr & Technol* 1994; 28: 481-483
- Breiteneder H: The Allergens of *Hevea brasiliensis*. *ACI International* 1998; 10/4: 101-109
- Breiteneder H, Scheiner O: Molecular and Immunological Characteristics of Latex Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 83-92
- Chye ML, Cheung KY: Beta-1,3-glucanase is highly expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol* 1995; 29: 397-402
- Chen Z, Cremer R, Posch A, Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Baur X: On the allergenicity of Hev b 1 among health care workers and patients with spina bifida allergic to natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997b; 100: 684-693
- Chen Z, Posch A, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X: Identification of hevein (Hev b 6.02) in *Hevea* latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 476-481
- Chen Z, Posch A, Lohaus C, Raulf-Heimsoth M, Meyer HE, Baur X: Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea* latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997a; 99: 402-409
- Chen Z, van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Baur X: Allergenic and antigenic determinants of latex allergen Hev b 1: peptide mapping of epitopes recognized by human, murine and rabbit antibodies. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 406-415

- Coombs R, Gell P: Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease.
In: (ed.: Gell P, Coombs R, Lachmann P): Clinical Aspects of Immunology 1975, Oxford, Blackwell
- Crippa M, Belleri L, Mistrello G, Tedoldi C, Alessio L: Prevention of latex allergy among health care workers and in the general population: Latex protein content in devices commonly used in hospitals and general practice.
Int Arch Occup Environ Health 2006; 9: 1-8
- Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X: The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex.
J Allergy Clin Immunol 1993; 92: 690-697
- d'Auzac J, Prevot JC, Jacob JL: What's new about lutoids? A vacuolar system model from *Hevea* latex.
Plant Physiol Biochem 1995; 33: 765-777
- Dennis MS, Henzel WJ, Bell J, Kohr W, Light DR: Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea* latex.
J Biol Chem 1989; 264: 18618-18626
- Dennis MS, Light DR: Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization and role in rubber biosynthesis.
J Biol Chem 1989; 264: 18608-18617
- Dennis R, Ownby MD: A history of latex allergy.
J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 27-32
- Deval R, Ramesh V, Prasad GBKS, Jain AK: Natural rubber latex allergy.
Indian J Dermatol Venerol Leprol 2008; 74: 304-310
- DIN (Deutsches Institut für Normung e. V.): Medizinische Handschuhe zum einmaligen Gebrauch; Teil 3: Anforderungen und Prüfungen für die biologische Bewertung; Deutsche Fassung EN 455-3 : 1999 D
- Docena GH, Benítez P, Fernández R, Fossati CA: Identification of allergenic proteins in condoms by immunoenzymatic methods.
Ann Allergy Asthma Immunol 2000; 85: 77-83
- Doekes G, van Niftrik M, Portengen L, Tomazic-Jezic VJ, Chen Z, Nij EIT, de Wind S, Heederik DJ: Measurement of Latex Proteins in Low-Volume Airborne Samples and Glove Extracts with a Sandwich EIA Using Polyclonal Rabbit Anti-Latex IgG.
J Allergy Clin Immunol 2001; 107: A438
- Frosch PJ, Born CM, Schütz R: Kontaktallergien auf Gummi-, Operations- und Vinylhandschuhe.
Hautarzt 1987; 38: 210-217
- Fuchs T: Gummi und Allergie.
Dustri Verlag Deisenhofen 1995
- Garabrant DH, Schweitzer S: Epidemiology of latex sensitization and allergies in health care workers.
J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 82-95
- Grimm A: Überempfindlichkeit gegen Kautschuk als Ursache von Urtikaria und Quickschem Ödem.
Klin Wochenschr 1927; 6: 1479
- Heese A, Peters KP, Koch HU, Hornstein OP: Allergien gegen Latexhandschuhe. Allergologie 1995; 18: 358-365
- Hollander A, Gordon S, Renström A, Thissen, Doekes G, Larsson PH, Malmberg P, Venables KM, Heederik D: Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. I. Analysis of air samples.
Allergy 1999; 54: 142-149
- Hosler D, Burkett SL, Tarkanian MJ: Prehistoric polymers: rubber processing in ancient Mesoamerica.
Science 1999; 284: 1988-1991
- IUIS- International Union of Immunological Societies; Allergen Nomenclature zuletzt aktualisiert am 02.03.2009: <http://www.allergen.org/Allergen.aspx>
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin 2002; 5. Auflage: 505f
- Kamath SR, Abraham MS: Effect of leaching parameters on the water soluble protein content of latex examination gloves: Program and Proceedings from the International Latex Conference: Sensitivity to Latex in Medical Devices.
Baltimore, MD, 1992
- Kidwai SA, Ansari AA, Salahuddin A: Effect of Succinylation (3-Carboxypropionylation) on the Conformation and Immunological Activity of Ovalbumin.
Biochem J 1976; 155: 171-180
- King TP, Hoffman D, Løwenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE, Thomas W: Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee.
Int Arch Allergy Immunol 1994; 105: 224-233

- Kolarich D, Altmann F, Sunderasan E: Structural analysis of glycoprotein allergen Hev b 4 from natural rubber latex by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 715-720
- Konz KR, Chia JK, Kurup VP, Resnik A, Kelly KJ, Fink JN: Comparison of latex hypersensitivity among patients with neurologic defects. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 950-954
- Kurup VP, Sussman GL, Yeang HY, Elms N, Breiteneder H, Arif SAM, Kelly KJ, Bansal NK, Fink JN: Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clin Mol Allergy* 2005; 3:11
- Kurup VP, Yeang HY, Sussman GL, Bansal NK, Beezhold DH, Kelly KJ, Hoffman DR, Williams B, Fink JN: Detection of immunoglobulin antibodies in the sera of patients using purified latex allergens. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 359-369
- Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685
- Leynadier F, Xuan TT, Dry J: Allergenic suppression in natural latex surgical gloves. *Allergy* 1990; 46: 619-625
- Lieberei R, Reisdorff C: *Nutzpflanzenkunde*. Georg Thieme Verlag KG 1976, 2007; 7. Auflage: 390f
- Lloyd FE: *Guayule (Parthenium argentatum Gray)*, a rubber-plant of the Chihuahuan desert. Carnegie Institution of Washington 1911
- Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.): *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 1998; 1. Auflage: 39f
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 139: 265-275
- Lundberg M, Wrangsjö K, Erikson-Widblom K, Johansson SGO: Reduction of latex-allergen content in Swedish medical catheter balloons- a survey of three years' production. *Allergy* 1997; 52: 1057-1062
- Moir GFJ: Ultracentrifugation and staining of Hevea latex. *Nature* 1959; 148: 1626-1628
- Moneret-Vautrin DA, Beaudouin E, Widmer S, Mouton C, Kanny G, Prestal F, Kohler C, Feldmann L: Prospective study of risk factors in natural rubber latex hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 668-677
- Mooibroek H, Cornish K: Alternative sources of rubber. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53: 355-365
- Nutter AF: Contact urticaria to rubber. *Br J Dermatol* 1979; 101: 597-598
- Paardekooper EC: Exploitation of the rubber tree. In: Webster CC, Baulkwill WJ, eds. *Rubber*. New York: Longman Scientific & Technical 1989; 349-414
- Palosuo T, Reinikka-Railo H, Kautiainen H, Alenius H, Kalkkinen N, Kulomaa M, Reunala T, Turjanmaa K: Latex allergy: the sum quantity of four major allergens shows the allergic potential of medical gloves. *Allergy* 2007; 62: 781-786
- Peixinho C, Tavares-Ratado P, Tomás MR, Taborda-Barata L, Tomaz CT: Latex allergy: new insights to explain different sensitization profiles in different risk groups. *British Journal of Dermatology* 2008; 159: 132-136
- Porri F, Lemièrè C, Birnbaum J, Guilloux L, Didelot R, Vervloet D, Charpin D: Prevalence of latex allergy in atopic and non-atopic subjects from the general population. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 154
- Posch A, Chen Z, Dunn MJ, Wheeler C, Petersen A, Leubner-Metzger G, Baur X: Latex allergen database. *Electrophoresis* 1997a; 18: 2803-2810
- Posch A, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Baur X: Latex allergens. *Clinical and Experimental Allergy* 1998; 28: 134-140
- Posch A, Chen Z, Wheeler C, Dunn MJ, Raulf-Heimsoth M, Baur X: Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* 1997b; 99: 385-395
- Posch A, Wheeler CH, Chen Z, Flagge A, Dunn MJ, Papenfuss F, Raulf-Heimsoth M, Baur X: Class I endochitinase containing a hevein domain is the causative allergen in latex-associated avocado allergy. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 667-672
- Pumphrey RSH: Allergy to Hevea latex. *Clin Exp Immunol* 1994; 98: 358-360

- Rihs HP, Raulf-Heimsoth M: Natural rubber latex allergens: Characterisation and evaluation of their allergenic capacity. *New Horizons* 2003; 3: 1-8
- Raulf-Heimsoth: Zelluläre Aspekte der Sensibilisierung und Allergie gegen Naturlatex- Beitrag zur Pathogenese allergischer Erkrankungen (Habilitationsschrift). Angefertigt am Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum im Jahr 2000
- Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Sander I, Merget R, Brüning T: Naturlatexallergie- Immer noch ein aktuelles Problem? *Trauma Berufskrankh* 2004; 6: 140-143
- Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Rozynek P, Cremer R, Gaspar A, Pires G, Yeang HY, Arif SAM, Hamilton RG, Sander I, Lundberg M, Brüning T: Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1657-1667
- Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Lundberg M, Cremer R, Maryska S, Brüning T, Rihs HP: Individual latex allergen sensitisation profiles in spina bifida patients and health care workers using a panel of recombinant latex allergens coupled to ImmunoCAP (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 2002; 106: 283
- Raulf-Heimsoth M, Sander I, Chen Z, Borowitzki G, Diewald K, van Kampen V, Baur X: Development of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Detection of the Latex Allergen Hev b 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 236-241
- Renström A, Gordon S, Larrson PH, Tee RD, Newman Taylor AJ, Malmberg P: Comparison of a radioallergosorbent (RAST) inhibition method and a monoclonal enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for aeroallergen measurement. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1314-1321
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1995; 3. neubearbeitete Auflage: 269
- Sander I, Raulf-Heimsoth M: Quantifizierung der inhalativen Enzymbelastung am Arbeitsplatz. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 2001; 61: 319-323
- Shim YY, Wanasundara JP: Quantitative detection of allergenic protein Sin a 1 from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seeds using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 1184-1192
- Slater JE, Vedvick T, Arthur-Smith A, Trybul DE, Kekwick RG: Identification, cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem* 1996; 271: 25394-25399
- Spartà G, Kemper MJ, Gerber AC, Goetschel P, Neuhaus TJ: Latex allergy in children with urological malformation and chronic renal failure. *J Urol* 2004; 171: 1647-1649
- Stern G: Überempfindlichkeit gegen Kautschuk als Ursache von Urtikaria und Quickschem Ödem. *Klin Wochenschr* 1927; 6: 1096-1097
- Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang YH, Cardoso MJ: Latex B-Serum -1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major allergens. *J Nat Rubb Res* 1996; 10: 82-99
- Sunderasan E, Ward MA, Yeang HY: Isolation and characterisation of latex cyanogenic glucosidase in *Hevea brasiliensis*. *J Rubber Res* 2002; 5: 244-252
- Sussman G, Tarlo S, Dolovich J: The spectrum of IgE-mediated responses to latex. *JAMA* 1991; 265: 2844-2847
- Tarlo SM, Wong L, Roos J, Booth N: Occupational asthma caused by latex in a surgical glove manufacturing plant. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 626-631
- TRGS- Technische Regeln für Gefahrstoffe 540: Sensibilisierende Stoffe. Technische Regeln für Gefahrstoffe 2000
- Untermayr E, Lukschal A, Hemmer W, Harwanegg C, Breiteneder H, Jarisch R, Schreiner O, Jensen-Jarolim E: Exercise with latex sport bands represents a risk for latex allergic patients. *Immunol Lett* 2008; 115: 98-104
- van Beilen JB, Poirier Y: Guayule and Russian Dandelion as Alternative Sources of Natural Rubber. *Critical Reviews in Biotechnology* 2007; 27: 217-231
- Vandenplas O, Delwiche JP, Evrard G, Aimont P, van der Brempt X, Jamart J, Delaunois L: Prevalence of occupational asthma due to latex among hospital personnel. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 54-60
- Vandenplas O, Larbanois A, Vanassche F, François S, Jamart J, Vandeweerdt M, Thimpont J: Latex-induced occupational asthma: time trend in incidence and relationship with hospital glove policies. *Allergy* 2009; 64: 415-420

Wagner S, Buck D, Hafner C, Sowka S, Niggemann B, Scheiner O, Breiteneder H: Hev b 7 is a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in children with spina bifida.
J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 621-627

Wagner S, Breiteneder H: The latex-fruit syndrome.
Biochem Soc Trans 2002; 30: 935-940

Wagner S, Breiteneder H: *Hevea brasiliensis* Latex allergens: Current Panel and Clinical Relevance.
Int Arch Allergy Immunol 2005; 136: 90-97

Wagner B, Krebitz M, Buck D, Niggemann B, Yeang HY, Han KH, Scheiner O, Breiteneder H: Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida.
J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 1084-1092

Westmeier R, unter Mitwirkung von Gronau-Czybulka S, Habeck C, Schach H, Schickle H, Theßling G, Wiesner P: Elektrophorese-Praktikum.
Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim 1990; S. 167ff (Elektrophorese), S. 53 (Blotting)

Wrangsjö K, Wahlberg JA, Axelsson IG: IgE-mediated allergy to natural rubber in 30 patients with contact urticaria.
Contact Dermatitis 1988; 19: 264-271

Yassin MS, Lierl MB, Fischer TJ, O'Brien K, Cross J, Steinmetz C: Latex allergy in hospital employees.
Ann Allergy 1994; 72: 245-249

Yeang HY, Arif SA, Yusof F, Sunderasan E: Allergenic proteins of natural rubber latex.
Methods 2002; 27: 32-45

Yeang HY, Hamilton RG, Bernstein DI, Arif SAM, Chow KS, Loke YH, Raulf-Heimsoth M, Wagner S, Breiteneder H, Biagini RE: Allergen concentration in natural rubber latex.
Clinical and Experimental Allergy 2006; 36: 1078-1086

Yip E, Cacioli P: The manufacture of gloves from natural rubber latex.
J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 3-14

Yip L, Hickey V, Wagner B, Liss G, Slater J, Breiteneder H, Susman G, Beezhold D: Skin prick test reactivity to recombinant latex allergens.
Int Arch Allergy Immunol 2000; 121: 292-299

Yulex: Webseite der Firma Yulex Corporation <http://www.yulex.com/crop/guayuletech-faq.php>

Abkürzungsverzeichnis

ABTS 2,2'	Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
A. dest	Aqua destillata	pAK	polyklonaler AK
AK	Antikörper	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphat buffered saline)
ASTM	American Society for Testing and Materials	PBST	PBS mit 0,05% Tween 20
BCIP 5	Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	PSF	Polysulfon
BGW	Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege	PTA	Phosphorwolframsäure
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)	PVDF	Polyvinylidenedifluorid
		PVP	Polyvinylpyrrolidon
DA	Drogerieartikel	r	Korrelationskoeffizient
DOC	Natriumdesoxycholat	REF	Rubber elongation factor
DTT	Dithiothreitol	rHev b	rekombinant hergestelltes Protein von <i>Hevea brasiliensis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
ELISA	engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	SFCA	Tensid freie Acetylcellulose (engl. surfactant-free cellulose acetate)
EN	europäische Norm	SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)		
Hev b allergenes	Protein aus <i>Hevea brasiliensis</i>	Tab.	Tabelle
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. tris buffered saline)
HS	Handschuh(e)	TBST	TBS mit 0,1% Tween 20
Ig	Immunglobulin	TCA	Trichloressigsäure
IPA	Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA)	TMB	Tetramethylbenzidin
		TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
		TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
		Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
		(v/v)	Volumen pro Volumen (eng. volume per volume)
kDa	Kilodalton	(w/v)	Gewicht pro Volumen (engl. weight per volume)
ku	Kilounits		
Lsg	Lösung		
mA	Milliampere		
mAK	monoklonaler AK		
MBP	Maltosebindeprotein		
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure		
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid		
nHev b	natives allergenes Protein aus <i>Hevea brasiliensis</i>		
nm	Nanometer		
NRL	Naturlatex (engl. natural rubber latex)		
OD	optische Dichte		
OPD	ortho-Phenylendiamin (1,2-Phenylendiamin)		

**IPA – Institut für Prävention und Arbeitsmedizin
der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung**
Institut der Ruhr-Universität Bochum

Bürkle-de-la-Camp-Platz 1
44789 Bochum

Telefon: +49 (0)234 / 302-4501
Fax: +49 (0)234 / 302-4505

E-Mail: ipa@ipa-dguv.de
Internet: www.ipa-dguv.de