

DIN 58924



ICS 11.100.30

Ersatz für
DIN 58924:2009-05

**Hämostaseologie –
Referenzmethode zur Bestimmung der Collagenbindungsaktivität des
VWF;
Text Deutsch und Englisch**

Haemostaseology –
Reference method for the determination of the collagen binding activity of the VWF;
Text in German and English

Hémostase –
Méthode de référence pour la détermination de l'activité collagène binding du VWF;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 20 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Abkürzungen	4
5 Bezeichnung	5
6 Entnahme und Aufbereitung des Blutes	5
7 Geräte, Materialien und Reagenzien	5
7.1 Geräte und Ausrüstung	5
7.2 Materialien und Reagenzien	6
7.2.1 ELISA-Platten	6
7.2.2 Collagen	6
7.2.3 Antikörper	6
7.2.4 Puffersysteme	6
7.2.5 Substrate	6
7.2.6 Referenzmaterial	7
8 Durchführung	7
8.1 Allgemeine Richtlinien	7
8.2 Bezugskurve	7
8.3 Probenverdünnungen	7
8.4 Mindestanforderungen	7
8.5 Testablauf	8
8.6 Messung	8
8.7 Auswertung und Evaluierung der Daten	8
8.8 Ergebnismitteilung	8
9 Validierung des Testsystems	8
10 Referenzintervall	8
11 Störfaktoren	9
12 Beeinflussung der Interpretation	9
Literaturhinweise	10

Tabellen

Tabelle 1 — Transport- und Lagerungsbedingungen	5
---	---

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-05 AA „Hämostaseologie“ im DIN-Normenausschusses Medizin (NAMed) erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN 58924:2009-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Transport- und Lagerungsbedingungen in Abschnitt 6 (insbesondere Tabelle 1) wurden überarbeitet;
- b) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 58924: 2009-05

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anwendbar für die Bestimmung der funktionellen Collagenbindungsaktivität des humanen Von Willebrand Faktors in Citratplasma und von gereinigtem plasmatischen oder rekombinanten Von Willebrand Faktor in pharmazeutischen Präparaten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 58905-1, *Hämostaseologie — Blutentnahme — Teil 1: Gewinnung von venösem Citratplasma für hämostaseologische Analysen*

DIN 58911-1, *Hämostaseologie — Kalibrierung von Messverfahren — Teil 1: Gerinnungszeit-Meßverfahren*

DIN 58911-2, *Hämostaseologie — Kalibrierung von Messverfahren — Teil 2: Photometrische Meßverfahren*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term/>

— DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Von Willebrand Faktor

humanes Glykoprotein großer Molekülmasse, das in der primären Hämostase sowohl für die Interaktion zwischen Thrombozyt und Gefäßwand als auch von Thrombozyten untereinander verantwortlich ist, und in der sekundären Hämostase das Trägerprotein des F VIII ist und dessen Genort auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 liegt

3.2

Von Willebrand Faktor Collagenbindungsaktivität

Anteil des VWF, der an immobilisierte Collagene bindet

4 Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden in dieser Norm verwendet:

BSA	Rinderserum Albumin (en: bovine serum albumin)
CBA	Collagenbindungstest (en: collagen binding assay)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HRP	Meerrettich-Peroxidase (en: horseradish peroxidase)
IE	Internationale Einheit (en: International Unit)
OPD	Phenylendiamin
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (en: phosphate buffered saline)
RT	Raumtemperatur

TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
WHO	Weltgesundheitsorganisation (en: World Health Organization)

Für den Von Willebrand Faktor gelten im Besonderen die folgenden Definitionen:

VWF	Von Willebrand Faktor
VWS	Von Willebrand Syndrom
VWF:Ag	Von Willebrand Faktor Antigen
VWF:RCo	Von Willebrand Faktor Ristocetin-Cofaktor Aktivität
VWF:CB	Von Willebrand Faktor Collagenbindungsaktivität

5 Bezeichnung

Bezeichnung der Bestimmung der VWF:CB ist

Bestimmung DIN 58924 — VWF:CB

6 Entnahme und Aufbereitung des Blutes

Die Entnahme und Aufbereitung des Blutes erfolgen nach DIN 58905-1.

Im Gegensatz zu vielen anderen Gerinnungsproteinen ist der VWF relativ stabil. Transport von Plasma oder Blut bei Raumtemperatur (RT) führt zu keinerlei Veränderungen, solange 72 h nicht überschritten werden. Danach kommt es zu einem graduellen Verlust großer Multimere und zu einem dysproportionalen Abfall funktioneller Tests wie VWF:RCo und VWF:CB, während das VWF:Ag über noch längere Zeit stabil bleibt [1]. Hämolytische Proben können ein Hinweis auf fehlerhafte Blutentnahme und Lagerung sein und dürfen nicht verwendet werden. Die Transport- und Lagerungsbedingungen müssen der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 — Transport- und Lagerungsbedingungen

Probe ^a	Temperatur	Zeit
Citratblut	Raumtemperatur	≤ 72 h
Citratplasma	Raumtemperatur	≤ 72 h
Citratplasma	–20 °C	Mindestens 1,5 Jahre
Citratplasma	–70 °C	Mindestens 10 Jahre
^a Lagerung und Transport bei Kühlschranktemperatur ist nicht geeignet, da dies zu qualitativen Veränderungen führt (Vortäuschung von VWS Typ 2).		

7 Geräte, Materialien und Reagenzien

7.1 Geräte und Ausrüstung

7.1.1 ELISA-Plattenlesegerät (en: ELISA reader).

7.1.2 Gerätespezifische Zusatzausrüstung wie PC und Auswertesoftware.

7.1.3 kalibrierte Pipetten und Mehrkanalpipetten.

7.1.4 ELISA-Plattenwaschgerät (das manuelle Waschen von ELISA-Platten ist zu vermeiden).

7.1.5 Trockenschrank für die Inkubation von ELISA-Platten.

7.2 Materialien und Reagenzien

7.2.1 ELISA-Platten

Als ELISA-Platten stehen Platten mit 96 Vertiefungen (96 well) zur Verfügung, die eine Beschichtung aufgrund physikalischer Adsorption erlauben und vorzugsweise aus Polystyrol hergestellt sind. Plattentypen mit hoher Proteinbindungskapazität müssen vorzugsweise verwendet werden. Alternativ dazu ist auch die kovalente Immobilisierung von Typ III Collagen aus humaner Plazenta an präaktivierte ELISA-Platten über einen Spacer-Arm beschrieben [2]. Bei Verwendung einer neuen Charge von Platten ist es empfehlenswert, die Eignung in Kombination mit dem jeweiligen Collagen zu testen. Darüber hinaus muss exemplarisch die Homogenität der Beschichtung insbesondere in den Randbereichen der Platten nachgewiesen werden.

7.2.2 Collagen

Als geeignete Collagene haben sich kommerziell erhältliche Präparationen der Typen I (z. B. fibrilläres Collagen aus der Pferdesehne) oder Typ III (z. B. Collagen aus humaner Plazenta) erwiesen [3]. Da diese im Handel erhältlichen Collagene üblicherweise nicht speziell für die Durchführung des Collagenbindungstests hergestellt werden, muss jede Charge in Vorversuchen auf ihre Eignung geprüft werden. Typische Beschichtungskonzentrationen sind für Typ I Collagen (fibrillär, Pferdesehne) (10 bis 50) µg/ml, für Typ III Collagen (humane Plazenta) (1 bis 5) µg/ml.

7.2.3 Antikörper

Hoch spezifische polyklonale anti-VWF Antikörper (beispielsweise aus dem Kaninchen) sind kommerziell erhältlich und können als Enzymkonjugate (z. B. als Peroxidase-Konjugat) verwendet werden.

7.2.4 Puffersysteme

Beschichtungslösungen:

Fibrilläre Collagene sind in der Regel nur im sauren Milieu löslich, für die Beschichtung sind daher saure Lösungen ($\text{pH} \leq 4$) zu empfehlen. Darüber hinaus können auch hochionische Lösungen unter Zusatz von stabilisierenden Kohlenhydraten verwendet werden. Die Beschichtung mit Typ-III-Collagenen kann gegebenenfalls auch bei neutralen pH-Werten, beispielsweise in PBS-Puffer, pH 7,3, durchgeführt werden.

Blockierlösung:

Als Blockierlösung können verschiedene Lösungen von Proteinen mit Konzentrationen zwischen 0,1 % und 3 % verwendet werden. Üblich ist der Einsatz von Gelatine, Trockenmagermilch, fettarmer Kuhmilch oder BSA.

Verdünnungspuffer:

Als Verdünnungspuffer kann PBS-Puffer pH 7,3 unter Zusatz von 0,1 % Polysorbat 20 und unspezifischem Proteinzusatz wie in der Blockierlösung zur Anwendung kommen.

Waschpuffer:

Als Waschpuffer kann PBS-Puffer unter Zusatz von 0,1 % Polysorbat 20 verwendet werden.

Stopplösung:

Als Stopplösung kann beispielsweise 2 M Schwefelsäure verwendet werden.

7.2.5 Substrate

Bei Verwendung von HRP-Antikörperkonjugaten kann das System OPD/ H_2O_2 oder TMB/ H_2O_2 zur Anwendung kommen. Die Substrate sind auch als gebrauchsfertige Lösung im Handel erhältlich.