

	DIN 58987	
ICS 11.100.30	Ersatz für DIN 58987:2010-03	
Hämostaseologie – Referenzmethode zur Bestimmung des Von Willebrand Faktor Antigens; Text Deutsch und Englisch Haemostaseology – Reference method for the Von Willebrand Factor antigen; Text in German and English Hémostase – Méthode de référence pour la détermination du Facteur Willebrand antigène; Texte en allemand et anglais		
Gesamtumfang 24 Seiten		
DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)		
		

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Symbole und Abkürzungen	4
5 Bezeichnung	5
6 Entnahme und Aufbereitung des Blutes	5
7 Geräte, Materialien und Reagenzien	5
7.1 Allgemeines	5
7.2 Geräte und Ausrüstung	6
7.3 Materialien und Reagenzien	6
7.3.1 ELISA-Technik	6
7.3.2 Automatisierte partikelverstärkte Agglutination	8
8 Durchführung	8
8.1 ELISA-Technik	8
8.1.1 Bezugskurve	8
8.1.2 Probenverdünnungen	8
8.1.3 Testablauf	8
8.1.4 Messung	9
8.1.5 Auswertung und Evaluierung der Daten	9
8.2 Automatisierte partikelverstärkte Agglutination	9
8.3 Qualitätssicherung und Leistungsdaten	10
8.3.1 Bezugskurve, Kalibrationsbereich und Messbereich	10
8.3.2 Verdünnungsechtheit des Tests	10
8.3.3 Verfahrenvergleich	10
8.3.4 Häufigkeit von Kontrollmessungen	10
8.3.5 Abweichungen der Kontrollen vom Referenzbereich	10
8.3.6 Ergebnismitteilung	10
9 Validierung des Testsystems	11
10 Referenzintervall	11
11 Störfaktoren	11
12 Beeinflussung der Interpretation	11
Literaturhinweise	12

Tabellen

Tabelle 1 — Transport- und Lagerungsbedingungen	5
Tabelle 2 — Beispiel für einen Testablauf	9
Tabelle 3 — Messvorschrift für die automatisierte partikelverstärkte Agglutination	10

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 176-08-04 AA „Hämostaseologie“ im DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech) 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 58987:2010-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Liste der Symbole und Abkürzungen überarbeitet;
- b) Anforderung an die Transportzeit von Citratplasma geändert von 48 h auf 72 h und Anforderung an die Lagerzeit geändert auf 1,5 Jahre bei -20 °C oder 10 Jahre bei -70 °C (siehe Tabelle 1);
- c) Strukturierung der Unterabschnitte zum Prüfverfahren an aktuelle Gestaltungsregeln angepasst;
- d) Anforderung an Blockierungs-Reagenz überarbeitet (siehe 7.3.1.3), d. h. Milchlösungen, hergestellt aus Trockenmilchpulver oder H-Milch ersetzt durch Milch;
- e) anstelle von Reinstwasser wird für die Herstellung der Beschichtungslösung gereinigtes Wasser verwendet;
- f) Latexreagenz ersetzt durch Suspension kleiner Partikel (7.3.2.2);
- g) Testablauf für den Sandwich-ELISA-Test überarbeitet;
- h) Anforderungen an die Messung (8.1.4) sowie die Auswertung und Evaluierung der Daten (8.1.5) neu aufgenommen;
- i) Anforderung an untere Grenze des erweiterten Messbereiches dahingehend geändert, dass sie 5 % nicht überschreiten darf;
- j) Anforderungen an die Präzision gestrichen;
- k) Anforderungen an die Validierung des Testsystems (siehe Abschnitt 9) neu aufgenommen;
- l) Literaturverzeichnis aktualisiert;
- m) Dokument redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 58987: 2010-03

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anwendbar für die immunologische Bestimmung der Von Willebrand Faktor Antigen Konzentration (VWF:Ag) in Citratplasmen und Faktorenkonzentraten. Als Referenzmethoden wurden die ELISA-Technik und die automatisierte partikelverstärkte Agglutination ausgewählt.

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 EN ISO 8655-1, *Volumenmessgeräte mit Hubkolben — Teil 1: Begriffe, allgemeine Anforderungen und Gebrauchsempfehlungen*

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 <https://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 Antigen

Von Willebrand Faktor-Molekül, das an einen spezifischen Antikörper binden kann und das nachgewiesen und quantifiziert werden kann

4 Symbole und Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden in diesem Dokument verwendet:

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure)-Diammoniumsalz
BSA	Rinderserum-Albumin
DDAVP	Desmopressin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IE	Internationale Einheit (en: International Unit, IU)

OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer
pNP	para-Nitrophenol
r	Korrelationskoeffizient
RILIBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer
RT	Raumtemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
WHO	Weltgesundheitsorganisation (en: World Health Organization)
VWD	Von Willebrand Krankheit
VWF	Von Willebrand Faktor
VWF:Ag	Von Willebrand Faktor Antigen

5 Bezeichnung

Bezeichnung der Bestimmung der VWF:Ag ist

Bestimmung DIN 58987-VWF:Ag

6 Entnahme und Aufbereitung des Blutes

Die Entnahme und Aufbereitung des Blutes muss nach DIN 58905-1 durchgeführt werden.

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 disproportionalen Abfall funktioneller Teste, während das VWF:Ag über noch längere Zeit stabil bleibt [1]. Hämolytische Proben können ein Hinweis auf fehlerhafte Blutentnahme und Lagerung sein. Die Transport- und Lagerungsbedingungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 — Transport- und Lagerungsbedingungen

Probe ^a	Temperatur	Zeit
Citratblut	Raumtemperatur	≤ 72 h
Citratplasma	Raumtemperatur	≤ 72 h
Citratplasma	-20 °C ^b	mindestens 1,5 Jahre
Citratplasma	-70 °C ^b	mindestens 10 Jahre
^a Lagerung und Transport bei Kühlschranktemperatur ist nicht geeignet, da dies zu qualitativen Veränderungen führt (Vortäuschung von VWD Typ 2).		
^b Der Auftauvorgang sollte bei 37 °C ohne Zentrifugation durchgeführt werden.		

7 Geräte, Materialien und Reagenzien

7.1 Allgemeines

Die Anweisungen der Hersteller von Geräten, Materialien und Reagenzien sollten befolgt werden. Instrument- und Reagenzkombinationen von verschiedenen Herstellern können zu nicht vergleichbaren Ergebnissen führen.

ren. Die Instrumente und Reagenzien der Hersteller können daher von der in diesem Dokument beschriebenen typischen Vorgehensweise in einem von diesem Dokument festgelegten Rahmen abweichen. Es liegt in der Verantwortung des Labors und des Herstellers, das jeweilige Testsystem so zu etablieren, dass sichergestellt ist, dass die in diesem Dokument geforderten Mindestanforderungen für die Leistungsdaten des Tests eingehalten werden.

Der primäre Standard ist immer der jeweils aktuelle WHO-Standard für VWF. Da WHO-Standards nur in begrenztem Umfang verfügbar sind, müssen in der täglichen Routine sekundäre Standards eingesetzt werden, die am primären (WHO-) Standard kalibriert sind. Bei guten kommerziellen Standards wird der zur Kalibration verwendete Primärstandard aufgeführt. Dies ist gerade in Übergangszeiten zwischen einem neuen und einem noch vorhandenen Standard notwendig. Neue WHO-Standards werden an dem zurzeit gültigen WHO-Standard kalibriert.

Durch diese Vorgehensweise ist in den letzten zwei Jahrzehnten zwischen dem ersten und dem derzeitigen Standard eine Abweichung zum Normalplasma-pool entstanden. Bei der Kalibrierung sekundärer (industrieller sowie hauseigener) Standards ist mit einer methodischen Fehlermöglichkeit zu rechnen. Dieser methodische Fehler kann die Differenz zum Normalplasma-pool (siehe DIN 58939-1) vergrößern oder vermindern. Die Kalibrierung des sekundären Standards kann auch durch eine Methode erfolgen, bei der sowohl der WHO-Standard als auch ein Normalplasma-pool verwendet wird.

Die Bezugskurve wird mit Kalibrierplasma bzw. kalibriertem Plasma-Pool erstellt.

7.2 Geräte und Ausrüstung

7.2.1 Pipetten und/oder Pipettierautomaten dürfen die Fehlergrenzen nach Herstellerangaben oder Laboranweisung nicht überschreiten und müssen nach DIN EN ISO 8655-1 regelmäßig gewartet werden.

7.2.2 Waschgerät: Handwaschgeräte oder Waschautomaten müssen für den verwendeten Plattentyp geeignet und entsprechend den jeweiligen Bedienungsanleitungen eingestellt und überprüft werden.

7.2.3 Lesegerät muss auf den Plattentyp und die dem Substrat entsprechende Wellenlänge eingestellt werden.

7.2.4 Geräte für die automatische Prüfung.

Geeignet sind Instrumente, für die durch den Reagenz- oder Instrumentenhersteller Testprozeduren erstellt wurden. Dementsprechend sind die Gebrauchsanweisungen von Reagenz- und Instrumentenhersteller zu befolgen.

7.3 Materialien und Reagenzien

7.3.1 ELISA-Technik

7.3.1.1 ELISA-Platten

Es müssen Platten mit genügend großer Bindungsfähigkeit eingesetzt werden. Rundboden und Flachbodenplatten sind gleichermaßen geeignet, wenn das Waschgerät auf den Plattentyp eingestellt wird. Geeignete Platten werden von verschiedenen Herstellern geliefert. Bei Verwendung der Platten ist der Randeﬀekt zu berücksichtigen (entsprechende Herstellerhinweise beachten). Plastik ändert seine physikalischen Eigenschaften während der Abkühlung nach dem Herstellen der Platte oder der Streifen. Dabei besteht eine Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Abkühlung. Da der Randbereich einer Platte deutlich stärker exponiert ist als die übrigen Kavitäten, sind hier andere Bindungseigenschaften zu erwarten als in der Mitte der Platte. Auch während der Inkubationsphasen im Labor sind die äußeren Kavitäten anderen physikalischen Einflüssen ausgesetzt als die mehr geschützten inneren. Durch Aussparung des Randbereichs können diese Eﬀekte vermindert werden.

7.3.1.2 Standards

Die Kalibrierkurve wird mit Kalibrierplasma (gegen den WHO-Standard kalibriert) bzw. mit Normalplasma-pool erstellt. ELISA-Verfahren erlauben genügend Verdünnungsschritte, um einen Bereich von 0,01 IE/ml bis 2 IE/ml (in der Regel auch angegeben als 1 IE/dl bis 200 IE/dl oder 1 % bis 200 % der Normalwerte abzudecken (siehe DIN 58911-1 und DIN 58911-2). Der Variationskoeffizient liegt üblicherweise unter 10 %. Daher kann auf eine Doppelbestimmung zugunsten der Messung von zwei Verdünnungen verzichtet werden. Wichtig ist die Angabe des Grenzwertes, ab dem eine höhere Verdünnung erforderlich ist.

7.3.1.3 Kontrollplasmen

Geeignete normale und abnormale Kontrollen für den unter 7.3.1.2 genannten Bereich werden entweder mit den jeweiligen Kits zur Verfügung gestellt oder können von verschiedenen Herstellern bezogen werden.

7.3.1.4 Reagenzien

7.3.1.4.1 Blockierungsreagenz: Üblich ist Rinderserum-Albumin (BSA). Vorteilhaft ist die Verwendung Protease-freier Reagenzien. Ebenso gut geeignet sind fettarme Milch, Rinderserum und Casein. Probenverdünnungslösungen mit hohem Albuminanteil (> 2 %) machen einen Blockierungsschritt oft überflüssig.

7.3.1.4.2 Enzyme und Substrate: HRP, H_2O_2 + (OPD/TMB/ABTS), alkalische Phosphatase + pNP. Zum Teil gebrauchsfertig zu beziehen. Ansonsten sind für jedes Reagenz Rezept zur Herstellung erhältlich. Weniger gebräuchliche Substrate sind: H_2O_2 + Luminol oder fluoreszierende Substanzen wie FITC oder Europium.

7.3.1.4.3 Stoppreagenz: Meist Säure z. B. H_2SO_4 (2 bis 2,5) mol/l oder 1 mol/HCl.

7.3.1.4.4 Beschichtungslösung:

a) 0,05 mol/l $Na_2CO_3/NaHCO_3$ Puffer, pH 9,6 (Beispiel):

- 5,3 g Na_2CO_3 /l, davon 29,3 Volumenanteile;
- 4,2 g $NaHCO_3$ /l, davon 70,7 Volumenanteile;
- 0,5 g/l NaN_3 .

b) PBS-Stammlösung 0,4 mol/l (Beispiel):

- 57,0 g Na_2HPO_4 ;
- 10,8 g KH_2PO_4 ;
- 7,6 g NaCl.

Mit etwa 800 ml gereinigtem Wasser lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen und mit gereinigtem Wasser auf 1 000 ml auffüllen. Die Gebrauchslösung wird 1:10 mit gereinigtem Wasser verdünnt (1 Volumenteil Puffer + 9 Volumenteile gereinigtem Wasser). PH-Wert nach Verdünnen kontrollieren und nachstellen.

7.3.1.4.5 Die folgenden Lösungen werden aus dieser Lösung hergestellt:

- Probenverdünnungs-Lösung: z. B. PBS/BSA (2–5)%ig;
- Antikörper-Verdünnungslösung: PBS/BSA 0,5%ig;
- Waschlösung: PBS/BSA 0,1%ig.

Detergenzien wie Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat sollten für diesen Test möglichst nicht verwendet werden, da sie zu einem Verlust der Antikörperbindung auf der Platte führen können. Sie sollten nur dort eingesetzt werden, wo ohne sie eine zu starke Hintergrundextinktion auftritt.

7.3.1.5 Antikörper

Die Produktion polyklonaler gegen humanen VWF gerichteter Antikörper ist in mehreren Spezies möglich. Da gute polyklonale Antikörper kommerziell verfügbar sind, ist die Eigenherstellung nicht notwendig. Dagegen sind kommerzielle monoklonale Antikörper meist schlecht charakterisiert. Informationen über das Epitop, gegen das sich der Antikörper richtet, sind oft nicht verfügbar. Daher bleibt für Tests auf monoklonaler Basis meist nur die Eigenherstellung mit anschließender Charakterisierung des Epitops. Für Routine-Testkits bieten monoklonale Antikörper bei einem derart polymorphen Protein wie dem VWF jedoch keinerlei erkennbare Vorteile.

7.3.2 Automatisierte partikelverstärkte Agglutination

7.3.2.1 Standard

Die Kalibrierkurve wird mit einem Kalibrierplasma zurückführbar zum WHO-Standard automatisch durch das Instrument erstellt.

7.3.2.2 Reagenzien und andere Materialien

7.3.2.2.1 Reagenz: Suspension kleiner Partikel, die mit Anti-Human-VWF-Antikörpern beschichtet sind.

7.3.2.2.2 Diluent: Das Diluent wird zur Verdünnung des Reagenzes verwendet.

7.3.2.2.3 Probenverdünnungspuffer: Es wird ein geeigneter Puffer zur Probenverdünnung eingesetzt.

8 Durchführung

8.1 ELISA-Technik

8.1.1 Bezugskurve

Pro Messserie, mindestens jedoch für jede ELISA-Platte, ist eine Bezugskurve mitzuführen. Die für den Test benötigten Verdünnungen für die Referenzmaterialien sind unmittelbar vor Testbeginn bei Raumtemperatur herzustellen. Als Richtwert für die Referenzmaterialien, die zur Erstellung der Bezugskurve verwendet wird, sind geeignete Verdünnungsstufen im Bereich von etwa 0,02 IE VWF:Ag/ml bis 0,001 IE VWF:Ag/ml einzusetzen.

8.1.2 Probenverdünnungen

Die für den Test benötigten Verdünnungen für die zu analysierenden Proben sind unmittelbar vor Testbeginn bei Raumtemperatur herzustellen. Es sind Probenverdünnungen im Bereich von 0,02 IE VWF:Ag/ml bis 0,001 IE VWF:Ag/ml einzusetzen. Es wird empfohlen, eine Serie, mindestens aber zwei geeignete Verdünnungsstufen in den Test einzusetzen, um in der klinischen Diagnostik auftretende hohe Konzentrationen zu erfassen.

8.1.3 Testablauf

Ein Sandwich-ELISA kann nach folgendem Testablauf durchgeführt werden. Das gilt sinngemäß auch für fertige Testkits, die zumeist mit Collagen vorbeschichtete ELISA-Platten enthalten. In der Regel wird mit Probenvolumina von 100 µl gearbeitet. Sämtliche Waschschrte müssen bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Ein Beispiel für einen Testablauf ist in Tabelle 2 gegeben.