

	DIN 58988	
ICS 11.100.30	Ersatz für DIN 58988:2010-03	
Hämostaseologie – Referenzmethode zur Bestimmung der Von Willebrand Faktor Multimere; Text Deutsch und Englisch Haemostaseology – Reference method for the Von Willebrand Factor multimers; Text in German and English Hémostase – Méthode de référence pour la détermination des Facteur Willebrand multimères; Texte en allemand et anglais		
Gesamtumfang 20 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 Materialien und Reagenzien	6
7.1 Allgemeines	6
7.2 Geräte und Ausrüstung	6
7.3 Materialien und Reagenzien	6
7.3.1 Agarose	6
7.3.2 Puffersysteme	7
7.3.3 Referenzmaterial	7
8 Durchführung	7
8.1 Allgemeine Vorgaben	7
8.2 Vorbereiten der Agarosegele	7
8.3 Probenvorbereitung	7
8.4 Elektrophorese	8
8.5 Detektion der VWF-Multimere	8
8.5.1 Färbung im Gel	8
8.5.2 Blotting und Färbung am Blot	8
8.6 Leistungsdaten	8
9 Auswertung und Evaluierung der Daten	8
9.1 Allgemeines	8
9.2 Visuelle Auswertung	8
9.3 Densitometrische Auswertung	9
9.4 Validierung des Testsystems	9
10 Referenzintervall	9
11 Störgrößen	9
Literaturhinweise	10

Tabellen

Tabelle 1 — Transport- und Lagerbedingungen	5
---	---

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 58988:2010-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anwendungsbereich zur Schärfung umformuliert;
- b) Liste der Symbole und Abkürzungen überarbeitet;
- c) 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);
- d) Strukturierung der Unterabschnitte zum Prüfverfahren an aktuelle Gestaltungsregeln angepasst;
- e) Anforderung an Leistungsdaten überarbeitet (siehe 8.6);
- f) Anforderung an Validierung des Testsystems überarbeitet (siehe 9.4);
- g) Literaturverzeichnis aktualisiert;
- h) Dokument redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 58988: 2010-03

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anwendbar für die Bestimmung der Anzahl und der Größenverteilung der humanen Von Willebrand Faktor Multimere und der Beurteilung der Substrukturen der VWF-Multimere in Citratplasma oder in Faktorenkonzentraten.

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*

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

VWF-Multimere

Oligomere und Polymere des VWF-Monomers

Anmerkung 1 zum Begriff: VWF wird als monomeres Polypeptid von 2 050 Aminosäuren (genannt VWF-Monomere) exprimiert und durch posttranslationale Modifizierungsschritte einschließlich der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken zu Oligo- und Polymeren polymerisiert. Diese, auch als Multimere bezeichneten Polymere, haben Molekülmassen von bis zu 20 Millionen Dalton oder mehr. In Plasma und in pharmazeutischen Präparaten liegt VWF in Mischungen von Multimeren verschiedener Molekülmassen vor, die durch das Verfahren der Bestimmung der VWF-Multimere sichtbar gemacht und semiquantitativ bestimmt werden können [1], [2]. Darüber hinaus erlaubt die Methode auch die charakteristische Substruktur, die so genannten Satellitenbanden, von VWF zu analysieren, die durch limitierte Proteolyse durch ADAMTS13 entsteht. ADAMTS13 ist eine spezifische Protease, welche als physiologisches Enzym den Multimerisierungsgrad von VWF reguliert [3].

4 Symbole und Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden in diesem Dokument verwendet:

ADMTS13	Eine Desintegrin- und Metalloproteinase mit einem Thrombospondin-Typ-1-Motiv, Mitglied 13 (en: A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13)
anti-IgG	Immunglobulin G
DDAVP	Desmopressin
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
IE	Internationale Einheit (en: International Unit, IU)
SDS	Natriumdodecylsulfat (en: Sodiumdodecylsulphat)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VWD	Von Willebrand Krankheit
VWF	Von Willebrand Faktor
VWF:Ag	Von Willebrand Faktor Antigen
VWS	Von Willebrand Syndrom

5 Bezeichnung

Bezeichnung der Bestimmung und Charakterisierung des Grades und der Struktur des Polymerisierungsgrades der VWF-Multimere ist

Bestimmung DIN 58988-VWF-Multimere

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 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. 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 Lagerbedingungen

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 Materialien und Reagenzien

7.1 Allgemeines

Die verschiedenen Multimere des VWF können sich durch SDS-Gelelektrophorese in einem großporigen Trägermaterial im elektrischen Feld auftrennen lassen. Bei Verwendung von einem etwa 1%igen Agarosegel kann das Multimerenspektrum qualitativ und semiquantitativ analysiert werden. Verwendet man höherprozentige Gele (z. B. 1,5 %ige bis 3%ige Agarose) so lassen sich auch Substrukturen der verschiedenen Multimere visualisieren.

Die so getrennten VWF-Multimere werden anschließend durch geeignete Methoden detektiert. Dies kann durch direkte Immunfärbung im Agarosegel oder durch Blotting und anschließende Färbung mit spezifischen Antikörpern, mit Lumineszenz- oder Chemolumineszenz-Verfahren sowie mit autoradiographischen Nachweisverfahren erfolgen. Dokumentiert wird entweder die Anzahl der zählbaren Multimerenbanden oder es wird zur Auswertung die densitometrisch bestimmte Verteilung der Bandenintensitäten herangezogen.

7.2 Geräte und Ausrüstung

7.2.1 Allgemein

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

7.2.2 Elektrophoreseapparatur mit Kühlung.

7.2.3 Stromversorgung.

7.2.4 Scanner zur densitometrischen Analyse.

7.2.5 Gerätespezifische Zusatzausrüstung wie PC und Auswertesoftware.

7.2.6 Kalibrierte Pipetten.

7.2.7 Wasserbad.

7.2.8 Waage.

7.2.9 Mikrowellenofen.

7.2.10 Schüttler.

7.2.11 Kunststofffolie mit einer hydrophilen Seite.

7.3 Materialien und Reagenzien

7.3.1 Agarose

Es können handelsübliche zur elektrophoretischen Anwendung geeignete Agarosen verwendet werden. Es sind sowohl kurze als auch lange Gelierzeiten geeignet.