

DIN 58987



ICS 11.100.30

Einsprüche bis 2023-05-03
Vorgesehen als Ersatz für
DIN 58987:2010-03

Entwurf

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 Von Willebrand Facteur antigène;
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-03-03 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 24 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

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 Methodenvergleich	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 — Messvorschrift für die automatisierte partikelverstärkte Agglutination	10

Vorwort

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

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

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 58909-1, *Hämostaseologie — Bestimmung der Faktor VIII-Gerinnungsaktivität (F VIII C) — Teil 1: Referenzmessverfahren für die Einstufenmethode*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe 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 Antigen

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

4 Symbole und Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden in dieser Norm 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 (en: Horseradish Peroxidase)
IE	Internationale Einheit (en: International Unit, IU)
OPD	o-Phenylendiamin
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer
RILIBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer
RT	Raumtemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

WHO	Welt Gesundheitsorganisation (en. World Health Organization)
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 sind nach DIN 58909-1 durchzuführen.

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 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	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 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. Die Instrumente und Reagenzien der Hersteller können daher von der in der Norm beschriebenen typischen Vorgehensweise in einem von der Norm 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 der Norm 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 zur Zeit gültigen WHO-Standard kalibriert.

Durch diese Vorgehensweise ist in den letzten zwei Jahrzehnten zwischen dem ersten und dem derzeitigen Standard (5th International Standard for F VIII and VWF in Plasma, NIBSC 02/150) eine etwa 8%ige Abwei-

chung zum Normalplasmapool entstanden. Bei der Kalibrierung sekundärer (industrieller wie hauseigener) Standards ist mit einer methodischen Fehlermöglichkeit zu rechnen. Dieser methodische Fehler kann die Differenz zum Normalplasmapool (siehe DIN 58939-1 und [7]) vergrößern oder vermindern. Die Kalibrierung des sekundären Standards kann auch durch eine Methode erfolgen, bei der sowohl der WHO-Standard als auch ein Normalplasmapool verwendet wird.

Die Bezugskurve wird mit Kalibrations-Plasma 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 entsprechend 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 Das 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. Dem entsprechend 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 Kalibrationkurve wird mit Kalibrations-Plasma (gegen den WHO Standard kalibriert) bzw. mit Normalplasmapool erstellt. ELISA-Methoden erlauben genügend Verdünnungsschritte, um einen Bereich von 0,01 U/ml bis 2 U/ml (1 % bis 200 %) abzudecken (siehe DIN 58911-1 und DIN 58911-2). Der Variationskoeffizient liegt üblicherweise unter 10 %. Daher kann auf eine Doppelbestimmung zugunsten der Messung von 2 Verdünnungen verzichtet werden. Wichtig ist, festzulegen, ab wann höher verdünnt werden muss.

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

Blockierungs-Reagenz:

Üblich ist Rinderalbumin (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.

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.

Stoppreagenz:

Meist Säure z. B. H_2SO_4 (2–2,5) M oder HCl 1 M.

Beschichtungslösung:

a) Na-Bicarbonat-Puffer 0,05 M, pH 9,6 (Beispiel):

- 5,3 g Na_2CO_3 /l, davon 29,3 Teile;
- 4,2 g NaHCO_3 /l, davon 70,7 Teile;
- 0,05 % Na-Azid (0,5 g/l).

b) PBS-Stammlösung 0,4 M (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.

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 oder Polyethylene glycol mono(4-tert-octylphenyl) ether 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. Dage-

gen 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 Kalibrationkurve wird mit einem Kalibrations-Plasma (am jeweils gültigen WHO-Standard kalibriert) 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 vom Kaninchen 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.