

E DIN EN ISO 11781:2024-01 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2023-11-24

Molekulare Biomarker-Analyse - Allgemeine Anleitung für die Einzellaborvalidierung qualitativer Real-time-PCR-Verfahren (ISO/DIS 11781:2023); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 11781:2023

Molecular biomarker analysis - General guidelines for single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods (ISO/DIS 11781:2023); German and English version prEN ISO 11781:2023

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen.....	7
3 Begriffe.....	7
4 Kurzbeschreibung.....	8
5 Einzellaborvalidierung der Leistungsmerkmale.....	8
5.1 Allgemeines.....	8
5.2 Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$).....	9
5.3 Bestimmung der Kopien der DNA-Zielsequenzen in DNA-Prüfmaterialien.....	9
5.4 Bewertung der Daten für die Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$).....	9
5.5 PCR-Effizienz und Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der $LOD_{95\%}$	10
5.6 Spezifität.....	10
5.6.1 Allgemeines.....	10
5.6.2 Bioinformatische (<i>In-Silico</i> -)Prüfung auf Spezifität.....	11
5.6.3 Praktische Prüfung auf Spezifität.....	11
5.6.4 Robustheit.....	11
6 Validierungsbericht.....	13
Anhang A (informativ) Schätzung der Kopienzahl der DNA-Zielsequenz.....	14
A.1 Allgemeines.....	14
A.2 Berechnung der Anzahl der haploiden Genomäquivalente.....	15
Anhang B (informativ) Bestimmung der Nachweisgrenze, der Präzision und der PCR-Effizienz.....	16
B.1 Allgemeines.....	16
B.2 Verdünnungsreihe der Ziel-DNA.....	16
B.3 Herstellung von PCR-Replikaten.....	16
B.4 Herstellung der Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$).....	17
B.5 Beurteilung der beobachteten Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze (optional).....	17
B.6 Bestimmung der PCR-Effizienz (optional).....	18
B.6.1 Allgemeines.....	18
B.6.2 Rechnerische Bestimmung der PCR-Effizienz mittels linearer Regressionsanalyse.....	19
Anhang C (informativ) Verallgemeinertes lineares gemischtes Modell (GLMM) mit Log-Log-Kopplung.....	20
C.1 Anwendungsbereich des GLMM mit Log-Log-Kopplung (komplementäres Log-Log-Modell).....	20

C.2	Bestimmung der Nachweiswahrscheinlichkeit (P_{POD})	20
C.3	POD, Amplifikationswahrscheinlichkeit und $\text{LOD}_{95\%}$	21
C.4	POD-Kurve	22
C.5	Software und Quelltext	22
C.5.1	Allgemeines	22
C.5.2	Schritt-für-Schritt-Anleitung der Benutzung von R und des Pakets „POD“	22
C.5.3	Implementierung von R Shiny	26
Anhang D (informativ) Robustheitsprüfung		34
Literaturhinweise		35

Bilder

Bild C.1 — Beispiel einer POD-Kurve	25
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Beispiel einer Robustheitsprüfung bezüglich Faktoren und Modifikationen der Vorgehensweise und Bedingungen von qualitativen Realtime-PCR-Verfahren	12
Tabelle 2 — Beispiel einer Robustheitsprüfung mithilfe eines orthogonalen Versuchsplans	12
Tabelle A.1 — Masse des haploiden Genoms von relevanten Spezies	14
Tabelle B.1 — Beispiel für eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der $\text{LOD}_{95\%}$	17
Tabelle B.2 — Beispiel für die statistische Bewertung einer DNA-Verdünnungsreihe ($n = 12$)	18
Tabelle D.1 — Beispiel für die Durchführung einer Robustheitsprüfung	34