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 (*In-Silico*-)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 $LOD_{95\,\%}$ ... 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 $LOD_{95\,\%}$ ... 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