DIN EN ISO 11781:2025-07 (D)

Untersuchung auf molekulare Biomarker - Anforderungen und Leitfaden für die Einzellaborvalidierung qualitativer Real-time-PCR-Verfahren (ISO 11781:2025); Deutsche Fassung EN ISO 11781:2025

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 7

Vorwort 8

Einleitung 9

1 Anwendungsbereich 10

2 Normative Verweisungen 10

3 Begriffe 10

4 Kurzbeschreibung 11

5 Einzellaborvalidierung der Leistungsmerkmale 11
5.1 Allgemeines 11
5.2 Nachweisgrenze 12
5.3 Bestimmung der Kopien der DNA-Zielsequenzen in DNA-Prüfmaterialien 12
5.4 Bewertung der Daten für die Nachweisgrenze 12
5.5 PCR-Effizienz und Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze 13
5.6 Spezifität 13
5.6.1 Allgemeines 13
5.6.2 Bioinformatische (In-silico-)Prüfung auf Spezifität 14
5.6.3 Praktische Prüfung auf Spezifität 14
5.6.4 Robustheit 14

6 Validierungsbericht 16

Anhang A (informativ) Schätzung der Kopienzahl der DNA-Zielsequenz 18
A.1 Allgemeines 18
A.2 Berechnung der Anzahl der haploiden Genomäquivalente 19

Anhang B (informativ) Bestimmung der Nachweisgrenze, der Präzision und der PCR-Effizienz 20
B.1 Allgemeines 20
B.2 Verdünnungsreihe der Ziel-DNA 20
B.3 Herstellung von PCR-Replikaten 20
B.4 Herstellung der Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweisgrenze 21
B.5 Beurteilung der beobachteten Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze (optional) 21
B.6 Bestimmung der PCR-Effizienz (optional) 22
B.6.1 Allgemeines 22
B.6.2 Rechnerische Bestimmung der PCR-Effizienz mittels linearer Regressionsanalyse 23

Anhang C (informativ) Verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Log-Log-Kopplung 25
C.1 Anwendungsbereich des GLMM mit Log-Log-Kopplung (komplementäres Log-Log-Modell) 25
C.2 Bestimmung der Nachweiswahrscheinlichkeit 25
C.3 Nachweiswahrscheinlichkeit, Amplifikationswahrscheinlichkeit und Nachweisgrenze 26
C.4 Nachweiswahrscheinlichkeitskurve 27
C.5 Software und Quellcode 27
C.5.1 Allgemeines 27

C.5.2 Schritt-für-Schritt-Anleitung der Benutzung von R und des Pakets POD 28
C.5.3 Interaktive webbasierte Anwendung 30
Anhang D (informativ) Robustheitsprüfung 31
Literaturhinweise 32

Bilder

Bild C.1 — Beispiel einer POD-Kurve 30

Tabellen

Tabelle 1 — Beispiel einer Robustheitsprüfung bezüglich Faktoren und Modifikationen der Vorgehensweise und Bedingungen von qualitativen Real-time-PCR-Verfahren 15

Tabelle 2 — Beispiel einer Robustheitsprüfung mithilfe eines orthogonalen Versuchsplans 16

Tabelle A.1 — Masse des haploiden Genoms von relevanten Spezies 18

Tabelle B.1 — Beispiel für eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der $LOD_{95\,\%}$ 21

Tabelle B.2 — Beispiel für die statistische Bewertung einer DNA-Verdünnungsreihe (n = 12) 22

Tabelle D.1 — Beispiel für die Durchführung einer Robustheitsprüfung 31