

Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten

Teil 60: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Begriffe, allgemeine methodenspezifische Anforderungen

DIN**58967-60**

ICS 07.100.10

Ersatz für
DIN 58967-60:2001-07

Diagnostics of infectious diseases and diseases of the immune system in serology and molecular biology —
Part 60: Polymerase chain reaction (PCR) — Terminology, general method-specific requirements

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss E 9 „Serologische und molekulare Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten“ in Zusammenarbeit mit dem Subkomitee E-48.02 „Characterization and Identification of Biological Systems“ des ASTM (American Society for Testing and Materials) Biotechnology Committee E-48, USA, erstellt.

Diese Norm berührt Schutzrechte. Auskunft erteilt der Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin.

Foreword

In case of doubt, the German-language version should be consulted as the authoritative text.

This standard was developed by the Technical Committee E 9 “Serological and molecular diagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system” of the department for medical standards (Normenausschuss Medizin; NAMed) of the German Institute for Standardization (DIN Deutsches Institut für Normung e.V.) in collaboration with subcommittee E-48.02 “Characterisation and Identification of Biological Systems” of ASTM (American Society for Testing and Materials) Biotechnology Committee E-48, USA.

This standard concerns patent rights. Details can be obtained from Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin, Germany.

NOTE: No English-language version is presently available for standards and literature referenced whose title is enclosed in brackets.

Änderungen

Gegenüber DIN 58967-60:1995-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Ergänzung des Begriffs „Fangsonde“.
- b) Empfehlung, das Kontaminationsrisiko durch die Wahl geeigneter Geräte und Bedingungen auszuschließen.
- c) Ausdrückliche Zulassung markierter Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs).

Gegenüber DIN 58967-60:2001-07 wurde folgende Berichtigung vorgenommen:

- a) Ergänzung eines Hinweises auf Schutzrechte.

Frühere Ausgaben

DIN 58967-60: 1995-01, 2001-07

Amendments

Compared to DIN 58967-60:1995-01 the following amendments were made:

- a) Addition of the term “fixation probe”.
- b) Recommendation, that the contamination risk should be excluded by choosing appropriate equipment and conditions.
- c) Explicit permission of the use of labelled deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP).

Compared to DIN 58967-60:2001-07 the following correction was made:

- a) Addition of a reference to patent rights.

Previous editions

DIN 58967-60: 1995-01, 2001-07

Fortsetzung Seite 2 bis 12

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für die Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten des Menschen mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Diese Norm kann sinn- gemäß auch zur PCR-Diagnostik anderer Er- krankungen des Menschen herangezogen werden. Sie legt die Anforderungen fest für die Probenaufbe- reitung, die In-vitro-Vervielfältigung von Nuklein- säuresequenzen (DNA-Sequenzen) sowie für den Nachweis der Spezifität der vervielfältigten Nukle- insäuresequenz (Amplifikat). Mit Hilfe der PCR können definierte Desoxiribonukleinsäuresequen- zen (DNA-Sequenzen) nachgewiesen werden. Ribonukleinsäuresequenzen (RNA-Sequenzen) können ebenfalls nachgewiesen werden nach Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) durch reverse Transkription.

Bei speziellen Anwendungsverfahren sind weite- re Anforderungen zu beachten. Für den Nach- weis von Nukleinsäuresequenzen der Human- Immunschwäche-Viren HIV-1 und HIV-2 mittels PCR gilt E DIN 58969-62.

Zweck dieser Norm ist es, laborspezifische Vor- aussetzungen und allgemeine methodenspezi- fische Begriffe und Mindestanforderungen festzu- legen, damit vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien erhal- ten werden.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publi- kationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Ände- rungen oder Überarbeitungen dieser Publikatio- nen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließ- lich Änderungen).

DIN 58936-1, *Qualitätssicherung in der Labor- medizin — Grundbegriffe*.

DIN 58936-2, *Qualitätssicherung in der Laborme- dizin — Begriffe zur Qualität und Anwendung von Klassierungs-, Zähl- und Messsystemen*.

DIN 58956-4, *Medizinische Mikrobiologie — Me- dizinisch-mikrobiologische Laboratorien — Anfor- derungen an die Entsorgung*.

DIN 58967-10, *Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten — Teil 10: Begriffe, Allge- meine Anforderungen*.

1 Scope

This standard applies to the diagnostic detection of human infectious diseases and diseases of the immune system by the polymerase chain reaction (PCR) procedure. This standard can also suitably apply to the PCR diagnostics of other human dis- orders. It establishes the requirements for sample preparation, in vitro amplification of nucleic acid sequences (DNA sequences) and detection of the specificity of the amplified nucleic acid sequence (PCR product, amplificate, amplicon). With the aid of PCR, defined deoxyribonucleic acid sequences (DNA sequences) can be de- tected. Ribonucleic acid sequences (RNA sequences) can also be detected following reverse transcription of the RNA to complementa- ry DNA (cDNA).

Additional requirements are to be observed for specific applications of these procedures. A stand- ard for the detection of nucleic acid sequences of the Human Immunodeficiency Viruses HIV-1 and HIV-2 through PCR exists (DIN 58969-62).

The purpose of this standard is to establish labo- ratory-specific requirements as well as the gen- eral procedural terminology and minimum require- ments to ensure comparable and reproducible test results among various laboratories.

2 Normative references

This standard incorporates, by dated or undated reference, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publica- tions are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendment or revi- sion. For undated references the latest edition of the publication referred to applies.

DIN 58936-1, *[Quality assurance in laboratory medicine — Basic terminology]*.

DIN 58936-2, *[Quality assurance in laboratory medicine — Terminology for quality and applica- tion of classification, counting and measuring systems]*.

DIN 58956-4, *[Medical microbiology — Medical microbiological laboratories — Waste disposal — Safety requirements and testing]*.

DIN 58967-10, *Serodiagnosis of infectious dis- eases and diseases of the immune system — Part 10: Terminology, general requirements*.

E DIN 58969-62, *Medizinische Mikrobiologie — Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten — Teil 62: Methodenspezifische Anforderungen an den Nukleinsäurenachweis von Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)*.

E DIN 58969-62, *[Medical microbiology — Diagnosis of infectious diseases in serological and molecular biology — Part 62: Method-specific requirements of the detection of nucleic acid sequences of Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)]*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die Grundbegriffe für die serologische und molekulare Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten nach DIN 58967-10, die Begriffe für Qualitätssicherung in der Labormedizin nach DIN 58936-1 und DIN 58936-2 und die folgenden Begriffe.

3 Terms and definitions

For the purposes of this standard the basic terms and definitions for the diagnosis and serodiagnosis of infectious diseases and diseases of the immune system given in DIN 58967-10, the basic terms and definitions for quality assurance in laboratory medicine given in DIN 58936-1 and DIN 58936-2 and the following terms and definitions apply.

3.1

Polymerase-Kettenreaktion

PCR

Verfahren, das die gezielte In-vitro-Vervielfältigung von DNA- oder (nach reverser Transkription in cDNA) RNA-Abschnitten erlaubt. Nach Denaturierung doppelsträngiger DNA in Einzelstrang-DNA lagern sich zwei in ihrer Orientierung zur Zielsequenz gegenläufige synthetische Primer (Oligonukleotide) an die für sie komplementären Bereiche der zu vermehrenden Zielsequenz (DNA-Abschnitt) an. Die aufgrund spezifischer Basenpaarung zwischen Primern und Zielsequenz entstehenden kurzen doppelsträngigen Bereiche begrenzen den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt und dienen als Startstellen für die gezielte In-vitro-DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase ohne Ligaseaktivität. Die wiederholte Abfolge von Hitzedenaturierung, Primeranlagerung und DNA-Synthese (Zyklen) führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des durch die Primer begrenzten DNA-Abschnittes. Das Vorkommen und die Spezifität vervielfältigter DNA-Abschnitte (Amplifikate) werden durch geeignete Verfahren nachgewiesen

en **polymerase chain reaction**

3.1

Polymerase chain reaction

PCR

procedure that allows specific in vitro amplification of DNA segments or RNA segments (after reverse transcription into cDNA). Following denaturation of double-stranded DNA into single-stranded DNA, two synthetic primers (oligonucleotides), which are directed opposite to each other regarding their orientation to the target sequence, anneal to the target sequence (DNA segment) that is to be amplified. The short double-stranded regions which form as a result of specific base pairing between the primers and target sequence, border the DNA segment to be amplified and serve as start positions for the specific in vitro DNA synthesis by means of a heat-stable DNA polymerase without ligase activity. The repeated processes of heat denaturation, primer annealing and DNA synthesis (cycles) result in an exponential amplification of the DNA segment defined by the primers. The occurrence and specificity of the amplified DNA segment (PCR product) are determined by means of suitable procedures

3.2

Primer

Oligonukleotid definierter Länge und Sequenz. Er ist komplementär zu einem Abschnitt der Zielsequenz einer diagnostisch relevanten Nukleinsäure. Ein Primerpaar begrenzt den Abschnitt der Zielsequenz, die vermehrt werden soll

3.2

Primer

oligonucleotide of defined length and sequence. It is complementary to a segment of a diagnostically relevant nucleic acid. A primer pair defines the segment of the target sequence that is to be amplified

3.3

Nested Primer

Oligonukleotid, das sich zwischen den Bindungsstellen eines ersten Primerpaares anlagert

3.4

Primeranlagerung

spezifische Bindung eines Primers an die Zielsequenz unter geeigneten Reaktionsbedingungen, die durch Temperatur, Reaktionspuffer und Nukleinsäuresequenz bestimmt werden

3.5 Polymerase für PCR

3.5.1

DNA-Polymerase für PCR

DNA-abhängige DNA-Polymerase

thermostabiles Enzym, das eine wiederholte DNA-Synthese unter den gewählten Reaktionsbedingungen erlaubt

3.5.2

Reverse Transkriptase

RNA-abhängige DNA-Polymerase

Enzym, das die Umschreibung von RNA in DNA unter den gewählten Reaktionsbedingungen erlaubt

3.6

Zielsequenz

zur Vervielfältigung ausgewählter Nukleinsäureabschnitt

3.7

Reaktionspuffer für PCR

definierte Pufferlösung mit geeigneter Ionenzusammensetzung und pH-Wert, um die Vervielfältigung von DNA in der PCR zu ermöglichen

3.8

Hybridisierung

spezifische Bindung einer komplementären Nukleinsäuresequenz an die Zielsequenz unter geeigneten Reaktionsbedingungen

3.3

Nested primer

oligonucleotide that attaches inside the binding sites of an initial primer pair

3.4

Primer attachment

specific binding of a primer to the target sequence under suitable reaction conditions which are determined by temperature, reaction buffer and nucleic acid sequence

3.5 Polymerase for PCR

3.5.1

DNA polymerase for PCR

DNA-dependent DNA polymerase

thermostable enzyme that allows a repeated DNA synthesis under the selected reaction conditions

3.5.2

Reverse transcriptase

RNA-dependent DNA polymerase

enzyme that allows transcription of the RNA to DNA under the selected reaction conditions

3.6

Target sequence

nucleic acid segment selected for amplification

3.7

Reaction buffer for PCR

defined buffer solution with appropriate ionic composition and pH value to permit the amplification of DNA by PCR

3.8

Hybridization

specific binding of a complementary nucleic acid sequence to the target sequence under suitable reaction conditions