DIN CEN/TS 17329-1

ICS 67.050

Ersatz für
DIN CEN/TS 17329-1
(DIN SPEC 10392-1):2019-06

Lebensmittel – Allgemeine Anleitung für die Validierung qualitativer Realtime-PCR-Verfahren – Teil 1: Einzellaborvalidierung; Deutsche Fassung CEN/TS 17329-1:2021

Foodstuffs –
General guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods –
Part 1: Single-laboratory validation;
German version CEN/TS 17329-1:2021

Denrées alimentaires –
Lignes directrices générales pour la validation des méthodes de PCR qualitative en temps réel –
Partie 1: Validation intralaboratoire;
Version allemande CEN/TS 17329-1:2021

Gesamtumfang 25 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17329-1:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-04 AA „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Zur vorliegenden Technischen Spezifikation wurde kein Entwurf veröffentlicht.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

— vorzugsweise als Datei per E-Mail an nal@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;

— oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10722 Berlin.

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 CEN/TS 17329-1:2019-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

a) Aufnahme des neuen Abschnitts C.4 zur Berechnung der Ergebnisse einer Einzellaborvalidierung mit dem R-Paket POD.

Frühere Ausgaben

DIN CEN/TS 17329-1 (DIN SPEC 10392-1): 2019-06

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

TECHNISCHE SPEZIFIKATION

TECHNICAL SPECIFICATION

SPÉCIFICATION TECHNIQUE

CEN/TS 17329-1

Juni 2021

ICS 67.050

Ersetzt CEN/TS 17329-1:2019

Deutsche Fassung

Lebensmittel — Allgemeine Anleitung für die Validierung qualitativer Realtime-PCR-Verfahren — Teil 1: Einzellaborvalidierung

Foodstuffs — General guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods — Part 1: Single-laboratory validation

Denrées alimentaires — Lignes directrices générales pour la validation des méthodes de PCR qualitative en temps réel — Partie 1: Validation intralaboratoire

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 16. Mai 2021 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 3
Einleitung ... 4
1 Anwendungsbereich ... 5
2 Normative Verweisungen ... 5
3 Begriffe ... 5
4 Kurzbeschreibung ... 6
5 Einzellaborvalidierung der Leistungsmerkmale ... 6
5.1 Allgemeines ... 6
5.2 Nachweisgrenze ($LOD_{95\ \%}$) ... 7
5.3 Bewertung der Daten für die Nachweisgrenze ($LOD_{95\ \%}$) ... 7
5.4 PCR-Effizienz und Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der $LOD_{95\ \%}$ ... 8
5.5 Spezifität ... 8
5.5.1 Allgemeines ... 8
5.5.2 Theoretische Prüfung auf Spezifität ... 8
5.5.3 Praktische Prüfung auf Spezifität ... 8
5.5.4 Robustheit ... 9
6 Validierungsbericht ... 10
Anhang A (informativ) Schätzung der Kopienzahl der Zielsequenz ... 11
Anhang B (informativ) Bestimmung der Nachweisgrenze, der Präzision und der PCR-Effizienz ... 13
B.1 Allgemeines ... 13
B.2 Verdünnungsreihe der Ziel-DNA ... 13
B.3 Herstellung von PCR-Replikaten ... 13
B.4 Herstellung von Konzentrationsstufen für die Bestimmung der Nachweisgrenze ($LOD_{95\ \%}$) ... 13
B.5 Beurteilung der beobachteten Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze (optional) ... 14
B.6 Bestimmung der PCR-Effizienz (optional) ... 15
B.6.1 Allgemeines ... 15
B.6.2 Rechnerische Bestimmung der PCR-Effizienz mittels linearer Regressionsanalyse ... 15
Anhang C (informativ) Statistisches Modell ... 17
C.1 POD und Poisson-Verteilung ... 17
C.2 POD, Amplifikationswahrscheinlichkeit und $LOD_{95\ \%}$ ... 18
C.3 POD-Kurve ... 19
C.4 Software und Quelltext ... 19
Anhang D (informativ) Robustheitsprüfung ... 22
Literaturhinweise ... 23

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17329-1:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt CEN/TS 17329-1:2019.

Diese neue Version wurde durch die Aufnahme einer Option (in Anhang C, C.4) zur Berechnung der Ergebnisse einer Einzellaborvalidierung unter Verwendung des R-Pakets POD [15] aktualisiert. Dieses Berechnungstool kann den Anwender dieses Dokuments unabhängig von der Konsultation eines Statistikers oder eines professionellen statistischen Dienstleisters bei der Auswertung der Ergebnisse einer Einzellaborvalidierung machen. Das R-Paket kann kostenlos heruntergeladen werden.

Diese Reihe besteht aus zwei Teilen:

— *Teil 1: Einzellaborvalidierung*

— *Teil 2: Ringversuch*

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Technische Spezifikation anzukündigen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

Einleitung

Verfahren für die qualitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (en: polymerase chain reaction, PCR) finden derzeit breite Anwendung beim Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, z. B. zum Nachweis und zur Identifizierung von gentechnisch veränderten Organismen und daraus hergestellten Erzeugnissen, zum Nachweis der Authentizität und der Spezies von Lebensmitteln und zu weiteren Zwecken. Es ist von Bedeutung, dass ein neu entwickeltes Verfahren für die Lebensmittelanalytik zwecktauglich ist und bestimmte Leistungsmerkmale und Qualitätskriterien erfüllt sind, was durch eine Reihe spezieller Validierungsexperimente nachgewiesen wird.

Die bei einer Einzellaborvalidierung erhaltenen Daten bilden die Grundlage für die Entscheidung, ob ein Verfahren hausintern angewendet wird. Darüber hinaus erleichtern sie die Entscheidung, ob das fragliche Verfahren im Rahmen eines Ringversuchs vollständig validiert werden sollte.

Das Ziel dieses Dokuments ist es, eine Vorschrift für die Einzellaborvalidierung von qualitativen Realtime-PCR-Verfahren vorzulegen, die in der Lebensmittelanalytik angewendet werden. Das beschriebene Verfahren stellt eine Empfehlung dar, die sich auf praktische Erfahrungen in einer Reihe von Laboratorien stützt. Es ist möglich, alternative Ansätze anzuwenden, für die gezeigt werden kann, dass die im vorliegenden Dokument erwähnten Leistungskriterien erfüllt werden.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Leistungsmerkmale und Mindestleistungskriterien für die Durchführung einer Einzellabor-Validierungsstudie für Verfahren der qualitativen (binären) Realtime-Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in Lebensmitteln fest.

Diese Vorschrift wurde entwickelt für qualitative Realtime-PCR-Verfahren zum Nachweis von DNA-Sequenzen, die von gentechnisch modifizierten Lebensmitteln stammen. Darüber hinaus ist es anwendbar für die Einzellaborvalidierung von qualitativen PCR-Verfahren, die zur Analyse sonstiger Lebensmittel eingesetzt werden, z. B. für den Nachweis und die Identifizierung von Spezies.

Das Dokument befasst sich nicht mit der Evaluierung der Anwendbarkeit und der Durchführbarkeit im Zusammenhang mit dem spezifischen Anwendungsbereich des PCR-Verfahrens.

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).

EN ISO 21571:2005[1], *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005)*

EN ISO 24276, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 24276)*

ISO 16577, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577, EN ISO 24276 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— IEC Electropedia: verfügbar unter https://www.electropedia.org/

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter https://www.iso.org/obp

3.1
Nachweiswahrscheinlichkeit
POD, en: probability of detection
Wahrscheinlichkeit, mit einem qualitativen Verfahren bei einer vorgegebenen Matrix und einer vorgegebenen Konzentration ein positives Analyseergebnis zu erhalten

Anmerkung 1 zum Begriff: In Bezug auf ein qualitatives Realtime-PCR-Verfahren gibt sie die Wahrscheinlichkeit an, dass bei einer gegebenen Anzahl von DNA-Kopien der Zielsequenz eine PCR-Amplifikation stattfindet.

1 Wie von EN ISO 21571:2005/A1:2013 betroffen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

3.2
PCR-Effizienz
für eine DNA-Kopie der Zielsequenz gemessene Amplifikationsrate je PCR-Zyklus im Verhältnis zum theoretisch erreichbaren Wert von 1

Anmerkung 1 zum Begriff: Die PCR-Effizienz wird aus der Steigung einer Kalibrierkurve berechnet, die sich bei der dekadisch-semilogarithmischen Auftragung der Anzahl der Quantifizierungszyklen (C_q) über der DNA-Konzentration ergibt. Hierfür kann die Steigung der berechneten Regressionskurve verwendet werden. Die PCR-Effizienz kann entweder als absolute Zahl oder als Prozentsatz ausgedrückt werden.

3.3
Nachweisgrenze
$LOD_{95\ \%}$, en: limit of detection
mittlere Anzahl von Kopien der Zielsequenz, die eine Nachweiswahrscheinlichkeit von 0,95 ergibt

4 Kurzbeschreibung

Zur spezifischen Amplifikation einer DNA-Zielsequenz mithilfe eines qualitativen Realtime-PCR-Verfahrens sind spezifische Primer sowie, je nach dem verwendeten Nachweissystem, auch Sonden entworfen worden. In einem nächsten Schritt müssen die Leistungsmerkmale des Verfahrens beurteilt werden, um nachzuweisen, dass das Verfahren die in den einschlägigen Dokumenten vorgeschriebenen Qualitätskriterien erfüllt [1] [2].

Den publizierten Leitlinien zufolge betreffen die Hauptkriterien bei der Einzellaborvalidierung eines qualitativen Realtime-PCR-Verfahrens vor allem die Nachweisgrenze (bei der die Nachweiswahrscheinlichkeit ≥ 95 % beträgt), die Spezifität für die DNA-Zielsequenz und die Robustheit gegenüber kleinen, aber beabsichtigten Variationen der Verfahrensparameter.

Auf Grundlage der Validierungsdaten kann verifiziert werden, ob die erforderlichen Mindestleistungskriterien erfüllt sind. Dies bildet die Grundlage für die Anwendbarkeit des Verfahrens durch ein einzelnes Labor. Anschließend kann eine Entscheidung darüber getroffen werden, ob eine Validierung des Verfahrens im Rahmen eines Ringversuchs durchgeführt wird.

Wenn das Design hierfür geeignet ist, wird eine Beurteilung der Vergleichpräzision (Übertragbarkeit zwischen Laboren) und der Leistungsfähigkeit des Verfahrens in verschiedenen Laboren, insbesondere des Anteils falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse, die mit negativen bzw. positiven Proben erhalten werden, sowie der laborübergreifenden Nachweiswahrscheinlichkeit (POD) in einem Ringversuch vorgenommen [3].

Ein allgemeiner Leitfaden für die Durchführung eines Ringversuchs findet sich in Teil 2 dieser Reihe.

5 Einzellaborvalidierung der Leistungsmerkmale

5.1 Allgemeines

Ein Leitfaden für die Zusammenstellung der zur vollständigen und detaillierten Beschreibung aller Komponenten erforderlichen Informationen, die zusammen mit der Vorschrift für das qualitative PCR-Verfahren angegeben werden sollten (d. h. Oligonukleotidsequenzen, Länge des Amplicons, Spezifikationen des Geräts oder des chemischen Verfahrens, PCR-Bedingungen, analytische Kontrollen usw.) findet sich in anderen einschlägigen Dokumenten [1] [2].

Die DNA-Extraktion muss entsprechend den in EN ISO 21571 festgelegten Anforderungen und Verfahren erfolgen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN/TS 17329-1:2021-09