

DIN CEN/TS 17747



ICS 11.100.10

**Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren –
Spezifikationen für präanalytische Prozesse für Exosomen und andere
extrazelluläre Vesikel im venösen Vollblut –
DNA, RNA und Proteine;
Deutsche Fassung CEN/TS 17747:2022**

Molecular in vitro diagnostic examinations –
Specifications for pre-examination processes for exosomes and other extracellular vesicles in
venous whole blood –
DNA, RNA and proteins;
German version CEN/TS 17747:2022

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro –
Spécifications relatives aux processus préanalytiques pour exosomes et autres vésicules
extracellulaires dans le sang total veineux –
ADN, ARN et protéines;
Version allemande CEN/TS 17747:2022

Gesamtumfang 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17747:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-03-03 AA „Qualitätsmanagement in medizinischen Laboratorien“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Zur vorliegenden Technischen Spezifikation wurde kein Entwurf veröffentlicht.

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.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an named@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 Medizin (NAMed), 10772 Berlin.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 9000:2015	siehe	DIN EN ISO 9000:2015-11
ISO 15189:2012	siehe	DIN EN ISO 15189:2014-11
ISO 17511:2020	siehe	DIN EN ISO 17511:2021-11

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 9000:2015-11, *Qualitätsmanagementsysteme — Grundlagen und Begriffe (ISO 9000:2015); Deutsche und Englische Fassung EN ISO 9000:2015*

DIN EN ISO 15189:2014-11, *Medizinische Laboratorien — Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2012, korrigierte Fassung 2014-08-15); Deutsche Fassung EN ISO 15189:2012*

DIN EN ISO 17511:2021-11, *In-vitro-Diagnostika — Anforderungen an die Ermittlung metrologischer Rückführbarkeit von Werten, die Kalibratoren, Richtigkeitskontrollmaterialien und Humanproben zugeordnet sind (ISO 17511:2020); Deutsche Fassung EN ISO 17511:2021*

Deutsche Fassung

**Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren —
Spezifikationen für präanalytische Prozesse für Exosomen
und andere extrazelluläre Vesikel im venösen Vollblut —
DNA, RNA und Proteine**

Molecular in vitro diagnostic examinations —
Specifications for pre-examination processes for
exosomes and other extracellular vesicles in venous
whole blood —
DNA, RNA and proteins

Analyses de diagnostic moléculaire in vitro —
Spécifications relatives aux processus préanalytiques
pour exosomes et autres vésicules extracellulaires dans
le sang total veineux —
ADN, ARN et protéines

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 13. März 2022 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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Allgemeine Anforderungen.....	11
5 Außerhalb des Labors.....	13
5.1 Entnahme des Untersuchungsmaterials	13
5.1.1 Allgemeines	13
5.1.2 Angaben zum Patienten/Spender des Untersuchungsmaterials	13
5.1.3 Wahl des Entnahmeröhrchens für venöses Vollblut durch das Labor.....	13
5.1.4 Entnahme von venösen Vollblutproben vom Patienten/Spender.....	14
5.2 Lagerung und Transport des Untersuchungsmaterials	15
5.2.1 Allgemeines	15
5.2.2 Lagerung und Transport bei Verwendung von Blutentnahmeröhrchen mit Stabilisatoren.....	15
5.2.3 Lagerung und Transport bei Verwendung von Blutentnahmeröhrchen ohne Stabilisatoren..	15
6 Im Labor	16
6.1 Eingang des Untersuchungsmaterials.....	16
6.2 Lagerung des Untersuchungsmaterials nach Transport und Eingang.....	16
6.3 Vorbereitung des Plasmas.....	16
6.4 Anforderungen an die Lagerung von Plasmaproben.....	17
6.5 Anreicherung von EV aus Untersuchungsmaterial	18
6.5.1 Allgemeines	18
6.5.2 Verwendung eines handelsüblichen EV-Anreicherungs-systems.....	18
6.5.3 Einsatz eines laboreigenen Verfahrens zur EV-Anreicherung.....	19
6.5.4 Qualität der angereicherten EV	19
6.5.5 Lagerung der angereicherten EV	19
6.6 Isolierung von interessierenden Analyten aus EV	20
6.6.1 Allgemeines	20
6.6.2 Verwendung eines handelsüblichen, zum Einsatz in der Diagnostik bestimmten Kits für die Isolierung von EV-DNA, EV-RNA und EV-Proteinen	20
6.6.3 Verwendung eines laboreigenen Isolierungsverfahrens.....	20
6.7 Quantitäts- und Qualitätsbewertung des isolierten interessierenden Analyten.....	22
6.7.1 Allgemeines	22
6.7.2 Quantitätsbewertung von EV-DNA und EV-RNA.....	22
6.7.3 Qualitätsbewertung von DNA und RNA	23
6.7.4 Quantitäts- und Qualitätsbewertung von EV-Proteinen	23
6.8 Lagerung des isolierten interessierenden Analyten	23
6.8.1 Allgemeines	23
6.8.2 Lagerung von DNA	24
6.8.3 Lagerung von RNA	25
6.8.4 Lagerung von EV-Proteinen.....	26
Anhang A (informativ) Beispiel eines typischen Protokolls zur Plasmagewinnung für die Anreicherung von EV aus nicht stabilisiertem Blut.....	27

Anhang B (informativ) Überblick über verschiedene Anreicherungsverfahren.....	28
B.1 Allgemeines	28
B.2 EV-Anreicherung durch Zentrifugieren	28
B.3 EV-Anreicherung durch Filtration	28
B.4 EV-Anreicherung durch Chromatographie	29
B.5 EV-Anreicherung durch Präzipitation	29
B.6 EV-Anreicherung durch Immunaффinität.....	29
B.7 EV-Anreicherung durch Mikrofluidik	29
Literaturhinweise.....	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17747:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ 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.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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.

Einleitung

Die molekulare In-vitro-Diagnostik hat bedeutende Fortschritte in der Medizin ermöglicht. Weitere Fortschritte werden von neuen Technologien erwartet, mit denen Profile von Nukleinsäuren, Proteinen und Metaboliten in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten analysiert werden. Die Profile dieser Moleküle können sich jedoch im Verlauf des präanalytischen Verfahrens einschließlich der Entnahme des Untersuchungsmaterials, des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung drastisch verändern.

Als Folge davon werden die Diagnostik- bzw. Forschungsergebnisse unzuverlässig oder sogar unmöglich, da in der anschließenden Untersuchung nicht die tatsächliche Situation im Patienten, sondern ein künstliches Profil bestimmt wird, das während des präanalytischen Prozesses geschaffen wurde.

Neben zirkulierenden zellfreien Nukleinsäuren, zirkulierenden Tumorzellen (ZTZ) und sonstigen seltenen Zellen stellen Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel einen weiteren wesentlichen Bestandteil flüssiger Biopsien dar. Daher wächst das Interesse am neu entstehenden Feld der Diagnostik anhand von Exosomen und anderen extrazellulären Vesikeln und der diesbezüglichen Forschung.

Mit dem in diesem Dokument beschriebenen präanalytischen Verfahren werden angereicherte extrazelluläre Vesikel (EV) (z. B. Exosomen) oder daraus isolierte DNA, RNA und Proteine gewonnen.

Es können neue zusätzliche extrazelluläre Vesikel freigesetzt werden und vorhandene extrazelluläre Vesikel können nach der Blutentnahme verloren gehen, wodurch sich das DNA-, RNA- oder Protein-Gesamtprofil der EV verändert. Außerdem können verschiedene Antikoagulanzen in verschiedenen Typen von Blutentnahmeröhrchen die Freisetzung von EV aus diversen im Blut vorhandenen Zellen, darunter Thrombozyten, beeinflussen. Weitere Faktoren, wie z. B. Lagerungs- und Transporttemperatur sowie -dauer, Zentrifugierungsparameter usw., können die Veränderungen der EV-Gesamtzusammensetzung im Blut nach der Entnahme beeinflussen.

Daher ist eine Normung des gesamten Arbeitsablaufs von der Entnahme des Untersuchungsmaterials bis zur Untersuchung des EV-Oberflächenproteins und der aus den EV isolierten DNA, RNA und Proteine notwendig. Zur Bestimmung der wichtigen Einflussfaktoren wurden entsprechende Studien durchgeführt. Bei der Festlegung und Normung der Schritte bei der Untersuchung von EV-Oberflächenproteinen sowie der DNA, RNA und Proteine aus EV während der sogenannten präanalytischen Phase stützt sich dieses Dokument auf solche Arbeiten.

In diesem Dokument werden die folgenden Verbformen verwendet:

- „muss/müssen“ zeigt eine Anforderung an;
- „sollte/sollten“ zeigt eine Empfehlung an;
- „darf/dürfen“ zeigt eine Zulässigkeit an;
- „kann/können“ zeigt eine Möglichkeit oder ein Vermögen an.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument gibt Empfehlungen zur Handhabung, Lagerung, Verarbeitung und Dokumentation von Proben venösen Vollbluts, die für die Untersuchung von DNA, RNA und Proteinen aus Exosomen und anderen extrazellulären Vesikeln während der präanalytischen Phase vor der Durchführung einer molekularen Analyse vorgesehen sind. Dieses Dokument betrifft Untersuchungsmaterial, das mit Blutentnahmeröhrchen für venöses Vollblut entnommen wurde.

Mit dem in diesem Dokument beschriebenen präanalytischen Verfahren werden DNA, RNA und Proteine aus angereicherten Exosomen und anderen extrazellulären Vesikeln isoliert.

Dieses Dokument ist anwendbar auf molekulare in-vitro-diagnostische Untersuchungen, die in medizinischen Laboratorien durchgeführt werden. Es ist darüber hinaus für die Verwendung durch Gesundheitseinrichtungen, einschließlich Einrichtungen, die Untersuchungsmaterial entnehmen und handhaben, Laborkunden, Entwickler und Hersteller von In-vitro-Diagnostika, Biobanken, in der biomedizinischen Forschung tätige Einrichtungen und kommerzielle Organisationen sowie Aufsichtsbehörden, vorgesehen.

Für die während der präanalytischen Phase durchgeführte Untersuchung von zirkulierender zellfreier RNA (ccfRNA, en: circulating cell-free RNA) und zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA, en: circulating cell-free DNA) aus venösem Vollblut, jeweils ohne vorherige Anreicherung von Exosomen und anderen extrazellulären Vesikeln, werden spezielle andere Maßnahmen angewendet. Diese werden nicht in diesem Dokument beschrieben, sind jedoch Gegenstand von EN ISO 20186-3, *Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für venöse Vollblutproben — Teil 3: Aus Plasma isolierte zirkulierende zellfreie DNA*, und CEN/TS 17742, *Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für venöse Vollblutproben — Isolierte zirkulierende zellfreie RNA aus Plasma*.

ANMERKUNG Internationale, nationale oder regionale Regelungen bzw. Anforderungen können ebenfalls für bestimmte Themen in diesem Dokument gelten.

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 15189, *Medizinische Laboratorien — Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189)*

ISO 15190, *Medical laboratories — Requirements for safety*

ISO/TS 20658, *Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN ISO 15189 und die folgenden Begriffe.

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

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Aliquot

Anteil einer größeren Menge eines homogenen Materials, wobei für die Entnahme ein vernachlässigbarer Probenahmefehler angenommen wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff wird üblicherweise für Flüssigkeiten verwendet. Gewebe sind heterogen und können daher nicht aliquotiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Definition entstammt dem Compendium of Chemical Terminology Gold Book. International Union of Pure and Applied Chemistry. Version 2.3.3., 2014; PAC 1990, 62, 1193 (Nomenclature for sampling in analytical chemistry (Recommendations 1990)) S. 1206; und die PAC 1990, 62, 2167 (Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990)) S. 2173.

3.2

Analyt

im Namen der messbaren Größe angegebener Bestandteil

[QUELLE: ISO 17511:2020, 3.2, modifiziert — Beispiel wurde entfernt.]

3.3

Blutentnahmesystem

intravenöse Vorrichtung zur Punktion einer Vene, die aus einer abgeschrägten Kanüle aus nichtrostendem Stahl und einem Schlauch mit befestigten Kunststoffflügeln und Verbindungsstück besteht

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verbindungsstück ist an eine weitere Blutentnahmevorrichtung, z. B. ein Blutentnahmeröhrchen, angeschlossen.

3.4

Blutentnahmeröhrchen

Röhrchen, das zur Abnahme von Blut verwendet wird, in der Regel unter Anlegen von Unterdruck, der das Blut aus der Vene durch die Kanüle in das Röhrchen zieht

3.5

geschlossen System

nicht modifizierbares System, das vom Anbieter einschließlich aller für die Untersuchung erforderlichen Komponenten geliefert wird (d. h. Hardware, Software, Verfahren und Reagenzien)

3.6

Desoxyribonukleinsäure

DNA

Polymer von Desoxyribonukleotiden, das in Doppelstrangform (dsDNA) oder in Einzelstrangform (ssDNA) vorkommt

[QUELLE: EN ISO 22174:2005, 3.1.2]

3.7

Desoxyribonuklease

DNase

Enzym, das den Abbau von DNA in kleinere Komponenten katalysiert

3.8

Untersuchung analytische Prüfung

Folge von Handlungen, deren Ziel die Bestimmung des numerischen Wertes oder der Merkmale einer Eigenschaft ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Prozesse (d. h. eine Folge von Handlungen), die mit dem isolierten Analyten beginnen und jegliche Art von Parameterprüfung oder chemischer Bearbeitung für die quantitative oder qualitative Untersuchung umfassen.

[QUELLE: EN ISO 15189:2012, 3.7, modifiziert — Der Begriff und die Definition werden ohne die im Original vorhandenen Anmerkungen verwendet. Eine zusätzliche Benennung wurde hinzugefügt.]

3.9

Hersteller der Untersuchung Hersteller der analytischen Prüfung

Unternehmen, das eine bestimmte analytische Prüfung herstellt und/oder produziert

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Anwendung dieses Dokuments ist ein Hersteller von Untersuchungen zu EV-DNA, EV-RNA und EV-Proteinen gemeint.

3.10

Leistungsfähigkeit einer Untersuchung Leistung einer analytischen Prüfung analytische Leistung

Genauigkeit, Präzision und Sensibilität einer Prüfung zum Messen des im Interesse stehenden Analyten

Anmerkung 1 zum Begriff: Andere Prüfleistungsmerkmale wie Robustheit oder Wiederholpräzision können auch angewendet werden.

[QUELLE: EN ISO 20184-1:2018, 3.4]

3.11

extrazelluläres Vesikel EV

von der Zelle auf natürliche Weise freigesetzter Partikel, der von einer Doppellipidschicht begrenzt wird und sich nicht vermehren kann, d. h. keinen funktionsfähigen Nukleus aufweist

BEISPIEL Exosome, Endosome, Onkosome, Apoptosekörperchen

[QUELLE: [1]]

3.12

EV-Stabilisator

chemische Formulierung, die die Stabilität von EV erhöht, einschließlich der EV-Gesamtpopulation, ihrer Beladung (z. B. DNA, RNA und Proteine) und der EV-Oberflächenproteine im Untersuchungsmaterial oder in einer Probe

3.13

Störsubstanz

endogene oder exogene Substanzen in klinischem Untersuchungsmaterial/Proben, die das Ergebnis einer Untersuchung beeinflussen können

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispiele für endogene Substanzen sind Blutbestandteile und saure Polysaccharide.

Anmerkung 2 zum Begriff: Beispiele für exogene Substanzen sind Talk und Antikoagulanzen.