

DIN EN ISO 11781



ICS 67.050

Einsprüche bis 2024-01-24
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17329-1:2021-09

Entwurf

**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

Analyse de biomarqueurs moléculaires –
Lignes directrices générales pour la validation des méthodes de PCR qualitative en temps
réel (ISO/DIS 11781:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 11781:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-11-24 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 68 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 11781:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 21569	siehe	DIN EN ISO 21569
ISO 21571:2005	siehe	DIN EN ISO 21571:2013-08

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 17329-1:2021-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung des Dokuments von Technischer Spezifikation zu Europäischer Norm;
- b) normative Verweisungen aktualisiert;
- c) Hinzufügung von Bild C.1 mit einem Beispiel für eine POD-Kurve;
- d) Hinzufügung eines R Shiny-Quellcodes in einem neuen Unterabschnitt in Anhang C;
- e) redaktionelle Überarbeitung.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 21569, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 21571:2013-08, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 21571:2005 + A1:2013*

— Leerseite —

<i>Titel de:</i>	Molekulare Biomarker-Analyse — Allgemeine Anleitung für die Einzellaborvalidierung qualitativer Real-time-PCR-Verfahren (ISO/DIS 11781:2023)
<i>Titel en:</i>	Molecular biomarker analysis — General guidelines for single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods (ISO/DIS 11781:2023)
<i>Titel fr:</i>	Analyse de biomarqueurs moléculaires — Lignes directrices générales pour la validation des méthodes de PCR qualitative en temps réel (ISO/DIS 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 (<i>In-Silico</i> -)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

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 11781:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17329-1:2021 ersetzen.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 11781:2023 wurde von CEN als prEN ISO 11781:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 16, *Horizontal methods for molecular biomarker analysis*, erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

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 beschriebene statistische Modell ist praktisch angewendet worden [3]. Auch andere Modelle können anwendbar sein, siehe ISO/TS 16393.

Das Ziel dieses Dokuments ist es, eine Vorschrift für die Einzellaborvalidierung von qualitativen Realtime-PCR-Verfahren vorzulegen, die in der Lebensmittelanalytik angewendet werden. Verfahren für die Extraktion von DNA aus der Lebensmittelmatrix sind nicht Gegenstand dieses Dokuments. Das beschriebene Verfahren stellt eine Empfehlung dar, die sich auf praktische Erfahrungen in einer Reihe von Laboratorien stützt. Alternative Vorgehensweisen dürfen angewendet werden, wenn sie nachweisbar die in diesem Dokument festgelegten Leistungskriterien erfüllen.

1 Anwendungsbereich

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

Das Dokument kann auf jede Einzellaborvalidierung eines qualitativen Realtime-PCR-Verfahrens zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in Lebensmitteln und Lebensmittelerzeugnissen angewendet werden, z. B. zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Lebensmitteln und zum Nachweis von Spezies, einschließlich Spezies, von denen bekannt ist, dass sie allergene Proteine produzieren.

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).

ISO 16577, *Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production*

ISO 21571, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577 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

Nachweiswahrscheinlichkeit

POD, en: probability of detection

Wahrscheinlichkeit, mit einem qualitativen Verfahren bei einer vorgegebenen Matrix und einer vorgegebenen Konzentration in einem einzelnen Labor 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.

[QUELLE: ISO 16577:2022, 3.9.12, modifiziert — Die Anmerkungen wurden entfernt und eine neue Anmerkung 1 zum Begriff wurde hinzugefügt.]

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 (Cq) 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 DNA-Kopien der Zielsequenz, die eine Nachweiswahrscheinlichkeit von 0,95 ergibt

3.4

Spezifität

Eigenschaft eines Verfahrens, ausschließlich auf das untersuchte Merkmal oder den untersuchten Analyten zu reagieren

[QUELLE: ISO 24276, 3.1.4]

4 Kurzbeschreibung

Zur spezifischen Amplifikation und zum Nachweis einer DNA-Zielsequenz mithilfe eines qualitativen Realtime-PCR-Verfahrens werden spezifische Primer sowie, je nach dem verwendeten Nachweissystem, auch Sonden entworfen. Im nächsten Schritt sollten bei der Einzellaborvalidierung die Leistungsmerkmale des Verfahrens beurteilt werden, um nachzuweisen, dass das Verfahren die in den einschlägigen Dokumenten vorgeschriebenen Qualitätskriterien erfüllt [1] [2].

Bei einem qualitativen Realtime-PCR-Verfahren sollten die Nachweisgrenze (bei der die Nachweiswahrscheinlichkeit $\geq 95 \%$ beträgt), die Spezifität für die DNA-Zielsequenz und die Robustheit gegenüber kleinen, aber beabsichtigten Variationen der Verfahrensparameter den Hauptschwerpunkt der Validierung bilden.

Auf der Grundlage der Einzellabor-Validierungsdaten kann bei einem qualitativen Realtime-PCR-Verfahren die Erfüllung der mindestens erforderlichen Leistungskriterien verifiziert werden und dies sollte wiederum die Grundlage für die Anwendbarkeit des Verfahrens durch ein einzelnes Labor bilden. Anschließend kann eine Entscheidung darüber getroffen werden, ob eine Validierung des Verfahrens im Rahmen eines Ringversuchs durchgeführt wird.

Wenn das Design hierfür geeignet ist, kann 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 werden [3].

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 qualitative PCR-Verfahren angegeben werden sollten, z. B. Oligonukleotidsequenzen, Länge des Amplicons, Spezifikationen des Geräts oder des chemischen Verfahrens, PCR-Bedingungen, analytische Kontrollen usw., findet sich in anderen einschlägigen Dokumenten [1] [2] oder ISO 21569.

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

5.2 Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$)

Die $LOD_{95\%}$ wird als Anzahl der Kopien der Zielsequenz angegeben und sollte anhand einer Verdünnungsreihe der Ziel-DNA bestimmt werden, wobei jede Verdünnung zusätzlich zur Ziel-DNA dieselbe Konzentration an Nicht-Ziel-DNA (Hintergrund-DNA) enthält.

Es sind mindestens sechs Konzentrationsstufen an Ziel-DNA mit jeweils 12 Replikaten je Stufe erforderlich.

Die niedrigste Verdünnungsstufe, d. h. diejenige mit der niedrigsten Anzahl an Kopien, bei der alle 12 Replikate positiv sind, wird als Näherungswert für die $LOD_{95\%}$ betrachtet (siehe Abschnitt B.2).

Die $LOD_{95\%}$ qualitativer Realtime-PCR-Verfahren sollte 20 Kopien der Zielsequenz nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Dieses Dokument ist auf die Validierung neuer Verfahren anwendbar. Für die Verifizierung von Verfahren können 10 Replikate ausreichend sein.

ANMERKUNG 2 Wenn die $LOD_{95\%}$ gleich 20 Kopien der Zielsequenz ist, beträgt auf Grundlage des Parameters der Poisson-Verteilung ($\lambda \times LOD_{95\%} = 2,996$) die Amplifikationswahrscheinlichkeit (λ) der gesamten PCR rund 15 % [3].

In Anhang A finden sich weitere detaillierte Informationen hinsichtlich der Abschätzung der Kopienzahl der Ziel-DNA.

Anhang B enthält eine praktische Anleitung zur Bestimmung der $LOD_{95\%}$, die im Experiment verifiziert worden ist.

In Anhang C sind die Grundlagen des speziell auf PCR-Verfahren abgestimmten statistischen Modells dargestellt.

5.3 Bestimmung der Kopien der DNA-Zielsequenzen in DNA-Prüfmaterialien

Eine Bestimmung der Anzahl von Kopien der DNA-Zielsequenzen ist für die Validierung erforderlich.

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz für eine festgelegte Masse an Nukleinsäure (DNA) kann auf Grundlage der haploiden Genomäquivalente aus der gemessenen DNA-Konzentration (siehe ISO 21571:2005, Anhang B [4]) und der Masse des Genoms berechnet werden [5] [6] [7]. Die Verwendung digitaler PCR-Ausrüstung (z. B. Droplet Digital PCR) ist ein alternativer Ansatz, der die genaue Bestimmung der Kopienzahl einer DNA-Zielsequenz oder der Konzentration einer DNA-Lösung erlaubt [8].

Die Qualität und die Konzentration (sehr hoch oder sehr niedrig) der für die Verdünnung verwendeten Hintergrund-DNA kann das Validierungsexperiment beeinflussen. Es wird daher dringend empfohlen, DNA zu verwenden, die auf die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren hin geprüft wurde (z. B. im Handel erhältliche DNA-Präparationen für die Molekularbiologie), und diese in einer Konzentration einzusetzen, die die Situation bei extrahierter DNA widerspiegelt [18].

5.4 Bewertung der Daten für die Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$)

Die $LOD_{95\%}$, die POD-Mittelwertkurve und das 95 %-Konfidenzintervall sollten mithilfe eines statistischen Modells ermittelt werden.

Die experimentelle Vorgehensweise, die auch eine Komponente einer Poisson-Verteilung beinhaltet, beruht auf dem verallgemeinerten linearen gemischten Modell (en: generalized linear mixed model, GLMM) mit einer komplementären Log-Log-Kopplungsfunktion. Dieses Modell hat sich als das wirksamste erwiesen, wenn die DNA-Kopienzahl gering ist und einer Poisson-Verteilung folgt.

Einzelheiten zum verallgemeinerten linearen gemischten Modell (GLMM) mit komplementärer Log-Log-Kopplungsfunktion finden sich in Anhang C. Zur Durchführung dieser Berechnung werden die der PCR hinzugefügte nominale Kopienzahl, die Anzahl der durchgeführten Replikate und die Anzahl erhaltener positiver Ergebnisse benötigt.

Unter Verwendung der Daten der Ergebnisse aus der Verdünnungsreihe können die $LOD_{95\%}$, das 95 %-Konfidenzintervall und die POD-Mittelwertkurve zusammen mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzbereich über einen Web-Service [9] oder durch Benutzung des R-Pakets POD (siehe Abschnitt C.5 [16]) berechnet werden.

Die $LOD_{95\%}$ wird auf Plausibilität geprüft. Ein kleinerer Wert als 2,996 deutet darauf hin, dass die Anzahl der Kopien der Zielsequenz, die der PCR tatsächlich hinzugefügt wurden, nicht der für die DNA-Lösungen berechneten (nominalen) Kopienzahl entspricht [3].

Werden bei der Stufe mit 0,1 Kopien der Zielsequenz je PCR mehr als zwei positive Ergebnisse erhalten, können die DNA-Verdünnungen nicht als verifiziert betrachtet werden und die Kopienzahl muss erneut bestimmt werden.

ANMERKUNG 1 Die Berechnung der $LOD_{95\%}$ ist nur dann gültig, wenn die falsch positiven Ergebnisse vernachlässigbar sind, d. h., wenn die Spezifitätsprüfung erfolgreich war und eine Kontamination der PCR durch Verschleppung ausgeschlossen werden kann.

ANMERKUNG 2 Die Stufe, die das Ergebnis einer 1 : 10-Verdünnung von 1 nominalen Kopie ist, wird im Rahmen dieses Dokuments zur leichteren Lesbarkeit als „Stufe mit 0,1 Kopien je PCR“ bezeichnet.

5.5 PCR-Effizienz und Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der $LOD_{95\%}$

Um die Variabilität der Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze optional zu bestimmen, wird die Kopienzahl auf Grundlage einer zusätzlichen Kalibrierreihe mit Ziel-DNA den jeweiligen Cq-Werten zugeordnet (zur Herstellung einer Kalibrierreihe, siehe Anhang B, Tabelle B.1).

Die Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der $LOD_{95\%}$ sollte durch Vergleich der Wiederholstandardabweichung mit den theoretischen Werten des Poisson-Modells beurteilt werden. Eine bereinigte Standardabweichung von $> 30\%$ weist darauf hin, dass die $LOD_{95\%}$, die bei Routineanalysen erreichbar ist, einer hohen Variabilität unterliegen kann (siehe Abschnitt B.5).

Die erhobenen experimentellen Daten erlauben außerdem die Berechnung der PCR-Effizienz (siehe Abschnitt B.6), der Steigung der Amplifikationskurve und des Bestimmtheitsmaßes (R^2). Bei einer PCR ohne inhibitorische Einflussfaktoren verläuft die Amplifikation in Form einer exponentiellen Verdopplung mit einer Steigung (Cq/anfängliche Kopienzahl) von $-3,3219$. Eine annehmbare PCR-Effizienz sollte um höchstens $\pm 10\%$ vom theoretisch erreichbaren Wert 100% abweichen (was einer Steigung zwischen $-3,1$ und $-3,6$ entspricht). Wenn eine PCR-Effizienz erhalten wird, die größer als der theoretische Höchstwert ist, sollten Fehler beim Ansetzen der Reaktion sowie eine vorliegende Inhibition der PCR in Erwägung gezogen werden. Das Bestimmtheitsmaß sollte mindestens $0,98$ (bzw. 98%) betragen.

5.6 Spezifität

5.6.1 Allgemeines

In-Silico-Analysen und die experimentellen Ergebnisse der Prüfung des Verfahrens anhand genomischer Sequenzdatenbanken und mithilfe von Material, das die Zielsequenz enthält, sollten angegeben werden. Die Prüfung sollte einschließlich bzw. ausschließlich der im Zusammenhang mit dem Anwendungsbereich des Verfahrens relevanten und repräsentativen Materialien durchgeführt werden, falls diese verfügbar sind.

5.6.2 Bioinformatische (*In-Silico*-)Prüfung auf Spezifität

Zur Überprüfung der Oligonukleotid- und Ampliconsequenzen müssen mit vorhandenen Bioinformatik-Tools bioinformatische Spezifitätsprüfungen durchgeführt werden, z. B. Primer-Dimer-Bildung mit primer3 [10]. Die Homologie zu anderen Sequenzen muss durch Recherchen in Nukleinsäuresequenz-Datenbanken, z. B. BLAST in GenBank® [11], überprüft werden.

Bei der *In-Silico*-Analyse sollten sich keinerlei Ähnlichkeiten ergeben zwischen der Zielsequenz und den Sequenzen, die in der Probe vorhanden sein und das Analyseergebnis beeinflussen können. Gegebenenfalls sollte(n) die Oligonukleotidsequenz(en) entsprechend angepasst werden. Zusätzliche Anleitungen zur *In-Silico*-Analyse sind in Literaturhinweis [12] zu finden.

5.6.3 Praktische Prüfung auf Spezifität

Es wird auf unerwartete Kreuzreaktionen mit Nicht-Ziel-DNA geprüft. Hierzu wird das PCR-Nachweissystem auf Kreuzreaktivität mit DNA von Organismen mit ähnlichen (homologen) genetischen Elementen, Genen oder Genkonstrukten geprüft. Außerdem wird auf Spezies geprüft, die häufig als Inhaltsstoffe in Lebensmitteln vorliegen, z. B. Mais, Soja, Raps, Reis, Kartoffeln, Weizen, Rind, Huhn, Schwein, Schaf, Pute, Pferd.

Wenn Nicht-Ziel-DNA geprüft und ein negatives Ergebnis erwartet wird, sollte die PCR mindestens 2 500 Kopien enthalten. Steht Referenzmaterial der Nicht-Ziel-DNA nicht in ausreichend hoher Konzentration zur Verfügung, können niedrigere Konzentrationen verwendet werden. In diesem Fall sollte die eingesetzte Kopienzahl angegeben werden. Die Amplifizierbarkeit der Nicht-Ziel-DNA wird durch eine unabhängige Prüfung verifiziert.

Außerdem werden Prüfungen mit Ziel-DNA durchgeführt. Hierzu wird Ziel-DNA, für die ein positives Ergebnis erwartet wird, in der Kopienzahl eingesetzt, die im Bereich der LOQ liegt (empirisch kann die der LOD_{95 %} entsprechende Kopienzahl mit dem Faktor 3, d. h. in der Regel 20 Kopien je PCR bis 60 Kopien je PCR, multipliziert werden). Die Nicht-Ziel-DNA wird der Ziel-DNA in einer Konzentration von 100 ng/25 µl bis 200 ng/25 µl des PCR-Mixes hinzugefügt, um Bedingungen zu simulieren, die in der Praxis relevant sind und das Ergebnis beeinflussen könnten.

Es ist ausreichend, die einzelnen PCR-Prüfungen unter Einschluss- (unter Verwendung von Ziel-DNA) bzw. Ausschluss-Bedingungen (unter Verwendung von Nicht-Ziel-DNA) in zwei Replikaten durchzuführen.

PCR-Ergebnisse der *In-Silico*-Analyse und der experimentellen Untersuchungen sollten die Anforderungen und Kriterien erfüllen oder übertreffen.

Tritt eine als akzeptabel betrachtete Kreuzreaktivität auf, sollte dies angegeben und im Hinblick auf den Anwendungsbereich des Verfahrens berücksichtigt werden.

5.6.4 Robustheit

Die Robustheit eines qualitativen Realtime-PCR-Verfahrens muss bewertet werden. Die Bewertung der Robustheit muss kleine, aber beabsichtigte Variationen umfassen, z. B. hinsichtlich der folgenden Verfahrensparameter:

- verschiedene Arten der Realtime-PCR-Ausrüstung, falls verfügbar;
- PCR-Reagenzienkits;
- beim Thermocycling-Programm angewendete Annealing-Temperatur;
- Mastermix-Volumen;

— Primer- und Sondenkonzentrationen.

Ein praktisches Beispiel bezüglich Faktoren und Modifikationen der Verfahrensbedingungen zur Steuerung aller relevanten Aspekte der qualitativen Realtime-PCR ist in Tabelle 1 angegeben. Weitere Faktoren oder Modifikationen dürfen angewendet werden, sofern der Gewinn an informativem Wert, der durch den Zusatz erhalten wird, ausreichend ist.

Die Prüfungen sollten nach einem multifaktoriellen Versuchsplan durchgeführt werden [13]. Die PCR mit den unterschiedlichen Faktoren-Kombinationen sollten mit einer Ziel-DNA-Konzentration durchgeführt werden, die der Kopienzahl an der LOD_{95 %} entspricht, multipliziert mit dem Faktor 3 (d. h. in der Regel 20 Kopien je PCR bis 60 Kopien je PCR). Die Ziel-DNA wird mit Nicht-Ziel-DNA (Hintergrund-DNA), z. B. 20 ng/μl, verdünnt. Für jede Kombination von Faktor und Stufe sollten die PCR-Prüfungen mindestens in drei Replikaten durchgeführt werden. Ein Beispiel für das Verfahren ist in Tabelle D.1 dargestellt.

Das Verfahren muss trotz veränderter Bedingungen mit allen Kombinationen positive Resultate ergeben.

Im Fall von negativen Ergebnissen sollte die PCR-Prüfung für die entsprechenden Kombinationen wiederholt werden. Bei wiederholt negativen Ergebnissen ist das Verfahren nicht robust genug und muss optimiert werden.

Größere Abweichungen zwischen Cq-Werten können ein Anzeichen dafür sein, dass die Robustheit des Verfahrens nicht ausreicht.

Statistisch gesicherte Beispiele für Robustheitsprüfungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben. Andere Optionen können angewendet werden, wenn sie zu vergleichbaren statistisch gesicherten Ergebnissen führen. Wenn das einzelne Labor die Grundlage für einen Ringversuch ist, werden dringend Prüfungen hinsichtlich mehrerer Variablen empfohlen, siehe Anhang D.

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

Faktor	1	0
PCR-Ausrüstung	A	B
PCR-Mastermix	X	Y
Primer-Konzentration	unverändert	-30 %
Sonden-Konzentration	unverändert	-30 %
Volumen des PCR-Reagenzienmixes (bei einem Gesamtvolumen von 25 μl)	spezifiziertes Volumen des PCR-Reagenzienmixes - 5 % (19 μl) + 5 μl DNA-Lösung	spezifiziertes Volumen des PCR-Reagenzienmixes + 5 % (21 μl) + 5 μl DNA-Lösung
Annealing-Temperatur	+1 °C	-1 °C

Tabelle 2 — Beispiel einer Robustheitsprüfung mithilfe eines orthogonalen Versuchsplans

Faktor	Kombination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Ausrüstung	1	1	1	1	0	0	0	0
PCR-Mastermix	1	1	0	0	1	1	0	0

Faktor	Kombination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Primer-Konzentration	1	0	1	0	1	0	1	0
Sonden-Konzentration	1	0	0	1	0	1	1	0
Gesamtvolumen des PCR-Reagenzienmixes	1	1	0	0	0	0	1	1
Annealing-Temperatur	1	0	1	0	0	1	0	1

Ein orthogonaler Versuchsplan ist durch folgenden Algorithmus charakterisiert: Für jedes Paar von Faktoren, z. B. PCR-Kit/Primer-Konzentration, treten alle vier Faktor-Stufen-Kombinationen (1 + 1, 1 + 0, 0 + 1, 0 + 0) mit derselben Häufigkeit auf (jeweils zweimal) (Tabelle 2). Solch ein Versuchsplan stellt sicher, dass mögliche Effekte auf die PCR-Prüfergebnisse aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Faktoren ebenfalls nachgewiesen werden können.

6 Validierungsbericht

Die bei der Einzellaborvalidierung erhaltenen Ergebnisse und Daten zu den Leistungsmerkmalen müssen in einem Bericht dokumentiert werden.

Der Bericht muss folgende Angaben enthalten:

- a) LOD₉₅ %:
 - 1) die Spezies der Ziel-DNA;
 - 2) Informationen darüber, wie die Kopienzahl für die Sensitivitätsprüfungen ermittelt wurde;
 - 3) geschätzte LOD₉₅ %;
 - 4) Art und Menge der verwendeten Hintergrund-DNA;
- b) bioinformatische Spezifitätsprüfungen:
 - 1) Ergebnisse;
 - 2) verwendete Datenbank;
 - 3) Zeitpunkt des Zugriffs auf die Datenbank;
- c) praktische Spezifitätsprüfungen:
 - 1) Spezies, aus der die DNA extrahiert wurde;
 - 2) je Reaktion verwendete Menge;
 - 3) Ergebnisse;
 - 4) Art und Menge der Hintergrund-DNA;
- d) Robustheit:
 - 1) Spezies, aus der die DNA extrahiert wurde;
 - 2) je Reaktion verwendete DNA-Menge;
 - 3) Parameteränderungen;
 - 4) Ergebnisse.

Anhang A (informativ)

Schätzung der Kopienzahl der DNA-Zielsequenz

A.1 Allgemeines

Die theoretische Anzahl der DNA-Zielsequenz-Kopien kann anhand von haploiden Genomäquivalenten aus der gemessenen DNA-Konzentration (siehe ISO 21571:2005, Anhang B) und der Genommasse berechnet werden, die der Literatur oder verschiedenen Datenbanken entnommen werden kann [5] [6] [7]. Die Referenzwerte und die verwendete Referenz müssen angegeben werden. Eine Liste der Genommasse der wichtigsten Spezies findet sich in Tabelle A.1.

Die Verwendung digitaler PCR-Ausrüstung (z. B. Droplet Digital PCR) ist ein alternativer Ansatz, der die genaue Bestimmung der Kopienzahl einer DNA-Zielsequenz oder der Konzentration einer DNA-Lösung erlaubt [8].

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

Spezies	Masse des haploiden Genoms pg
Baumwolle (<i>Gossypium</i> spp. L.)	2,33 [5]
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	7,33 [6]
Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	1,8 [5]
Leinsamen (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	0,70 [6]
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	172 [6]
Mais (<i>Zea mays</i> L.)	2,6 [5]
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	0,39 [5]
Raps (<i>Brassica napus</i> L.)	1,10 [6]
Reis (<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> L.)	0,46 [6]
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	1,13 [6]
Weichweizen (<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i> L.)	17,33 [6]
Zuckerrübe (<i>Beta vulgaris</i> L.)	0,92 [6]
Rind (<i>Bos taurus</i> L.)	3,65 [7]
Huhn (<i>Gallus domesticus</i> Gmelin)	1,25 [7]
Schwein (<i>Sus scrofa</i> L.)	3,03 [7]
Schaf (<i>Ovis aries</i> L.)	3,30 [7]
Pute (<i>Meleagris gallopavo</i> L.)	1,40 [7]
Pferd (<i>Equus caballus</i> L.)	3,21 [7]
Lachs (<i>Salmo salar</i> L.)	3,27 [7]

A.2 Berechnung der Anzahl der haploiden Genomäquivalente

Bei Verwendung von genomischer DNA wird zunächst auf Grundlage der Masse des jeweiligen haploiden Genoms der Spezies die Anzahl der Genomäquivalente, G_e , je Mikroliter nach Gleichung (A.1) berechnet:

$$G_e = \frac{C_D}{H} \times 1\,000 \quad (\text{A.1})$$

Dabei ist

G_e Anzahl der Genomäquivalente, je Mikroliter;

C_D die DNA-Konzentration, in ng/μl;

H die Masse des haploiden Genoms, in pg.

Die entsprechende Anzahl von Kopien der DNA-Zielsequenz kann anhand der Anzahl der Genomäquivalente geschätzt werden. In diesem Zusammenhang müssen die Anzahl der Kopien je haploidem Genom sowie mögliche Unterschiede im Ploidiegrad und der Zygotität des eingesetzten Referenzmaterials berücksichtigt werden.

Bei Verwendung von Plasmid-DNA oder Amplicon-DNA kann die Anzahl der Kopien N_c auf Grundlage der Länge der Sequenz (in Basenpaaren, bp) und der spektrophotometrisch oder fluorometrisch bestimmten DNA-Konzentration (in ng/μl) nach Gleichung (A.2) berechnet werden:

$$N_c = \frac{C_D}{l_s \times 660} \times 6\,022 \times 10^{11} \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist

N_c die Anzahl der Kopien;

C_D die DNA-Massenkonzentration, in ng/μl;

l_s die Länge der Sequenz, in Basenpaaren (bp);

660 die durchschnittliche molekulare Masse eines Basenpaares, in Dalton;

$6\,022 \times 10^{11}$ die Avogadrosche Zahl der Moleküle je Mol geteilt durch Nanogramm/Gramm × Mikroliter/Liter.

Plasmid-DNA sollte vor der Verwendung bei der PCR durch einen Restriktionsverdau linearisiert werden.

Referenz-DNA oder Referenzmaterial mit einer zertifizierten Zahl an Kopien je Volumeneinheit, die bzw. das in Bezug auf die Zielsequenz so gut wie möglich charakterisiert ist, z. B. hinsichtlich der Anzahl der Kopien und der Zygotität, ist besonders gut geeignet.

Anhang B (informativ)

Bestimmung der Nachweisgrenze, der Präzision und der PCR-Effizienz

B.1 Allgemeines

Im Folgenden ist ein Beispiel für einen Arbeitsplan zur experimentellen Bestimmung der LOD_{95 %} (in Kopien der Zielsequenz), der Präzision und der PCR-Effizienz dargestellt.

B.2 Verdünnungsreihe der Ziel-DNA

Eine Verdünnungsreihe der (genomischen, Plasmid- oder Amplicon-)DNA-Probe mit darin enthaltener Zielsequenz wird hergestellt. Dabei ist sicherzustellen, dass jede Verdünnungsstufe dieselbe Konzentration an zugesetzter DNA ohne Zielsequenz enthält. Bei der zugesetzten DNA sollte es sich um DNA von Pflanzenspezies oder Lachssperma-DNA in Konzentrationen von bis zu 200 ng je 25 µl des PCR-Mixes handeln. Der Zusatz von nicht-spezifischer Hintergrund-DNA zur Ziel-DNA in die Prüfprobe verbessert die Fähigkeit der für die PCR verwendeten Polymerasen, die Ziel-DNA aufzufinden und daran zu binden.

Vor der Verwendung sollte die Hintergrund-DNA auf eine PCR-Inhibition und ihre Wirkung auf die Amplifikation der Zielsequenz nach Literaturhinweis [14] oder einer vergleichbaren Literaturquelle geprüft werden.

Das in Tabelle A.1 angegebene Beispiel enthält eine Verdünnungsreihe, die zur Bestimmung der LOD_{95 %} verwendet werden kann. Dieses Beispiel sieht eine Lösung vor, die für 12 Replikate bei jeder der sechs aufgeführten Konzentrationsstufen ausreichend ist.

Durch Einbeziehen einer Reihe von Standard-DNA-Proben bei der Durchführung der Analyse ist es möglich, eine unabhängige Kalibrierung und Überprüfung des PCR-Systems, einschließlich des Thermocyclers, der Reagenzien und des Verfahrens, zu erhalten. Die aus einer Kalibrierreihe erhaltenen Daten zeigen die systematische Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der LOD_{95 %} und der PCR-Effizienz des experimentellen Systems.

Eine Kalibrierreihe sollte mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt werden, die mindestens 4 Konzentrationsstufen einer Ziel-DNA-Standardlösung, bestehend aus genomischer DNA, Plasmid-DNA oder Amplicon-DNA, umfassen. Die vier Stufen können 2 500, 500, 100, 50 Kopien je Reaktion umfassen. PCR-Prüfungen bei den verschiedenen Konzentrationsstufen der Kalibrierreihe sollten mindestens in drei Replikaten durchgeführt werden. Eine Kalibrierreihe sollte bei jedem Lauf mit Ziel-DNA-Verdünnungen im Bereich der LOD_{95 %} eingeschlossen werden.

B.3 Herstellung von PCR-Replikaten

PCR-Replikate sollten aus einem einzelnen Mastermix hergestellt werden, dessen Volumen mindestens für ein oder zwei zusätzliche Replikate als die tatsächlich verwendeten Replikate ausreicht. Der PCR-Mastermix enthält alle Komponenten außer der Proben-DNA. Jede Proben-DNA-Lösung einer jeden Verdünnungsstufe sollte ebenfalls separat hergestellt und dann auf die einzelnen Reaktionen (Wells) verteilt werden. Die für die Replikate beschriebene Vorgehensweise sollte sowohl auf die Verdünnungsreihe der Prüfprobe als auch auf die Kalibrierreihe der Standardlösung angewendet werden.

B.4 Herstellung der Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD_{95 %})

Für die Bestimmung der LOD_{95 %} kann eine Verdünnungsreihe, die eine festgelegte Anzahl an Ziel-DNA-Kopien enthält, nach den in Tabelle B.1 angegebenen Beispielen hergestellt werden. Das Gesamtvolumen, die nominale Kopienzahl, die Anzahl der Replikate sowie die nominale Anzahl je Replikat sind angegeben.

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

Stufe	Herstellung	Nominale Kopien/µl	Gesamt-volumen µl	Anzahl der Replikate	Nominale Kopien in 5 µl
1	60 µl DNA-Lösung (4 Kopien/µl) + 60 µl Verdünnungspuffer ^a	2	120	12	10
2	60 µl DNA-Lösung (2 Kopien/µl) + 60 µl Verdünnungspuffer ^a	1	120	12	5
3	60 µl DNA-Lösung (1 Kopie/µl) + 90 µl Verdünnungspuffer ^a	0,4	150	12	2
4	60 µl DNA-Lösung (0,4 Kopien/µl) + 60 µl Verdünnungspuffer ^a	0,2	120	12	1
5	60 µl DNA-Lösung (0,2 Kopien/µl) + 60 µl Verdünnungspuffer ^a	0,1	120	12	0,5
6	20 µl DNA-Lösung (0,1 Kopien/µl) + 80 µl Verdünnungspuffer ^a	0,02	100	12	0,1
^a Enthält Hintergrund-DNA, d. h. 20 ng/µl Lachssperma-DNA für die Molekularbiologie in 0,2 × TE-Puffer).					

ANMERKUNG Zur Verbesserung der Präzision der LOD_{95 %}-Bestimmung können weitere Verdünnungsstufen einbezogen werden.

B.5 Beurteilung der beobachteten Variabilität der gemessenen Kopienzahl im Bereich der Nachweisgrenze (optional)

Das Einbeziehen einer Verdünnungsreihe standardisierter Ziel-DNA zur Kalibrierung erlaubt die Bestimmung der Variabilität bei den Ergebnissen hinsichtlich der DNA-Kopienzahl bei Verdünnungsstufen im Bereich der LOD_{95 %}. Bei dieser Bewertung können nur Verdünnungsstufen in Betracht gezogen werden, bei denen alle Replikate positiv sind. Die für eine spezifische Verdünnung der standardisierten Ziel-DNA bestimmten Cq-Werte der Realtime-PCR können direkt der jeweils zugehörigen geschätzten Kopienzahl zugeordnet werden. Allerdings kann die durch verschiedene Faktoren bedingte zufällige Messabweichung zur Variabilität beitragen. Eine statistische Bewertung dieser Art von Bestimmung ist in Tabelle B.2 dargestellt. Das Verfahren zur Bestimmung der geschätzten Anzahl an Kopien in der Probe beruht auf der in Anhang A angegebenen Berechnung auf der Grundlage der molekularen Masse. Im Beispiel kann die Standard-DNA-Verdünnung von 5 Kopien in Erwägung gezogen werden, weil alle zwölf Replikate positiv waren, der Mittelwert auf der Grundlage der experimentell bestimmten Cq-Werte der zwölf Replikat-Proben jedoch 4 Kopien betrug. Die Standardabweichung, bzw. die Quadratwurzel aus der Varianz, beträgt 2. Der Variationskoeffizient, der gleich dem Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert ist, beträgt 50 %.

Liegen die Wiederholstandardabweichungen im Bereich der Standardabweichung des Poisson-Modells, kann daraus geschlossen werden, dass die unter Wiederholbedingungen beobachteten Unterschiede auf die