

Approfondimenti tecnico-scientifici sul controllo analitico degli OGM

Validazione dei metodi analitici per il rilevamento di OGM

Francesco Gatto



**Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca di OGM
IZS di Lazio e Toscana – Roma 30 Ottobre 2007**



IL PUNTO DI VISTA DEL LABORATORIO DI CONTROLLO

Se la validazione costa tempo, fatica e denaro, perché affrontarla ?

- Affidabilità dei risultati
- Confrontabilità di risultati e metodi
- Ottimizzazione dei metodi
- Adempimento ai requisiti tecnici e normativi
- Accreditamento

LE TAPPE DI UN PROCESSO DI VALIDAZIONE COMPLETO

MESSA A PUNTO DEL METODO



PRE-VALIDAZIONE DEL METODO

"single laboratory study", ove possibile 2-4 laboratori



PIENA VALIDAZIONE DEL METODO

studi interlaboratorio

Parametri

Prove Qualitative

1. Applicabilità-Fattibilità
2. Sensibilità e Specificità
3. Robustezza
4. Limite di rivelazione (LOD)

Prove Quantitative

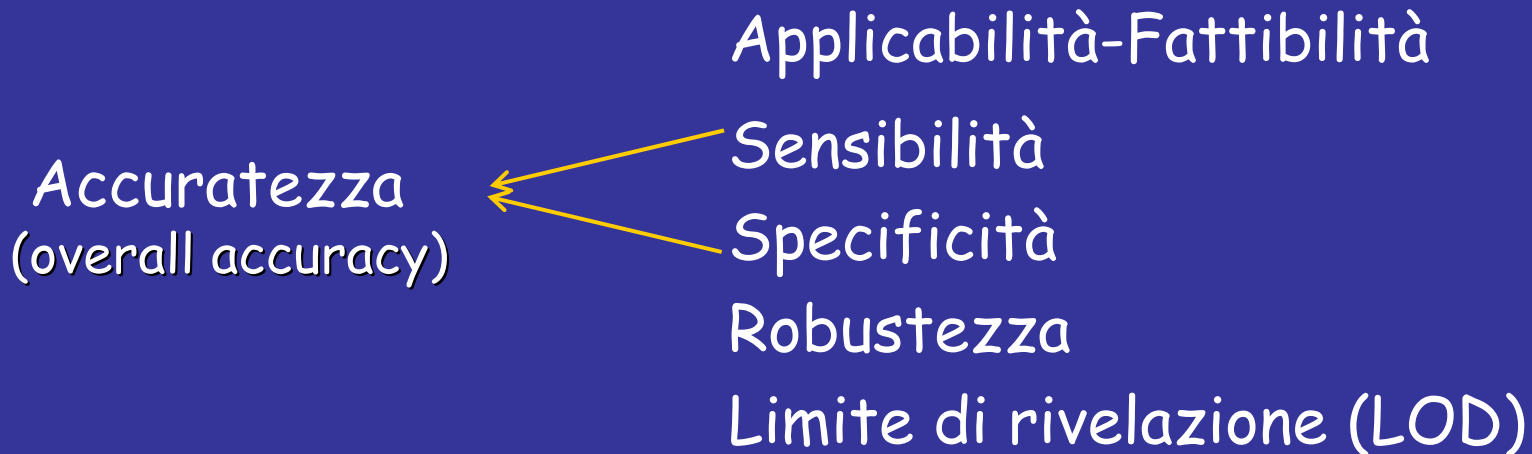
1. Applicabilità-Fattibilità
2. Sensibilità e Specificità
3. Robustezza
4. Limite di rivelazione (LOD)
5. Limite di quantificazione (LOQ)
6. Range di applicabilità (Efficienza e Linearità)

Accuratezza:

7. Precisione (Ripetibilità e Riproducibilità)
8. Esattezza

Iniziamo per gradi...

LA VALIDAZIONE DELLE PROVE PCR QUALITATIVE



Applicabilità-Fattibilità

- Parametro descrittivo: definizione degli analiti, matrici e concentrazioni per le quali un metodo può essere utilizzato.
- Valutazione costi/campione dell'analisi

SPECIFICITÀ E SENSIBILITÀ NELLE PROVE PCR QUALITATIVE: 2 DEFINIZIONI MUTUATE DALLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

SPECIFICITÀ

probabilità di ottenere un risultato negativo in assenza dell'analita



$$\text{N}^\circ \text{negativi correttamente classificati} / \text{N}^\circ \text{campioni non contenenti analita}$$

SENSIBILITÀ

probabilità di ottenere un risultato positivo in presenza dell'analita



$$\text{N}^\circ \text{positivi correttamente classificati} / \text{N}^\circ \text{campioni contenenti analita}$$

OVERALL ACCURACY

probabilità di ottenere un risultato corretto



$$\text{N}^\circ \text{positivi e negativi correttamente classificati} / \text{N}^\circ \text{totale dei campioni}$$

SPECIFICITÀ E SENSIBILITÀ NELLE PROVE PCR QUALITATIVE: UN ESEMPIO PRATICO

		SIT. REALE	
		+	-
P C R	+	76	2
	-	4	18
		80	20

SPECIFICITÀ

$VN/N^{\circ}\text{campioni non contenenti analita} \Rightarrow 18/20=90\%$

SENSIBILITÀ

$VP/N^{\circ}\text{campioni contenenti analita} \Rightarrow 76/80=95\%$

OVERALL ACCURACY

$VP+VN/N^{\circ}\text{ totale campioni} \Rightarrow (76+18)/100=94\%$

PRECISIONE E ACCURATEZZA NELLE PROVE PCR QUALITATIVE

ANCORA CONCETTI MUTUATI DALLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

- * Si possono invertire i termini del problema e valutare, come indicatori di precisione ed accuratezza della prova,
- ♦ % Falsi Positivi $\Rightarrow$ $FP/N^{\circ}\text{campioni non contenenti analita} = 2/20 = 10\%$
 - % Falsi Negativi $\Rightarrow$ $FN/N^{\circ}\text{campioni contenenti analita} = 4/80 = 5\%$

Si tratta rispettivamente del complemento a 100 dei valori di sensibilità (90%) e specificità (95%) prima calcolati: cambia il punto di vista ma la sostanza del discorso rimane invariata

		SIT. REALE	
		+	-
P C R	+	76	2
	-	4	18
		80	20

Table 6. Selectivity test results

B10 concentration in Bt11	Number of replicates	Positive results	Negative results
1%	21	21	0
0.1%	21	21	0
0%	21	0	21

SIT. REALE

PCR

	+	-
+	42	0
-	0	21
	42	21

$$\text{Specificità} = \frac{42}{42} = 100\%$$

$$\text{Sensibilità} = \frac{21}{21} = 100\%$$

$$\text{Accuratezza} = \frac{63}{63} = 100\%$$

IL LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE PCR QUALITATIVE

DEFINIZIONE E APPROCCI DI CALCOLO

LOD

Minima concentrazione di analita a livello della quale si ottiene segnale in almeno il 95% dei replicati di prova effettuati

Per procedere alla determinazione del LOD:

- ✓ occorre predisporre diluizioni del DNA bersaglio in H₂O e/o DNA non-bersaglio fino a bassi numeri di copie (teoricamente fino ad 1 copia)
- ✓ essendo impossibile condurre la PCR su 100 replicati per ciascuno dei livelli di concentrazione del bersaglio (per verificare il 95% di positività) una semplificazione, comunque rigorosa, consiste nel fare 20 replicati ed individuare la prima diluizione in cui compare un negativo ($1/20 = 5\%$ FN);

IL LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE QUALITATIVE: UN APPROCCIO PRATICO SEMPLIFICATO

✓ Un approccio pratico per determinare il LOD prevede una diminuzione del numero di replicati, fino a 8-10, controbilanciata però da un aumento nella stringenza dei requisiti di positività (95% → 100%), in queste condizioni....

Copie DNA bersaglio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LOD → 67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

...il LOD è la concentrazione più bassa di analita in corrispondenza della quale si ottiene segnale per tutti i replicati di PCR

$$\frac{20}{21} \approx 95\% \rightarrow$$

Table 5. LOD test results

Copy numbers/rxn	Number of replicates	Positive results	Negative results
500	10	10	0
100	21	21	0
20	21	21	0
4	21	20	1
0	21	0	21

LA VALIDAZIONE DELLE PROVE PCR QUANTITATIVE

Applicabilità-Fattibilità

Sensibilità

Specificità

Robustezza

Limite di rivelazione (LOD)

Limite di quantificazione (LOQ)

Efficienza ← Linearità ← Range di applicabilità

Accuratezza:

Precisione

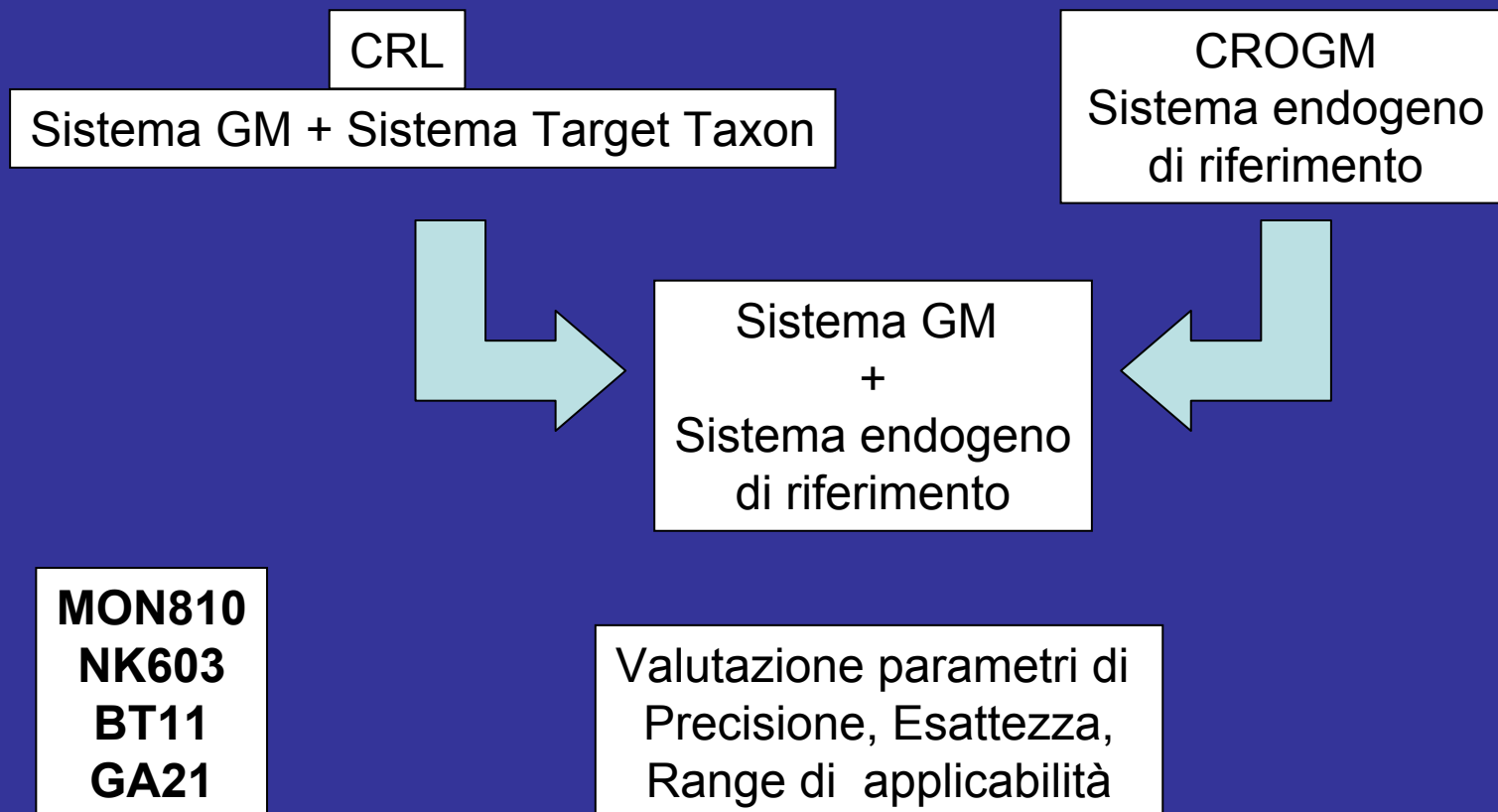
Esattezza

→ Ripetibilità
→ Riproducibilità



Ring test CROGM-Network

Standardizzazione delle metodiche di analisi



Ring test CROGM-Network

CROGM

- 20 campioni incogniti di DNA
- Calibratori (DNA)
- Reagenti
- Laboratori: allestire 2 piastre PCR Real Time, Raccolta e invio dati

LA VALIDAZIONE DELLE PROVE PCR QUANTITATIVE

CRL

Applicabilità-Fattibilità
Sensibilità
Specificità
Robustezza

da definire



Limite di rivelazione (LOD)

Limite di quantificazione (LOQ)

Efficienza ← Linearità ← Range di applicabilità

CROGM-Network

Accuratezza:

Precisione

Esattezza

Ripetibilità

Riproducibilità



LA PRECISIONE NELLE PROVE PCR QUANTITATIVE

PRECISIONE

Grado di accordo tra risultati analitici indipendenti ottenuti in condizioni definite (ISO 5725-1, ISO 3534-1)

si esprime in termini di "imprecisione" •[∞] come deviazione standard semplice (σ) o relativa (**RSD**, anche detta Coefficiente di Variazione percentuale, **CV%**) dei replicati di misura condotti in:

Intralaboratorio

Ripetibilità ristretta

(intra serie)

Misure eseguite in tempi brevi
Nessuna taratura tra le misure
Stesso operatore
Stessa apparecchiatura

Ripetibilità intermedia

(es. day-to-day)

Misure eseguite in tempi differenti
Taratura eseguita fra le misure
Operatori differenti
Apparecchiature diverse

interlaboratorio

Riproducibilità

Aumento della Variabilità

ACCURATEZZA ED ESATTEZZA NELLE PROVE PCR QUANTITATIVE

ESATTEZZA

grado di accordo tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati di prova ed il valore di riferimento accettato (ISO 3534-1)

ACCURATEZZA

grado di accordo tra un risultato di prova ed il valore di riferimento accettato (ISO 3534-1, ISO 5725-1)

NB: talora impropriamente ci si riferisce all'esattezza come accuratezza della media, ma il termine accuratezza applicato ad un insieme di risultati di prova implica una combinazione delle componenti casuali e sistematiche di errore (ISO 3534-1), pertanto l'accuratezza esprime un'incertezza di misura[√] e compendia esattezza e precisione (ISO 5725-1)

⇒ La confusione ed il disaccordo tra i vari organismi in merito a questi due parametri rimane, pertanto, in particolare per l'accuratezza, non è possibile al momento indicare una modalità di calcolo ed un criterio di accettabilità univoci

L'ESATTEZZA NELLE PROVE PCR QUANTITATIVE

L'esattezza si esprime in genere in termini di BIAS si calcola su CRM o su campioni utilizzati in prove interlaboratorio, nell'intero intervallo di misura del metodo

$$BIAS_{ass.} = V_{medio} - V_{rif.}$$

$$BIAS\% = BIAS_{ass.} / V_{rif.}$$

I criteri di accettabilità suggeriti su tutto il range di misura in prove interlaboratorio sono

per ENGL $BIAS\% \leq |25\%|$ ♠

per Codex $BIAS\% \leq |30\%|$ ♦

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI VALIDAZIONE INTRA ED INTERLABORATORIO IN UN RING TRIAL: UN ESEMPIO

Event-specific method for the quantitation of maize line TC1507 using real-time PCR

Unknown sample GM%	Expected value (GMO %)					
	0.00	0.10	0.50	0.90	2.00	5.00
Laboratories having returned results	14	14	14	14	14	14
Samples per laboratory	2	2	2	2	2	2
Number of outliers	0	0	1	2	1	0
Reason for exclusion	-	-	G. test	G. test; C. test	C. test	-
Mean value	0.000	0.106	0.480	0.933	1.966	5.420
RSD _r < 30% ⇒ Repeatability relative standard deviation (%)	0.00	18.11	11.70	7.68	8.48	14.41
Repeatability standard deviation	0.00	0.02	0.06	0.07	0.17	0.78
RSD _R < 35% ⇒ Reproducibility relative standard deviation (%)	0.00	19.91*	14.78	10.24	21.19	21.65
RSD _R < 50% * Reproducibility standard deviation	0.00	0.02	0.07	0.10	0.42	1.17
Bias (absolute value)	0.00	0.006	- 0.02	0.033	- 0.034	0.42
Bias% < 25% ⇒ Bias (%)	0.00	6.00	- 4.00	3.70	- 1.70	8.40*

*Calcolo dell'esattezza al livello 5% GM = (5.42-5.00)/5.00 = 0.42/5 = 0.084 = 8.40%

IL LOD ED IL LOQ NELLE PROVE PCR QUANTITATIVE: PROBLEMATICHE E POSSIBILI APPROCCI

Il metodo "tradizionale" prevede che LOD e LOQ corrispondano a:

$$\text{LOD} \Rightarrow \text{segnale}_{\text{bianco}} + 3 \sigma$$

$$\text{LOQ} \Rightarrow \text{segnale}_{\text{bianco}} + 6-10 \sigma$$

Questo approccio presuppone che per concentrazioni di analita bersaglio $\cong$ zero la distribuzione dei segnali di misura corrispondenti sia normale

MA...

...in PCR quantitativa la distribuzione dei valori di C_t del bianco è tronca e ♦

VALORE $C_{t0} \equiv N^{\circ}$ finale cicli



$$\sigma_{C_{t0}} = 0$$



OCCORRE VALUTARE NUOVE PROCEDURE...

LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

LOD DAS

	Baseline S	Baseline S	Threshold	Data				
Piastra A	3	30	0,090	11/07/2007 18.27				
Piastra B	3	24	0,085	12/07/2007 13.31				
n. copie	33		8		2		0	
Piastra	A	B	A	B	A	B	A	B
1	35,085	34,770	36,096	37,257	37,970	ndetermine	ndetermine	ndetermine
2	36,028	34,575	35,728	35,831	ndetermine	37,863	38,595	ndetermine
3	35,171	34,623	38,087	38,127	36,707	ndetermine	38,180	39,983
4	34,241	33,939	37,265	38,025	ndetermine	38,010	ndetermine	ndetermine
5	34,904	35,001	ndetermine	37,218	ndetermine	ndetermine	ndetermine	ndetermine
6	34,770	34,303	39,015	26,825	36,472	ndetermine	ndetermine	ndetermine
7	35,085	34,671	35,819	36,641	37,097	36,617	ndetermine	38,107
8	34,795	34,686	37,193	37,175	36,900	38,943	ndetermine	ndetermine
9	34,975	35,530	36,985	38,036	ndetermine	36,939	38,050	ndetermine
10	34,210	ndetermine	38,314	39,064	39,123	ndetermine	ndetermine	ndetermine
media	34,926	34,677	37,167	36,420	37,378	37,674	38,275	39,045
ST.Dev.	0,511	0,439	1,154	3,488	0,997	0,924	0,284	1,326
R.ST.Dev. %	1,463	1,265	3,105	9,576	2,669	2,453	0,743	3,397
n. Pos.	10	9	9	10	6	5	3	2
% Pos	100	90	90	100	60	50	30	20
% Pos tot	95		95		55		25	



LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

LOD GA21

	Baseline S	Baseline S	Threshold	Data
Piastra A	3	24	0,118	02/10/2007 10.02
Piastra B	3	27	0,054	04/10/2007 16.09

n. copie	70		35		17,5		8,8		4,4		2,2	
Piastra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	32,872	34,613	33,868	36,047	35,366	36,749	37,474	38,693	37,100	39,904	39,053	41,935
2	32,687	34,323	33,586	35,578	34,728	35,928	36,660	37,584	35,615	39,309	38,291	41,468
3	32,260	34,247	33,831	35,401	34,371	36,338	34,897	37,573	35,886	38,841	39,626	39,325
4	32,511	33,959	33,597	35,303	34,330	37,031	35,408	36,796	37,439	38,725	38,522	41,525
5	32,350	34,225	33,104	35,140	34,529	35,528	35,727	38,673	37,619	38,126	36,722	39,738
6	32,417	34,009	33,400	34,494	34,686	35,486	34,936	37,209	36,830	38,933	38,340	38,266
7	32,586	33,986	33,118	35,729	34,034	35,525	35,623	39,348	40,146	40,158	38,474	39,636
8	32,281	33,629	33,710	35,558	33,960	36,859	35,054	38,087	36,926	49,046	36,723	39,742
9	31,938	33,815	33,550	35,890	34,109	36,496	36,195	36,723	36,651	37,389	38,854	ndetermine
10	32,292	34,126	33,631	35,226	34,668	36,471	36,433	38,349	37,513	38,532	39,356	39,880
media	32,419	34,093	33,540	35,437	34,478	36,241	35,841	37,904	37,173	39,896	38,396	40,168
ST.Dev.	0,260	0,278	0,263	0,440	0,417	0,585	0,843	0,872	1,237	3,314	0,984	1,210
R.ST.Dev. %	0,803	0,815	0,785	1,240	1,210	1,615	2,351	2,301	3,327	8,306	2,563	3,012
n. Pos.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9
% Pos	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90
% Pos tot	100		100		100		100		100		95	



LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

LOD MON810

	Baseline S	Baseline S	Threshold	Data
Piastra A	3	26	0,200	01/10/2007 10.55
Piastra B	3	27	0,198	01/10/2007 13.17

n. copie	70		35		17,5		8,8		4,4		2,2	
Piastra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	34,641	34,942	35,772	36,349	36,980	37,524	37,023	38,352	40,240	40,100	Indeterminate	39,177
2	34,906	34,470	36,014	35,196	38,081	36,544	38,353	36,918	38,670	38,782	40,187	41,020
3	34,222	34,867	36,384	35,763	37,014	36,841	37,270	36,962	39,618	40,478	38,516	40,164
4	34,896	34,967	36,141	36,412	36,954	37,588	38,806	37,481	39,000	39,365	41,185	40,280
5	34,459	34,550	35,787	36,204	36,702	36,753	36,869	37,622	38,686	38,341	40,361	Indeterminate
6	34,629	34,683	36,265	35,596	37,339	37,828	37,171	37,902	39,131	41,380	38,966	40,615
7	34,993	35,228	35,838	35,946	37,019	36,969	38,178	37,988	38,659	39,161	39,531	Indeterminate
8	34,546	34,653	35,969	35,980	36,508	36,206	37,177	38,242	38,185	39,173	40,233	38,239
9	34,895	35,329	35,747	35,725	36,753	36,905	37,670	38,680	40,414	39,212	Indeterminate	40,015
10	34,467	34,553	35,331	35,780	36,835	35,948	37,306	37,062	38,792	39,048	Indeterminate	38,740
media	34,665	34,824	35,925	35,895	37,019	36,911	37,582	37,721	39,139	39,504	39,854	39,781
ST.Dev.	0,251	0,294	0,302	0,368	0,435	0,602	0,648	0,616	0,728	0,897	0,910	0,964
R.ST.Dev. %	0,723	0,844	0,839	1,024	1,174	1,632	1,725	1,633	1,861	2,270	2,283	2,424
n. Pos.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	8
% Pos	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70	80
% Pos tot	100		100		100		100		100		75	



LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

LOD NK603

	Baseline S	Baseline S	Threshold	Data
Piastra A	3	30	0,200	27/09/2007 17.03
Piastra B	3	27	0,200	28/09/2007 9.54

n. copie	70		35		17,5		8,8		4,4		2,2	
Piastra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	36,528	36,325	37,053	36,623	38,935	38,542	39,123	39,499	40,648	42,432	40,671	39,959
2	35,995	36,346	36,609	36,256	38,397	37,302	38,302	38,953	41,500	40,214	42,521	40,953
3	35,822	36,067	36,548	36,818	36,967	37,997	39,207	39,661	40,093	39,957	Indeterminate	39,672
4	36,180	36,104	37,503	36,394	38,285	38,106	38,241	38,228	42,019	40,404	41,198	41,656
5	36,049	35,949	36,325	36,187	37,414	37,388	38,295	38,968	39,455	40,943	39,263	40,273
6	36,769	35,357	36,502	36,355	38,011	38,266	37,957	38,103	41,590	40,676	Indeterminate	40,929
7	35,551	35,878	36,801	36,485	37,238	37,577	39,599	42,144	39,893	39,395	42,153	Indeterminate
8	35,415	36,111	36,348	37,223	38,258	37,950	38,360	40,403	40,739	40,936	40,548	43,225
9	35,717	35,788	36,923	36,655	38,045	39,066	39,196	38,206	38,631	40,872	Indeterminate	41,334
10	35,884	35,976	37,222	36,850	37,464	37,610	38,464	38,507	39,702	41,263	41,099	41,786
media	35,991	35,990	36,783	36,585	37,901	37,980	38,674	39,267	40,427	40,709	41,065	41,087
ST.Dev.	0,418	0,285	0,390	0,317	0,611	0,548	0,552	1,252	1,069	0,819	1,080	1,085
R.ST.Dev. %	1,162	0,791	1,060	0,866	1,612	1,443	1,427	3,188	2,644	2,012	2,629	2,642
n. Pos.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	9
% Pos	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70	90
% Pos tot	100		100		100		100		100		80	



LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

LOD TC1507

	Baseline S	Baseline S	Threshold	Data
Piastra A	3	15	0,166	28/09/2007 0.00
Piastra B	3	15	0,131	28/09/2007 15.04

n. copie	70		35		17,5		8,8		4,4		2,2	
Piastra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	32,941	32,854	34,161	33,946	34,560	35,588	35,899	35,929	ndetermine	36,853	38,114	ndetermine
2	33,021	32,628	34,414	34,035	34,582	34,078	36,112	34,904	36,052	36,327	36,912	35,825
3	33,133	32,878	34,908	33,689	35,048	34,748	36,688	35,297	ndetermine	36,196	38,591	38,470
4	33,393	33,186	34,509	33,878	35,561	36,139	35,248	35,678	37,812	39,178	38,249	37,761
5	32,980	32,622	34,933	34,112	35,371	35,565	37,155	35,219	36,687	37,157	38,106	37,186
6	33,148	33,007	34,068	33,938	35,120	35,419	35,376	36,679	38,245	38,263	38,718	ndetermine
7	33,958	32,938	34,447	34,301	35,700	35,005	35,595	35,166	38,121	36,455	ndetermine	36,879
8	33,503	32,615	33,988	33,629	35,259	34,401	37,593	37,013	ndetermine	ndetermine	39,275	36,468
9	33,663	33,335	33,655	34,131	35,084	35,175	37,227	35,680	ndetermine	35,484	ndetermine	38,037
10	33,295	33,189	34,186	33,958	34,318	34,452	36,603	38,905	38,373	37,154	36,715	36,882
media	33,303	32,925	34,327	33,962	35,060	35,057	36,350	36,047	37,548	37,008	38,085	37,189
ST.Dev.	0,329	0,257	0,400	0,201	0,451	0,642	0,825	1,207	0,953	1,124	0,875	0,867
R.ST.Dev. %	0,988	0,782	1,166	0,593	1,286	1,831	2,271	3,349	2,539	3,037	2,297	2,330
n. Pos.	10	10	10	10	10	10	10	10	6	9	8	8
% Pos	100	100	100	100	100	100	100	100	60	90	80	80
% Pos tot	100		100		100		100		75		80	



LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

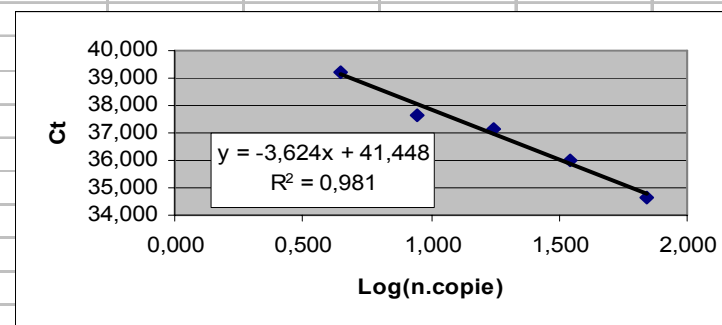
LOD MON810

Dev.St.Relativa
LOD: $RSD \leq 33\%$
LOQ: $RSD \leq 25\%$

	Baseline	Baseline	Threshold	Data
Piastra A	3	26	0,200	01/10/2007 10.55

n. copie	70		35		17,5		8,8		4,4		2,2
Piastra	A	copie	A	copie	A	copie	A	copie	A	copie	A
1	34,641	75,569	35,772	36,816	36,980	17,098	37,023	16,636	40,240	2,154	ndetermina
2	34,906	63,856	36,014	31,577	38,081	8,495	38,353	7,146	38,670	5,843	40,187
3	34,222	98,618	36,384	24,958	37,014	16,729	37,270	14,221	39,618	3,199	38,516
4	34,896	64,263	36,141	29,123	36,954	17,374	38,806	5,357	39,000	4,736	41,185
5	34,459	84,823	35,787	36,479	36,702	20,396	36,869	18,347	38,686	5,782	40,361
media	34,624	77,426	36,020	31,790	37,146	16,018	37,664	12,341	39,243	4,343	40,062
ST.Dev.	0,293	14,703	0,256	5,027	0,537	4,452	0,863	5,784	0,677	1,626	1,119
R.ST.Dev. %	0,845	18,990	0,712	15,814	1,445	27,792	2,291	46,867	1,725	37,441	2,793
n. Pos.	5		5		5		5		5		4

n. copie	Log(n.copie)	Ctmedio	slope	intercetta	R2
70	1,845	34,624	-3,624	41,4479	0,980586
35	1,544	36,020			
17,5	1,243	37,146			
8,8	0,944	37,664			
4,4	0,643	39,243			



Curva di Calibrazione : 4 Punti
slope = [-4,0; -3,0]
 $R^2 \geq 0,97$

LIMITE DI RIVELAZIONE NELLE PROVE REAL TIME PCR

Curva di Calibrazione : 4 Punti
slope = [-4,0; -3,0]
 $R^2 \geq 0,97$



$$n.copie_{calc} = 10 \frac{Ct-INTERC.}{slope}$$



Dev.St.Relativa
 LOD: $RSD \leq 33\%$
 LOQ: $RSD \leq 25\%$

	Slope		R^2	
	A	B	A	B
GA21	-3,606	-3,924	0,99	0,99
MON810	-3,624	-3,852	0,98	1,00
NK603	-3,943	-3,750	0,98	0,97
TC1507	-3,270	-3,603	0,96	1,00

LOD

	A	B	media
GA21	17,5	35	26,25
MON810	17,5	8,8	13,15
NK603	35	17,5	26,25
TC1507	17,5	35	26,25

LOQ

	A	B	media
GA21	17,5	35	26,25
MON810	17,5	17,5	17,5
NK603	35	35	35
TC1507	35	35	35



Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories

The LOD is given by:

$$LOD = \frac{4u_0}{1 - 4RSU^2}$$

Equation 16

u_0 absolute standard uncertainty

RSU relative standard uncertainty

The LOQ is given by:

$$LOQ = \sqrt{\frac{u_0^2}{RSU_{MAX}^2 - RSU^2}}$$

Equation 17

u_0 absolute standard uncertainty

RSU relative standard uncertainty

RSU_{MAX} largest acceptable relative standard uncertainty

