

Walidacja i weryfikacja metod analiz GMO

Magdalena Żurawska-Zajfert

IHAR-PIB Radzików, Laboratorium Kontroli GMO

Norma PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

7. Wymagania dotyczące procesu

7.1 Przegląd zapytań, ofert i umów

7.2 Wybór, weryfikacja i walidacja metod

7.3 Pobieranie próbek

7.4 Postępowanie z obiektami do badań i wzorcowań

7.5 Zapisy techniczne

7.6 Ocena niepewności pomiaru

7.7 Potwierdzenie ważności wyników

7.8 Raportowanie wyników

7.9 Skargi

7.10 Prace niezgodne z wymaganiami

7.11 Nadzorowanie danych i zarządzanie informacją

Weryfikacja wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

Weryfikacja - sprawdzenie możliwości prawidłowego realizowania metody przed jej wprowadzeniem, sprawdzenie czy metoda osiąga wymagane parametry

Zapisy z przeprowadzonej weryfikacji powinny być zachowywane.

Weryfikacja powinna być powtórzona w przypadku zmian w metodzie.

Walidacja wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

Walidacja powinna być na tyle obszerna aby spełnić potrzeby danego zastosowania lub obszaru zastosowania. (17025:2018-02)

Walidacja jest procesem.

Walidacji podlegają

- metody nieznormalizowane
- metody opracowane przez laboratorium
- metody znormalizowane wykorzystywane poza przewidzianym dla nich zakresem
- metody znormalizowane, które zostały zmodyfikowane

Techniki stosowane do walidacji metody to:

- wzorcowanie lub wyznaczanie systematycznego błędu pomiaru i precyzji z wykorzystaniem wzorców odniesienia lub materiałów odniesienia
- systematyczna ocena czynników wpływających na wynik
- badanie odporności metody poprzez zmianę kontrolowanych parametrów (temperatura, objętość)
- porównanie wyników uzyskanych innymi metodami
- porównania międzylaboratoryjne
- ocena niepewności wyników pomiarów

Cechy zwalidowanych metod:

- odpowiednie do potrzeb klienta
- spójne z wyspecyfikowanymi wymaganiami

dla zamierzonego zastosowania

Powtórna walidacja metody gdy zwalidowana metoda ma wprowadzane zmiany, których oddziaływanie jest określone jako mające wpływ na walidację pierwotną.

Zapisy z walidacji:

- zastosowana procedura walidacji
- specyfikacja wymagań
- cechy charakterystyczne metody
- uzyskane wyniki
- stwierdzenie walidacyjne dla metody, wskazujące na jej przydatność do zamierzonego zastosowania

Walidacja może obejmować parametry:

- dokładność
- odtwarzalność
- powtarzalność
- czułość
- precyzję
- poprawność
- liniowość
- granicę wykrywalności
- granicę oznaczalności
- selektywność, specyficzność
- zakres roboczy
- stabilność
- wydajność amplifikacji
- niepewność

PN-EN ISO/IEC 17025:2005,
Definition of Minimum Performance Requirements for. Analytical Methods of GMO Testing. European Network of GMO
Laboratories (ENGL),
PN-EN ISO 24276

Weryfikacja może obejmować parametry:

- precyzję (RSDr)
- poprawność (błąd systematyczny)
- liniowość (współczynnik R^2), wydajność amplifikacji
- granicę wykrywalności
- granicę oznaczalności

Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL) „Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods” EUR 29015 EN - 2017

Stabilność

Zdolność metody lub urządzenia do odporności na działanie czynników zewnętrznych -wytrzymałość metody, urządzenia.

Dla metody PCR czynniki, które mogą wpływać na jej stabilność to:

- termocykler
- mastermix
- objętość reakcji
- stężenie starterów i sond
- temperatura przyłączania starterów

Badanie stabilności (elastyczności) metody powinno udowodnić niezawodność analizy po wprowadzeniu niewielkich celowych zmian parametrów metody.

Kryterium akceptacji: odchylenia przy niewielkich celowych zmianach nie powinny być większe niż $\pm 30\%$

Czułość

Najmniejsza ilość składnika, która daje sygnał i może być oznaczana daną metodą badawczą.

Selektywność, specyficzność

Miara zdolności metody do wykrywania określonego fragmentu DNA z mieszaniny.

Powtarzalność (precyzja w warunkach powtarzalności)

Stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania w określonych warunkach tą samą metodą badawczą.

Kryterium akceptacji: $RSDr \leq 25\%$

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

Stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania przez wszystkich analityków tą samą metodą badawczą w określonych warunkach.

Kryterium akceptacji: $RSDR < 35\%$

Zakres roboczy

Zakres w którym metoda zachowuje jednorodność, liniowość. Zakres ten można określić jako zakres stosowania, w którym można osiągnąć akceptowalną poprawność i precyzję.

Kryterium akceptacji: RSDr i poprawność $\leq 25\%$

Poprawność, błąd systematyczny (dokładność)

Stopień zgodności między średnią wartością uzyskaną z dużej serii pomiarów, a przyjętą wartością odniesienia.

Poprawność metody powinna zostać sprawdzona poprzez analizę odpowiednich materiałów referencyjnych z certyfikowaną zawartością oznaczanego składnika.

Kryterium akceptacji: $\pm 25\%$ od oczekiwanej wartości wzorcowej

Liniowość

Zdolność do uzyskiwania wyników pomiaru wprost proporcjonalnych do stężenia substancji oznaczanej w próbce, w określonym zakresie – zgodnie z wyznaczonym równaniem funkcji regresji $y=ax+b$

Zależność między obiema zmiennymi charakteryzuje współczynnik korelacji R

Kryterium akceptacji: $R^2 \geq 0,98$ (współczynnik determinacji)

Wydajność amplifikacji

Parametr zależny od współczynnika nachylenia krzywej standardowej (slope).

Wyliczany jest ze wzoru: $Efficiency = 10^{\left(\frac{-1}{slope}\right)} - 1$

Przyjęto, że slope = -3,32 odpowiada 100% wydajności.

Kryterium akceptacji: $-3,1 \geq slope \geq -3,6$

Precyzja

„Dokładność – względne odchylenie standardowe w warunkach powtarzalności (RSD_r)”: względne odchylenie standardowe wyników badań uzyskanych w warunkach powtarzalności. Warunki powtarzalności to warunki, w jakich uzyskano wyniki badań prowadzonych tą samą metodą, na identycznym materiale badawczym, w tym samym laboratorium, przez tego samego użytkownika, przy użyciu tego samego sprzętu, w krótkich odstępach czasu (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 619/2011)

$$RSD_r = \frac{SD}{M} \times 100$$

SD – odchylenie standardowe

M – średnia wyników z 10 powtórzeń

(aby przy poziomie ufności=95% k=2)

RSD_r ≤ 25%

Granica wykrywalności (LOD)

Najmniejsza ilość analitu lub najmniejsze jego stężenie w próbce badanej, które zostały wykazane badaniami międzylaboratoryjnymi lub odpowiednią walidacją, możliwe do wykrycia w sposób nie podlegający wątpliwości, lecz niekoniecznie możliwe do oznaczenia ilościowego (PN-EN ISO 24276)

Jest to najmniejsza ilość substancji badanej jaką można wykryć w badanej próbce daną metodą badawczą.

LOD powinno być mniejsze od $1/20$ stężenia docelowego, np. dla 0,9% teoretyczna wartość LOD powinna być mniejsza od 0,045% (Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. European Network of GMO Laboratories, ENGL)

Granica oznaczalności (LOQ)

Najmniejsza ilość analitu lub najmniejsze jego stężenie w próbce badanej, które zostały wykazane badaniami międzylaboratoryjnymi lub odpowiednią walidacją, możliwe do oznaczania ilościowego z akceptowaną precyzją i dokładnością. (PN-EN ISO 24276)

Jest to najmniejsza ilość substancji badanej jaką można pewnie oznaczyć ilościowo z akceptowalnym poziomem precyzji i dokładności.

LOQ powinno być mniejsze od $1/10$ stężenia docelowego przy względnym odchyleniu standardowym w warunkach powtarzalności $(RSDr) \leq 25\%$, np. dla 0,9% teoretyczna wartość LOQ powinna być mniejsza od 0,09%.

(Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. European Network of GMO Laboratories-ENGL)

Szacowanie niepewności

Źródła niepewności

- Metoda
- Środowisko
- Personel
- Wzorzec
- Obiekt badany

Suma niepewności ze źródeł niepewności daje niepewność złożoną.

Niepewność rozszerzona (niepewność całkowita) jest iloczynem współczynnika rozszerzenia (k) i złożonej niepewności standardowej



- Niepewność standardowa – np. odchylenie standardowe
- Złożona (całkowita) niepewność standardowa – uc jest oszacowanym odchyleniem standardowym równym dodatniemu pierwiastkowi kwadratowemu całkowitej wariancji otrzymanej przez uwzględnienie wszystkich składników niepewności
- Niepewność rozszerzona U – zakres w którym znajduje się wartość mierzona wielkości z dużym poziomem ufności
- Współczynnik rozszerzenia dla poziomu ufności 95% wynosi $k=2$

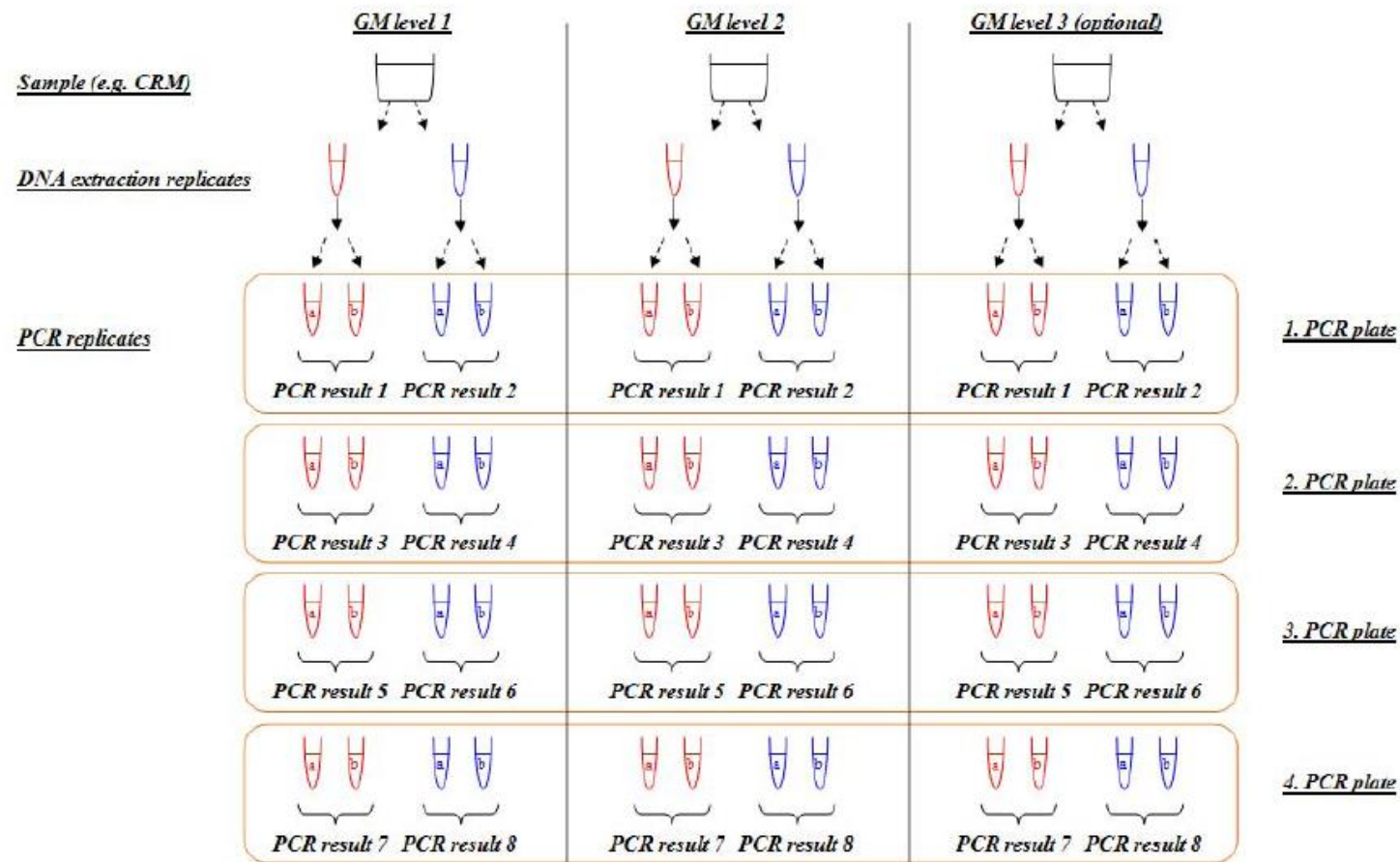
Weryfikacja - praktyczne wyznaczanie parametrów dla ilościowego Real Time PCR

<p>1. Optional: Preliminary test to define appropriate DNA concentrations</p>	<p>Test at least 3 target concentrations in the range of 300 ng – 0.1 ng (dependent on plant species)⁽¹⁹⁾. e.g. 300 ng Maize DNA corresponds to approx. 110 000 endogenous gene copies whereas 0.1 ng corresponds to approximately 37 copies.</p>
<p>2. Dynamic range, R² coefficient, and amplification efficiency</p>	<p>Example 1: 2 calibration curves minimum requirements</p> <p>5 calibration points with 3 PCR replicates each (triplicates) All slopes shall be in the range of $-3.6 \leq \text{slope} \leq -3.1$ and all R² values should be ≥ 0.98.</p> <p>Example 2: 4 calibration curves;</p> <p>5 calibration points with 2 PCR replicates each (duplicates) average of 4 slopes and R² are used to verify the acceptance.</p> <p>Example 3: 2 calibration curves;</p> <p>8 calibration points in 5 PCR replicates (pentaplicates) also covering the low concentrations for LOD and LOQ. Average of the part above LOQ for slope and R² are used to verify the acceptance.</p>

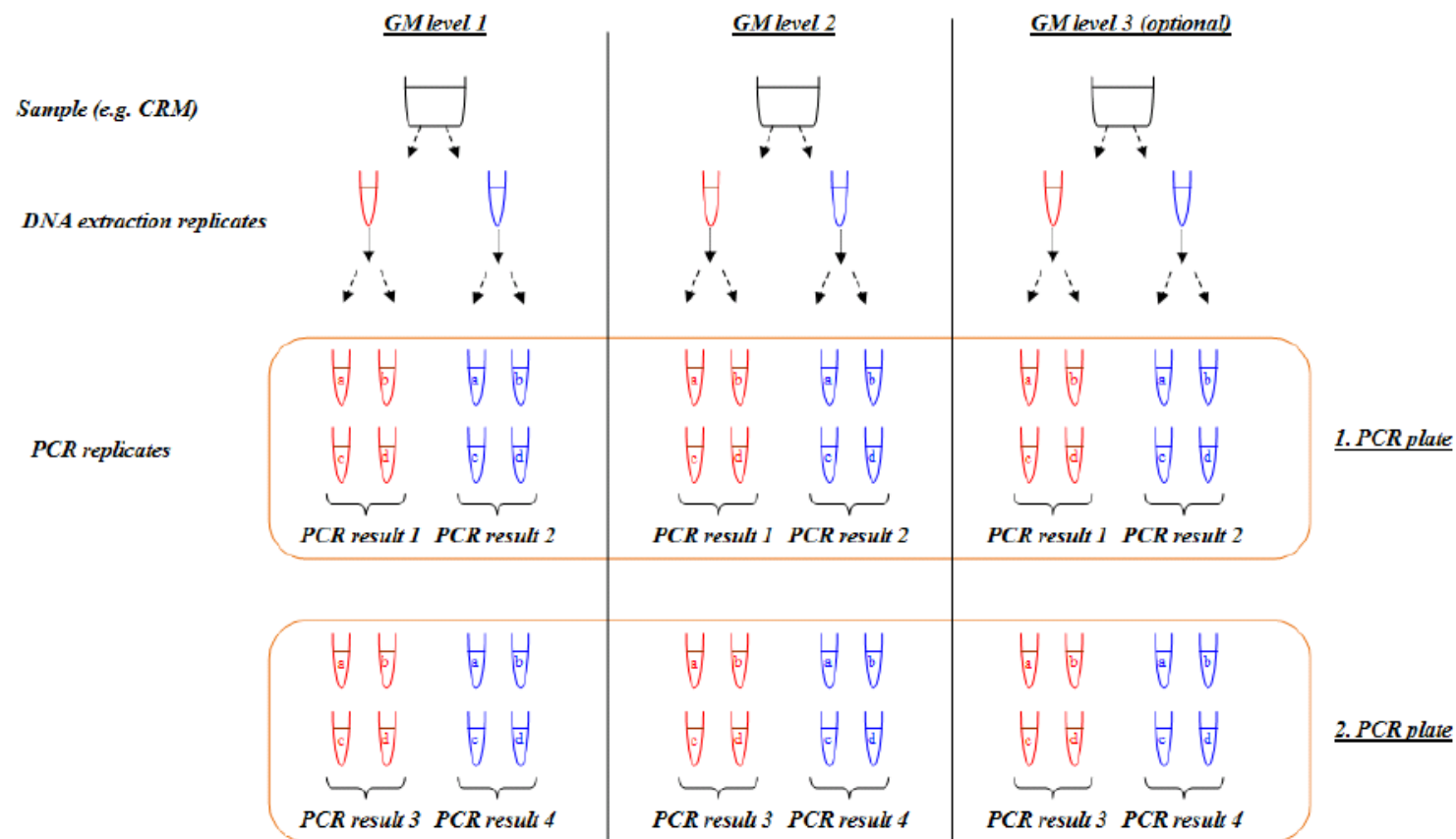
Weryfikacja - praktyczne wyznaczanie parametrów dla ilościowego Real Time PCR

<p>3. Trueness, Precision, RSD_r</p>	<p>At least 2 GM levels (one around labeling threshold and one around LOQ, a third recommended to the upper part of the dynamic range)</p> <p>Example 1: 2 DNA extraction replicates per GM level, 2 PCR replicates per extraction/plate, 4 plates resulting in 16 test results and 8 GM-estimations per GM level* (Fig. 2)</p> <p>Example 2: 2 DNA extraction replicates per GM level, 4 PCR replicates per extraction/plate, 2 plates resulting in 16 test results and 4 GM-estimations per GM level* (Fig. 3)</p> <p>For estimation of the intermediate precision PCR runs are carried out at least on two different days by the same operator or, if possible, by an additional operator.</p>
<p>4. LOQ, LOD</p>	<p>LOQ: 10 PCR replicates at a low concentration (e.g. 80, 60, 40, 20, 10, 5, and 1 copies). LOQ is the lowest concentration of a series where RSD of the copy number measurements are below 25% and the point is covered by the standard curve.</p> <p>LOD: 10 PCR replicates at a low concentration (e.g. 20, 10, 5, and 1 copies). LOD is then the lowest concentration in a series where all replicates are positive.</p>

Schemat doświadczenia – dokładność, precyzja



Schemat doświadczenia – dokładność, precyzja



Schemat doświadczenia – stabilność

Table 1. Example of conditions tested

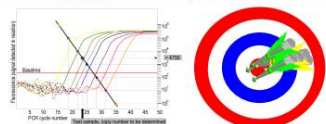
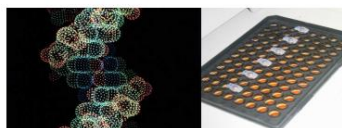
Factor	Condition 0	Condition 1
Thermal cycler (brand/model)	A	B
Master mix concentration	unchanged	- 10%
Primer concentration	unchanged	- 30%
Probe concentration	unchanged	- 30%
Master mix volume (total of 25 μ L)	19 μ L master mix + 5 μ L sample DNA	21 μ L master mix + 5 μ L sample DNA
Annealing temperature	+1°C	-1°C

Table 2. Multifactorial design of the conditions outlined in table 1

Factor	Combination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Thermal cycler	0	0	0	0	1	1	1	1
Master mix	0	0	1	1	0	0	1	1
Primer concentration	0	1	0	1	0	1	0	1
Probe concentration	0	1	1	0	1	0	0	1
Master mix volume	0	0	1	1	1	1	0	0
Annealing temperature	0	1	0	1	1	0	1	0



JRC TECHNICAL REPORT



Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing

European Network of GMO Laboratories (ENGL)

2015

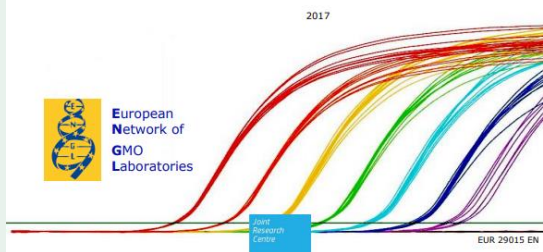


JRC TECHNICAL REPORTS

Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods

Version 2

Hougs L, Gatto F, Goerlich O, Grohmann L, Lieske K, Mazzara M, Narendja F, Ovesná J, Papazova N, Scholtens I, Zel J.



Joint Research Centre
EUR 29015 EN



JRC TECHNICAL REPORTS

Overview and recommendations for the application of digital PCR

European Network of GMO Laboratories (ENGL)

Pecoraro S., Berben G., Burns M., Corbisier P., De Giacomo M., De Loose M., Dagand E., Dobnik D., Eriksson R., Holst-Jensen A., Kaçkılı D. M., Kreysa J., Lievens A., Mäde D., Mazzara M., Paternò A., Petersen V., Savini C., Sovová T., Sowa S., Spilberg B.

2019



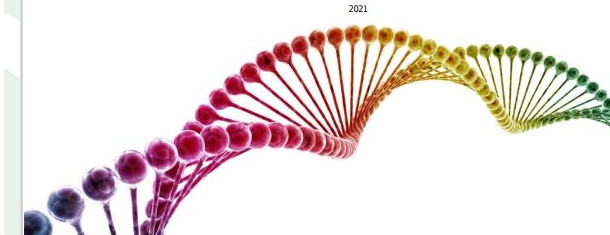
JRC TECHNICAL REPORT

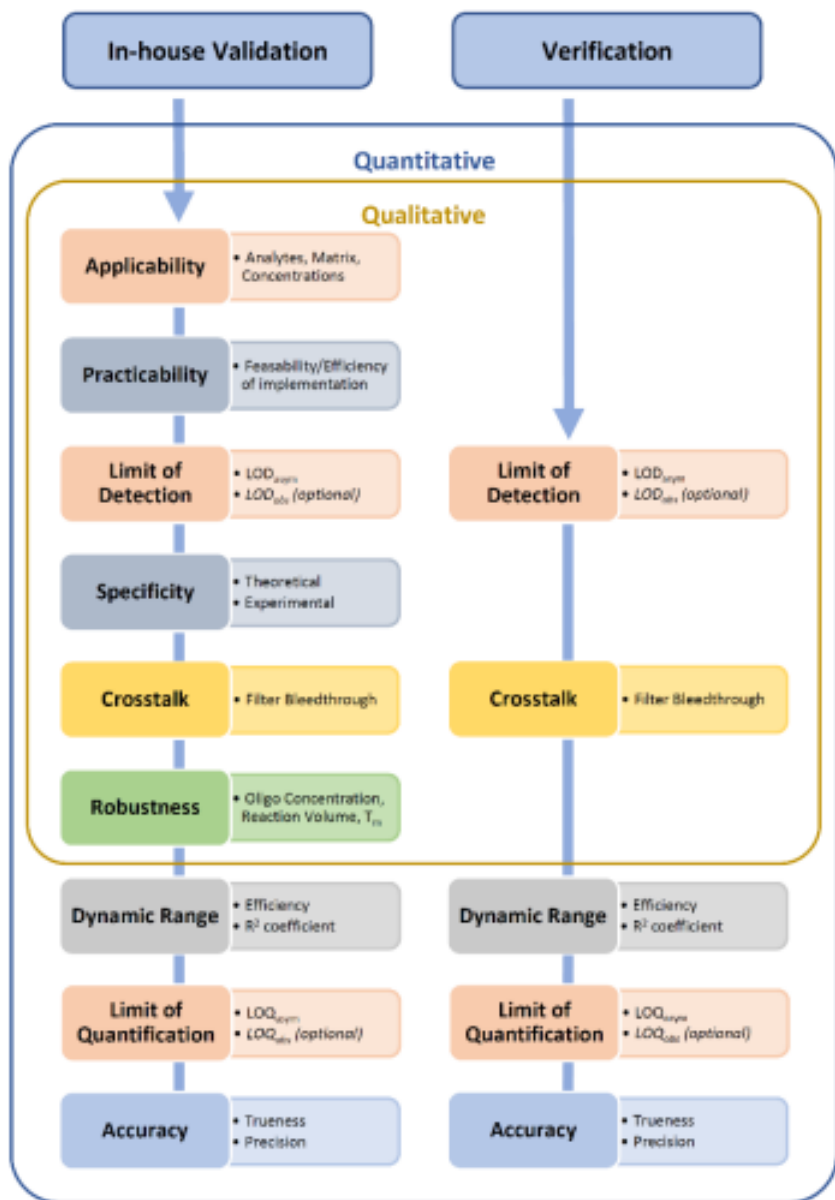
Guidance document on multiplex real-time PCR methods



European Network of GMO Laboratories
Grohmann L, Barbante A, Eriksson R, Gatto F, Georgieva T, Huber I, Hulín J, Köppl R, Marchesi U, Marzini L, Mazzara M, Narendja F, Owen H, Perri E, Scholtens I, Sovová T, Sowa S, Stehla D, Weiden C, Zbeňková K.

2021





Multiplex PCR Condition	Target sequence A (copies/reaction)	Target sequence B (copies/reaction)	Target sequence C (copies/reaction)
Test LOD_{asym} target A	10	2,500	2,500
Test LOD_{asym} target B	2,500	10	2,500
Test LOD_{asym} target C	2,500	2,500	10

Condition	Target sequence A (copies/reaction)	Target sequence B (copies/reaction)	Target sequence C (copies/reaction)	Target sequence D (copies/reaction)
Cross-talk A	0	20,000	20,000	20,000
Cross-talk B	20,000	0	20,000	20,000
Cross-talk C	20,000	20,000	0	20,000
Cross-talk D	20,000	20,000	20,000	0

Dziękuję za uwagę

Radzików
05-870 Błonie
tel. +48 22 733 45 00
NIP: 5290007029
REGON: 000079480
e-mail: postbox@ihar.edu.pl
www.ihar.edu.pl

Magdalena Żurawska-Zajfert

tel. 22 733 45 26 lub 22 733 45 00 wew. 319
e-mail: m.zurawska@ihar.edu.pl