



UNIVERSITE de LIEGE

Comment adéquatement déclarer valide ou non valide une méthode analytique ?

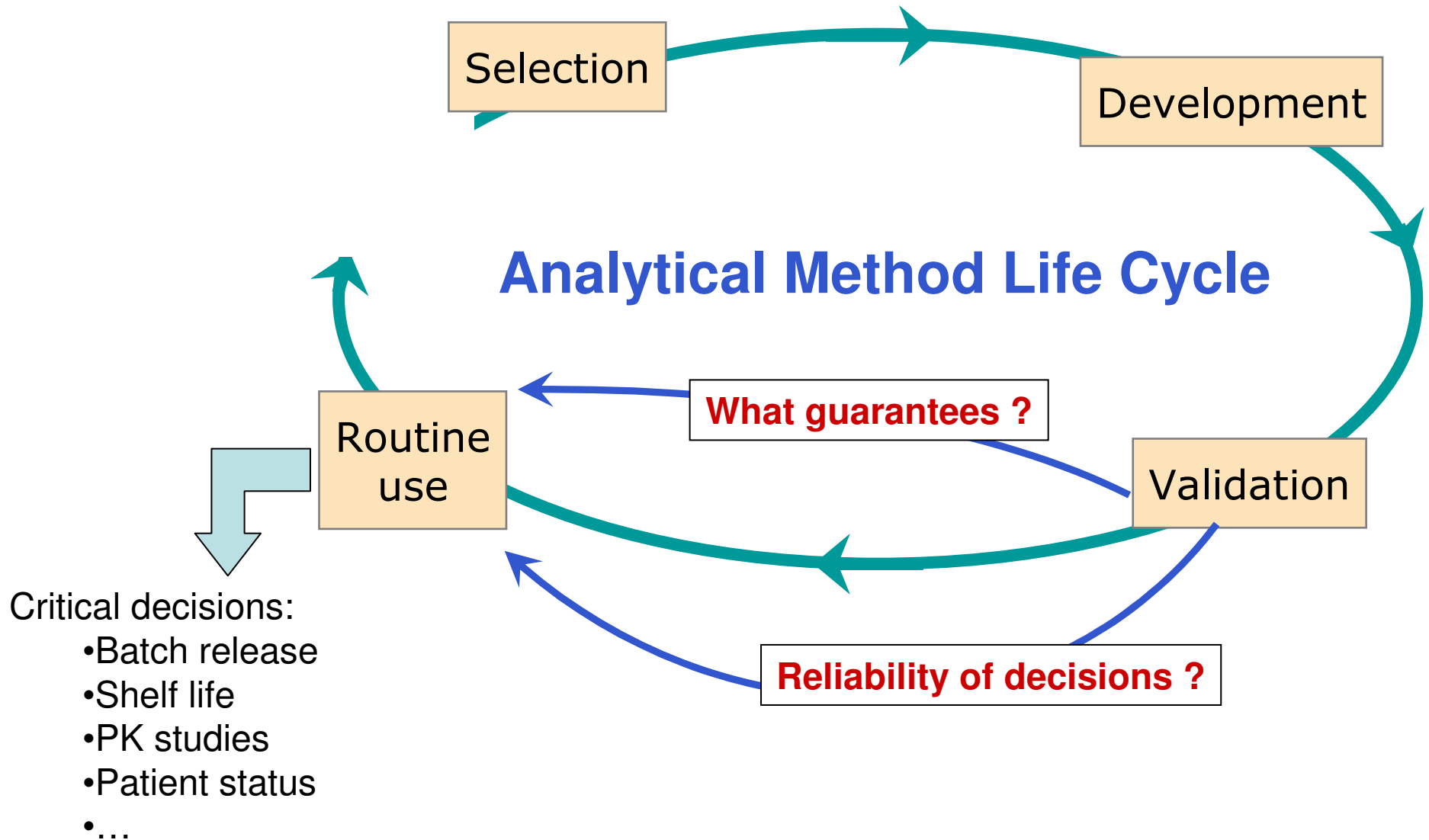
E. Rozet, Ph. Hubert



Montpellier

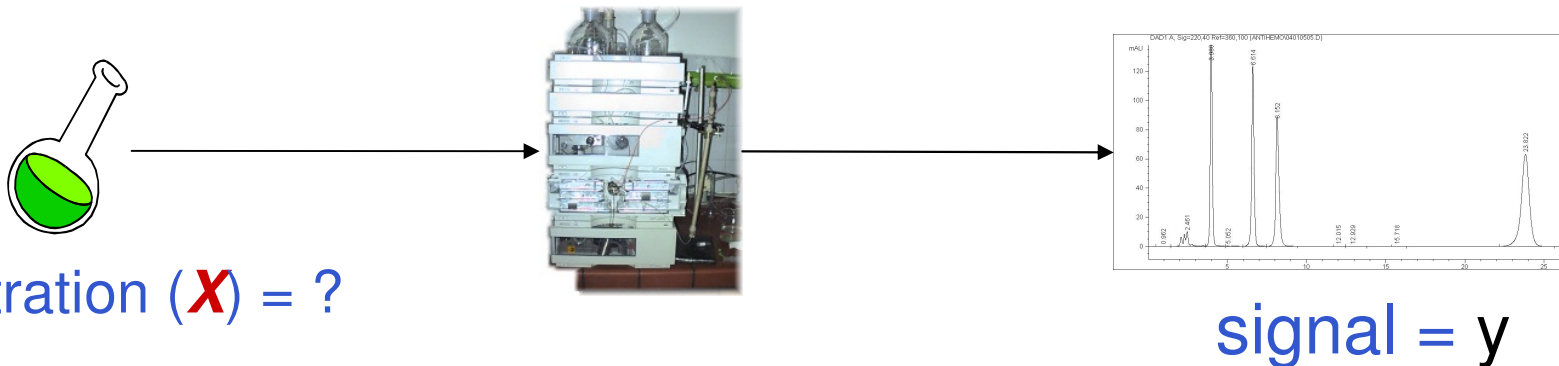
4 & 5 avril 2011

Objectif d'une méthode analytique

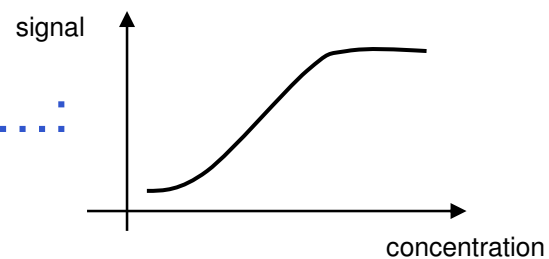


Méthode analytique

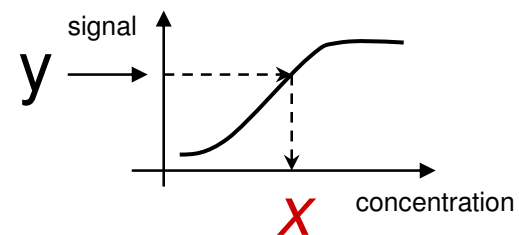
Pas de quantification directe !



Besoin d'une calibration...:



... pour obtenir la concentration (**X**):



Objectif d'une méthode analytique

L'objectif d'une méthode analytique quantitative est d'être capable de déterminer le plus **exactement** possible **chaque** quantité inconnue que le laboratoire devra quantifier.

$$X_i \leftrightarrow \mu_T$$

X_i = résultat mesuré

μ_T = vraie value inconnue

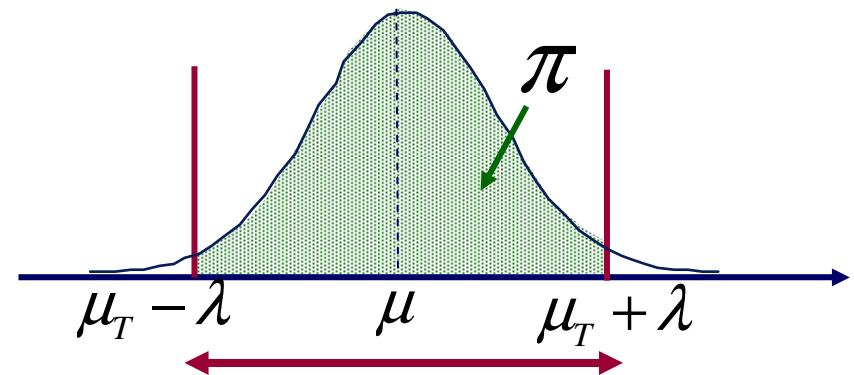
Objectif de la validation

Donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités des **garanties** que chaque future résultat qui sera obtenu en routine sera **suffisamment proche** de la vraie valeur inconnue de l'analyte dans l'échantillon.

$$\pi = P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \geq \pi_{\min}$$

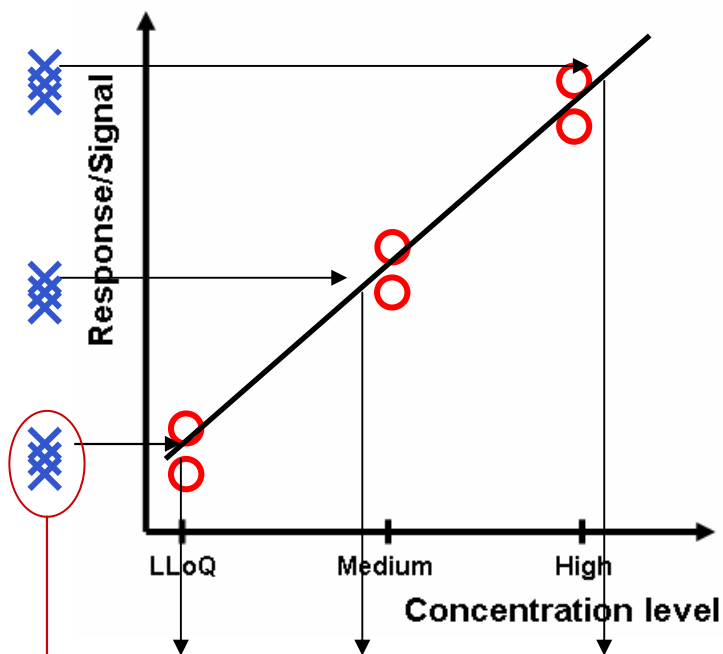
λ = Limite d'acceptation prédefinie

π_{\min} = proportion minimum de résultats inclus dans $\pm \lambda$



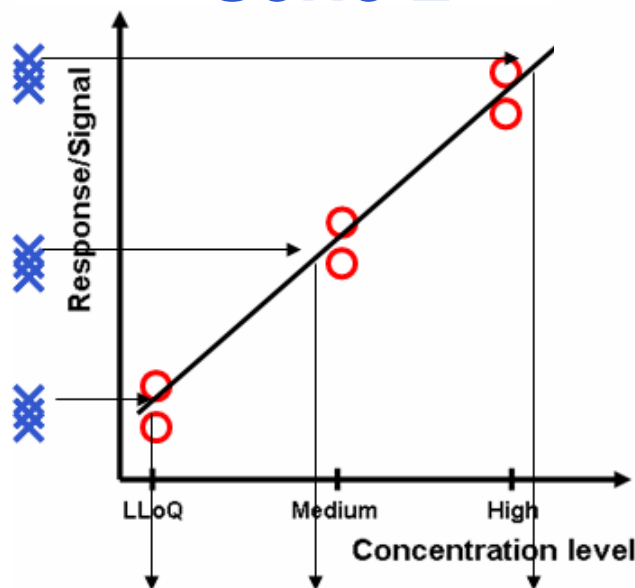
Design et modèle de validation

Série 1

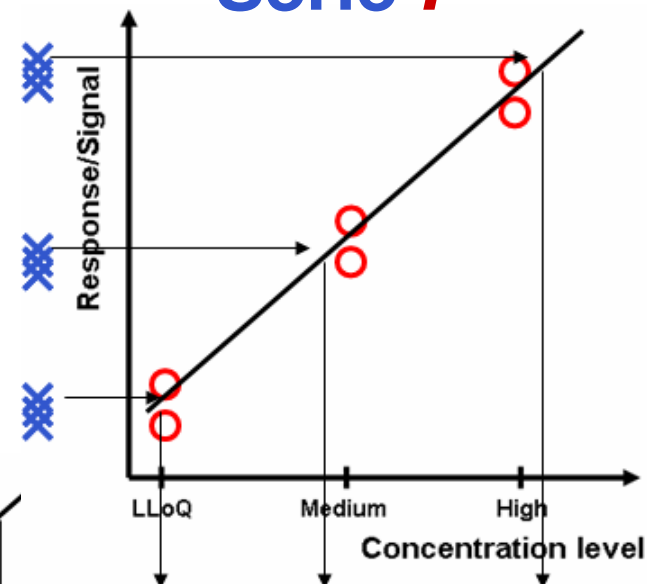


J répétitions

Série 2



Série I



○ Calibration standards
× Validation standards

Design et modèle de validation

- Pour chaque niveau de concentration des standards de validation le modèle est un modèle ANOVA aléatoire à un facteur:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}, \quad \alpha_i \sim iN(0, \sigma_\alpha^2), \quad \varepsilon_{ij} \sim iN(0, \sigma_\varepsilon^2)$$

$$\sigma_{I.P.}^2 = \sigma_\alpha^2 + \sigma_\varepsilon^2$$

- Pour chaque niveau de concentration des standards de validation nous avons donc les estimateurs suivant:

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J X_{ij} \quad \hat{\sigma}_{I.P.}^2 = \hat{\sigma}_\alpha^2 + \hat{\sigma}_\varepsilon^2 = \frac{1}{J} MSA + \left(1 - \frac{1}{J}\right) MSE$$

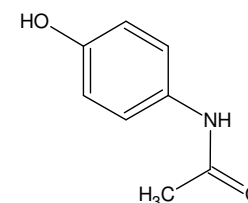
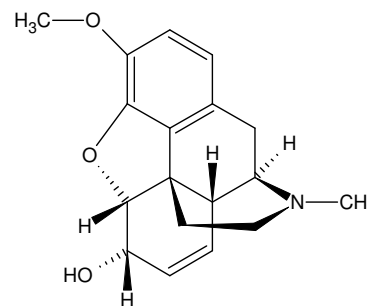
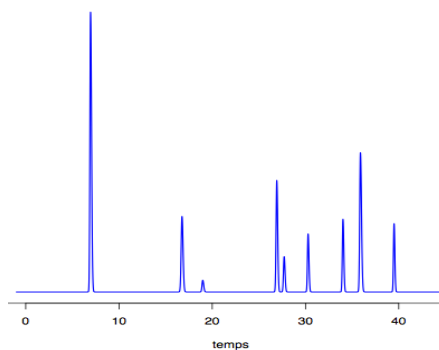
$$MSA = \frac{J}{I-1} \sum_{i=1}^I (\bar{X}_i - \bar{X})^2 \quad MSE = \frac{1}{I(J-1)} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$$

$$\hat{\delta} = 100 \frac{\bar{X} - \mu_T}{\mu_T}$$

$$CV_{I.P.} = 100 \frac{\hat{\sigma}_{I.P.}}{\bar{X}}$$

Exemple d'application

- Validation d'une méthode de dosage de la codéine et du paracétamol dans un produit pharmaceutique par HPLC-UV
- Design:
 - 3 séries,
 - 3 répétitions par série
 - 3 niveaux de concentration



Comment décider ?

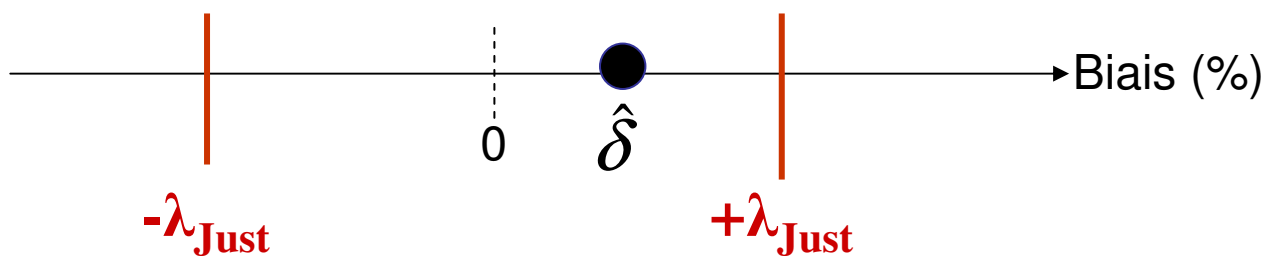
Approches conventionnelles:

Evaluation **distincte** des critères de **justesse** et de **fidélité** par rapport à des limites d'acceptation (λ) fixées a priori.

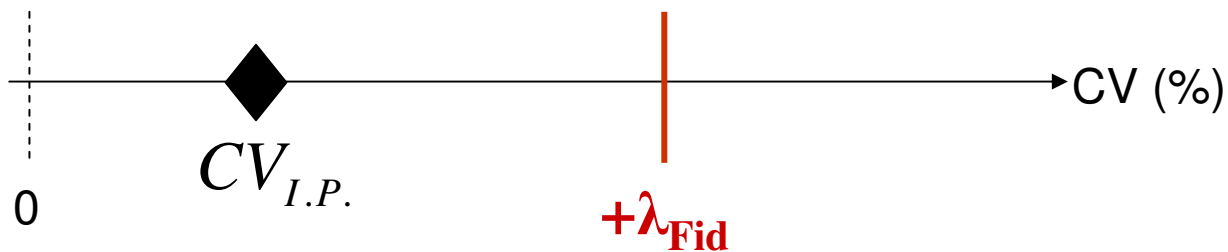
- Descriptive:
 - **justesse**: basée sur l'estimation du *biais* uniquement;
 - **fidélité**: basée sur l'estimation du $CV_{I.P.}$ uniquement.
- Différence:
 - **justesse**: basée sur un test de signification bilatéral de Student pour le *biais* uniquement.
- Equivalence:
 - **justesse**: basée sur un intervalle de confiance du *biais*;
 - **fidélité**: basée sur un intervalle de confiance de la variance de fidélité intermédiaire.

Approche descriptive

Justesse:



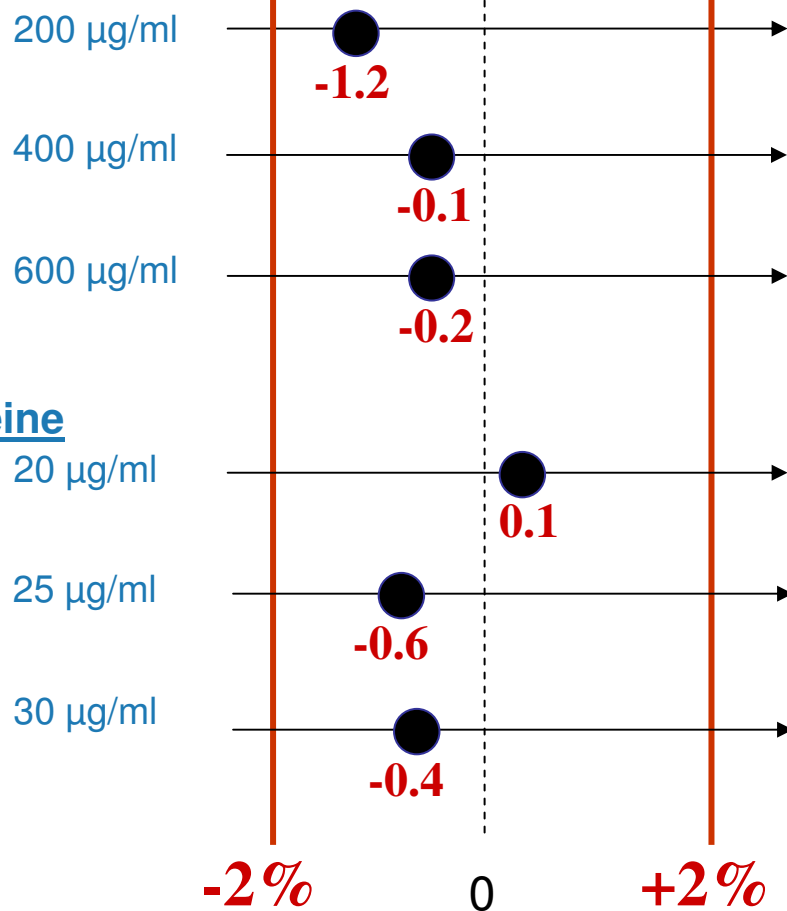
Fidélité:



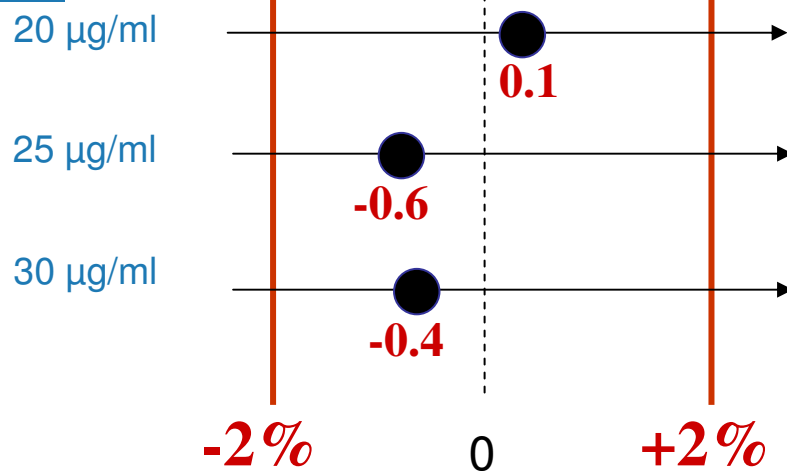
Exemple d'application

Justesse

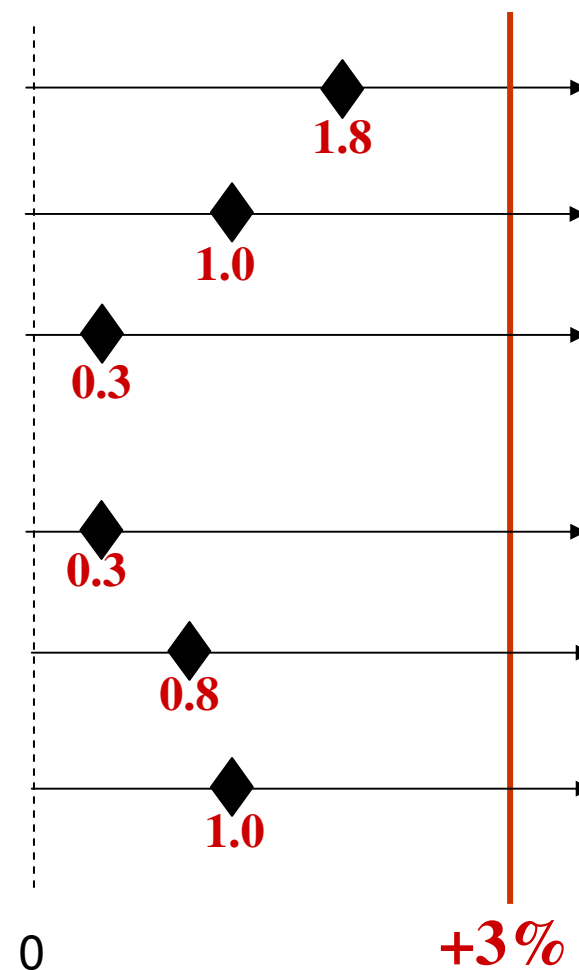
Paracetamol



Codéine

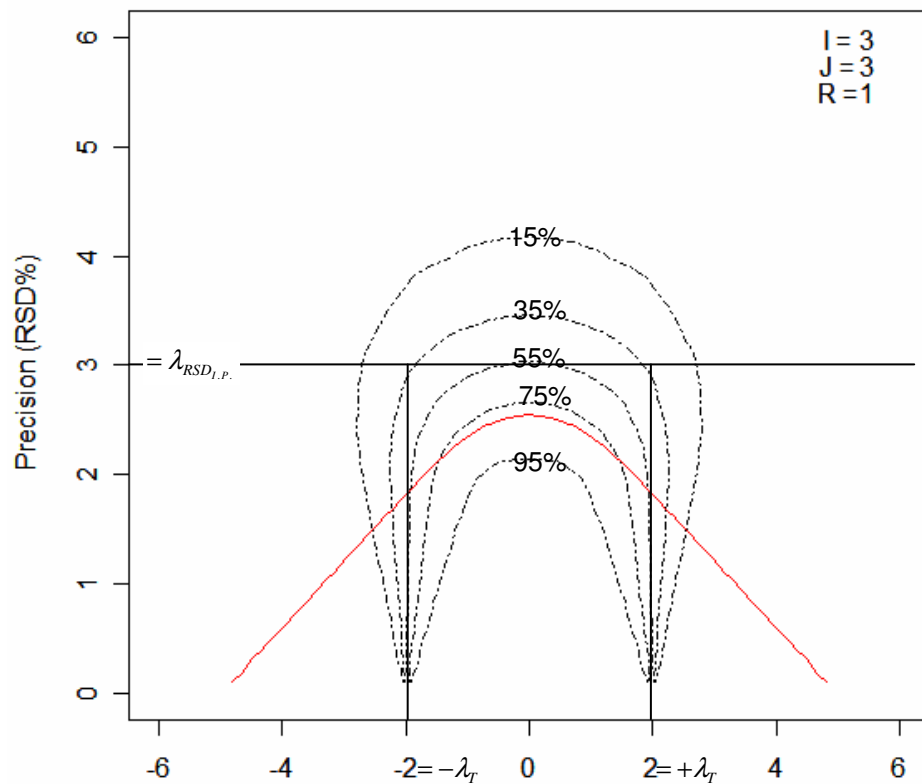


Fidélité

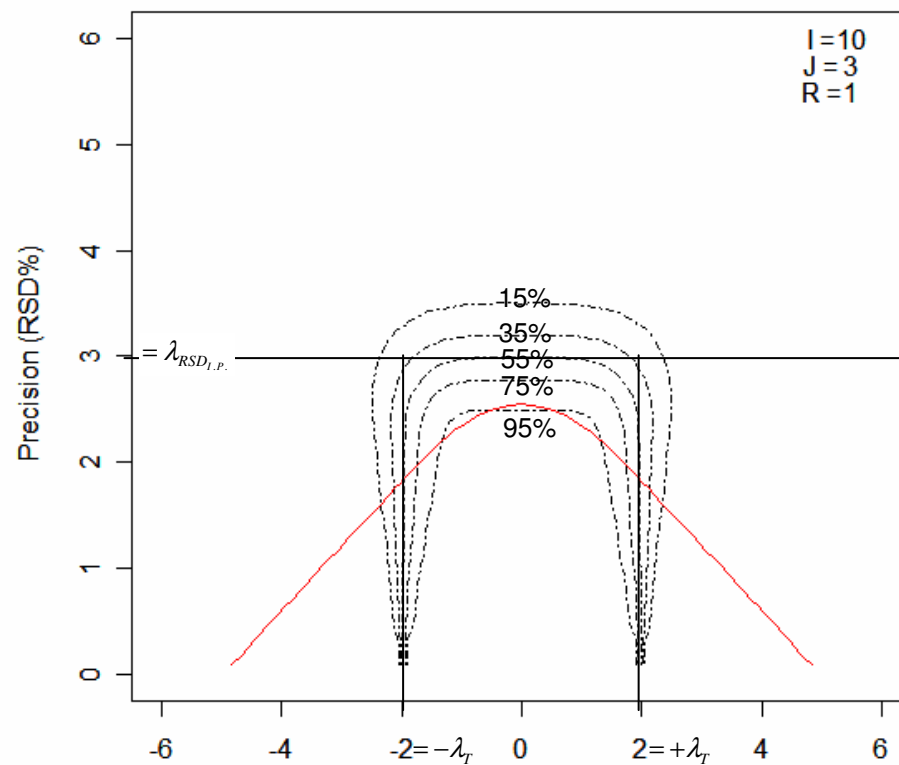


Descriptive: performance globale

Descriptive approach



Descriptive approach



$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{with} \quad \alpha_i \sim iN(0, \sigma_\alpha^2), \quad \varepsilon_{ij} \sim iN(0, \sigma_\varepsilon^2) \quad \text{and} \quad R = \sigma_\alpha^2 / \sigma_\varepsilon^2$$

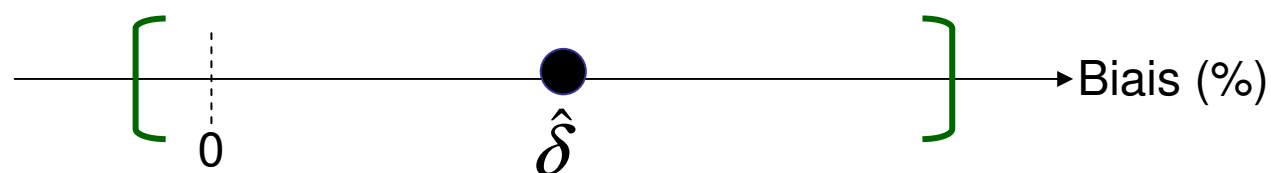
$$\lambda_{Just} = \pm 2\%$$

$$\lambda_{Fid} = 3\%$$

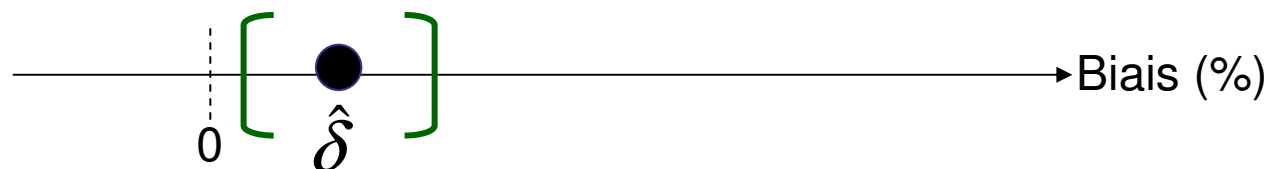
Approche différence

$$H_0 : \delta = 0$$

$$H_1 : \delta \neq 0$$

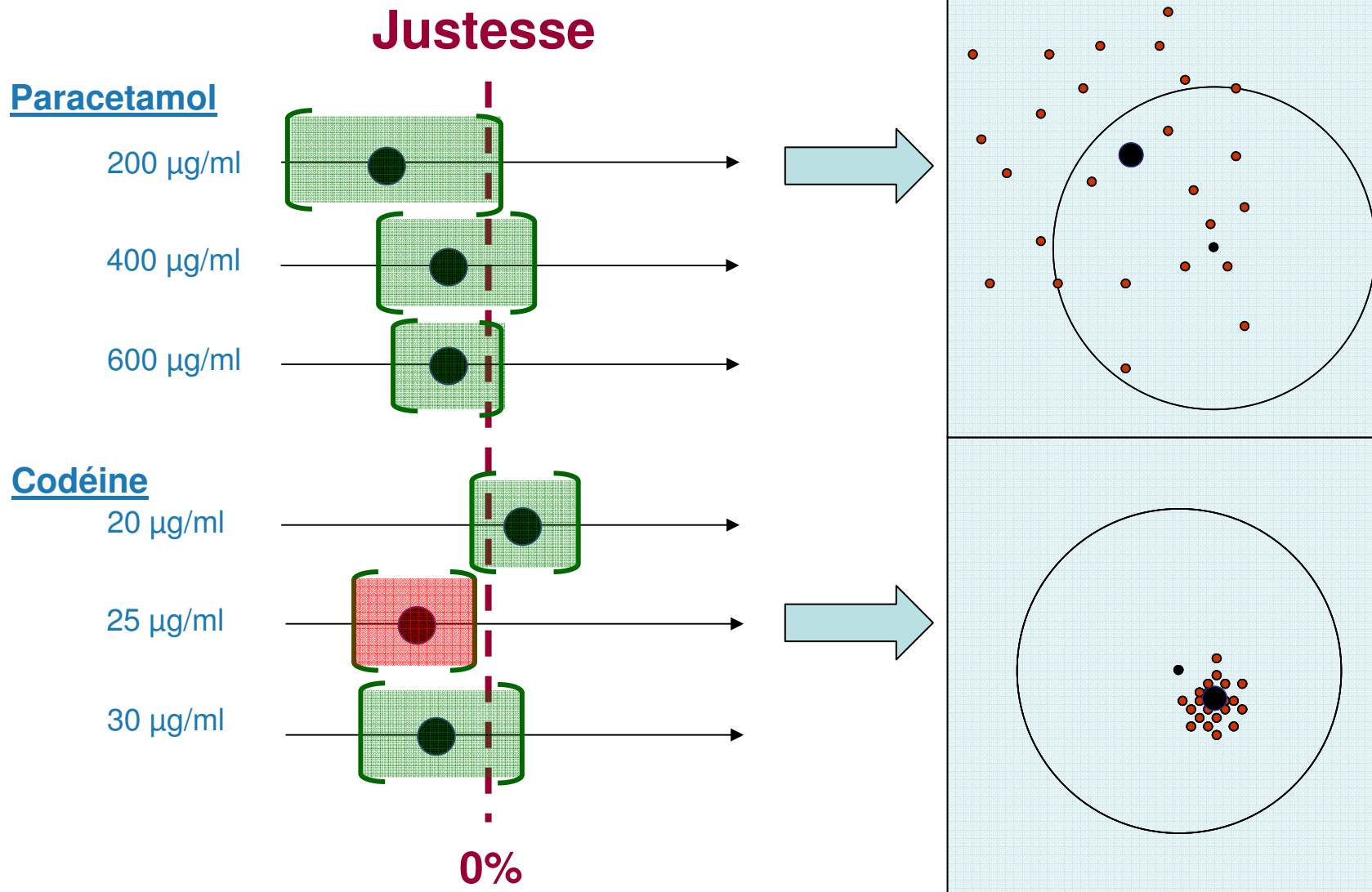


Non rejet de $H_0 \rightarrow$ Méthode **valide** !?



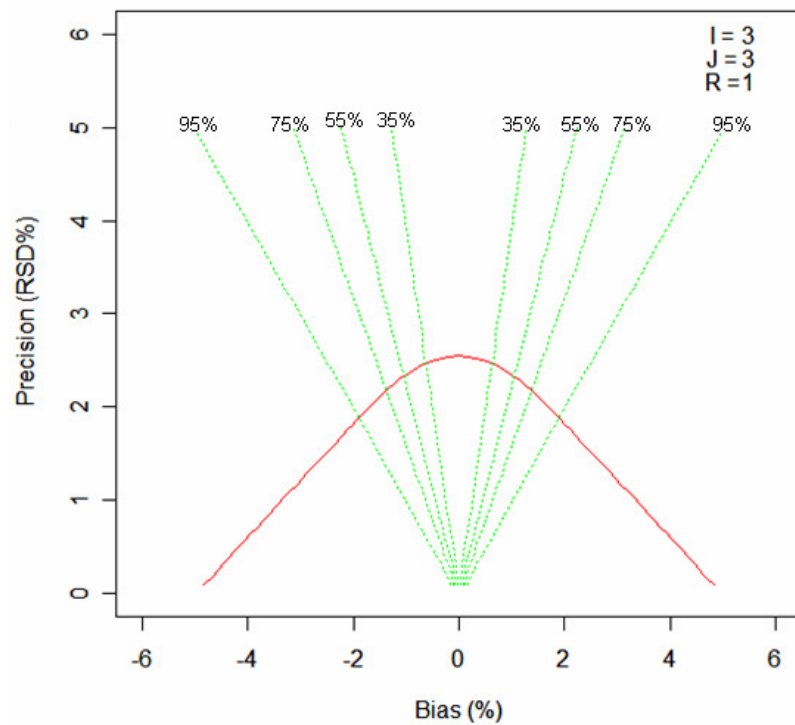
Rejet de $H_0 \rightarrow$ Méthode **non valide** !?

Exemple d'application

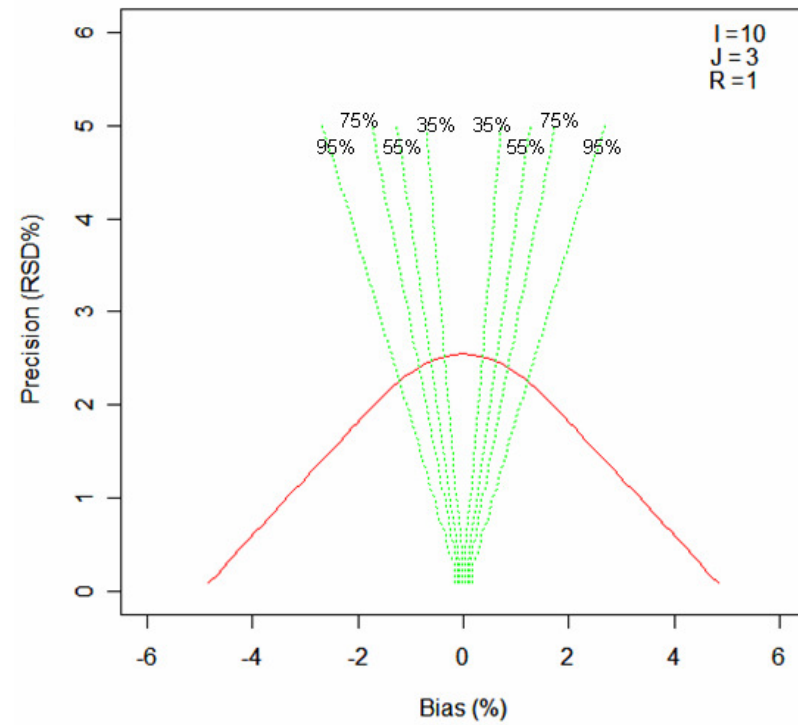


Différence: performance globale

Difference approach



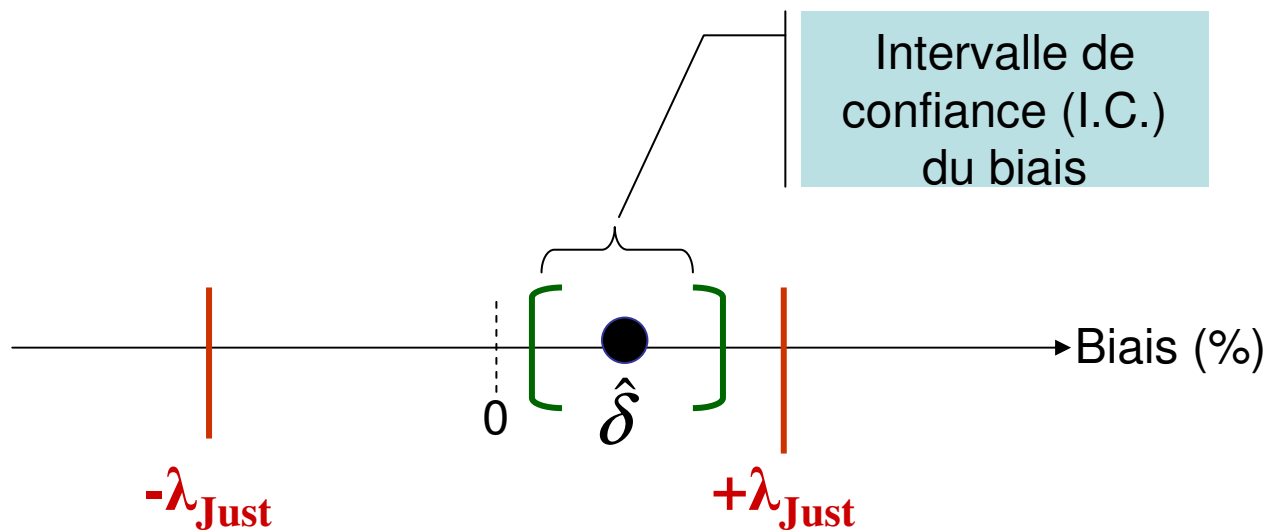
Difference approach



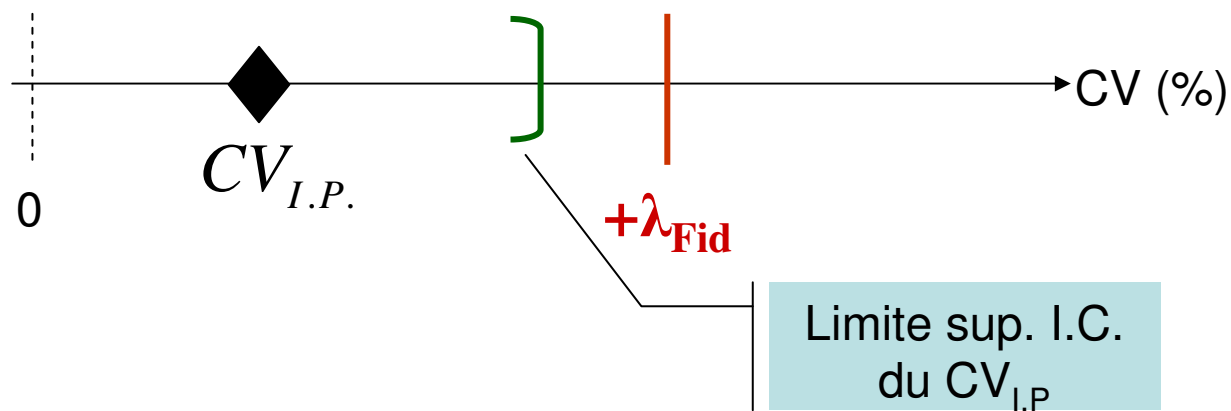
$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{with} \quad \alpha_i \sim iN(0, \sigma_\alpha^2), \quad \varepsilon_{ij} \sim iN(0, \sigma_\varepsilon^2) \quad \text{and} \quad R = \sigma_\alpha^2 / \sigma_\varepsilon^2$$

Approche équivalence

Justesse:



Fidélité:



Approche équivalence

- L'intervalle de confiance du **biais** est donné par :

$$\left[(\hat{\mu}_1 - \mu_T) - t_{(ddl, \alpha)} \hat{\sigma}_{\mu_1 - \mu_T} ; (\hat{\mu}_1 - \mu_T) + t_{(ddl, \alpha)} \hat{\sigma}_{\mu_1 - \mu_T} \right]$$

$$\hat{\sigma}_{\mu_1 - \mu_T}^2 = \left(\frac{\hat{\sigma}_B^2}{I} + \frac{\hat{\sigma}_W^2}{IJ} \right)$$

$$ddl = IJ - 1$$

- La limite supérieur (L_S) de l'intervalle de confiance du **CV_{I.P.}** est donné par :

Si $MSE < MSA$, alors $L_{S, \hat{\sigma}_{I.P.}^2} = \hat{\sigma}_{I.P.}^2 + \sqrt{\left(\frac{I-1}{\chi_{\alpha, I-1}^2} - 1 \right) \left(\frac{MSA}{J} \right)^2 + \left(\frac{IJ-I}{\chi_{\alpha, IJ-I}^2} - 1 \right) \left(1 - \frac{1}{J} \right)^2 MSE^2}$

Sinon $L_{S, \hat{\sigma}_{I.P.}^2} = \frac{(IJ-1)\hat{\sigma}_{I.P.}^2}{\chi_{\alpha, IJ-1}^2}$

$$L_{S, CV_{I.P.}} = 100 \frac{\sqrt{L_{S, \hat{\sigma}_{I.P.}^2}}}{\bar{X}}$$

Exemple d'application

Justesse

Paracetamol

200 µg/ml

400 µg/ml

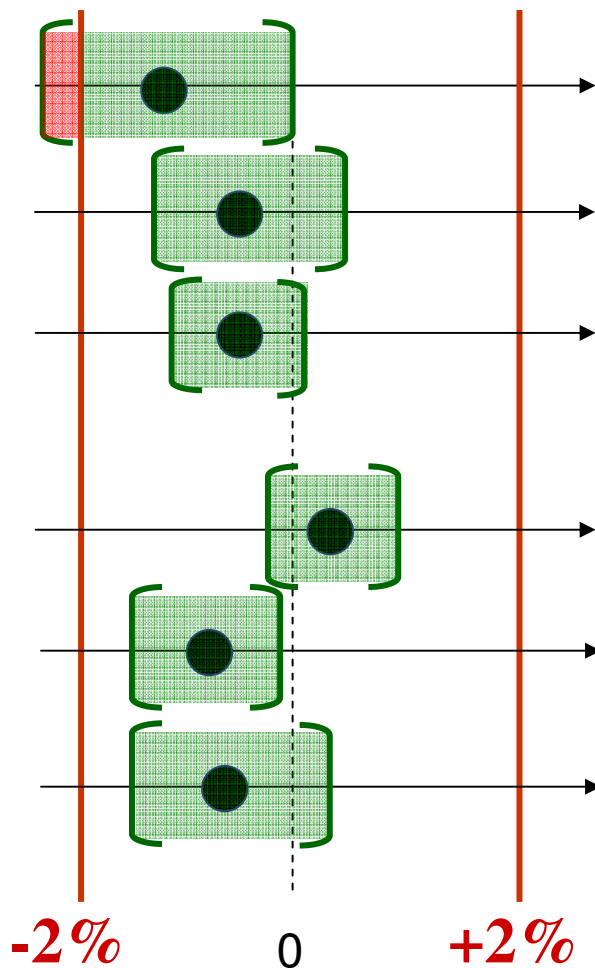
600 µg/ml

Codéine

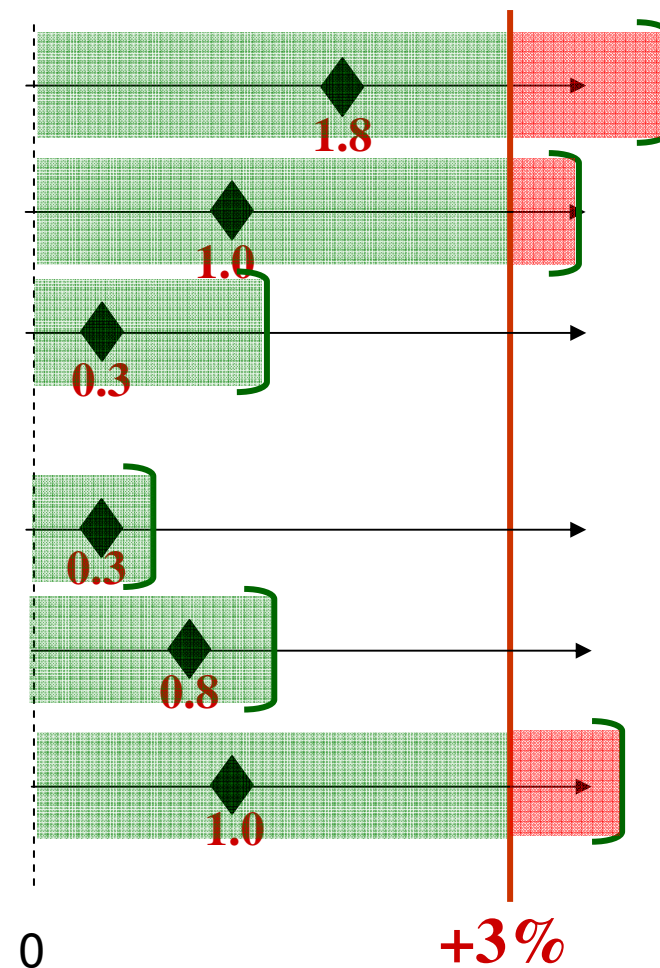
20 µg/ml

25 µg/ml

30 µg/ml

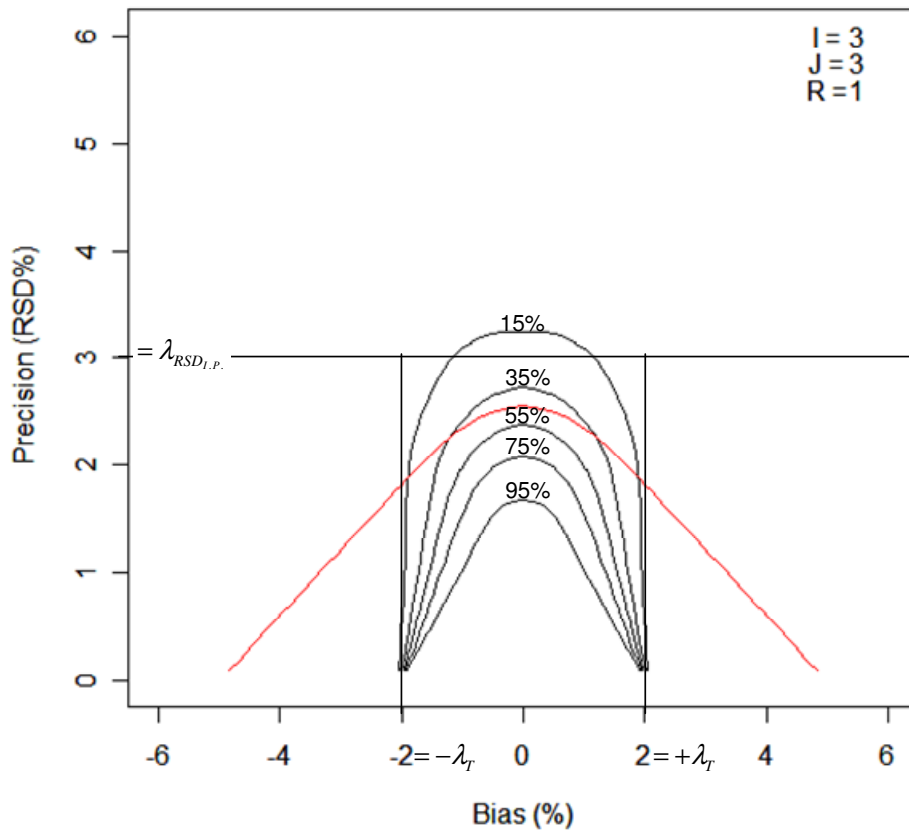


Fidélité

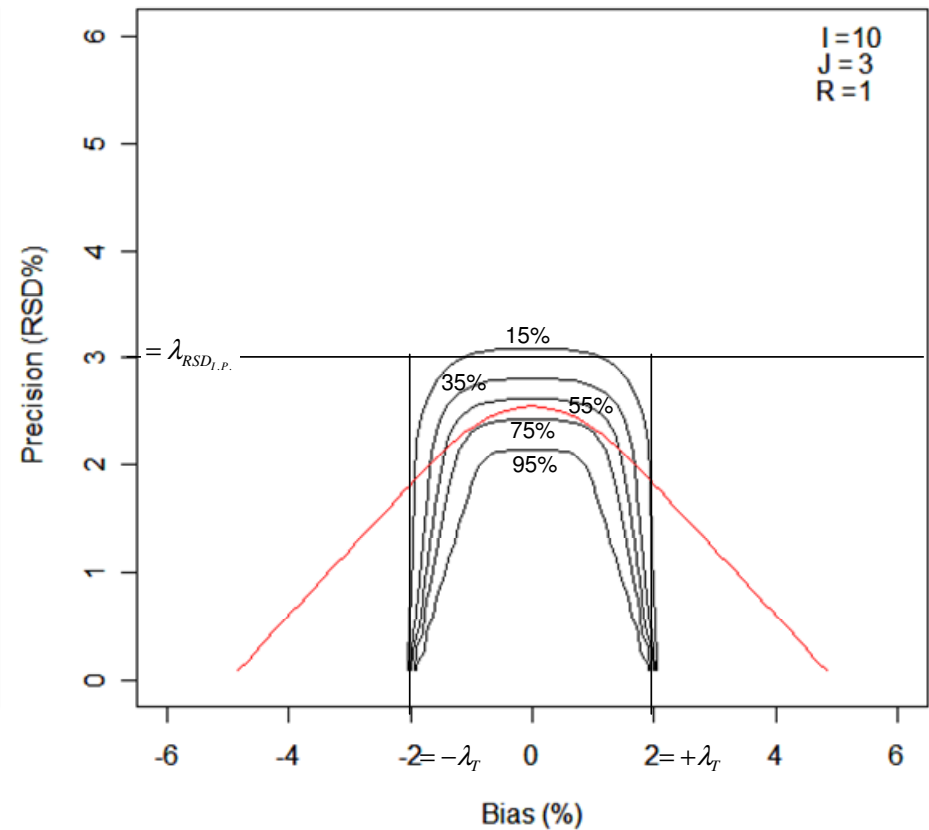


Equivalence: performance globale

Equivalence approach



Equivalence approach



$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{with} \quad \alpha_i \sim iN(0, \sigma_\alpha^2), \quad \varepsilon_{ij} \sim iN(0, \sigma_\varepsilon^2) \quad \text{and} \quad R = \sigma_\alpha^2 / \sigma_\varepsilon^2$$

$$\lambda_{Just} = \pm 2\%$$

$$\lambda_{Fid} = 3\%$$

Comment décider ?

L'objectif de la validation est d'évaluer la probabilité que chaque futur résultat soit dans les limites d'acceptation.

→ Basé sur les estimations du biais et du $CV_{I.P.}$.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Comment décider ?

L'objectif de la validation est d'évaluer la **probabilité que chaque futur résultat** soit dans les limites d'acceptation.

→ Basé sur les estimations du biais et du $CV_{I.P.}$.

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \middle| \hat{\delta}, \hat{\sigma} \right\} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude requise
de chaque futur
résultat

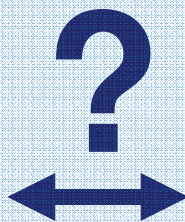
Comment décider ?

L'objectif de la validation est d'évaluer la **probabilité que chaque futur résultat** soit dans les limites d'acceptation.

→ Basé sur les **estimations du biais et du $CV_{I.P.}$** .

$$E_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \left\{ P \left[|X_i - \mu_T| < \lambda \right] \right\}_{\hat{\delta}, \hat{\sigma}} \geq \pi_{\min}$$

Exactitude requise
de chaque futur
résultat



Estimateurs des **performances**
de la méthode obtenu en
phase de **validation**

Missing Link

Résumé des objectifs

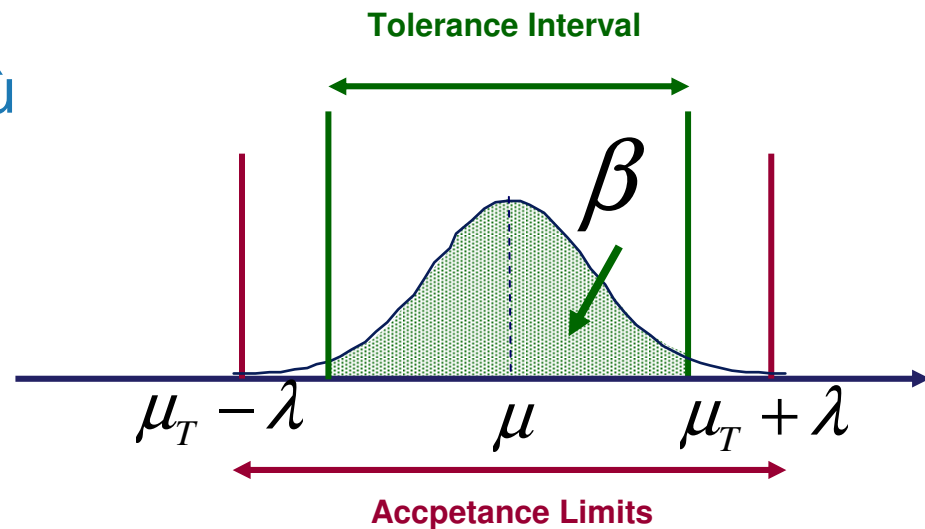
Objectifs

- Chaque futur résultat / pas les résultats passés.
- Futurs résultats / pas les performances de la méthode analytique.
- Les performances passées de la méthode sont insuffisants pour prendre une décision même s'ils fournissent des informations sur cette méthode.
- **Comment prendre une décision basée sur la qualité des futurs résultats ?**

Comment décider ?

β -Expectation Tolerance Interval (β TI)

Permettent de prédire où chaque futur résultat va se trouver (*Wald, 1942*).



→ Si le β -expectation tolerance interval est inclus dans les limites d'acceptation (λ), alors la **probabilité que chaque futur résultat tombe dans les limites d'acceptation (λ) est d'au moins β** (ex. 80%).

Design et modèle de validation

- Pour un model ANOVA aléatoire balancé à un facteur, un β -expectation tolerance interval adéquat est (Mee, 1984):

$$\left[\hat{\mu} - t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)} \hat{\sigma}_{Tol} ; \hat{\mu} + t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)} \hat{\sigma}_{Tol} \right]$$

$$\text{avec } \hat{\sigma}_{Tol} = \sqrt{1 + \frac{J \frac{\hat{\sigma}_\alpha^2}{\hat{\sigma}_\varepsilon^2} + 1}{IJ \left(\frac{\hat{\sigma}_\alpha^2}{\hat{\sigma}^2} + 1 \right)}} \hat{\sigma}_{I.P.}$$

- En relatif:

$$\left[\hat{\delta} - t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)} CV_{Tol} ; \hat{\delta} + t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)} CV_{Tol} \right]$$

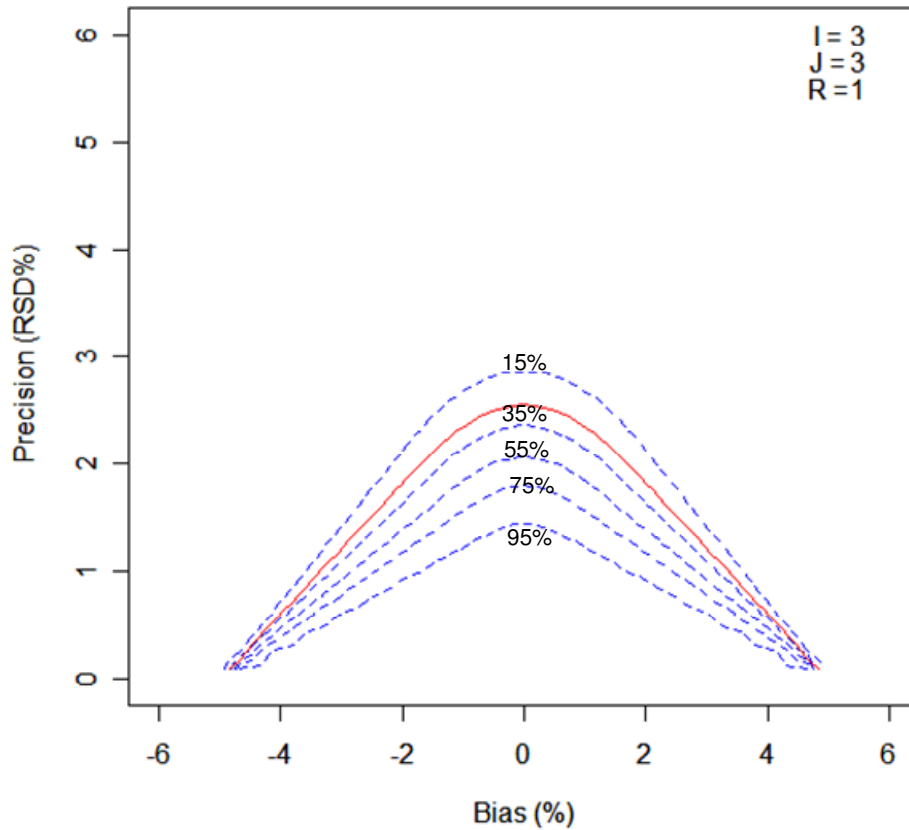
$$\hat{\delta} = 100 \frac{\bar{X} - \mu_T}{\mu_T}$$

$$CV_{Tol} = 100 \frac{\hat{\sigma}_{Tol}}{\bar{X}}$$

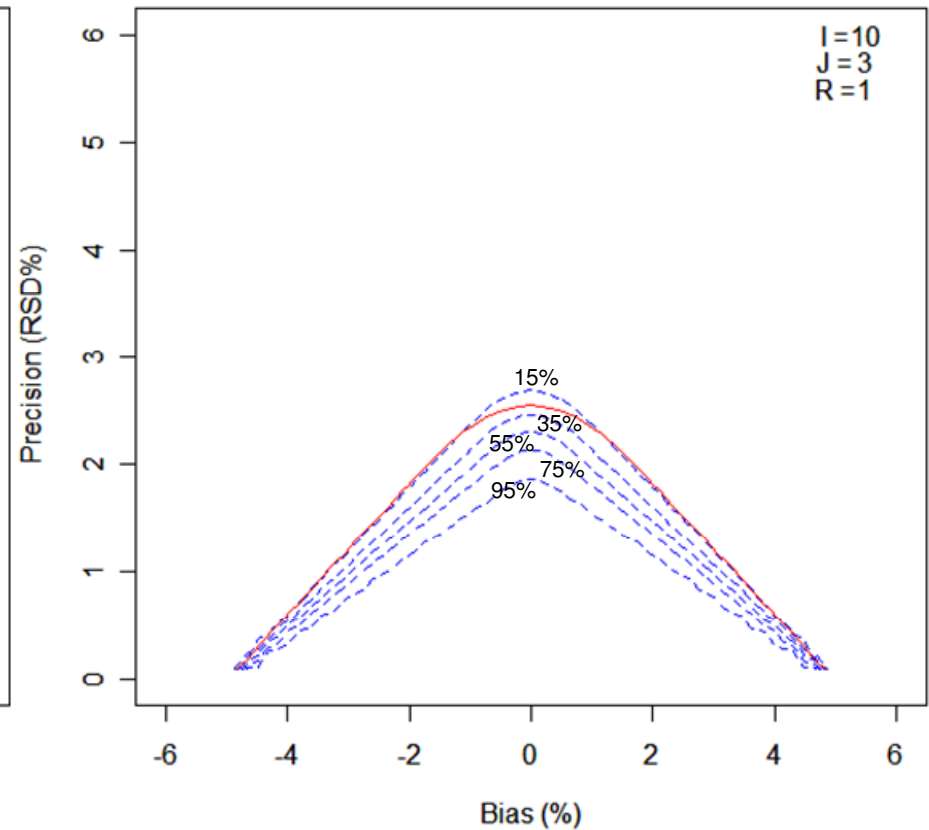
ν : ddl de Satterthwaite

β TI : performance globale

Tolerance Interval approach



Tolerance Interval approach



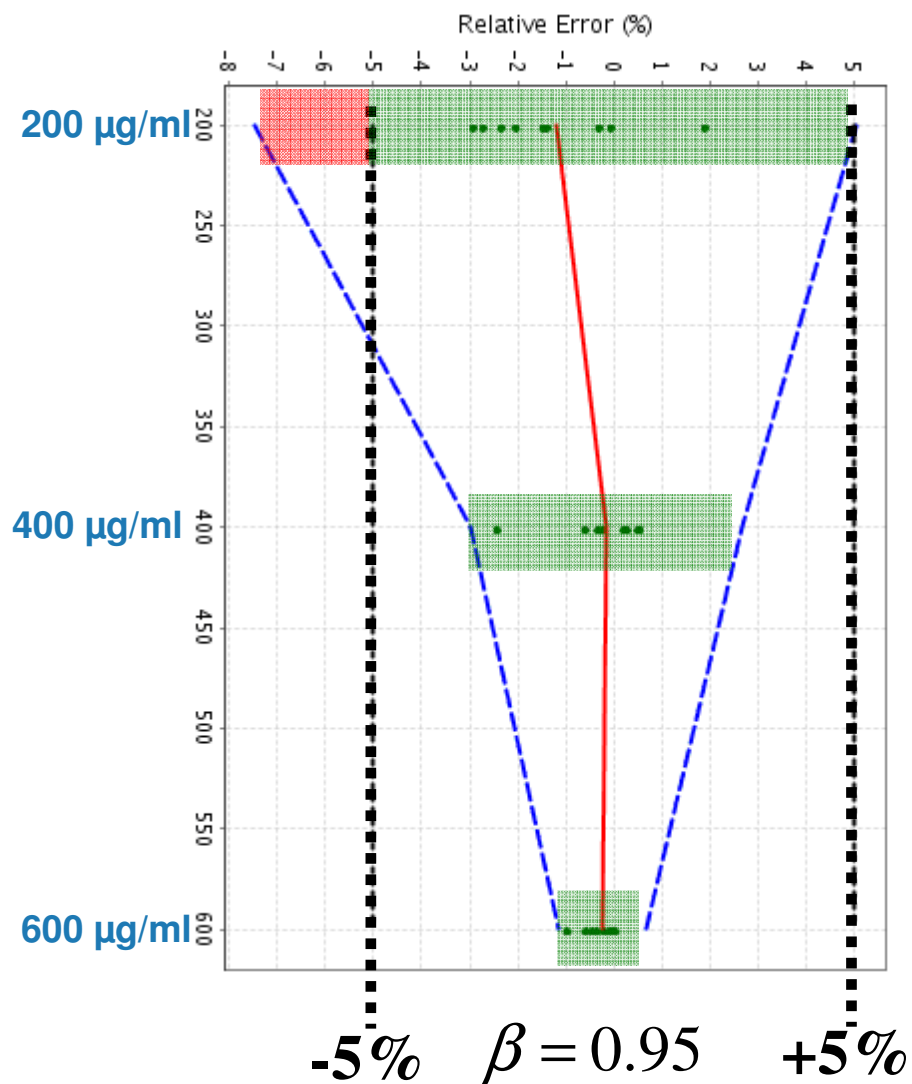
$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{with} \quad \alpha_i \sim iN(0, \sigma_\alpha^2), \quad \varepsilon_{ij} \sim iN(0, \sigma_\varepsilon^2) \quad \text{and} \quad R = \sigma_\alpha^2 / \sigma_\varepsilon^2$$

$$\lambda = \pm 5\%$$

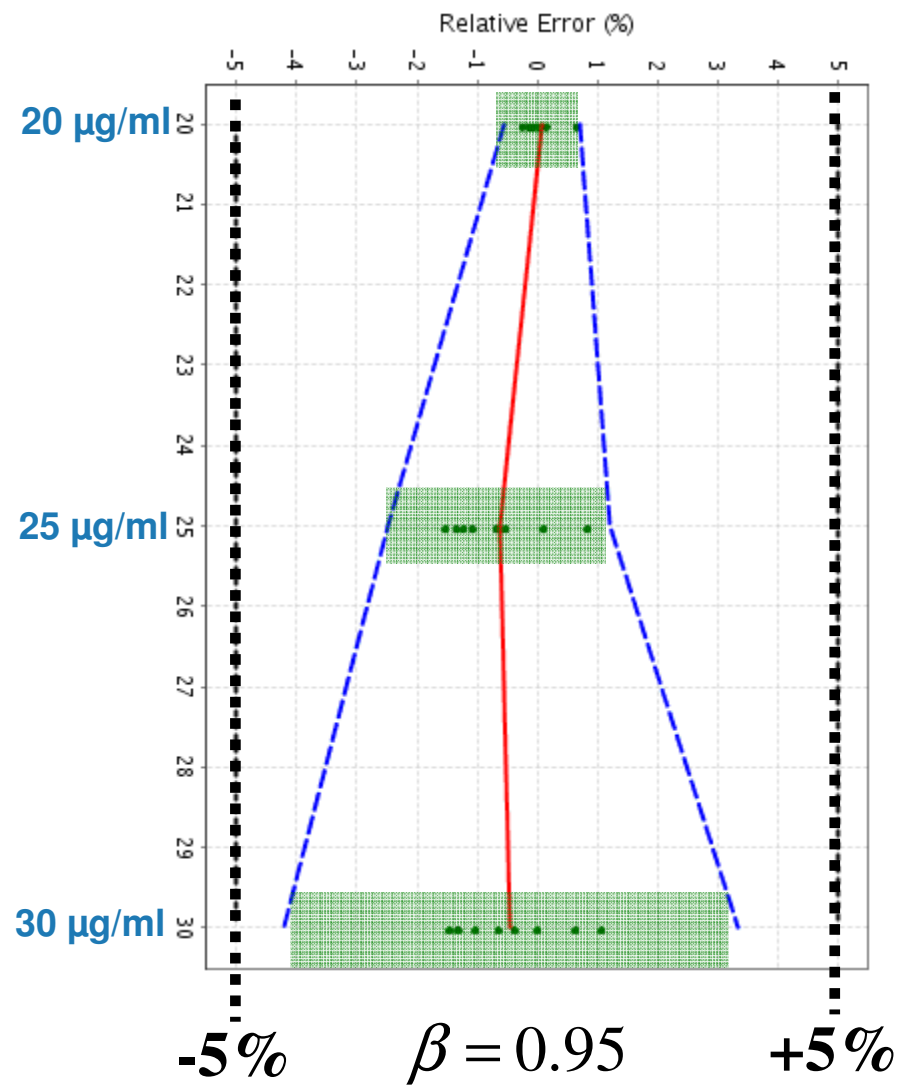
$$\beta = 0.95$$

Exemple d'application

Paracetamol



Codéine



Conclusions

- La **qualité des futurs résultats** ($\approx \pi$) doit être l'objectif et non pas les performances de la méthode analytique.
- Les **β -expectation tolerance interval** permettent d'atteindre cet objectif.
- De cette manière, les **risques** sont mieux connus à l'issue de la validation de la méthode.
- Méthodologie de décision **applicable pour tout type** de méthode analytique quantitative (chromatos, électrophorèses, spectros, ELISA, qPCR, ...)

Merci pour votre attention

- Check our publications at:

<http://orbi.ulg.ac.be/>



Search key words: « Philippe Hubert »

