Modelli di Validazione per dati Qualitativi

Silvia Orlandini (AEOS) sil.orlandini@outlook.it
Eugenio Traini (AEOS) eugeniotraini@gmail.com

Analytica, Roma 21-22 Marzo 2019

Outline

- Introduzione
- Schema sperimentale
  - Omogeneitá dei batches
  - Definizione del CCß
  - Curva dose risposta
  - Selettivitá
  - Ring Test
- Calcolo precisione
  - Ripetibilitá
  - Riproducibilítá intralaboratorio

Introduzione:Oggetto Validazione (1)

BRT Inhibitor Test
BRT MRL Screening Test
BRT hi-sense

- ISO 13969 IDF 183 Milk and Milk products –
Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor tests
- ISO 18330 IDF 188 Milk and milk products –
Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues
- COMMISSION DECISION C1 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the Interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044) (Text with EEA relevance) **(2002/657/EC)** OJ L 221, 17.8.2002, p. 8
- COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLs) 20/1/2010 –
Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer)
- **ISO/IDF Draft Guideline milk screening test validation**
- AOAC Binary Data Interlaboratory Study Workbook Version 2.3
- ISO 16393.2019/TS Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods
- ISO/WD 5725-3 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Alternative designs for accuracy studies

Introduzione:Oggetto Validazione (2)

https://www.aim-bayern.de/html/e_km_validierungs_zertifikat.html

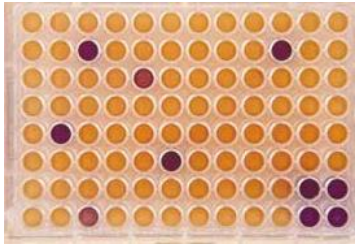
https://www.nmkl.org/index.php/nb/nordval

1 Marzo 2019

BRT Inhibitor Test	**Nordval No. 051**
BRT MRL Screening Test	**Nordval No. 052**
BRT–hi-sense	**Nordval No. 053**

Principio analitico

test qualitativo basato sulla risposta microbiologica



- - + ++ +++ +++

Campione negativo

Campione non completamente negativo

Campione positivo

Principio del metodo si basa sulla crescita del batterio (*Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis* C953) e sul cambiamento di colore del media a seguito di una reazione redox dell'indicatore.
Se il batterio cresce il media cambia colore da blu a giallo indicando che non c'é presenza di sostanze inibenti (Giallo) oppure il media rimane blu perché il batterio non cresce indicando la presenza di sostanze inibenti (Blu)

Campioni utilizzati per la validazione

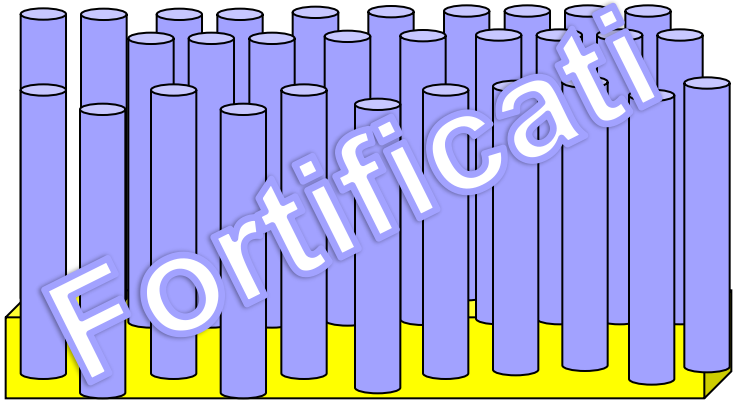
- Un campione composto da diverse masse testate con 6 diversi kit microbiologici e 4 receptor test al fine di escludere la presenza di residui nella categoria di

30 diversi Antibiotici

- Pennicilline
- Cefalosporine
- Macrolidi
- Sulfonamidi
- Tetracicline
- Aminoglicosidi
- Fenicoli
- Penncillinasi

Negativo

Congelato



Preparazione 6 diluizioni per ogni antibiotico (abx)

Numero di ripetizioni per ogni abx

Closeness to MRL	No. of Replicates
≤0.5 MRL	20
>0.5 MRL and <0.9 MRL	40
≥0.9 MRL and ≤ MRL	60
> MRL	20

n=20 exp CCß< 0,5MRL

Exp.CCß 2 ppb

20 replicates

MRL=4 ppb

n=60 exp CCß >0,9 MRL

Exp.CCß 3,6 ppb

60 replicates

MRL= 4 ppb

Sistemi di Lettura

Visivo

(3 tecnici)

Fotometrico

(2 fotometri)

Dati Qualitativi

Visivo

(3 tecnici)

Positivo = 1
Negativo = 0
Non completamente negativo = 2

Fotometrico

(2 fotometri)

Secondo Beer and Suhren 1993.
Utilizzando come lunghezze d'onda per la misura
420 nm e 620 nm come riferimento
Il rapporto del valore misurato con il valore medio dei controlli positi e negativi
X% = 100* (S-NC)/(PC-NC) PC=100%
NC=0%

Assorbimento <40% campione Negativo

40% < Assorbimento relativo < 65 % = 2 = Non completamente negativo

Assorbimento > 65 % Campione positivo

No. Risultati ottenuti

- 3 Kits (6 differenti lotti di piastre per ogni kit)
- 5 serie di risultati per i sistemi di lettura
- 30 Abx in 7 diluizioni ognuno

Kit	N. Risultati	N. Piastre
BRT Inhibitor Test	60.340	154
BRT MRL- Screening Test	56.798	142
BRT hi-Sense	64.400	161
Totale	**181.538**	**457**

Dati elaborati con R

R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing.
R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

Omogeneitá dei batches (1)

Sono stati utilizzati i risultati fotometrici poiché presentavano una migliore ripetibilitá

É stato applicato il test esatto di Fisher alla concentrazione CCßA perché piú preciso del test Chi Quadro

Sono state create tabelle di contingenza batches/Fotometrico 1 e batches/Fotometrico 2

Il test non é stato applicato agli abx per quali il CCßA non é stato determinato

H_0 = non ci sono differenze tra batches

Per un livello di significativitá $\alpha = 0.05$ and the p-value <0.05 l'ipotesi nulla é rifiutata e significa che c'é la probabilitá di differenze tra batches alla concentrazione CCß A

Omogeneitá dei batches (2)

			BRT		MRL		hi-sense	
Nr.	Abx	MRL	p value		p value		p value	
			ELISA 1	ELISA 2	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 1	ELISA 2
1	Benzylpenicillin	4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	Ampicillin	4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3	Amoxicillin	4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	Cloxacillin	30	0,33	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5	Dicloxacillin	30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6	Nafcillin	30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
7	Oxacillin	30	0,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	Cefalexin	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	Cefapirin	60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	Cefoperazon	50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	Cefazolin	50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
12	Cefquinom	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
13	Ceftiofur	100	0,11	0,11	1,00	1,00	1,00	1,00
14	Cefalonium	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
15	Erythromycin	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
16	Tylosin	50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
17	Sulfadiazine*	100			0,11	0,11	1,00	1,00
18	Sulfadimethoxin*	100			0,11	0,33	1,00	1,00
19	Sulfadimidin/-methazin*	100	1,00	1,00			1,00	1,00
20	Sulfathiazol*	100	1,00	0,06	1,00	1,00	0,06	1,00
21	Sulfadoxin	100			1,00	1,00	1,00	1,00
22	Sulfamethoxypyridazin	100	1,00	1,00	1,00	1,00	0,06	0,25
23	Chlortetracyclin	100			1,00	1,00	1,00	1,00
24	Oxytetracyclin*	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
25	Tetracyclin*	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
26	Dihydrostreptomycin	200	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
27	Streptomycin	200	1,00	1,00	1,00	1,00	0,11	0,11
28	Gentamicin	100	1,00	1,00	0,11	0,33	1,00	1,00
29	Neomycin	1500	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30	Chloramphenicol*	0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

sig. Low	*	<0.05
sig. Mediu	**	<0.01
sig. High	***	<0.001

Non sono stati ottenuti valori<0,05

H_0 accettata !

Definizione CCß

Capacità di rilevazione (CCβ) rappresenta il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rilevare, con una probabilità di errore di β. Per le sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, ciò significa che la capacità di rilevazione è la concentrazione alla quale il metodo è in

grado di rilevare le concentrazioni limite consentite con una certezza statistica di 1 − β.

ß=0,05

- CCß A = 95% risultati positivi di categoria 1
- CCß B = 95% risultati positivi di categoria 1

  + risultati di categoria 2

Substance	Reading System	Concentration	No. of total Results	No. of Results (pos. Class A)	Percentage of CCß A	Lower 95%-CI (CCß A)	Upper 95%-CI (CCß A)	No. of Results (pos. Class B)	Percentage of CCß B	No. of Results (negative)
Benzyl-penicillin	Photometric	0.5	80	0	0.00	-	-	0	0.00	80
		0.75	80	0	0.00	-	-	0	0.00	80
		1	80	0	0.00			0	0.00	
		1.5	80	0	0.00			26	0.33	
		2	80	68	0.85			12	1.00	0
		2.5	80	80	1.00	-	-	0	1.00	0
		3	80	80	1.00	-	-	0	1.00	0
	Visual	0.5	120	0	0.00	-	-	2	0.02	118
		0.75	120	0	0.00	-	-	1	0.01	119
		1	120	0	0.00	-	-	6	0.05	
		1.5	120	0	0.00			60	0.50	
		2	120	83	0.69			37	1.00	0
		2.5	120	120	1.00	-	-	0	1.00	0
		3	120	120	1.00	-	-	0	1.00	0
	Photometric + Visual	0.5	200	0	0.00	0.00	0.02	2	-	198
		0.75	200	0	0.00	0.00	0.02	1	-	199
		1	200	0	0.00	0.00	0.02	6	-	194
		1.5	200	0	0.00			86	-	114
		2	200	151	0.76			49	-	0
		2.5	200	200	1.00	0.98	1.00	0	-	0
		3	200	200	1.00	0.98	1.00	0	-	0

2,5 CCß A

2,0 CCß B

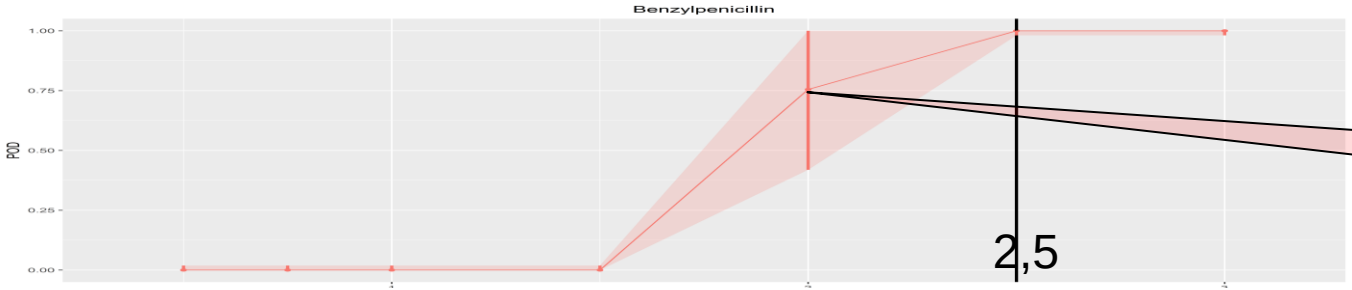
2,5 CCß A

2,0 CCß B

2,5 CCß A

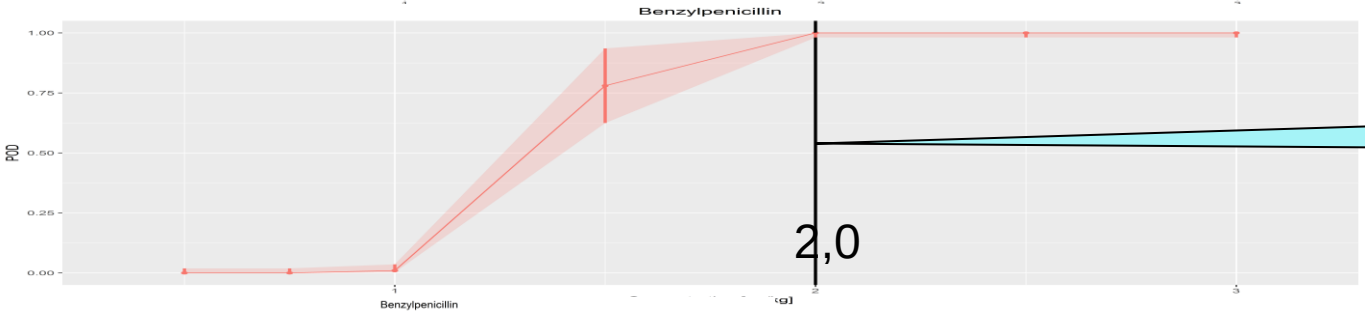
Curva Dose risposta

Pen G



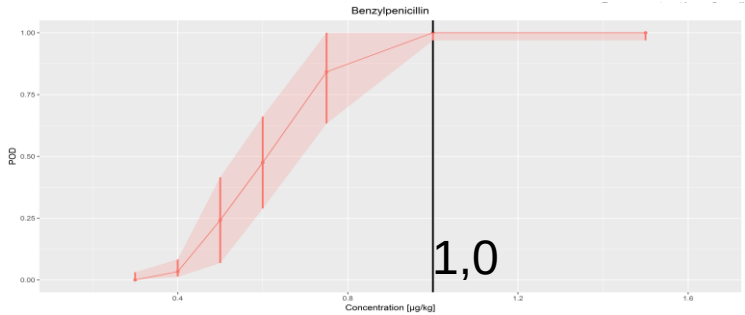
BRT Inhibitor Test

Media generale e intervallo di confidenza IC



BRT MRL Screening Test

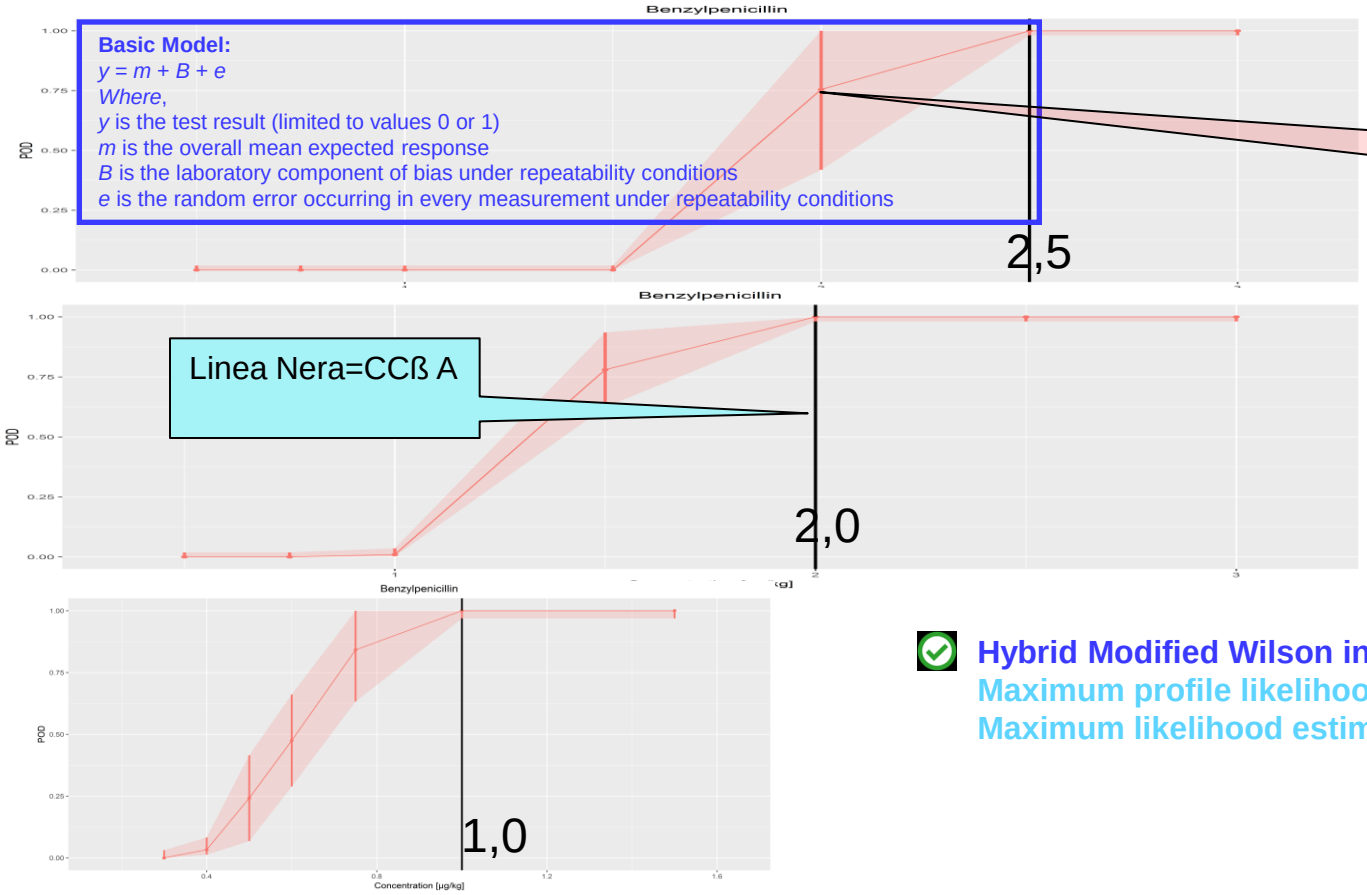
Linea Nera=CCß A



BRT hi-sense

Curva Dose risposta

Pen G



Basic Model:

y = m + B + e

Where,

y is the test result (limited to values 0 or 1)

m is the overall mean expected response

B is the laboratory component of bias under repeatability conditions

e is the random error occurring in every measurement under repeatability conditions

Media generale e intervallo di confidenza IC

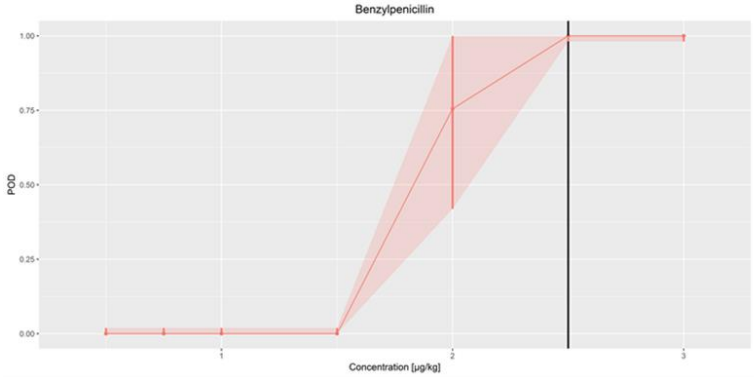
Linea Nera=CCß A

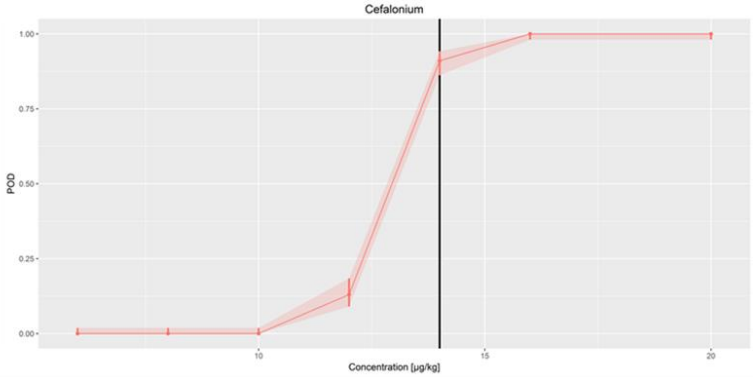
Hybrid Modified Wilson interval model

Maximum profile likelihood based on Probit model

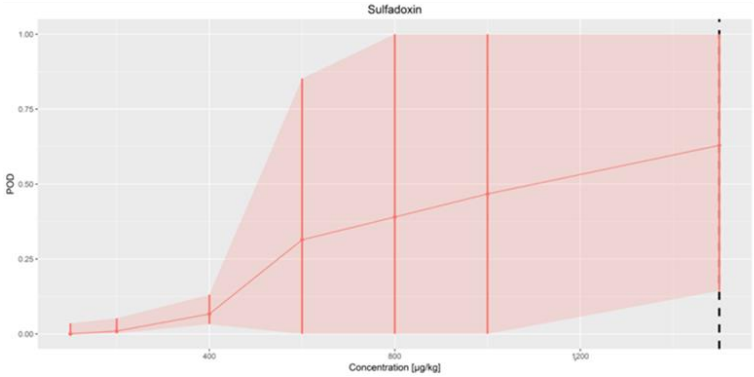
Maximum likelihood estimate based on Beta binomial

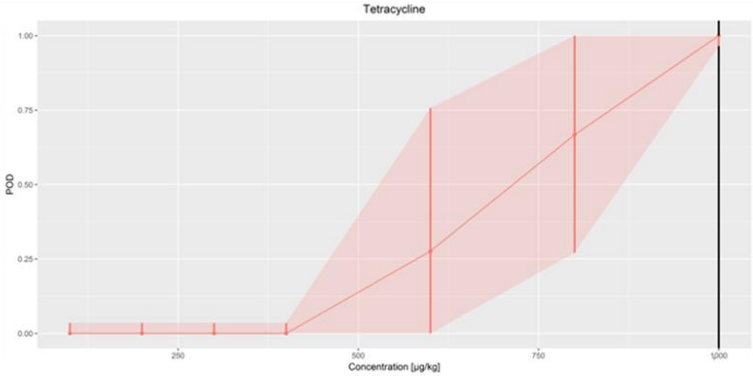
Curva Dose risposta





Battericida





Batteriostatico

Determinazione CCß (esempio)

Group of Antibiotics	Substance	MRL EU [µg/kg]	CCß A [µg/kg]	CCß B [µg/kg]
Penicillins	Benzylpenicillin	4	1	0.6
	Ampicillin	4	1.5	1.25
	Amoxicillin	4	1.5	1.25
	Cloxacillin	30	10	9
	Dicloxacillin	30	6	5
	Nafcillin	30	4	4
	Oxacillin	30	4	3
Cephalosporins	Cefalexin	100	125	100
	Cefapirin	60	3	2.5
	Cefoperazone	50	20	15
	Cefazolin	50	4	3
	Cefquinome	20	20	20
	Ceftiofur	100	10	10
	Cefalonium	20	6	5
Macrolides	Erythromycin	40	80	40
	Tylosin	50	40	20
Sulfonamides	Sulfadiazine	100	200	60
	Sulfadimethoxin	100	200	50
	Sulfamethazine	100	400	100
	Sulfathiazol	100	60	40
	Sulfadoxin	100	400	150
	Sulfamethoxypyridazine	100	100	40
Tetracyclines	Chlortetracycline	100	300	150
	Oxytetracycline	100	100	75
	Tetracycline	100	150	75
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin	200	300	150
	Streptomycin	200	500	250
	Gentamicin	100	40	10
	Neomycin	1,500	150	60
Fenicol	Chloramphenicol	-	4,000	2,000

Selettivitá

AiM–BRT Inhibitor Test

Use	Drug Class	Substance	MRL [µg/kg]	Concentration [µg/kg]	False positive Results
Anti-inflammatory Substances	NSAID	Flunixin	40	4,000	0/6
	NSAID	Metamizole	50	5,000	0/6
	Glucocorticoid	Prednisolone	6	600	0/6
Antiparasitics	Antihelminthic	Triclabendazole	10	1,000	0/6
	Ectoparasite	Deltamethrin	20	2,000	0/6
Ketosis Treatment	Polyether-Antibiotic	Monensin	2	200	0/6

AiM–MRL Screening

					False positive Results	
Use	Drug Class	Substance	MRL [µg/kg]	Concentration [µg/kg]	Class A	Class B
Anti-inflammatory Substances	NSAID	Flunixin	40	4,000	0/6	0/6
	NSAID	Metamizol	50	5,000	0/6	0/6
	Glucocorticoid	Prednisolon	6	600	0/6	0/6
Antiparasitics	Antihelminthic	Triclabendazol	10	1,000	0/6	0/6
	Ectoparasite	Deltamethrin	20	2,000	0/6	0/6
Ketosis Treatment	Polyether-Antibiotic	Monensin	2	200	0/6	1/6

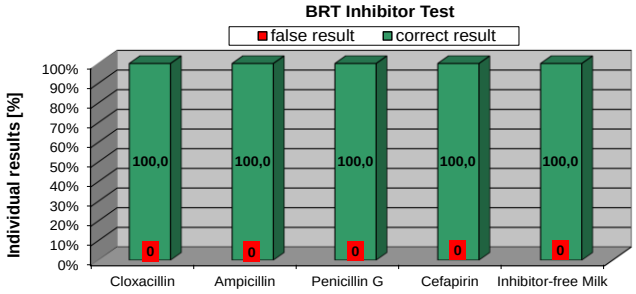
AiM–hi-sense

					False positive Results	
Use	Drug Class	Substance	MRL [µg/kg]	Concentration [µg/kg]	Class A	Class B
Anti-inflammatory Substances	NSAID	Flunixin	40	4,000	0/6	2/6
	NSAID	Metamizol	50	5,000	0/6	0/6
	Glucocorticoid	Prednisolon	6	600	0/6	3/6
Antiparasitics	Antihelminthic	Triclabendazol	10	1,000	0/6	0/6
	Ectoparasite	Deltamethrin	20	2,000	0/6	1/6
Ketosis Treatment	Polyether-Antibiotic	Monensin	2	200	0/6	6/6

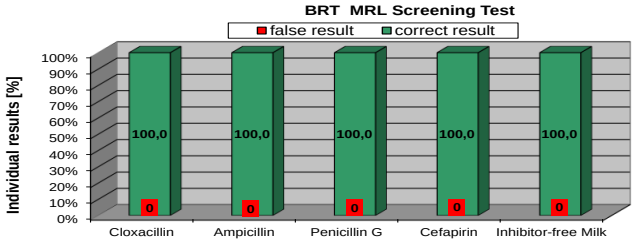
Ring Test…

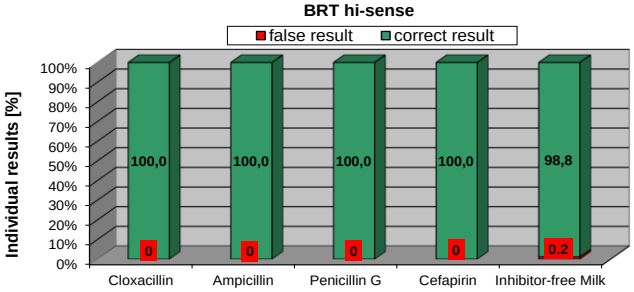
61 set di dati da 10 paesi

Analizzato 8 campioni fortificati e 7 campioni negativi



Substance	Concentration [µg/kg]	No. Samples
Benzylpenicillin	4	2
Ampicillin	4	2
Cefapirin	60	2
Cloxacillin	30	2
-	-	7



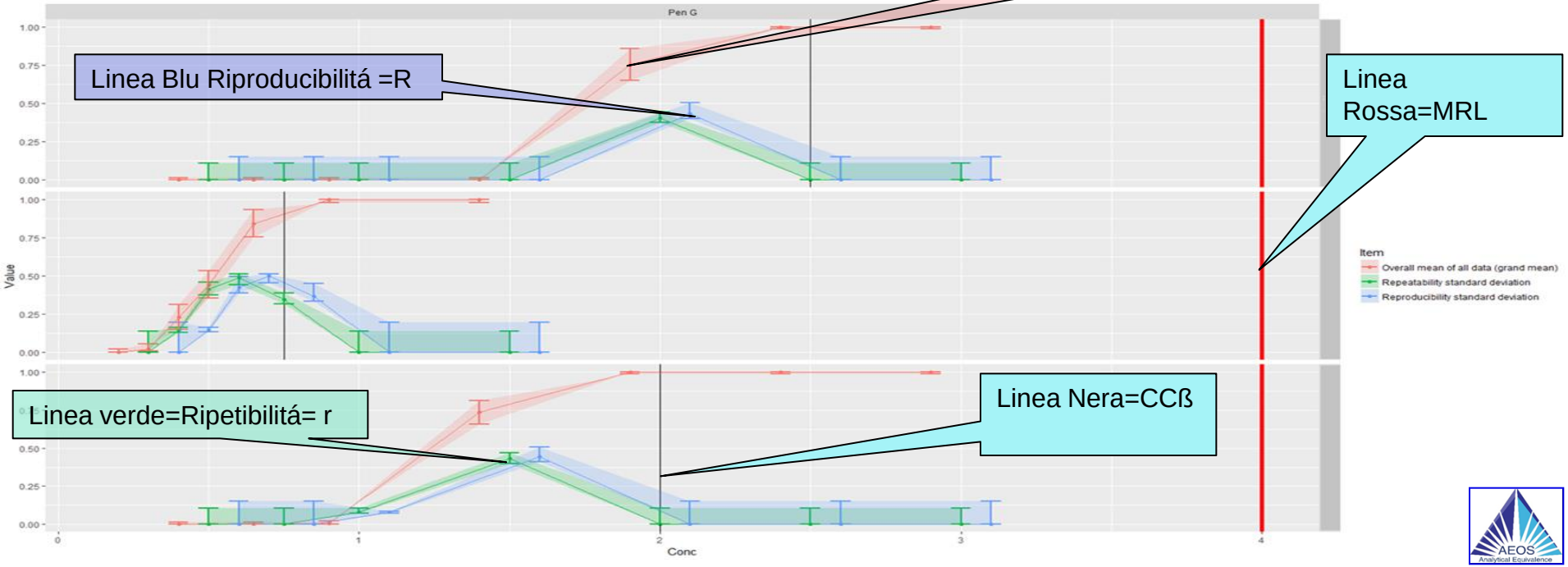


…….Characterisation of a Binary Method via a Validation Experiment 16293 e ISO 5725-3

Precisione: ripetibilitá e riproducibilitá intralaboratorio

- **Hybrid Modified Wilson interval model**
  Maximum profile likelihood based on Probit model
  Maximum likelihood estimate based on Beta binomial

Pen G example



Conclusione & Ringraziamenti

- La statistica dei dati qualitativi è in via di sviluppo
- Interessante lavorare in concerto Biologi/Veterinari e Statistici per produrre strumenti che forniscano interessanti informazioni

Prof. Dörte Dopfer
Dr. Marlène Tremblay

Grazie per l'attenzione