

CURS – V –

ANALIZA EXPERIMENTELOR CROSS – OVER

PUTEREA TESTELOR SI CALCULUL NUMARULUI

DE VOLUNTARI

PATRATUL LATIN

Inferenta statistică pentru efecte într-un experiment standard 2*2 cross – over
Modelul statistic

Considerăm două medicamente, unul de testat (T) și altul de referință (R), administrate în două perioade (I și II). Rațiunea principală a experimentului cross – over, experiment în care o parte din subiecți primesc cele două medicamente în secvența RT, iar cealaltă parte în secvența TR, este aceea că, analiza datelor obținute poate pune în evidență efectele reziduale, sau “carry – over”, cum mai sunt numite, ale administrării în prima perioadă, asupra rezultatelor obținute în perioada a doua. În cazul existenței unor astfel de efecte este necesar să se poată face distincția între efectele “directe” și efectele reziduale. Efectul direct este efectul ce îl are medicamentul în perioada în care este administrat, pe când efectul carry – over este efectul pe care acesta îl are în perioada următoare administrării sale. Spunem că un medicament are un efect carry – over de ordin k, dacă efectul primei administrări se manifesta și după k perioade de administrare.

Rezultatele experimentului sunt variabile aleatoare Y_{ijk} pe care le considerăm având următoarea structură:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}$$

unde μ este media totală, i este indicele pentru subiect, $i = \overline{1, n_k}$, j este indicele pentru perioadă și k este indicele pentru secvența. $F_{(j,k)}$ este efectul direct, fix, al medicamentului (formulării) administrat în perioada j , în secvența k (Observație: efectul este de fapt cantitatea de medicament măsurată sau în parametrul farmacocinetic calculat pornind de la aceasta).

Schema de administrare fiind $\begin{pmatrix} RT \\ TR \end{pmatrix}$ avem că $(F_{(j,k)}) = \begin{pmatrix} F_R F_T \\ F_T F_R \end{pmatrix}$ și, din faptul că μ este media lui Y_{ijk} avem $\sum F_{(j,k)} = 0$ și $\sum C_{(j-1,k)} = 0$, deci $F_R + F_T = 0$ și $C_R + C_T = 0$

$C_{(j-1,k)}$ este efectul carry – over (fix) al medicamentului administrat în perioada $j-1$ (considerăm că, datorită existenței unui interval de timp “de spălare” între administrări, efectul carry – over nu depășește o perioadă).

e_{ijk} reprezintă eroarea aleatoare în măsurarea valorilor individuale pentru fiecare subiect.

Considerăm ca variabilele S_{ik} (“efectul de subiect”) sunt repartizate identic, cu media 0 și dispersia σ_s^2 , iar variabilele e_{ijk} sunt repartizate $N(0, \sigma_e^2)$. În fapt, dispersiile erorilor pot diferi de la un medicament la altul.

Testarea efectului secvenței de administrare

Pentru efectul secvenței de administrare sau a efectelor carry – over, considerând următoarele totaluri pe subiecți în cadrul unei secvențe date:

$$U_{ik} = Y_{i1k} + Y_{i2k}, \quad i = \overline{1, n_k}, \quad k = 1, 2 \quad (\text{R+T și respective T+R})$$

Valoarea medie și dispersia variabilelor U_{ik} vor fi:

$$E(U_{ik}) = \begin{cases} 2\mu + C_R, & \text{pentru subiecții în secvența 1} \\ 2\mu + C_T, & \text{pentru subiecții în secvența 2} \end{cases}$$

$$D(U_{ik}) = D(2S_{ik} + \varepsilon_{i_k} + \varepsilon_{i_2k}) = 4\sigma_s^2 + 2\sigma_e^2 = \sigma_u^2$$

Fie $C = C_T - C_R$. C poate fi folosit pentru determinarea efectelor carry – over. Datorită restricției $C_T + C_R = 0$ efectele carry – over sunt egale pentru cele două formulări, adică $C = 0$, dacă și numai dacă $C_T = C_R = 0$. Ca urmare, testarea absenței efectelor carry – over este echivalentă cu testarea egalității acestora. Când efectele carry – over sunt absente, efectul direct al medicamentului ($F = F_T - F_R$) poate fi estimat pe baza datelor din amândouă perioadele. Dacă efectele carry – over nu sunt egale, nu există un estimator nedepășat pentru efectul direct al medicamentului, din acest motiv fiind necesară testarea prealabilă a existenței efectelor carry – over.

Existența efectelor carry – over inegale poate fi determinată prin testarea următoarelor ipoteze:

$$H_0 : C = 0 \Leftrightarrow C_T = C_R$$

$$H_1 : C \neq 0 \Leftrightarrow C_T \neq C_R$$

Respingerea ipotezei nule duce la concluzia prezenței efectelor carry – over inegale. Pentru testarea ipotezelor asupra lui C se folosesc următoarele medii de selecție corespunzând fiecărei secvențe:

$$\overline{U}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} U_{ik}, \quad k = 1, 2$$

$\overline{U}_{.1}$ și $\overline{U}_{.2}$ sunt mediile de selecție pentru eșantioane aleatoare independente din populații normale cu dispersii egale. Ca urmare testarea ipotezei se poate face utilizând testul t pereche.

C poate fi estimat prin diferența între sumele mediilor perioadelor în interiorul secvențelor.

$$\hat{C} = \overline{U}_{.2} - \overline{U}_{.1} = -(\overline{Y}_{.11} + \overline{Y}_{.21}) + (\overline{Y}_{.12} + \overline{Y}_{.22}) \quad \begin{pmatrix} R & T \\ T & R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \overline{Y}_{.11} & \overline{Y}_{.21} \\ \overline{Y}_{.12} & \overline{Y}_{.22} \end{pmatrix}$$

Ținând cont de presupunerile asupra variabilelor S_{ik} prezentate anterior, \hat{C} este normal distribuit cu media C și dispersia $D(\hat{C}) = 2(2\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = \sigma_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Dispersia $D(\hat{C})$ poate fi estimată prin înlocuirea lui σ_u^2 cu $\hat{\sigma}_u^2 = S_u^2$ dispersia de selecție totală pentru subiecții din cele două secvențe:

$$D(\hat{C}) = \hat{\sigma}_u^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \text{ unde } \hat{\sigma}_u^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (U_{ik} - \overline{U}_{.k})^2$$

$$\text{Astfel, în ipoteza } H_0, \quad T_c = \frac{\hat{C}}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{\overline{X}_{R+T} - \overline{X}_{T+R}}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ are o repartiție Student}$$

cu $n_1 + n_2 - 2$ grade de libertate. Ca urmare, vom respinge ipoteza nulă

$H_0 : C_T = C_R$ în favoarea ipotezei alternative $H_a : C_T \neq C_R$ la un nivel α de semnificație, dacă $|T_c| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2\right)}$.

Facem observatia ca $C_T + C_R = 0$ dar aceasta nu implica si ca $\hat{C}_T + \hat{C}_R = 0$. De fapt noi testam ipoteza $C_T = C_R$, care se confunda cu ipoteza absentei efectului de secventa.

Pe baza statisticii t, se poate calcula un interval de încredere $(1-\alpha)*100\%$ pentru

$$C: \hat{C} \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2\right)} \hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}.$$

Deoarece, dupa cum am vazut $\sigma_u^2 = 4\sigma_s^2 + 2\sigma_e^2$, acest interval este foarte larg.

Efectul direct al medicamentului

În vederea testării efectului direct al medicamentului se pot folosi diferențele între perioade în interiorul fiecărei secvențe, după cum urmează:

$$d_{ik} = \frac{1}{2}(Y_{i2k} - Y_{i1k}), \quad i = \overline{1, n_k}, \quad k = \overline{1, 2}.$$

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + C_{j-1,k} + P_j + F_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Experimentul fiind de tipul $\begin{pmatrix} R & T \\ T & R \end{pmatrix}$ avem:

$$Y_{i21} = \mu + S_{i1} + C_R + P_2 + F_T + \varepsilon_{i21}$$

$$Y_{i11} = \mu + S_{i1} + 0 + P_1 + F_R + \varepsilon_{i11}$$

$$d_{i1} = / + / + \frac{C_R}{2} + \frac{P_2 - P_1}{2} + \frac{F_T - F_R}{2} + \frac{\varepsilon_{i21} - \varepsilon_{i11}}{2}$$

Analog,

$$Y_{i22} = \mu + S_{i2} + C_T + P_2 + F_R + \varepsilon_{i22}$$

$$Y_{i12} = \mu + S_{i2} + 0 + P_1 + F_T + \varepsilon_{i12}$$

$$d_{i2} = / + / + \frac{C_T}{2} + \frac{P_2 - P_1}{2} + \frac{F_R - F_T}{2} + \frac{\varepsilon_{i22} - \varepsilon_{i12}}{2}$$

Valoarea medie și dispersia pentru diferențele din cadrul perioadelor sunt:

$$E(d_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R] \text{ pentru subiectii in secventa 1} \\ \frac{1}{2}[(P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + C_T] \text{ pentru subiectii in secventa 2} \end{cases}$$

$$D(d_{ik}) = \sigma_d^2 = D\left(\frac{1}{2}(\varepsilon_{i2k} - \varepsilon_{i1k})\right) = \frac{1}{4}[D(\varepsilon_{i2k}) + D(\varepsilon_{i1k})] = \frac{\sigma_e^2}{2}$$

Se vede că dispersia diferențelor între perioade include numai intravariabilitatea, ceea ce reprezintă de fapt avantajul experimentului de tip cross – over. În ceea ce privește media diferențelor, aceasta include atât efectul direct al medicamentului cât și efectul rezidual (carry – over).

Sa notăm efectul perioadei și efectul direct (efectul formulării) prin $P = P_2 - P_1$ și $F = F_T - F_R$.

Pentru a verifica ipotezele statistice asupra lui F, să considerăm mediile diferențelor între perioade în interiorul fiecărei secvențe: $\bar{d}_{.k} = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} d_{ik}$, $k = \overline{1,2}$.

Diferența între secvențe ($\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}$) este un estimator nedeplasat al lui F atunci când nu avem efecte carry – over inegale ($C_R = C_T$)

$$E(\bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2}) = (F_T - F_R) + \frac{(C_R - C_T)}{2} = F - \frac{C}{2} \text{ unde } C = C_T - C_R.$$

Ca urmare, dacă $C_T \neq C_R$ nu avem un estimator nedeplasat pentru F din datele pentru amândouă perioadele. Dacă însă $C_T = C_R$, atunci

$$\hat{F} = \bar{d}_{.1} - \bar{d}_{.2} = \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{.21} - \bar{Y}_{.11}) - (\bar{Y}_{.22} - \bar{Y}_{.12})] = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$$

este un estimator nedeplasat cu dispersia minimă pentru F (unde $\bar{Y}_T = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.21} + \bar{Y}_{.12})$ și

$\bar{Y}_R = \frac{1}{2}(\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.22})$). Schema de administrare fiind $\begin{pmatrix} RT \\ TR \end{pmatrix}$ rezultă că $\bar{Y}_R = \frac{1}{2}(\bar{R}_1 + \bar{R}_2)$ și

$$\bar{Y}_T = \frac{1}{2}(\bar{T}_1 + \bar{T}_2)$$

$$\begin{pmatrix} \bar{Y}_{.11} & \bar{Y}_{.21} \\ \bar{Y}_{.12} & \bar{Y}_{.22} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \bar{Y}_R & \bar{Y}_T \\ \bar{Y}_T & \bar{Y}_R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \bar{R}_1 & \bar{T}_1 \\ \bar{T}_2 & \bar{R}_2 \end{pmatrix}$$

\bar{Y}_R și \bar{Y}_T sunt așa numitele “least square means” (LS) – mediile tip cele mai mici pătrate – pentru produsul de referință și cel testat, în fapt “mediile mediilor” dintre cele două secvențe.

În practică, F este estimată prin diferența directă între mediile celor două formulări

$$\hat{F}^* = \bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^*,$$

$$\text{unde } \bar{Y}_R^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left(\sum_{i=1}^{n_1} Y_{i11} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i22} \right) \text{ și } \bar{Y}_T^* = \frac{1}{n_1 + n_2} \left(\sum_{i=1}^{n_1} Y_{i21} + \sum_{i=1}^{n_2} Y_{i12} \right)$$

Când $C_R = C_T$, se obține $E(\bar{Y}_R^*) = \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_R + n_1P_1 + n_2P_2]$ și

$$E(\bar{Y}_T^*) = \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_1 + n_2)\mu + (n_1 + n_2)F_T + n_1P_2 + n_2P_1].$$

$$\text{Deci, } E(\bar{Y}_T^* - \bar{Y}_R^*) = (F_T - F_R) + \frac{1}{n_1 + n_2} [(n_2 - n_1)P_1 + (n_1 - n_2)P_2]$$

Ca urmare, diferența între mediile celor două formulări \hat{F}^* , nu este un estimator nedeplasat pentru F decât atunci când $n_1 = n_2$.

Diferența între mediile “least – square” pentru cele două formulari, \hat{F} , este normal distribuită, cu media F și dispersia $D(\hat{F}) = \sigma_d^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$.

Deoarece $\{d_{i1}\}$, $i = \overline{1, n_1}$ și $\{d_{i2}\}$, $i = \overline{1, n_2}$ sunt două selecții independente din populații normale cu dispersii egale (atunci când nu avem efecte carry – over inegale) un test pentru efectul direct poate fi obținut pe baza statisticii t – pereche.

$$T_d = \frac{\hat{F}}{\hat{\sigma}_d^2 \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

unde $\hat{\sigma}_d^2$ (notată și S_d^2) este dispersia de selecție pentru diferența între perioade, și este un estimator nedeplasat al lui σ_d^2

$$\hat{\sigma}_d^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (d_{ik} - \bar{d}_{.k})^2$$

Deoarece $(n_1 + n_2 - 2)\hat{\sigma}_d^2$ este distribuit $\sigma_d^2 \chi^2(n_1 + n_2 - 2)$, T_d este distribuit t cu $n_1 + n_2 - 2$ grade de libertate. Un interval de încredere $(1 - \alpha) * 100\%$ pentru F este următorul:

$$\hat{F} \pm t \left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2 \right) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

Prezența efectului direct al medicamentului poate fi examinată prin testarea ipotezelor: $H_0 : F_T = F_R$ și $H_1 : F_T \neq F_R$. Respingem H_0 dacă $|T_d| > t \left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2 \right)$.

Trebuie să observăm că această metodă de testare se referă la egalitatea efectelor celor două medicamente și nu la “bioechivalența” lor, care va fi discutată mai departe.

Mentionam doar ca mediile pot fi egale dar medicamentele sau nu fie bioechivalente sau pot sau nu fie egale dar medicamentele sa fie bioechivalente deoarece in testarea bioechivalentei intervine essential si variabilitatea datelor.

După cum s-a menționat mai sus, \hat{F} nu este un estimator nedeplasat al lui F în prezența efectelor carry – over inegale ($C_T \neq C_R$). Un estimator nedeplasat al lui F poate fi obținut totuși folosind numai datele din prima perioadă, dar cu o pierdere de informație și, în consecință, de precizie. Dacă $\bar{Y}_{.11}$ și $\bar{Y}_{.12}$ sunt mediile celor două formulări în prima perioadă, atunci:

$$E(\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11}) = (\mu + P_1 + F_T) - (\mu + P_1 + F_R) = F_T - F_R = F$$

Să notăm $\bar{Y}_{.12} - \bar{Y}_{.11} = \hat{F} \Big|_C$. Avem că $\hat{F} \Big|_C$ este un estimator nedeplasat al lui F, chiar și în prezența efectelor carry – over inegale.

Dispersia lui $\hat{F}|_C$ este $D(\hat{F}|_C) = (\sigma_s^2 + \sigma_e^2) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$. Observăm deasemenea că $D(\hat{F}|_C) - D(\hat{F}) = \left(\sigma_s^2 + \frac{\sigma_e^2}{2} \right) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$. Deci, pierderea de precizie ca urmare a folosirii numai a datelor din prima perioadă este de minim 50% atunci când $\sigma_s^2 = 0$.

Din acest motiv, în practică, este foarte importantă perioada de spălare pentru a dispărea efectele reziduale până la a doua administrare.

În prezența efectelor carry – over inegale, se poate verifica ipoteza privind inegalitatea efectelor și se poate construi și un interval de încredere $(1 - \alpha) * 100\%$ pentru F folosind datele din prima perioadă.

Un estimator nedeplasat pentru $D(\hat{F}|_C)$ este $D(\hat{F}|_C) = S_f^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$ unde

$$S_f^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ik} - \bar{Y}_{.1k})^2.$$

$$Y_{i11} = \mu + S_{i1} + P_1 + F_R + \varepsilon_{i11}$$

$$\bar{Y}_{.11} = \mu + S_{.1} + P_1 + F_R + \bar{\varepsilon}_{.11}$$

$$\frac{\sum (Y_{i11} - \bar{Y}_{.11})^2}{n_1 - 1} = \frac{\sum (S_{i1} - \bar{S}_{.1})^2}{n_1 - 1} + \frac{\sum (\varepsilon_{i11} - \bar{\varepsilon}_{.11})^2}{n_1 - 1}$$

Dar din proprietatea generală $E(S_x^2) = \sigma_x^2$ suma este o estimare a lui $\sigma_s^2 + \sigma_e^2$:

$$E(S_f^2) = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} * E \left((n_1 - 1) \frac{\sum (Y_{i11} - \bar{Y}_{.11})^2}{n_1 - 1} + (n_2 - 1) \frac{\sum (Y_{i12} - \bar{Y}_{.12})^2}{n_2 - 1} \right) =$$

$$= \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} [(n_1 - 1)(\sigma_s^2 + \sigma_e^2) + (n_2 - 1)(\sigma_s^2 + \sigma_e^2)] = \sigma_s^2 + \sigma_e^2$$

Deci, S_f^2 este un estimator nedeplasat pentru $\sigma_s^2 + \sigma_e^2$, dar nu avem estimări individuale pentru σ_s^2 și σ_e^2 pornind numai de la datele din prima perioadă.

Intervalul de încredere $(1 - \alpha) * 100\%$ pentru F în prezența efectelor carry – over inegale va fi $\hat{F}|_C \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} S_f \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$.

Ipoteza nulă privind absența efectului direct este respinsă dacă $\left| \frac{\hat{F}|_C}{S_f \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \right| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)}$.

În practică, în prezența efectelor carry – over inegale, datele din prima perioadă sunt folosite efectiv pentru a testa bioechivalența, dar nu trebuie să uităm următoarele consecințe ale acestei proceduri:

1) Puterea de detecție a diferențelor semnificative clinic este micșorată datorită creșterii dispersiei și,

2) Pierderea de informație anulează însăși avantajul experimentului crossover și anume eliminarea variabilității între subiecți în compararea formulărilor.

Efectul perioadei

Să definim următoarele diferențe:

$$O_{ik} = \begin{cases} d_{ik}, \text{ pentru subiecții în secvența 1} \\ -d_{ik}, \text{ pentru subiecții în secvența 2} \end{cases}$$

Dar cum am aratat mai sus avem:

$$\bar{d}_{\bullet 1} = \frac{1}{2} [C_R + (P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + f_1(\varepsilon)]$$

$$\bar{d}_{\bullet 2} = \frac{1}{2} [C_T + (P_2 - P_1) + (F_R - F_T) + f_2(\varepsilon)]$$

$$\bar{O}_{\bullet 1} - \bar{O}_{\bullet 2} = \bar{d}_{\bullet 1} + \bar{d}_{\bullet 2} = C_R + C_T + (P_2 - P_1) + f(\varepsilon)$$

Valoarea medie și dispersia acestor diferențe cross-over sunt:

$$E(O_{ik}) = \begin{cases} \frac{1}{2} [(P_2 - P_1) + (F_T - F_R) + C_R], \text{ pentru subiecții în secvența 1} \\ \frac{1}{2} [(P_1 - P_2) + (F_T - F_R) - C_T], \text{ pentru subiecții în secvența 2} \end{cases}$$

și

$$D(O_{ik}) = \sigma_d^2 = \frac{\sigma_e^2}{2}$$

Avem

$$\bar{O}_{\bullet k} = \begin{cases} \bar{d}_{\bullet 1} \text{ pentru } k = 1 \\ \bar{d}_{\bullet 2} \text{ pentru } k = 2 \end{cases} \quad \begin{pmatrix} R_1 & T_1 \\ T_2 & R_2 \end{pmatrix} \approx \begin{pmatrix} \bar{Y}_{\bullet 11} & \bar{Y}_{\bullet 21} \\ \bar{Y}_{\bullet 12} & \bar{Y}_{\bullet 22} \end{pmatrix}$$

Un estimator nedeplasat pentru efectul perioadei P poate fi obținut ca

$$\hat{P} = \bar{O}_{\bullet 1} - \bar{O}_{\bullet 2} = \frac{1}{2} [(\bar{Y}_{\bullet 21} - \bar{Y}_{\bullet 11}) - (\bar{Y}_{\bullet 12} - \bar{Y}_{\bullet 22})]$$

Deoarece $C_T + C_R = 0$, \hat{P} este un estimator de dispersie minimă pentru P, indiferent de prezența efectelor carry-over.

Un interval de încredere $(1 - \alpha) * 100\%$ pentru P este $\hat{P} \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$.

Respingem ipoteza nulă privind absența efectului de perioadă: $H_0 : P_1 = P_2$,

$H_a : P_1 \neq P_2$ atunci când $|T_0| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)}$, unde $T_0 = \frac{\hat{P}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$.

Interferența statistică pentru efectele carry-over, directe și de perioada sunt prezentate, în rezumat, în tabelul 1.

Tabelul 1.

Teste statistice pentru efectele fixe într-un experiment 2*2 cross – over.

Efect	Efecte carry – over inegale	MVUE	$(1 - \alpha)/100\%C.I.$	Test statistic
Carry over	-	$C = \overline{U}_{.2} - \overline{U}_{.1} = (\overline{Y}_{.11} + \overline{Y}_{.21}) - (\overline{Y}_{.12} + \overline{Y}_{.22})$	$C \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} \hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$	$T_c = \frac{C}{\hat{\sigma}_u \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$
Efect direct	Nu	$F = \overline{d}_{.1} - \overline{d}_{.2} = \frac{1}{2} [(\overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.11}) - (\overline{Y}_{.22} - \overline{Y}_{.12})]$	$F \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$	$T_d = \frac{F}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$
Efect indirect	Da	$F _C = \overline{Y}_{.12} - \overline{Y}_{.11}$	$F _C \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} S_f \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$	$T_f = \frac{F _C}{S_f \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$
Perioada	-	$P = \overline{O}_{.1} - \overline{O}_{.2} = \frac{1}{2} [(\overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.11}) + (\overline{Y}_{.12} - \overline{Y}_{.22})]$	$P \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2\right)} \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$	$T_o = \frac{P}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$

MVUE– estimare

Analiză dispersională a datelor de bioechivalență

Analiză statistică a datelor în experimentul de determinare a bioechivalenței tip 2*2 cross – over se poate face, după cum s-a prezentat anterior, aplicând testul Student

pereche în compararea rezultatelor grupate în secvențe, perioade sau formulări, pentru a verifica ipoteze privitoare la efectele fixe. Aceleași rezultate se pot obține și prin aplicarea unor metode de analiză dispersională, avantajul acestora fiind că ele sunt mai generale și se pot aplica și în alte tipuri, mai complexe, de experiment biofarmaceutic.

Analiză dispersională în analiza variabilității se bazează pe separarea pe partiția sumei totale a pătratelor SS (sum of squares) abaterilor datelor experimentale față de media totală $\bar{Y}_{...}$, în componente corespunzătoare efectelor fixe și componenta corespunzătoare erorilor aleatoare. În particular, pentru un experiment 2*2 cross – over, se împarte suma abaterilor celor $2(n_1 + n_2) - n_1$ este proba din secvența 1, iar n_2 este proba și în secvența 2 – observații în componentele corespunzătoare efectele carry – over, efectelor de perioada, efectelor directe, și componenta corespunzătoare erorilor:

$$SS_{total} = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{...})^2 = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{ik} + \bar{Y}_{ik} - \bar{Y}_{...})^2 =$$

$$\sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (Y_{ijk} - \bar{Y}_{ik})^2 + 2 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} (\bar{Y}_{ik} - \bar{Y}_{...})^2 = SS_{int\ ra}^t + SS_{int\ re}^2$$

unde

- $Y_{ijk} - \bar{Y}_{ik}$ este valoarea individuală subiect – medie subiect ,
- $\bar{Y}_{ik} - \bar{Y}_{...}$ este medie subiect – medie totală,
- $\bar{Y}_{ik} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^2 Y_{ijk}$, notat anterior cu \bar{U}_{ik}

Ca fenomen, se consideră fiecare subiect ca o grupa cu două valori, iar dacă fiecare valoare individuală reprezintă o selecție din aceeași populație, variabilitatea în interiorul grupelor trebuie să fie de același ordin de mărime cu variabilitatea între grupe.

- $SS_{int\ re}^t$ este suma pătratelor datorată subiecților (între subiecți),
- $SS_{int\ ra}^t$ este suma pătratelor datorată variabilității datelor privitoare la același subiect în perioade diferite.

Numărul total de date este $2(n_1 + n_2)$, și deci numărul de grade de libertate al sumei totale este $2(n_1 + n_2) - 1$.

În cele două secvențe sunt $n_1 + n_2$ subiecți și, ca urmare, $SS_{int\ re}^t$ și $SS_{int\ ra}^t$ au $n_1 + n_2 - 1$ și respectiv $n_1 + n_2$ grade de libertate (în cazul lui $SS_{int\ re}^t$ mediile individuale sunt legate între ele, media lor fiind egală cu media totală).

$SS_{int\ re}^t$ poate fi descompus mai departe în două componente, una legată de efectele fixe carry – over și una legată de eroarea inter – subiecți:

$$SS_{int\ re}^t = SS_{carry} + SS_{int\ er}$$

$$SS_{carry} = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} \left[(\bar{Y}_{.12} + \bar{Y}_{.22}) - (\bar{Y}_{.11} + \bar{Y}_{.21}) \right]^2$$

și $SS_{int\ er} = \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \frac{Y_{ik}^2}{2} - \sum_{k=1}^2 \frac{Y_{..k}^2}{2n_k}$ unde Y_{ik} și $Y_{..k}$ sunt sumele valorilor Y_{ijk} după indicii specificați.

SS_{carry} și $SS_{int\ er}$ au 1 respectiv $n_1 + n_2 - 1$ grade de libertate. Fiecare suma de pătrate împărțită la numărul gradelor de libertate este o medie de pătrate (MS – mean square). Se poate arăta ca valorile lor medii sunt egale cu:

$$E(MS_{carry}) = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} (C_T - C_R)^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$$

$$E(MS_{int\ er}) = 2\sigma_s^2 + \sigma_e^2$$

De aici, pentru a testa ipoteza privind egalitatea efectelor carry – over, putem folosi faptul că variabila aleatoare $F_c = \frac{MS_{carry}}{MS_{int\ er}}$ este repartizată Fisher – Snedecor $F(1, n_1 + n_2 - 2)$.

Observăm că distribuția $F(1, \nu)$ este egală cu pătratul unei distribuții t cu ν grade de libertate. Astfel, aplicarea testului F mai sus este echivalentă cu aplicarea testului t variabilei $T_c: F_c = T_c^2$.

Similar, suma $SS_{int\ ra}^t$ poate fi descompusă în trei componente corespunzând efectelor directe, efectelor de perioadă și efectelor reziduale:

$$SS_{int\ ra}^t = SS_{med} + SS_{perioada} + SS_{int\ ra}$$

unde

- $SS_{med} = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} \left\{ \frac{1}{2} \left[(\overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.11}) - (\overline{Y}_{.22} - \overline{Y}_{.12}) \right] \right\}^2$
- $SS_{perioada} = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} \left\{ \frac{1}{2} \left[(\overline{Y}_{.21} - \overline{Y}_{.11}) - (\overline{Y}_{.12} - \overline{Y}_{.22}) \right] \right\}^2$
- $SS_{int\ ra} = \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} Y_{ijk}^2 - \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} \frac{Y_{ik}^2}{2} - \sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^2 \frac{Y_{.jk}^2}{n_k} + \sum_{k=1}^2 \frac{Y_{..k}^2}{2n_k}$
- SS_{med} și $SS_{perioada}$ au un singur grad de libertate, iar $SS_{int\ ra}$ are $n_1 + n_2 - 2$ grade

de libertate.

- Valorile medii pentru variabilele “mean square” sunt:

$$E(MS_{med}) = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} \left[(F_T - F_R) + \frac{C_R - C_T}{2} \right]^2 + \sigma_e^2$$

$$E(MS_{perioada}) = \frac{2n_1n_2}{n_1 + n_2} (P_2 - P_1)^2 + \sigma_e^2$$

$$E(MS_{int\ ra}) = \sigma_e^2$$

Observăm că $MS_{int\ ra} = 2\hat{\sigma}_d^2$, unde $\hat{\sigma}_d^2$ este dispersia de selecție a diferenței între perioade. Când $C_R = C_T$, ipoteza nulă privind lipsa efectului direct (de fapt ipoteza se referă la egalitatea efectelor celor două formulări) se poate testa ținând cont de variabila aleatoare $F_d = \frac{MS_{med}}{MS_{int\ ra}}$ care este distribuită $F(1, n_1 + n_2 - 2)$. Respingem ipoteza nulă atunci când $F_p > F(1, n_1 + n_2 - 2)$.

Similar cu cele discutate anterior, se observă ca $F_p = T_0^2$.

Trebuie făcută observația că aplicarea testului t în compararea a două medii de selecție este posibilă atunci când știm deja că selecțiile provin din populații normale, cu aceeași dispersie. Aplicarea analizei dispersionale presupune deasemenea ipoteza de normalitate și faptul că variabilele a căror pătrate se sumează au provenit dintr-o aceeași populație $N(\mu, \sigma^2)$.

Deci, atât pentru aplicarea analizei dispersionale cât și testului t, modelul statistic prezentat și ipotezele privind normalitatea și egalitatea dispersiilor pentru erori și pentru efectele de secvență sunt esențiale.

Un rezumat al modului de aplicare a analizei dispersionale în experimentul 2*2 cross – over este prezentat în tabelul 2.

Aceiași metodă de analiză dispersională se poate aplica în verificarea ipotezei prezenței unei variabilități între subiecți $H_0 : \sigma_s^2 = 0$ și $H_a : \sigma_s^2 > 0$ pe baza faptului că

variabila aleatoare $F_v = \frac{MS_{inter}}{MS_{intra}}$ este repartizată $F(n_1 + n_2 - 2, n_1 + n_2 - 2)$ în ipoteza H_0 .

Astfel, se respinge ipoteza privind absența variabilității între subiecți atunci când $F_v > F(\alpha, n_1 + n_2 - 2, n_1 + n_2 - 2)$.

Este de reținut că metodele prezentate pleacă de la ipotezele, conținute implicit în modelul statistic, ca efectele de perioadă, de formulare și de carry – over, sunt independente între ele și că deasemenea, nu există interacțiuni între acestea și efectele aleatoare. Pentru a verifica aceste ipoteze sunt necesare experimente cu mai multe perioade de administrare. De exemplu, testarea interacțiunii subiecți – formulare în compararea a două formulări, fiecare subiect trebuie să primească cele două formulări de câte două ori și deci este necesar un experiment cu 4 perioade de administrare.

Metoda intervalului de încredere

Anterior a fost prezentată modalitatea de testare a ipotezei nule ca două produse sunt “egale” între ele după efectuarea unui experiment 2*2 cross-over, metoda care a fost criticată de mulți autori (Westlake, 1972; Metzler, 1974; Dunnet & Gent 1977, etc). În locul acesteia a fost propusă de Westlake (1976) și de Metzler (1974) o metodă bazată pe intervale de încredere.

Bazat pe această metodă Westlake (1981) sugerează următorul algoritm de lucru în luarea deciziei.

Dacă intervalul de încredere $(1 - 2\alpha) * 100\%$ pentru diferența $\mu_T - \mu_R$ sau pentru raportul $\frac{\mu_T}{\mu_R}$ se află în limitele de acceptare impuse, atunci se acceptă ca medicamentul testat este bioechivalent cu cel de referință. Uzual se aplică regula $\pm 20\%$, iar $\alpha = 0.05$ și, în acest caz, regula de acceptare devine:

a) Produsele sunt bioechivalente daca intervalul de incredere 90% pentru $\mu_T - \mu_R$ este in limitele $\pm 20\%$ din efectul produsului de referinta sau daca,

b) $\frac{\mu_T}{\mu_R}$ este intre 80% si 120% cu probabilitatea 90%.

Aici trebuie facuta observatia ca, in ambele cazuri, aplicarea regulii presupune cunoasterea lui μ_R , ceea ce nu este niciodata cazul, si se ia din acest motiv \bar{Y}_R pe post de μ_R .

Exista si o metoda exacta de evaluare a intervalului de incredere pentru $\frac{\mu_T}{\mu_R}$ bazata pe o teorema a lui Fieller, dar nu se utilizeaza in practica datorita complexitatii ei. Metoda cea mai utilizata este metoda celui mai scurt interval, care foloseste pe \bar{Y}_R pe post de μ_R si considera ca nu exista efecte carry – over.

Metoda celui mai mic interval

Fie \bar{Y}_T si \bar{Y}_R mediile “least square” ale celor doua produse (adica media produsului in prima perioada + media produsului in a doua perioada si impartit la 2, ceea ce, atunci cand numarul de subiecti in cele doua perioade nu este egal, difera de media totala).

Intervalul de incredere clasic (“cel mai scurt”) $(1-2\alpha)*100\%$ se obtine din

distributia variabilei aleatoare $T = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - (\mu_T - \mu_R)}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ unde n_1 si n_2 reprezinta

numarul de subiecti in secventa 1 si respectiv 2, iar $\hat{\sigma}_d$ este dispersia de selectie a diferentelor intre valorile masurate pentru cele doua produse, dupa cum s-a prezentat anterior. In ipoteza de normalitate T este distribuit Student cu $n_1 + n_2 - 2$ si intervalul de incredere $(1-2\alpha)*100\%$ pentru $\mu_T - \mu_R$ va fi:

$$L_1 = (\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - t(\alpha, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

$$U_1 = (\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) + t(\alpha, n_1 + n_2 - 2) \hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

Intervalul de incredere de mai sus pentru $\mu_T - \mu_R$ poate fi convertit intr-un interval de incredere pentru $(1 - 2\alpha) * 100\%$ aproximativ pentru $\frac{\mu_T}{\mu_R}$ prin impartire la \bar{Y}_R (acceptand \bar{Y}_R ca valoare pentru μ_R). Deci,

$$L_2 = \left(\frac{L_1}{\bar{Y}_R} + 1 \right) * 100\%$$

$$U_2 = \left(\frac{U_1}{\bar{Y}_R} + 1 \right) * 100\%$$

Fie θ_L si θ_U limitele inferioara si superioara pentru bioechivalenta iar δ_L si δ_U limitele pentru raport. Produsele sunt considerate bioechivalente daca $(L_1, U_1) \in (\theta_L, \theta_U)$ sau $(L_2, U_2) \in (\delta_L, \delta_U)$ unde $\theta_L = -0.2 * \mu_R$, $\theta_U = 0.2 * \mu_R$, $\delta_L = 80\%$, $\delta_U = 120\%$ in cazul regulii $\pm 20\%$.

Utilizarea intervalelor de incredere in decizia privind bioechivalenta, intuitiv pare ca rezolva problema, dar ar fi o greseala sa pierdem din vedere ca limitele intervalului de incredere sunt si ele variabile aleatoare. Intervalul de incredere $(1 - 2\alpha) * 100\%$ pentru $\mu_T - \mu_R$ este intervalul in care, daca vom repeta studiul de un numar mare de ori, de exemplu n, de $(1 - 2\alpha) * 100\%$ ori $\mu_T - \mu_R$ va fi in cele n intervale aleatoare construite. Cu alte cuvinte, intr-un experiment repetat de multe ori, diferenta (raportul) mediilor se va afla cu probabilitatea de cel putin $1 - 2\alpha$ in intervalul de incredere $(1 - 2\alpha) * 100\%$ deoarece, in ipoteza de normalitate, $P\{\mu_T - \mu_R \in (L_1, U_1)\} = 1 - 2\alpha$.

Totusi, nu exista o garantie in acest sens, practic probabilitatea $P\{(L_1, U_1) \subset (\theta_L, \theta_U)\}$ nefiind in mod obligatoriu mai mare sau egala cu $1 - 2\alpha$.

Astfel s-au generat 1000 de valori de ASC in modelul standard 2*2 cross-over, in ipoteza de normalitate. Pentru simplificare s-a presupus ca nu exista efecte carry-over sau de perioada. Valoarea de referinta si testata au fost considerate amandoua 100 cu $n_1 = n_2$, 9 respectiv 12. Limitele de echivalenta pentru diferenta au fost in acest fel intre -

20 și 20. S-au considerat următoarele dispersii: $\sigma_e^2 = 400, 900, 1600$ (deci coeficienți de variație 20, 30 și respectiv 40%). Rezultatul a fost ca, pentru $n_1 = n_2 = 9$ doar 76.8% din intervalele de încredere (L_1, U_1) au fost între limitele de echivalență atunci când CV a fost 20%. Când CV a fost 30%, procentul a scăzut la 24.7%, iar când CV=40% a scăzut până la 2.1%. Pentru $n_1 = n_2 = 12$, rezultatele au fost similare. Deci, atunci când coeficientul de variabilitate este mare, intervalul de încredere nu are gradul de certitudine cerut de FDA. Cu alte cuvinte, probabilitatea unei concluzii corecte privind bioechivalența, nu are valoarea cerută. În aceste cazuri s-a sugerat simularea bazată pe valorile experimentale considerate ca fiind valorile reale ale parametrilor populației, pentru a evalua gradul de asigurare a intervalului (L_1, U_1) .

Mai facem observația că probabilitatea de a concluziona corect biodisponibilitatea pentru (L_1, U_1) și (L_2, U_2) este aceeași atunci când este cunoscut μ_R .

Tabelul 4.2.1. Rezumatul rezultatelor simulării

Marimea probei	Media referinței	Media testului	CV (%)	% din intervalele de încredere incluzând 0	% din intervalele de încredere incluse în (-20,20)
$n_1 = n_2 = 9$	100	100	20	90.3	76.8
			30	91.3	24.7
			40	90.4	2.1
$n_1 = n_2 = 12$	100	100	20	90.7	91.5
			30	89.2	43.9
			40	88.6	7.5

Metoda testării ipotezelor despre intervale

Ipoteze asupra intervalor

Stabilirea bioechivalenței între două medicamente se bazează pe compararea profilului concentrației sanguine realizat de medicamentele respective. Desigur că, practic, niciodată profilurile obținute experimental pentru două medicamente nu vor fi identice. Problema este de a decide dacă aceste diferențe sunt sau nu semnificative statistic.

Dacă diferențele între mediile parametrilor testați (aria de sub curbă, concentrația maximă sau alte funcții de acestia) să aflu, cu o probabilitate dată, între limite considerate ca acceptabile, atunci se acceptă că produsele sunt bioechivalente. Formal, dacă notăm mediile pentru produsul testat și cel de referință cu μ_T și respectiv μ_R , limita superioară

pentru diferenta lor θ_S , iar limita inferioara cu θ_I , ipoteza de testat si ipoteza alternativa vor fi:

$$H_0 : \mu_T - \mu_R \leq \theta_S \text{ sau } \mu_T - \mu_R \geq \theta_I$$

$$H_a : \theta_I < \mu_T - \mu_R < \theta_S$$

Se considera ca formularea ipotezei bioechivalentei ca ipoteza nula duce la o scadere a riscului consumatorului in defavoarea producatorului dar aceasta depinde in mare masura de dispersia celor doua loturi si de diferenta reala intre mediile lor. In ceea ce priveste limitele θ_L si θ_U ele se aleg de obicei 20% din μ_R , ceea ce aparent este foarte simplu si clar dar, in practica ne izbim de dificultatea insurmontabila ca, de fapt nu stim niciodata valoarea lui μ_R si avem numai estimari ale intervalului in care se afla acesta cu o probabilitate data.

Daca inlocuim datele experimentale cu logaritmul lor, ipotezele de testat si alternativa devin

$$H'_0 : \mu_T - \mu_R \leq \delta_I \text{ sau } \mu_T - \mu_R \geq \delta_S$$

$$H'_a : \delta_I < \mu_T - \mu_R < \delta_S$$

unde $\delta_I = \exp(\theta_I)$ si $\delta_S = \exp(\theta_S)$

Ipoteza nula este ipoteza compusa din doua ipoteze simple, testul de bioechivalenta descompunandu-se de fapt in doua teste unilaterale:

$$H_{01} : \mu_T - \mu_R \leq \theta_I \text{ vs } H_{a1} : \mu_T - \mu_R > \theta_S \text{ si}$$

$$H_{02} : \mu_T - \mu_R \geq \theta_S \text{ vs } H_{a2} : \mu_T - \mu_R < \theta_I$$

O biodisponibilitate mai mare a produsului testat decat cel de referinta, implica posibilitatea unor efecte secundare sau toxice crescute si o “siguranta” mai mica. Bioechivalenta implica o echivalenta atat in ceea ce priveste efectul cat si in ceea ce priveste siguranta.

Metoda celor “doua teste unilaterale”, Schuirmann

Daca vrem sa testam ipotezele enuntate la un nivel de semnificatie α , in conditiile in care presupunem ca datele sunt normal repartizate, putem aplica testul t. Echivalenta este stabilita atunci cand

$$T_I = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \theta_L}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} > t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$$

$$T_S = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \theta_L}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} < -t(\alpha, n_1 + n_2 - 2)$$

Observam ca procedeul celor doua teste t unilaterale este echivalent cu metoda clasica de testare a includerii intervalului de incredere pentru $\mu_T - \mu_R$ cu probabilitatea $(1 - 2\alpha) * 100\%$ in (θ_I, θ_S)

Metoda Anderson si Hauck

In locul celor doua teste t unilaterale pentru testarea bioechivalentei, Anderson si Hauck au propus in 1983 un singur test, bazat pe testarea valorii variabilei

$$T_{AH} = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \frac{\theta_I + \theta_S}{2}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Atunci cand datele sunt normal repartizate, variabila T_{AH} este distribuita t, necentrata, avand ca parametru de necentralitate $\delta = \frac{(\mu_T - \mu_R) - \frac{\theta_I + \theta_S}{2}}{\sigma_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ unde σ_d are semnificatia prezentata anterior.

Se respinge ipoteza H_0 si se accepta bioechivalenta atunci cand $C_1 < T_{AH} < C_2$ unde C_1 si C_2 sunt determinate de relatia

$$P(C_1 < T_{AH} < C_2 | \mu_T - \mu_R = \theta_S, \sigma_d) = P(C_1 < T_{AH} < C_2 | \mu_T - \mu_R = \theta_I, \sigma_d) = \alpha$$

In particular, daca alegem $-C_1 = C_2 - C$, relatia de definitie devine

$$P(T_{AH} | \langle C | \mu_T - \mu_R = \theta_S, \sigma_d) = P(|T_{AH}| | \langle C | \mu_T - \mu_R = \theta_I, \sigma_d) = \alpha$$

O piedica in aplicarea testului deriva din aceea ca nu il cunoastem pe δ . Se calculeaza, din acest motiv, o valoare empirica $p = P(T_{AH} | \langle |t_{AH}| | \mu_T - \mu_R = \theta_U, \sigma_d)$ unde t_{AH} este valoarea observata a lui T_{AH} .

H_0 este respinsa cu nivelul de semnificatie α , atunci cand $p < \alpha$.

Pe de alta parte se poate face o evaluare a lui δ , bazat pe o distributie t necentrata, pe o distributie t centrata sau pe o distributie normala.

$$\text{Un estimator al lui } \delta, \text{ pe baza unei distributii t necentrate este } \hat{\delta} = \frac{\theta_U - \theta_L}{2\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

In acest caz formula anterioara devine:

$$\begin{aligned} p &= P(T_{AH} | \langle |t_{AH}| | \mu_T - \mu_R = \theta_S) = P(-|t_{AH}| - \hat{\delta} < T_{AH} - \hat{\delta} < |t_{AH}| - \hat{\delta}) = \\ &= F_t(|t_{AH}| - \hat{\delta}) - F_t(-|t_{AH}| - \hat{\delta}) \end{aligned}$$

$$\text{unde } T_{AH} - \hat{\delta} = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \theta_U}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ si } F_t \text{ este functia de repartitie t, cu } n_1 + n_2 - 2 \text{ grade de}$$

libertate.

Sa observam in continuare ca aceasta aproximatie ne duce la un test echivalent cu evaluarea variabilelor aleatoare T_I si T_S din metoda Schuirmann. Astfel, presupunand ca $t_{AH} > 0$, avem

$$|t_{AH}| - \hat{\delta} = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \frac{\theta_I + \theta_S}{2} - \frac{\theta_S - \theta_I}{2}}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = \frac{(\bar{Y}_T - \bar{Y}_R) - \theta_S}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = T_S$$

$$\text{Similar, } -|t_{AH}| - \hat{\delta} = -T_L \text{ deci } p = F_t(|t_{AH}| - \hat{\delta}) - F_t(-|t_{AH}| - \hat{\delta}) = F_t(-T_L) - F_t(T_S)$$

Se observa ca testul Anderson si Hauck este intotdeauna mai puternic decat testul Schuirmann deoarece p poate fi mai mic decat α chiar si atunci cand T_I si T_S sunt mai mari decat α .

Metoda considera ca t_{AH} este testul cel mai puternic dar, in conditiile de normalitate, nu exista neconditionat testul cel mai puternic, uniform cel mai puternic, sau uniform cel mai puternic nedeplasat, atata timp cat μ_T , μ_R si σ_d^2 nu sunt cunoscute (Lehmann 1959, Kendall si Stuart 1961).

Intr-un studiu de simulare, Anderson si Hauck (1983) au aratat ca metoda propusa de ei este un test mai puternic (in sensul ca probabilitatea de a concluziona bioechivalenta) decat metoda intervalului de incredere, decat metoda Westlake (metoda intervalului simetric fata de origine).

In plus, testul este mai puternic decat cel Schuirmann indiferent daca μ_T si μ_R sunt sau nu echivalente. Diferenta de putere devine neglijabila pe masura ce "masura

sensibilitatii" $\nabla = \frac{\theta_U - \theta_L}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ devine mai mare.

In plus, metoda Anderson si Hauck poate concluda bioechivalenta chiar atunci cand variabilitatea este foarte mare deoarece zona critica este deschisa la capat. Altfel spus, metoda duce la concluzia bioechivalentei in cazurile studiilor cu o foarte mica precizie, unde variabilitatea individuala este foarte mare.

Puterea testului si calculul numarului de voluntari

Uneori de pune problema determinarii numarului de experimente necesare pentru a asigura o putere testului date fiind riscul α si puterea $1 - \beta$ pentru a respinge ipotezele false cu o anumita probabilitate impusa.

Fie $H_0 : \mu = \mu_0$ si $H_a : \mu \neq \mu_0$. O astfel de ipoteza se numeste ipoteza complexa.

Problema noastra se poate rezolva in cazul unei ipoteze alternative de tipul $H_1 : \mu = \mu_1$ numita ipoteza simpla. Sa considerem ca adevarata medie este $\mu_1 = \mu_0$. Fie $\mu_1 > \mu_0$.

Puterea testului $1 - \beta$ este prin definitie probabilitatea de a respinge H_0 cand ipoteza alternativa H_a este adevarata. $1 - \beta = P(\text{respinge } H_0 / H_a \text{ adevarata})$

Dar H_0 este respinsa in zona critica, adica pentru $z > z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ sau $z < -z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ unde

$$z = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}.$$

$$1 - \beta = P\left(\frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} < z_{\frac{\alpha}{2}} \text{ sau } \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} > z_{1-\frac{\alpha}{2}} \mid \mu = \mu_1\right) =$$

$$= P\left(\bar{x} < \mu_0 + z_{\frac{\alpha}{2}} * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ sau } \bar{x} > \mu_0 + z_{1-\frac{\alpha}{2}} * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \mid \mu = \mu_1\right)$$

Daca aceasta medie este μ_1 atunci $\frac{\bar{x} - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$ este repartizat $N(0,1)$. Prin urmare

$$P\left(\bar{x} < \mu_0 + z_{\frac{\alpha}{2}} * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ sau } \bar{x} > \mu_0 + z_{1-\frac{\alpha}{2}} * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \mid \mu = \mu_1\right) = \Phi\left(\frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} + z_{\frac{\alpha}{2}}\right) + 1 - \Phi\left(\frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} + z_{1-\frac{\alpha}{2}}\right)$$

Pentru $\frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} < -0.5$ se poate considera ca $\Phi\left(\frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} + z_{1-\frac{\alpha}{2}}\right) \cong 0$

$\Phi(z_\beta) = \beta$ unde $\beta = \Phi\left(\frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} + z_{1-\frac{\alpha}{2}}\right)$ Conform definitiei cuantilelor avem

$$z_\beta = \frac{\mu_0 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} - z_{\frac{\alpha}{2}} \text{ si } \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{\mu_0 - \mu_1}{z_{\frac{\alpha}{2}} + z_\beta}. \text{ Asadar, } n = \frac{\sigma^2 \left(z_{\frac{\alpha}{2}} + z_\beta\right)^2}{(\mu_0 - \mu_1)^2}$$

De obicei se scrie: $n = \left(z_{\frac{\alpha}{2}} + z_\beta\right)^2 \left(\frac{\sigma}{\Delta}\right)^2$

In cazul in care nu se cunoaste σ^2 si se utilizeaza o estimatie a sa, distributia variabilei aleatoare devine Student si se obtine formula:

$$n \geq 2[t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 \frac{\hat{\sigma}_d^2}{\Delta^2}$$

In cazul studiilor de bioechivalenta diferenta Δ care trebuie "depistata" este 20%

si formula devine $n \geq 2[t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 \left(\frac{CV}{20}\right)^2$ cu $CV = 100 \frac{\sigma_e}{\mu_R}$

PLANIFICAREA EXPERIENȚELOR

Dacă în modelul de analiză factorială intervin p factori iar factorul r are I_r nivele, $1 < r < p$, atunci rezultă că avem de-aface cu $N = I_1 \dots I_p$ celule, adică cu N sisteme de condiții experimentale.

Pentru efectuarea experiențelor, putem lua în considerare toate celulele — caz în care avem de-aface cu *clasificarea completă*, sau putem lua în considerare numai o parte din celule — caz în care spunem că avem de-aface cu *clasificarea incompletă*.

Dacă se recurge însă la o *schemă incompletă de experimentare* atunci evident *nu se obțin informații despre toate sistemele de condiții* și deci observațiile nu pot fi pe deplin reprezentative.

Deoarece în unele situații nu putem cuprinde în schema experimentală toate celulele, rezultă că uneori trebuie să recurgem și la clasificarea incompletă. De aceea vom preciza în această etapă unele detalii referitoare la analiza dispersională în *clasificarea incompletă a experiențelor*.

Pentru o schemă incompletă este necesar să se precizeze modul în care trebuie alese celulele în care se vor efectua experiențe.

Metoda pătratelor latine și metoda blocurilor incomplete reprezintă criterii de alegere a acestor celule. În funcție de alegerea celulelor în care se vor face experiențe și de numărul de experiențe din celulă se rezolvă și modelele de analiză dispersională corespunzătoare.

Schema pătratului latin

Pătratul latin de ordinul m este o schemă de planificare a experiențelor în *analiza trifactorială* în cazul când toți cei trei factori au același număr de nivele m , experiențele se produc numai în m^2 din cele m^3 celule, iar aceste m^2 celule se aleg conform regulii care urmează și anume: se construiește o schemă conținând de m ori fiecare din cifrele 1, 2, ... m dispuse în formă de pătrat astfel încât pe orice linie sau pe orice coloană a acestui tabel pătratic o anumită cifră să apară o singură dată. Notînd cu A, B, C respectiv cei trei factori convenim să reprezentăm nivelele factorului A prin liniile pătratului (în ordinea lor naturală), nivelele lui B prin coloanele pătratului (tot în ordinea lor naturală) iar nivelele lui C prin numerele din pătrat.

Prin convenția precizată se pot alege cele m^2 celule. De exemplu, conform tabelului de mai jos ($m = 5$ nivele)

3	4	5	1	2
1	2	4	3	5
2	3	1	5	4
4	5	3	2	1
5	1	2	4	3

nivelul factorului C care trebuie observat împreună cu nivelul 3 al lui A ($i = 3$) și nivelul 4 al lui B ($j = 4$) este 5 (adică $K = 5$). Numărul 5 se găsește la intersecția liniei a treia cu coloana a patra a tabelului și deci celula în care se va face experiența este (3,4,5).

Se observă că prin intermediul pătratului latin toate cele m^2 celule care se aleg cu scopul de a fi incluse în planul de experiențe sînt distincte.

Cu ajutorul a m cifre (deci în cazul unui număr de m nivele) se pot construi mai multe pătrate latine. În plus fiind dat un pătrat latin se poate obține din el o mulțime de pătrate latine prin permutarea liniilor, coloanelor și numerelor. Această mulțime se numește *mulțimea transformatelor*. De asemenea pentru un pătrat latin dat există o *formă canonică* sau un *pătrat standard* care are pe prima linie și pe prima coloană numerele 1, ..., m așezate în ordine. De exemplu forma canonică a tabelului de mai sus este

1	2	3	4	5
2	3	5	1	4
3	4	1	5	2
4	5	2	3	1
5	1	4	2	3

Dintr-un pătrat latin dat, se poate arăta cu ușurință că se pot obține $m!(m - 1)!$ pătrate latine care au același pătrat standard cu pătratul dat. Aceste pătrate se obțin prin permutarea liniilor, coloanelor și numerelor pătratului latin dat.

Pentru fixarea unui plan de experiențe prin metoda pătratului latin trebuie ales mai întâi un astfel de pătrat. Alegerea acestui pătrat trebuie făcută însă *la întâmplare* și există procedee speciale prin care se realizează acest lucru.

**PROGRAMUL KINETICA 2000 PENTRU EXPERIMENTE CU BLOCURI
ECHILIBRATE, COMPLETE ȘI INCOMPLETE**

Pentru a ilustra metodele discutate în secțiunile precedente vom utiliza datele AUC dintr-un studiu prezentat de Purich. Acest studiu a fost efectuat cu 12 subiecți sănătoși pentru a stabili bioechivalența între două formulări de câte 100mg de tablete beta-blocker (locale și europene) și o soluție (de referință).

O perioadă de 7 zile de „washout” a fost păstrată între tratamente.

Datele inițiale sunt listate în tabelul de mai jos.

Datele AUC din studiul lui Purich

subject	treatment	sequence	data
sub01	A	ACB	5,69
sub02	A	ACB	3,6
sub03	B	BAC	3,55
sub04	B	BAC	7,31
sub05	C	CBA	6,59
sub06	C	CBA	9,68
sub07	B	BCA	4,63
sub08	B	BCA	8,75
sub09	C	CAB	7,25
sub10	C	CAB	5
sub11	A	ABC	4,63
sub12	A	ABC	3,87
sub01	C	ACB	4,21
sub02	C	ACB	5,01
sub03	A	BAC	5,07
sub04	A	BAC	7,42
sub05	B	CBA	7,72
sub06	B	CBA	8,91
sub07	C	BCA	7,23
sub08	C	BCA	7,59
sub09	A	CAB	7,88
sub10	A	CAB	7,84
sub11	B	ABC	6,77
sub12	B	ABC	7,62
sub01	B	ACB	6,83
sub02	B	ACB	5,78
sub03	C	BAC	4,49

sub04	C	BAC	7,86
sub05	A	CBA	7,26
sub06	A	CBA	9,04
sub07	A	BCA	5,06
sub08	A	BCA	4,82
sub09	B	CAB	9,02
sub10	B	CAB	7,79
sub11	C	ABC	5,72
sub12	C	ABC	6,74

Prelucarea acestor date cu pachetul de programe *Kinetica 2000* implică:

- Importul datelor în fereastra *Study*;
- Invocarea, din lista derulantă *Statistics* a ferestrei *Latin Square >2 Formulations*

Formulations

- Parametrizarea subrutinei astfel:
 - **Data Column:** data
 - **Subject Column:** subject
 - **Treatmnet Column:** treatment
 - **Sequence Column:** sequence
 - Marcarea casetei *More Than 1 Square*.
- Dacă se datele sunt a-simetrice atunci se marchează caseta *Log Transformation for y values* pentru a prelucra datele logaritmăte și a îndepărta astfel asimetria și a asigura o relativă omogenitate a dispersiei.
- Apăsarea pe butonul **OK** pentru a închide fereastra *Latin Square n formulation* și a începe prelucrarea
- Deschiderea ferestrei *Study Info* pentru vizualizarea rezultatelor.

Dacă experimentul este nebalansat atunci prelucarea datelor cu ajutorul pachetului de programe *Kinetica 2000* se face invocând , din lista derulantă *Statistics*, fereastra *Unbalanced Block*. Parametrizarea subrutinei este identică cu *Latin Square >2 Formulations* (desigur fără marcarea casetei *More Than 1 Square* care oricum este inactivă).

Rezultatele prelucrării datelor din studiul lui Purich cu pachetul de programe *Kinetica 2000*:

 LATIN SQUARE DESIGN : ANOVA TABLE for data

LATIN SQUARE with more than one square

SOURCE	D.F	SS	MS	F	p
Period	2	7,4222	3,7111	3,207	0,06196 NS
Subject	11	64,71	5,8828	5,083	0,0008341 ***
Formulation	2	6,5728	3,2864	2,84	0,08213 NS
Error	20	23,147	1,1574		
Total	35	101,85			

	N	Mean	SD	SEM
Formulation:num = A	12	6,015	1,7882	0,5162
Formulation:num = B	12	7,0567	1,6913	0,48823
Formulation:num = C	12	6,4475	1,6136	0,46581

Root Mean Square Error = 1,0758 ; CV = 0,165346

phi = 1,37589

Minimum detectable difference = 1,04665

 Unbalanced block DESIGN : ANOVA TABLE for data

SOURCE	D.F	SS	MS	F	p
Period	2	7,4222	3,7111	3,207	0,06196 NS
Subject	11	64,71	5,8828	5,083	0,0008341 ***
Formulation	2	6,5728	3,2864	2,84	0,08213 NS
Error	20	23,147	1,1574		

Total 35 101,85

	N	Mean	SD	SEM
Formulation:num = A	12	6,015	1,78819	0,516205
Formulation:num = B	12	7,05667	1,69129	0,488233
Formulation:num = C	12	6,4475	1,6136	0,465807

Root Mean Square Error = 1,0758 ; CV = 0,165346
phi = 1,37589
Minimum detectable difference = 1,04665

Comentarii

1. În ANOVA furnizată de Kinetica efectul „carryover” este considerat nul.
2. Pe aceste date rezultatele obținute cu modulul *Latin Square* și modulul *Unbalanced block* sunt identice.