

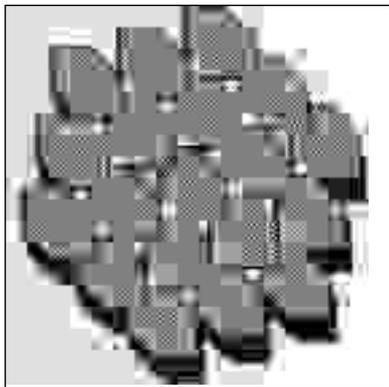
Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 61 - Maggio 1991 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

www.medicalsystems.it  
http://medicalsystems.editoria.com

ISSN 0394 3291

# Caleidoscopio

*Italiano*



**Luigi Romano**

## Valutazione dei kit immunochimici



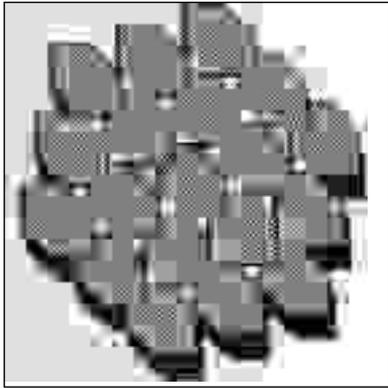
Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1991

# Caleidoscopio

*Italiano*



**Luigi Romano**

Laboratorio di Radioimmunologia  
Ospedale "V. Monaldi" Napoli



## Valutazione dei kit immunochimici



61

Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1991

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'*Index Medicus* e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'*International system of units (SI)*.

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassa  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari**

# Caleidoscopio

*It aliatto*

## Editoriale

Non è certo esagerato affermare che questi ultimi anni sono stati caratterizzati da un ulteriore ed importantissimo sviluppo dei dosaggi immunochimici che, già alle origini, si erano presentati innovativi e con possibilità che parevano utopia sino ad allora.

Tra i nuovi traguardi raggiunti dai dosaggi immunochimici va senz'altro ricordato il passaggio del dosaggio radioisotopico in fase liquida verso quello in fase solida (che offre tra l'altro il vantaggio di essere più rapido), la possibilità di dosare sostanze nell'ordine di pico o attomoli, ed ancora la messa a punto di metodiche affidabili che non utilizzano un tracciante marcato offrendo spesso una valida alternativa che permette superare le perplessità da alcuni sollevate sui traccianti radioisotopici. Una altra tappa importante è stata senza dubbio la messa a punto di sistemi di automazione e semiautomazione del lavoro con un significativo risparmio in termini di tempo da parte dell'operatore. L'introduzione, infine, dei dosaggi con l'uso degli anticorpi monoclonali ha permesso una specificità unica.

Oggi i dosaggi immunochimici hanno raggiunto una diffusione in tutti i laboratori notevole e sono diventati spesso insostituibili. Il successo di questi dosaggi è legato a diversi fattori che vanno dalla impossibilità di trovare delle alternative e, quando queste sono disponibili, non offrono le stesse garanzie dei dosaggi immunologici oppure le alternative non sono altrettanto semplici nella loro esecuzione.

I limiti e le potenzialità dei dosaggi immunochimici non sono ancora stati raggiunti e già si affacciano nuove possibilità quali ad esempio gli immunosensori.

Senza dubbio in questo travolgente tourbillon è estremamente importante la fase di valutazione delle nuove metodiche ed il confronto con quelle già acquisite.

Questo volume del dottor Luigi Romano vuoi essere un mezzo per affrontare proprio il problema della valutazione dei kit che quotidianamente vengono proposti con lusinghe e promesse che necessitano sempre di un rigoroso controllo scientifico. Il dottor Luigi Romano, è come sempre un esperto del settore. Ha infatti conseguito la laurea in Chimica prima e quindi in Scienze Biologiche. Attualmente è Dirigente del Servizio di Radioimmunologia ed Immunochimica dell'Ospedale "Monaldi" di Napoli.

E', ancora, docente del Corso di Radioimmunologia presso la Scuola di Specializzazione in Medicina Nucleare della II Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Napoli.

Autore di numerosissime pubblicazioni scientifiche comparse su riviste nazionali ed estere, con particolare riguardo ai modelli chimico-fisici razionali di descrizione dei dosaggio immunochimico ed alla elaborazione informatizzata dei dati, è autore di un testo sul dosaggio immunometrico e di varie monografie su temi analitici. Attualmente è presidente “pro tempore” della Società Campana di Radioimmunologia.

Sergio Rasso

## Introduzione

Negli ultimi anni, anche a seguito del sempre più vasto impiego di nuovi approcci biotecnologici, si è assistito ad un notevole sviluppo del settore degli immunodiagnostici.

Infatti le ormai classiche tecnologie chimiche sono state affiancate da tecnologie del tutto perfezionate ed ottimizzate, quali quelle degli anticorpi monoclonali, che hanno consentito una vasta disponibilità di reagenti altamente specifici con cui è possibile allestire kit di elevata qualità analitica e diagnostica.

L'approccio immunochimico alla determinazione nei liquidi biologici di una vasta gamma di analiti è stato anche favorito dalla crescente tendenza all'utilizzazione di metodiche basate su traccianti con rilevamento del segnale non isotopico e sulla sempre maggiore disponibilità di sistemi automatizzati dedicati.

Parallelamente a questi fattori sono stati meglio studiati ed approfonditi gli aspetti squisitamente metodologici dei dosaggi, da cui è derivata una serie di procedure analitiche sempre più rapide e semplici in termini operativi.

Questa situazione si è naturalmente ripercossa quantitativamente sul mercato dei kit immunodiagnostici e degli analizzatori più o meno integrati ed automatizzati, determinando una ampia disponibilità di proposte, in continuo accrescimento.

Pertanto all'utilizzatore si pone il compito di selezionare il prodotto ottimale per le proprie specifiche esigenze, il che può essere fatto razionalizzando le informazioni sulla metodologia ed esaminando criticamente i risultati della valutazione delle varie componenti dei kit e nel caso di sistemi analitici delle caratteristiche fondamentali dello strumento automatico.

Dall'esame dei lavori inerenti la valutazione di metodi di analisi apparsi sulla letteratura di settore più recente, è possibile notare che non vi sono metodi di studio armonizzati univoci, ma che ciascun Autore fa riferimento ad una serie di procedure alquanto differenziate.

Mentre alcuni criteri sono adottati da più Autori, altri sono meno diffusi o addirittura inediti, nel senso che non sono ufficialmente proposti nelle note, raccomandazioni e protocolli delle principali Società scientifiche del settore.

In ogni caso anche questi criteri scarsamente applicati possono fornire interessanti informazioni sulle prestazioni analitiche di un dosaggio immunologico.

Abbiamo quindi ritenuto interessante proporre in questa breve monografia una serie di approcci sperimentali di semplice esecuzione, indipendentemente dalla loro diffusione ma sulla base di una oggettiva utilità, i quali nel loro complesso o organizzati parzialmente secondo criteri sistematici personalizzati volti ad approfondire solo particolari aspetti consentano di delineare le caratteristiche fondamentali di un kit od un sistema in esame. Consigliamo comunque al lettore di approfondire la conoscenza delle fonti utilizzate, riportate in Bibliografia, per un corretto supporto ad un impiego effettivo.

## Criteri generali di valutazione di un kit

In un kit immunodiagnostico ciascun reagente, la tecnica di separazione, il metodo di rilevamento del segnale emesso dal tracciante e la elaborazione dei dati contribuiscono alla misura finale della concentrazione di analita e, quindi, alla qualità del kit.

Pertanto lo studio completo di una metodologia prevede la valutazione dei parametri di seguito considerati:

- 1) caratteristiche dichiarate dal Produttore
- 2) precisione -struttura dell'errore della risposta  
    profilo di imprecisione della dose  
    precisione della dose intersaggio
- 3) standard -caratteristiche biochimiche  
    matrice  
    curva standard
- 4) tracciante -attività specifica  
    immunoreattività
- 5) antisieri - stabilità  
    costanti di affinità
- 6) condizioni di reazione - stabilità alle variazioni  
    aspetti termodinamici
- 7) minima dose rilevabile
- 8) accuratezza - recupero  
    parallelismo  
    cross reattività  
    interferenti
- 9) varie - tempo di dosaggio  
    attrezzature particolari  
    costo reagenti  
    costo globale, etc.

Tutti questi aspetti, sebbene separati in fase della successiva esposizione, sono ovviamente intercorrelati (ad esempio accuratezza e minima dose rilevabile sono fattori che limitano la precisione) e determinano le differenze tra le performances analitiche.

## **1) Caratteristiche di composizione, qualità e procedimento operativo dichiarati dal Produttore**

Il manuale di "Istruzioni per l'uso" di un kit è senz'altro la prima componente in grado di fornire informazioni sulle caratteristiche peculiari del dosaggio.

Negli Stati Uniti la Food and Drug Administration, che emette la normativa per fabbricanti di diagnostici, prescrive che essi dichiarino determinati parametri chimici generali ed anche i produttori europei più qualificati sono sostanzialmente allineati con tale prescrizione. La maggior parte dei manuali di istruzione esemplifica inoltre 1 risultato ottenibile da un dosaggio simulato e consiglia il metodo ritenuto più idoneo per il trattamento dei dati sperimentali relativi alla curva standard ed al calcolo degli incogniti.

E' quindi possibile, come consiglia l'AACC (Ligand Work Assay Group of standards Committee), riportare su un modulo -esemplificato nello schema 1 - tutto il complesso dei dati dichiarati.

Diviene quindi semplice rilevare con immediatezza un intero blocco di informazioni e controllare direttamente differenti kit l'uno con l'altro, mediante parametri ufficialmente dichiarati. E' anche consigliabile utilizzare i dati esemplificativi e rappresentativi del dosaggio, generalmente riportati in tali manuali, per costruire curve standard semplici (risposta verso dose) che permettono di cogliere differenze tra van kit e che spesso non sono etidenziabili a seguito di particolari trasformazioni, ad esempio quelle logaritmiche.

Vanno inoltre considerati i range di riferimento consigliati, verificando che non si trovino in prossimità di una delle estremità della curva standard (il che spesso si verifica per alcuni marcatori tumorali quali CEA e PAP).

Altri aspetti correlati al dosaggio, utili in via preliminare e spesso desumibili dall'insert package, sono quelli relativi all'animale usato per la produzione del primo e secondo anticorpo, al metodo di coniugazione ed al metodo di purificazione del tracciante (HPLC, cromatografia di affinità; tali informazioni biochimiche permettono di inquadrare meglio la costituzione del kit e rendono conto delle differenze con altri prodotti.

Analita	Morfina
Tipo di dosaggio	RIA in fase solida
Componenti del kit	
stato dei reagenti	reattivi pronti
codice colore	si
controlli inclusi (n)	no
matrice sieri di controllo	-
standard di riferimento	morfina
matrice standard	urina umana
livelli concentrazione	0-2.5-10-25-100-500 ng/ml
tipo di tracciante	isotopico (Iodio 125)
matrice del tracciante	soluz. tampone
provenienza anticorpo	coniglio
affinità dell'anticorpo	non dichiarata
composizione precipitante	non richiesto
composizione soluz. lavaggio	non richiesta
tipo di provetta richiesto	sensibilizzata (fornita)
Procedimento	50 µl camp., 1 ml tracc. incub. 1h a temp. amb., decantare, contare
Algoritmo suggerito per curva standard	logit-log con omissione del calcolo di NSB
Limitazioni della metodica	dosabili urine con pH compreso 3.5-8.0
Valori attesi	
Adulti m.	<25 ng/ml
Adulti f.	<25 ng/ml
Bambini	
Recupero	96-112%
Parallelismo	102-113%
Specificità	codeina 0.03%; non dosabili 90 sostanze (tra cui etilmorfina e cocaina)
Minima dose rilevabile	0.3 ng/ml
Precisione intrasaggio (CV)	5.4%
intersaggio (CV)	6.6%

**Schema 1. Esempio di modello per la valutazione di un manuale d'uso ed esempio di applicazione ad un kit di Morfina della Diagnostic Product Corporation.**

## 2) Precisione

### *Precisione intra ed intersaggio*

Uno dei requisiti che deve essere soddisfatto da un qualsiasi complesso analitico è quello di possedere un buon livello di precisione nell'ambito di concentrazioni misurabili.

Come è noto la precisione è un indice statistico che definisce il grado di accordo tra misure ripetute su uno stesso campione, e tale accordo dipende essenzialmente da errori casuali dovuti a componenti diverse quali le caratteristiche del sistema di dispensazione sieri e reagenti, la statistica di conteggio (se il metodo è isotopico), la stabilità del segnale analitico, le caratteristiche individuali dei reagenti e delle variabili metodologiche.

Lo studio della precisione ci informa sulle limitazioni inerenti la rilevanza clinica del dosaggio, cioè determina il livello di fiducia o di confidenza che possiede il risultato numerico. In determinati contesti clinici la riproducibilità di una misura è anche più importante per il clinico che segue il decorso di un paziente della accuratezza.

La precisione è descritta quantitativamente in modo indiretto mediante la deviazione standard (DS) o il coefficiente di variazione (CV) di misure ripetute.

La precisione intrasaggio, in cui si verifica l'accordo tra i replicati di una stessa prova, può essere meglio valutata se si utilizzano esperienze diverse; successivamente le stime di ogni prova vengono combinate per dar luogo ad una stima cumulativa.

Così ad esempio se si utilizzano tre esperienze di dieci replicati ciascuna, il calcolo della deviazione standard intrasaggio può essere eseguito con le formule:

DS singola nel saggio:

$$DS \text{ sing} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{9}}$$

Imprecisione cumulativa intrasaggio:

$$DS \text{ cum} = \sqrt{\frac{(DS \text{ sing } 1)^2 + (DS \text{ sing } 2)^2 + (DS \text{ sing } 3)^2}{3}}$$

La precisione intersaggio, con cui si misura la capacità del metodo di riprodurre il risultato di uno stesso campione di giorno in giorno, ovvero l'intervallo di confidenza di un singolo risultato, richiede in teoria l'esecuzione di almeno 20 prove successive, il che usualmente va oltre le limitazioni imposte da un procedimento di screening e ne limita la valutazione.

Tornando alla precisione intrasaggio, questa può essere ben stimata inizialmente eseguendo una "prova kit" i cui risultati permettono il calcolo di diverse grandezze statistiche ed immunochimiche.

La “prova kit” consiste nella esecuzione in almeno 10 replicati di tutti gli standard del kit (zero incluso) e di tre sieri di controllo a livelli di concentrazione nell'intorno del 20, 50 ed 80% della massima capacità legante (nei dosaggi per competizione).

Dai risultati ottenuti sui sieri di controllo è possibile subito confrontare i valori di precisione con quelli forniti dal Produttore (che in genere riferisce i dati agli stessi livelli percentuali della massima capacità legante) impiegando il test statistico del  $\chi^2$ ; così pure è possibile confrontare i risultati di precisione di due differenti kit attraverso il test F di Fisher per il confronto tra varianze, ed evidenziare la eventuale significatività statistica delle differenze.

I risultati relativi ai decuplicati dei vari standard permettono inoltre uno studio approfondito della struttura dell'errore.

#### *Struttura dell'errore*

I valori di varianza della risposta relativa a ciascuno standard nella prova kit (ricordiamo che  $\text{varianza} = DS^2$ ) possono servire per descrivere la funzione matematica di andamento dell'errore al crescere della risposta; tale funzione prende il nome di relazione errore risposta (RER). In generale l'andamento non è uniforme ma viene definito eteroscedastico, nel senso statistico di non omogeneo; infatti l'errore aumenta all'aumentare della risposta analitica. Per descrivere matematicamente la funzione si fa ricorso ad un modello proposto da D.J. Finney con la formula:

$$\text{Varianza (risposta)} = A_0 \times (\text{risposta})^J$$

dove  $A_0$  rappresenta un fattore di proporzionalità, mentre J è espressione della ampiezza con cui aumenta l'errore al crescere della risposta.

Lo studio della struttura dell'errore è quindi di grande rilievo ai fini della valutazione di un metodo immunochimico in quanto il valore di J finisce con il rappresentare una caratteristica del sistema di dosaggio, segnatamente dei reagenti e dei sistemi di separazione e strumentali impiegati nel protocollo di lavoro. In particolare dalla formula di Finney consegue che per  $J=0$  si è in presenza di un errore costante (che come detto non si verifica nel caso dei dosaggi immunochimici); per  $J=1$  vi è proporzionalità diretta tra errore e risposta; per  $J=2$  si ha costanza del CV %; i valori compresi tra 0 e 2 rendono conto di quanto aumenti l'imprecisione al crescere della risposta e quindi -in linea di massima- il metodo sarà tanto migliore quanto più basso è il suo valore di J.

Per il calcolo di  $A_0$  e J è possibile applicare una regressione lineare tra il logaritmo della risposta media dei 10 replicati di ciascuno standard ed il logaritmo della relativa varianza. La pendenza della retta di regressione fornisce il valore di J mentre l'antilogaritmo dell'intercetta rappresenta  $A_0$ . La qualità del calcolo è espressa dal coefficiente di correlazione lineare della regressione, che per  $r > 0.9$  è intesa per accettabile.

$A_0$  e J, in quanto parametri utili a sintetizzare la precisione della risposta intrasaggio, possono essere utilmente inseriti nei protocolli di valutazione di un kit.

Un esempio di calcolo è fornito nello schema 2.

1° standard	risposta 1:800 risposta 2:880	media:840 varianza:3200
2° standard	risposta 1:1600 risposta 2:2000	media:1800 varianza:80000
3° standard	risposta 1:4000 risposta 2:4900	media:4450 varianza:405000
4° standard	risposta 1:10000 risposta 2:11000	media:10500 varianza:500000
5° standard	risposta 1:18000 risposta 2:19800	media:18900 varianza:1620000
<p>Applicando la regressione lineare ai logaritmi delle coppie di valori media (X)/Varianza (Y) si ottiene:  intercetta = -2.982; <math>A_0 = \text{antilog}(-2.982) = 5.067 \text{ E-}2</math>  pendenza = 1.787 <math>J = 1.787</math>  coefficiente di correlazione = 0.9379</p>		

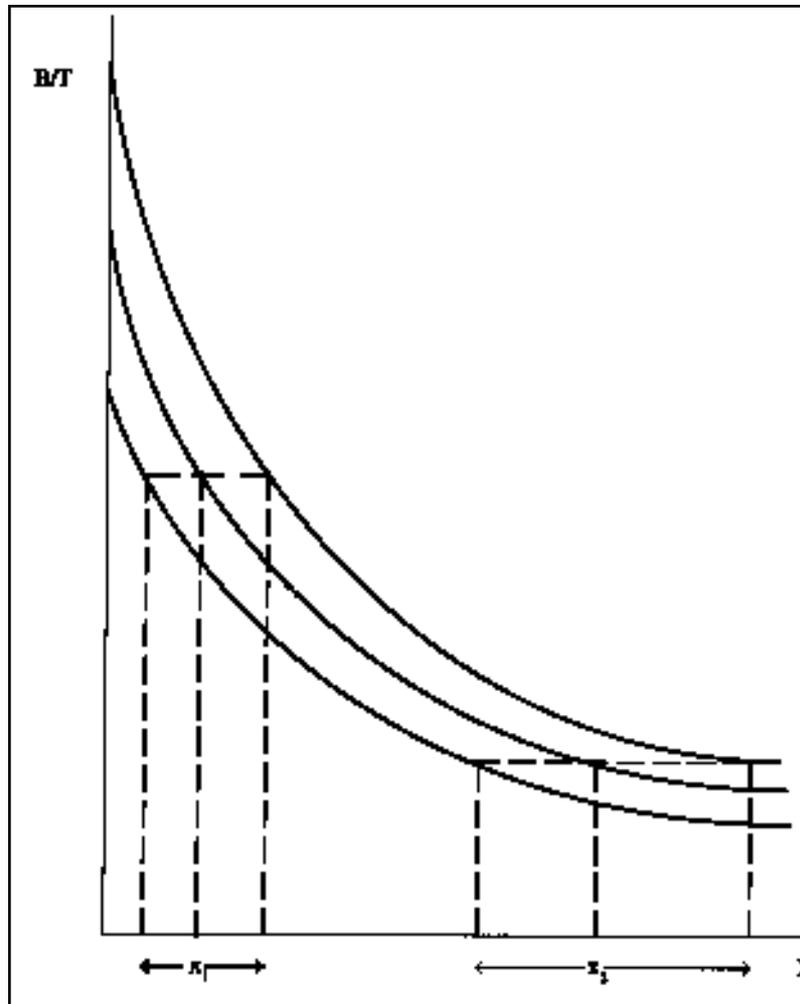
**Schema 2. Ricerca dei coefficienti della RER,  $A_0$  e J, in una prova che per semplicità di dimostrazione è eseguita in duplicato su cinque dosi standard. Esempio di calcolo di  $A_0$  e J.**

*Profilo di imprecisione della dose*

La mancanza di uniformità di ampiezza di errore della risposta lungo la curva standard si riflette, attraverso la pendenza della curva stessa, in una non uniformità della imprecisione della dose relativa, come si può notare in Fig. 1.

Tale andamento deriva dalla formula:

$$DS (\text{dose}) = DS (\text{risposta}) / \text{pendenza}$$



**Figura 1.** Effetto della eteroscedasticità della varianza della risposta e della pendenza sui limiti di confidenza di differenti livelli di dose.

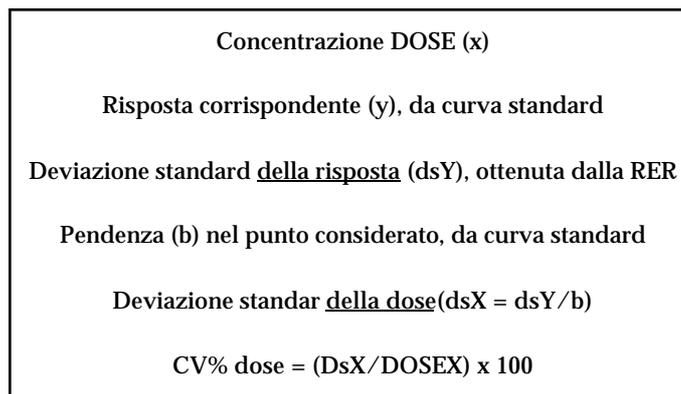
Dalla conoscenza della RER e dalla espressione matematica che descrive la curva standard (da cui è possibile desumere la pendenza della stessa in ogni punto) si può determinare il valore di DS teorica per ogni valore di dose, e quindi il valore di CV%; riportandone il valore per ciascun valore di dose standard è possibile costruire il grafico definito profilo di imprecisione utile ai fini di:

- determinare l'intervallo di lavoro utile ad un CV% prefissato;
- confrontare metodi di elaborazione diversi per uno stesso dosaggio;
- confrontare kit differenti;
- studiare gli effetti di varianti metodologiche (tempi di incubazione, temperatura);
- valutare effetti di invecchiamento del kit.

La RER ed il profilo di imprecisione possono essere costruiti anche senza eseguire la prova kit, ma semplicemente accorpando i duplicati di un singolo dosaggio in fasce piP o meno ampie di risposta e calcolandone la varianza media (o mediana). In tal caso si deve disporre di un numero consistente di duplicati (almeno 100), distribuiti in modo equo nell'arco di risposta della seduta analitica.

La costruzione del profilo di imprecisione non è che l'applicazione di parametri già a disposizione dell'operatore; infatti per ciascuna dose è possibile procedere secondo lo schema 3.

Nella Figura 2 è riportato un'esempio numerico ed il relativo andamento grafico.



**Schema 3. Flusso di calcolo da seguire per ciascuna dose per ottenere il relativo CV%.**

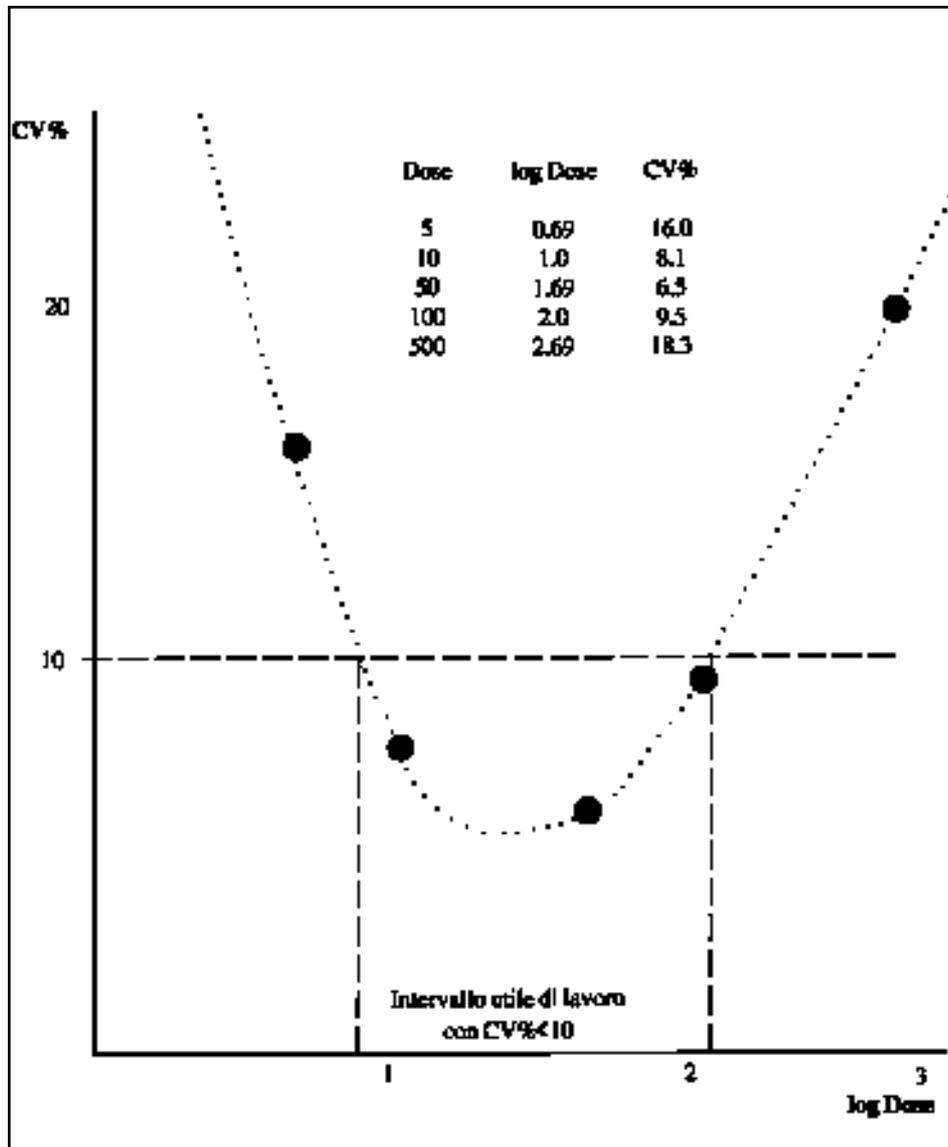


Figura 2. Esempio numerico e grafico di profilo di imprecisione della dose.

### 3) Standard e curva dose-risposta

#### *Caratteristiche degli standard interni*

Le analisi immunochimiche sono analisi per confronto in cui si misura la concentrazione di analita presente nel campione incognito mediante interpolazione su di una curva standard. Questa viene realizzata mediante il dosaggio di standard forniti con il kit, la cui elaborazione matematica descrive la relazione dose-risposta. Ciò implica che la sostanza presente negli standard sia identica a quella presente nel campione o almeno simile ad essa. Tale presupposto non sempre è verificato a causa della variabilità dell'analita sia nel campione sia negli standard.

Il produttore spesso dichiara la natura chimica dello standard usato, se esso sia identico all'analita o se sia un'analogo, un metabolita, un ligando cross-reagente.

Ad esempio per la gastrina si impiega frequentemente uno standard sintetico G-17 per misurare la forma predominante G-37 dell'ormone; per la digossina vengono usate come standard molecole non coniugate mentre il ligando del saggio h rappresentato da un coniugato aptenico; gli standard di alcune molecole complesse derivano da un singolo specifico tessuto (ad esempio ferritina splenica, CEA di cellule tumorali del colon) anche se si dosano le stesse molecole derivanti perb da altri tessuti e, quindi con differenze ed eterogeneità a livello quanto meno della struttura ternaria e dell'immunogenicità.

Uno dei problemi più ostici della standardizzazione è poi quello in cui si dosano sostanze biologiche, la cui presenza nel campione è caratterizzata da attività espresse in Unità Internazionali (UI) anzichè da concentrazioni, come ad esempio nel caso degli ormoni glicoproteici. Per tali analiti bisogna fare molta attenzione nel distinguere su quale materiale di riferimento il metodo è standardizzato. Infatti l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito due denominazioni:

- Standard Internazionale (IS), che è un preparato la cui *potenza* (valore di attività biologica o immunologica) è stata determinata mediante un programma concordato, basato sul dosaggio del materiale da parte di almeno 20 laboratori di riferimento scelti in tutto il mondo;

- Preparato di Riferimento Internazionale (IRP), che viene allestito e purificato sulla base degli stessi criteri ma la cui potenza è determinata in un numero più ridotto di laboratori.

Di tali IS ed IRP possono esistere differenti allestimenti, preparati in anni diversi, che si differenziano per potenza e metodo di assegnazione della stessa.

Gli IS ed IRP, di non eccessiva disponibilità, vengono utilizzati per la calibrazione dei dosaggi eseguiti nei laboratori di ricerca e clinici attraverso dosaggi comparativi, per cui nella preparazione adottata come standard di un kit possono esservi eterogeneità naturali e/o indotte tali da spiegare differenze anche sostanziali nei risultati di kit diversi che formalmente fanno riferimento allo stesso materiale standard. Anche la produzione su vasta scala può determinare variazioni negli standard sia chimici sia biologici: così

pub verificarsi una deaminazione nella preparazione di insulina e glucagone, può perdersi acido sialico in quella dell'HCG, LH, FSH e TSH, e si possono formare dei dimeri durante le procedure di liofilizzazione.

Anche le caratteristiche della matrice degli standard (definita come complesso di sostanze che non siano lo standard stesso) quali il pH, la forza ionica, la presenza di proteine e/o lipidi, influenzando la fase di separazione bound/free contribuiscono a determinare una differente morfologia della curva standard e possono creare effetti di sovra o sottostima del campione anche quando vi sia perfetta identità tra standard ed analita.

In fase di valutazione del kit sono di sicuro aiuto alcune semplici procedure atte a stabilire alcune caratteristiche degli standard interni, da eseguire "una tantum":

- verifica del numero di standard e se la concentrazione di quello più elevato sia effettivamente utile all'economia del saggio; in caso di elaborazione pesata della curva standard un punto esterno poco utile clinicamente può peggiorare il kit della curva e -quindi- se il numero di standard lo consente (almeno 5 oltre lo zero) potrà essere vantaggiosamente eliminato nei successivi dosaggi routinari;

- controllo delle differenze di concentrazione tra gli standard consecutivamente considerati due alla volta, per verificare che non vi siano differenze troppo elevate. In tal caso è opportuno realizzare uno standard intermedio e verificare che nella zona lasciata scoperta non vi siano punti di inflessione tali da determinare una sistematica inaccuratezza del dosaggio, come ad esempio è visualizzabile in Fig. 3.

- controllo di linearità e precisione di una o due diluizioni dello standard a più bassa concentrazione, nei dosaggi per competizione. Spesso possono infatti verificarsi risposte più elevate di quelle relative alla dose zero che dovrebbe rappresentare la massima capacità legante; questo fenomeno è definito effetto gancio alle basse dosi ed è imputabile alla cooperatività positiva tra i siti leganti dell'anticorpo o alla formazione di anelli stabili anticorpo-ligando. Un esempio è riportato in Fig. 4.

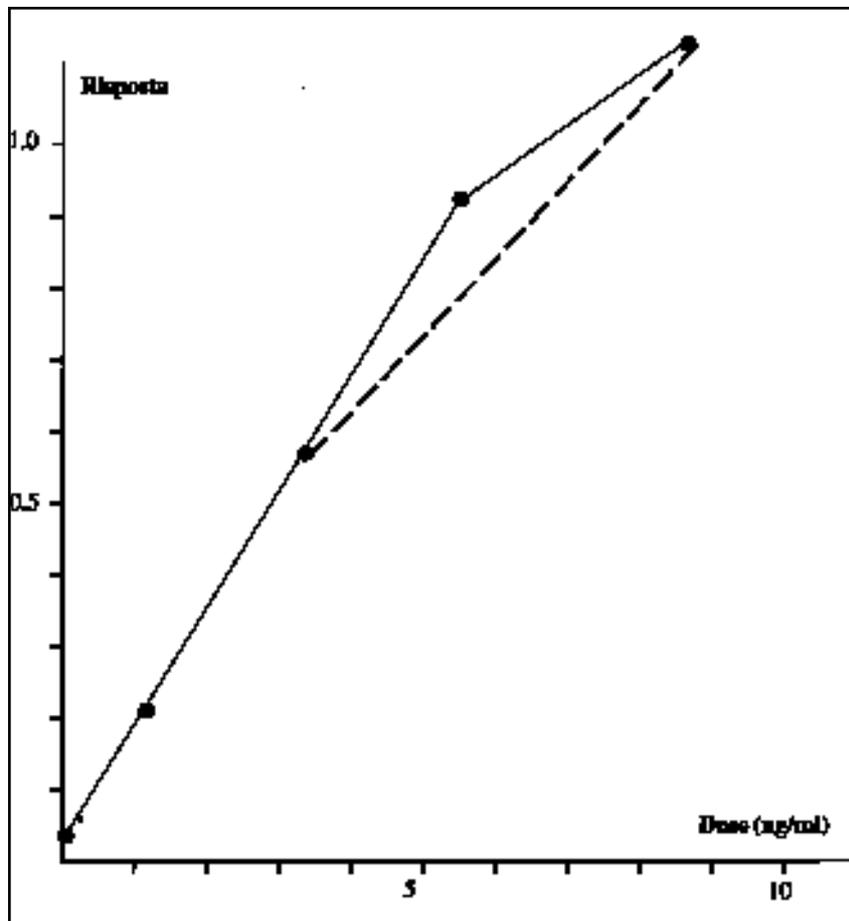
#### *Modelli di elaborazione della curva dose-risposta*

La elaborazione dei risultati relativi ai replicati delle vane dosi standard consente la costruzione della curva su cui interpolare le concentrazioni dei campioni incogniti. Essa può essere eseguita in numerosi modi, che implicano formule a diverso grado di complessità e che richiedono comunque una gestione assistita da calcolatore.

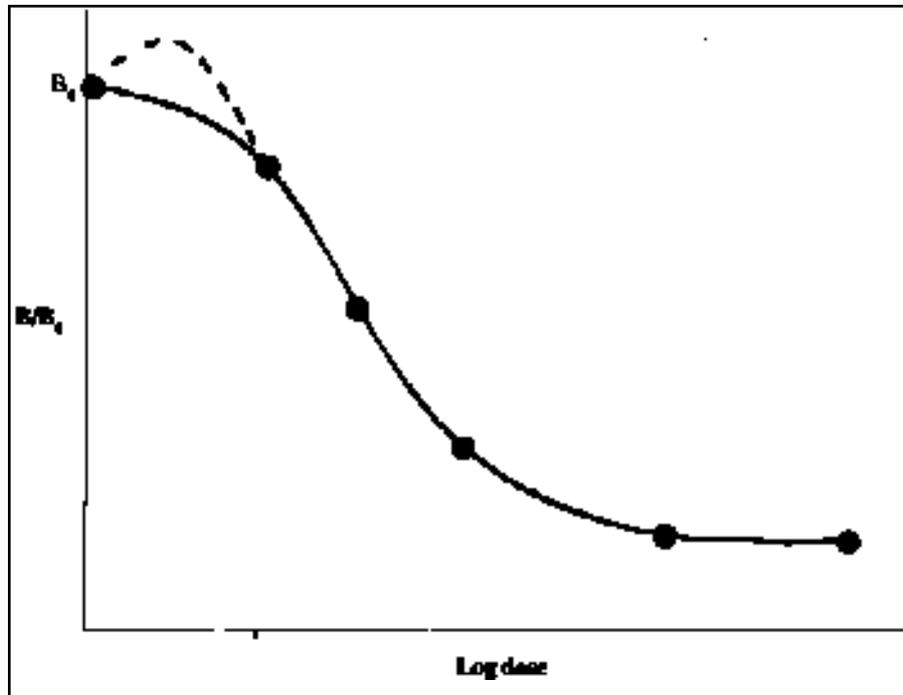
La morfologia della curva cambia ovviamente a seconda delle trasformazioni impiegate per esprimere le concentrazioni nominali e le risposte sperimentali, ma varia anche -a parità di trasformazione scelta- in funzione della formulazione matematica adottata per la descrizione dei risultati.

Non è questa la sede per dilungarci sui metodi di elaborazione dati, ampiamente trattati anche in modo approfondito in altri testi, ma ricordiamo che si possono classificare in:

- metodi empirici, che danno una interpretazione fenomenologica della curva limitandosi a raccordare semplicemente i punti sperimentali;



**Figura 3.** Effetto del numero di standard sulla accuratezza della stima. L'uso degli standard 0, 1, 3 ed 8 ng/ml è quello proposto e fornito dal produttore. L'inserimento di uno standard a concentrazione 5 ng/ml mostra un diverso punto di inflessione.



**Figura 4. Effetto gancio alle basse dosi, comprese tra lo standard zero ed il primo standard.**

<p><b>Metodi empirici</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grafico manuale</li> <li>- Interpolazione lineare</li> <li>- Interpolazione polinomiale</li> <li>- Funzione Spline</li> <li>- Funzione Smoothed Spline</li> </ul> <p><b>Metodi razionali approssimati</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Logit-log (pesata o non pesata)</li> <li>- Logistica 4 parametri</li> <li>- Logistica 5 o più parametri</li> <li>-WON -LL</li> </ul> <p><b>Metodi razionali esatti</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Scatchard</li> <li>- Feldman</li> <li>- Fernandez-Loeb</li> <li>- Wilkins</li> <li>- Jackson, Marshall, Ekins</li> </ul>
---

**Tabella 1. Principali metodi di elaborazione dati in immunometria.**

- metodi razionali basati esattamente o approssimativamente sulla legge di azione di massa alla base del saggio, e che quindi hanno una più intima connessione con le ipotesi chimico-fisiche che lo sottendono.

I principali modelli sono riportati in Tabella 1. Di questi i più diffusi sono il metodo logit-log, il metodo logistico a 4 o più parametri, il metodo spline; i metodi razionali esatti sono impiegati molto più di rado e raramente risiedono nei pacchetti di software dedicati all'elaborazione dei dati in immunochimica. In ogni caso è utile conoscerli e disporre della possibilità di gestire i fondamentali, quali Scatchard e Jackson Marshall—Ekins poiché -come vedremo più avanti- permettono una conoscenza sintetica approfondita di alcuni aspetti chimici del kit in esame.

La validità di adattamento di un modello alla architettura del saggio può essere espressa da parametri matematico statistici spesso notificati dai software residenti sui più diffusi gamma counter. I principali parametri sono:

- coefficiente di correlazione, di cui si ricorda che la maggiore approssimazione all'unità ~ un primo indice di bontà della regressione;

- varianza residua, corrispondente alla varianza delle ampiezze delle deviazioni dei punti sperimentali intorno alla curva calcolata. Ovviamente un più basso valore di varianza residua corrisponde ad una migliore regressione;

- errore quadratico medio, (root mean square ovvero RMS), corrispondente alla deviazione standard degli scarti dei punti sperimentali intorno alla curva; anche in questo caso più basso è il valore dell'RMS, migliore è l'adattamento della regressione;

- Test F ovvero rapporto tra varianza spiegata con la regressione e varianza non spiegata per il complesso dei punti sperimentali; in questo caso la qualità della regressione è più elevata per valori più alti di F;

- ricalcolo delle dosi che si ottiene dalla differenza tra valore nominale e valore ricalcolato per ciascuno standard sulla curva impiegata; è opportuno ricavare un valore finale unico -ove il computer non lo esegua- accorpando i valori assoluti delle differenze percentuali relative a tutti gli standard ed esprimendo la differenza percentuale media, utile a confrontare attraverso un solo parametro due differenti metodi di elaborazione o due curve trattate con lo stesso modello.

Naturalmente questi metodi di controllo della qualità dell'elaborazione sono applicabili solo con quelle elaborazioni definite di *regressione*, in cui cioè la curva calcolata passa attraverso i punti sperimentali, mentre non si possono avere informazioni statistiche con i cosiddetti metodi di *interpolazione*, in cui la curva passa sopra i punti sperimentali (metodi punto a punto, quali ad esempio la spline).

Un approccio logico alla definizione di informazioni contenute nella curva dose! risposta non può infine prescindere da un giudizio diretto (in

fase di prova kit) e/o nel tempo (in quanto gestibili come parametri da archivio) sui parametri della curva che possono essere definiti *espliciti*, nel senso che fanno parte dei dati fondamentali della curva stessa e che sono:

- capacità legante (risposta massima/risposta totale disponibile ovvero B/T%), in genere compresa tra il 30 ed il 50% nei sistemi competitivi per ottenere una soddisfacente sensibilità

- legame non specifico (risposta del fondo strumentale/risposta totale disponibile ovvero NSB/T%), che di norma non deve superare il 5% e che per valori più elevati è un buon indice di degradazione del tracciante;

- dosi corrispondenti a cali fissi di capacità legante (in genere 20, 50, 80%);

- parametri della funzione interpolante, quali l'intercetta e -soprattutto- la pendenza che determina la sensibilità analitica del sistema.

Così volendo verificare se il metodo 4PL meglio si adatti rispetto quello logit-log per un determinato dosaggio, se ne possono confrontare i parametri citati; se questi fossero ad esempio quelli di seguito descritti:

	4PL	logit
coeff. correl.	.9993.	9982
varianza residua	5.4e <sup>3</sup>	4.8e <sup>2</sup>
test F	12560	2166
ricalcolo dosi		
5	5.8	5.4
10	10.6	10.9
20	20.1	18.2
50	49.9	46.3
100	100.8	104.6
diff.% tot.	23.5	38.0
diff.% media	4.7	7.6

se ne potrebbe dedurre che il metodo 4PL meglio si adatta a descrivere i risultati sperimentali nel loro complesso, anche se risulta più inaccurato nella stima della prima dose. Una verifica più completa prevede comunque anche il confronto dei profili di imprecisione.

#### 4) Tracciante

##### *Il tracciante isotopico*

In radioimmunologia il tracciante è un costituente che contribuisce in modo consistente alla qualità del saggio ed -al tempo stesso- è quello meno stabile, facendo riferimento non tanto al decadimento del segnale radioattivo quanto alla degradazione della molecola. Una scarsa qualità del tracciante comporta quindi perdita di sensibilità, scarsa precisione, aumento del segnale non specifico (NBS), calo della capacità legante e variazioni nell'andamento della curva standard.

Una descrizione semplicistica della reazione immunologica del dosaggio RIA si basa sugli assunti che: tutto il tracciante sia costituito da sole molecole marcate, possa legarsi con l'anticorpo, competa con l'antigene freddo, sia presente in quantità molto basse.

In pratica il tracciante può presentare un diverso ammontare di Iodio-125 per molecola e/o essere marcato in percentuale più o meno elevata, o anche essersi degradato a causa dei diversi fenomeni di lisi della molecola determinati dalla radioattività.

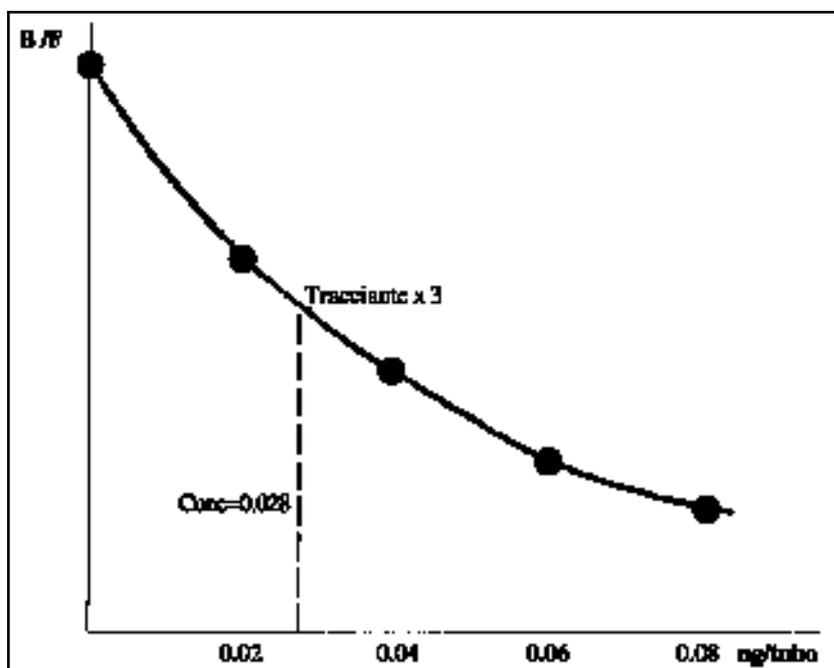
E' quindi opportuno valutare la qualità del tracciante di un kit, definibile essenzialmente attraverso due parametri: attività specifica ed immunoreattività.

L'attività specifica rappresenta l'ammontare di radioattività per unità di massa che viene normalmente espressa in Becquerel/massa. Non sempre i Produttori dichiarano questo dato, preferendo notificare il valore di attività totale espresso in Becquerel/ volume totale di tracciante; quest'ultimo parametro è senz'altro utile per il calcolo della quantità di radioattività complessivamente impiegata in laboratorio ma non permette la conoscenza dell'attività specifica, se non si conosce la concentrazione in analita marcato del tracciante stesso. Ed è proprio quest'ultima grandezza che invece interessa il laboratorista che volesse approfondire le proprie conoscenze sul kit, in quanto solo conoscendo la concentrazione del tracciante è possibile procedere all'applicazione di modelli razionali -quali lo Scatchard- da cui ricavare le caratteristiche immunochimiche del dosaggio (costante di affinità, concentrazione dell'antisiero).

Il calcolo dell'attività specifica può anche essere eseguito nel laboratorio con la tecnica del "self displacement". In pratica il tracciante viene aggiunto ad un tubo di reazione come se fosse un normale campione; quindi la concentrazione di tracciante addizionale viene letta sulla curva standard espressa con B/F in ordinata e quantità di dose in ascissa. Dalla conoscenza della attività totale e dalla concentrazione di tracciante ottenuta è quindi possibile risalire all'attività specifica.

Così ad esempio se si dosano i cinque standard di un ipotetico kit si ottiene la curva esemplificata in Fig. 5.

Trattando il tracciante come se fosse un campione, si aggiunge ad un tubo una quantità pari a quattro volte il volume unitario richiesto normalmente. Interpolando la risposta relativa a tale tubo sulla curva standard si ottiene un valore -ad esempio- di 0.028 ng che è pari a  $0.028/4$  ng cioè 0.007 ng di analita per volume unitario di tracciante. L'attività specifica sarà quin-

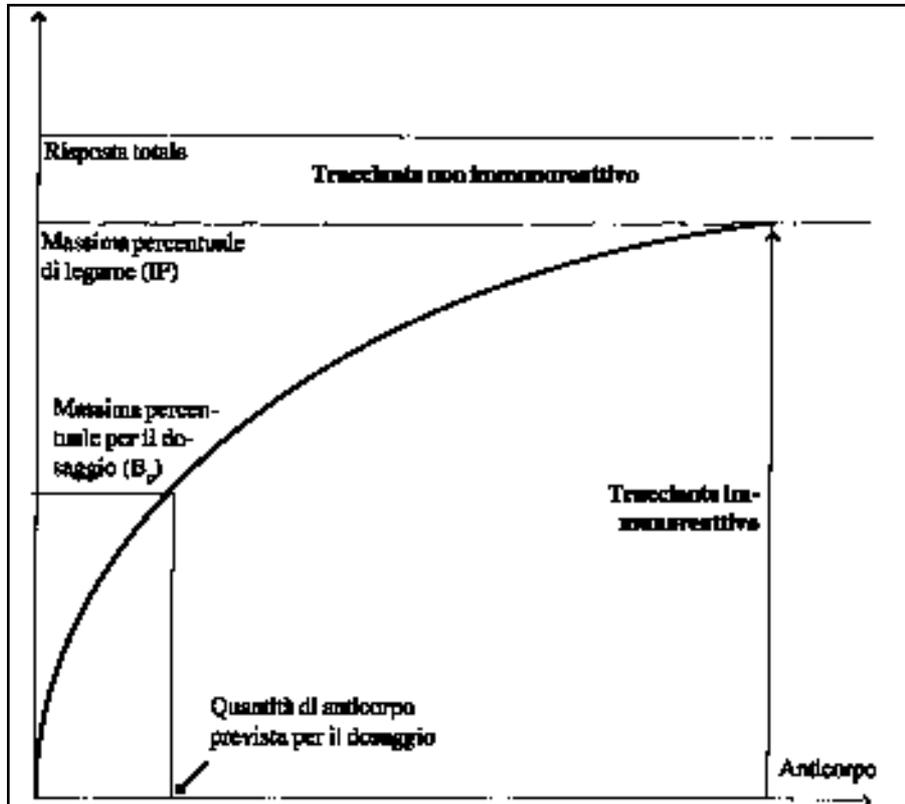


**Figura 5.** Attività specifica calcolata mediante "self-displacement". La figura mostra come, ad esempio, 3 volumi di tracciante trattati come campione contengono 0,028 ng. Pertanto la massa di tracciante è  $0,028/4$ , ( $4=3$  volumi come campione + 1 volume come tracciante), cioè 0,007 ng. Tale valore di massa permette, congiuntamente al valore di attività totale ed al volume di tracciante/tubo, di risalire ai Bq/ml.

di eguale ai Becquerel relativi a quel volume unitario diviso 0,007. Per accrescere l'accuratezza del calcolo è meglio allestire diversi tubi con aliquote crescenti di volume di tracciante (cioè +1 vol., +2 vol., +3 vol., +4 vol.) e verificare che vi sia corrispondenza tra i 4 valori corretti per il rispettivo ammontare.

Va comunque ricordato che questo metodo fornisce risultati abbastanza approssimativi. Esso inoltre non è applicabile quando il tracciante è pre-diluito al punto che una aggiunta doppia o tripla al tubo di reazione stravolga il volume finale, alterando le cinetiche di reazione e le concentrazioni ottimali per lo svolgersi del saggio. In alcuni casi l'attività specifica può essere talmente elevata da non mostrare displacement, il che spesso si verifica nel caso di apteni coniugati.

L'immunoreattività rappresenta la capacità del tracciante di legarsi all'anticorpo. Questa proprietà viene misurata facendo reagire un ammontare costante di tracciante (in genere la quantità prevista per l'esecuzione del dosaggio) con quantità crescenti di anticorpo, fino al raggiungimento di un plateau della risposta espressa in percentuale di tracciante legato, come ad esempio in Fig. 6.



**Figura 6. Immunoattività.** La percentuale di traccianti legato (asse y) aumenta all'aumentare di anticorpo (asse x) fino al raggiungimento di un plateau. La massima capacità legante corrispondente, espressa come percentuale della risposta totale, rappresenta la frazione immunoreattiva (IF).

La massima percentuale ottenuta viene definita frazione immunoreattiva (IF). Il valore di IF deve superare l'80% per consentire dosaggi sensibili. Molte curve standard che esprimono la risposta in B/F o in B/T possono essere migliorate apportando alla risposta relativa al Totale la correzione:

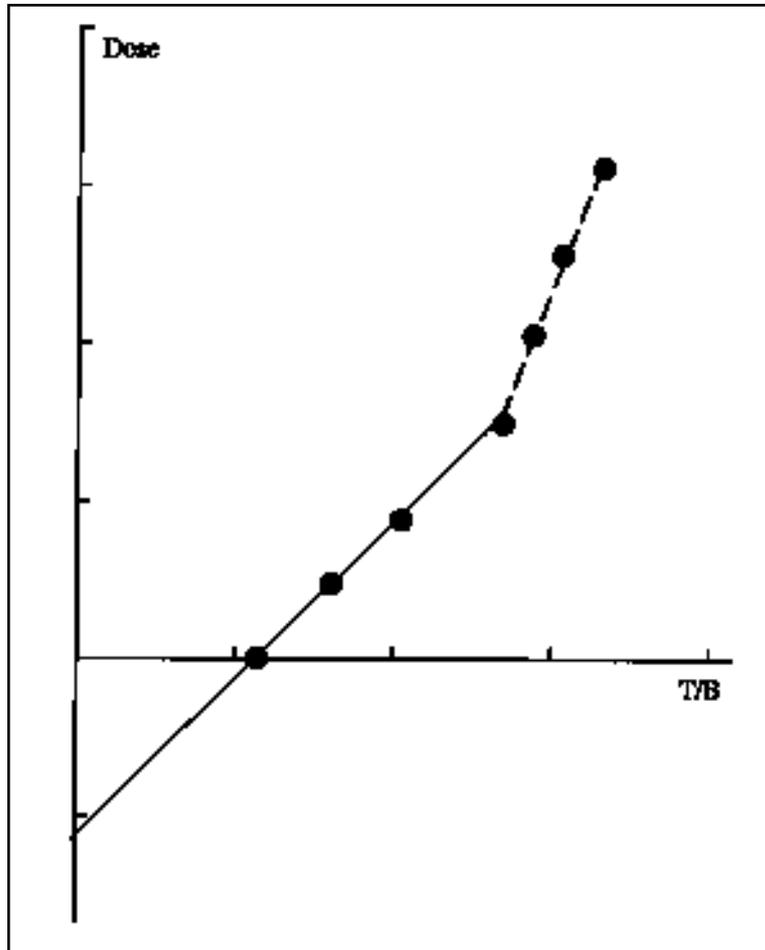
$$\text{Totale corretto} = \text{Totale} * \text{IF}$$

*Tracciante non isotopico*

La tecnica del calcolo dell'immunoattività è praticamente identica nel caso di un tracciante non isotopico, mentre non è facile trasferire la tecnica del self displacement a traccianti enzimatici o fluorescenti.

*Diagramma reciproco*

Nei metodi per competizione riportando il rapporto T/B sull'asse delle ascisse e la dose sull'asse delle ordinate si ottiene una risposta lineare a pen-



**Figura 7. Diagramma reciproco. Risultati di un dosaggio con buona linearità sui primi quattro standard.**

denza positiva su un tratto elevato di curva. E' stato dimostrato che la pendenza del tratto lineare è sostanzialmente equivalente alla concentrazione dell'anticorpo, mentre l'intercetta (in valore assoluto, essendo in genere negativa) corrisponde con buona approssimazione alla concentrazione del tracciante (vedi Fig. 7).

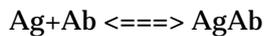
Questo metodo -per quanto semplice- fornisce un grossolano ma efficace approccio, preliminare rispetto ai modelli razionali, per un primo rilevamento di parametri del tracciante e dell'antisiero e per evidenziare eventuali problemi in uno di tali componenti dell'immunodosaggio, quando si verifichi un eclatante allontanamento dalla linearità.

## 5) Antisiero

### *Valutazione in metodi competitivi*

Le caratteristiche di specificità e sensibilità di un dosaggio immunochimico vengono determinate dall'antisiero monoclonale o policlonale impiegato. Questo viene caratterizzato con la classica analisi di Scatchard, metodo razionale di elaborazione della curva standard, che -nei metodi per competizione (RIA, FIA, LIA, etc.)- permette il calcolo della concentrazione anticorpale e della costante di affinità

I presupposti chimici di questo approccio sono le condizioni ideali di uno schema del tutto generico e semplificato della reazione tra antigene ed anticorpo:



la cui costante di equilibrio è:

$$k = \frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]} \quad (1)$$

in cui:

[AgAb] = frazione totale di antigene legato in immunocomplesso;

[Ag] = frazione totale di antigene libero;

[Ab] = frazione totale di anticorpo libero;

Facendo riferimento ai dati numerici del dosaggio è lecito affermare che:

$$[\text{AgAb}] = B_{\text{tot}} = B (X + X^*) / T$$

$$[\text{Ag}] = F_{\text{tot}} = F (X + X^*) / T$$

$$[\text{Ab}] = A_{b_0} - B_{\text{tot}}$$

dove:

B= risposta Bound;

F= risposta Free (F=T-B);

T= risposta Totale;

X=massa antigene nativo dello standard;

X\*= massa totale antigene nel tracciante;

B<sub>tot</sub>= massa totale di antigene legato;

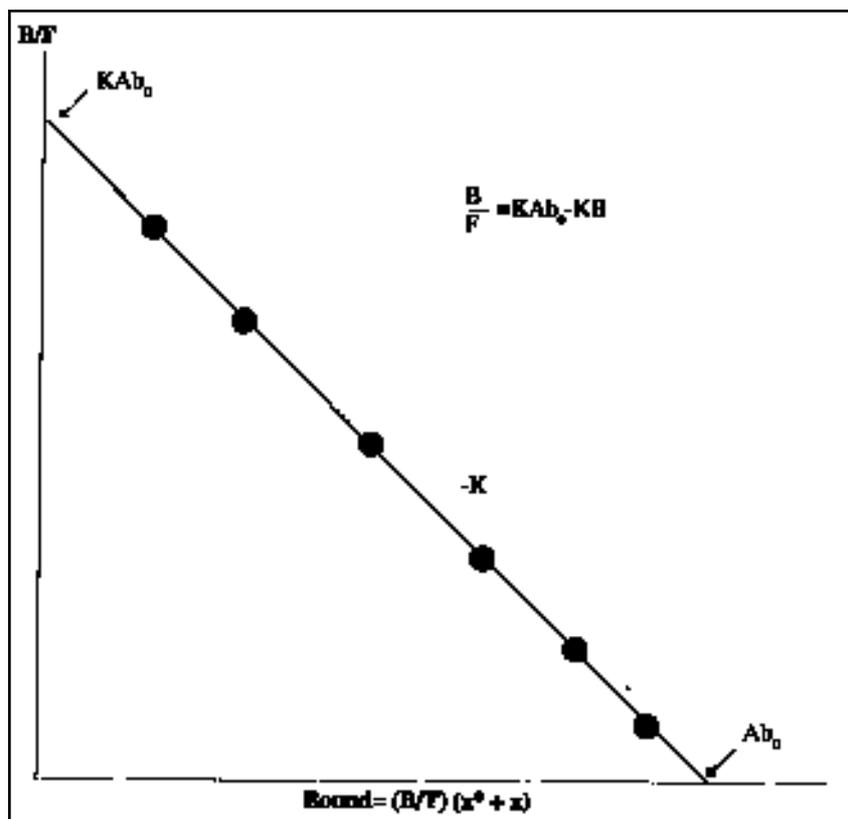
F<sub>tot</sub>= massa totale di antigene libero;

A<sub>b\_0</sub>= concentrazione totale iniziale di anticorpo;

La (1) può essere quindi riscritta come:

$$\begin{aligned} K &= B_{tot} / (F_{tot}(A_{b_0} - B_{tot})) \text{ da cui} \\ B_{tot} / F_{tot} &= K A_{b_0} - K B_{tot} \text{ e quindi} \\ B/F &= K A_{b_0} - K(B/T) (X + X^*) \end{aligned} \quad (2)$$

L'equazione (2) è assimilabile a quella di una retta con pendenza negativa del tipo  $Y = a - bX$ , per cui riportando in grafico per i vari standard il rapporto  $B/F$  in funzione di  $(B/T) (X + X^*)$  si ottiene una retta la cui intercetta sull'asse delle ordinate rappresenta  $K A_{b_0}$ , la cui pendenza è data da  $-K$ ; inoltre per  $B/F = 0$  si verifica la condizione per la quale la retta incontra l'asse delle ascisse in un punto il cui valore rappresenta la concentrazione totale iniziale di anticorpo  $A_{b_0}$ . Un esempio grafico è riportato in Figura 8. Questo approccio allo studio dell'antisiero non presenta un costo in termini di materiale in quanto è eseguibile con i dati noti del dosaggio.



**Figura 8.** Andamento teorico del grafico di Scatchard. Riportando il rapporto  $B/F$  in funzione del  $B$  totale, nel caso di un dosaggio ideale, si ottiene una retta di cui la pendenza è  $-K$  (costante di equilibrio) e l'intercetta sulle ascisse è la concentrazione totale dei siti leganti,  $A_{b_0}$ .

Infatti per il calcolo dei metameri su cui applicare la regressione lineare si impiegano valori dei segnali delle risposte relative alla quota legata, al totale, al segnale di fondo (NBS da sottrarre alla risposta B per un calcolo corretto) ed i valori di massa di analita presenti nella provetta di reazione provenienti dal volume di standard e da quello di tracciante. Di tali valori relativi alle masse di analita, il primo è noto in quanto deducibile dalla concentrazione assegnata allo standard stesso, mentre il secondo è dichiarato dal produttore o è ricavabile da una prova di self displacement precedentemente o contemporaneamente eseguita.

La costante di equilibrio che si ottiene adottando questo modello ha dimensioni di litro/mol, mentre  $Ab_0$  ha dimensioni massa/tubo facilmente esprimibili (noti il peso molecolare dell'analita ed il volume di reazione) in moli/litro.

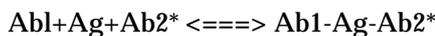
E' comunque opportuno ricordare che il modello Scatchard si basa su assunti semplificati e che quindi in pratica si possono verificare andamenti non lineari. In ogni caso se la linearità è accettabile (coeff. corr. > 0.9) i valori di K e di  $Ab_0$ , pur se espressione di valori medi apparenti, danno indicazioni utili alla caratterizzazione di aspetti precipi del kit.

Infatti: il titolo dell'antisiero è proporzionale al prodotto ( $K Ab_0$ ); l'affinità dell'antisiero è direttamente proporzionale a K; il grado di completezza della reazione è legato a K nel senso che per alti valori di K ( $K > 10^6$ ) la reazione è quasi completa, mentre per valori bassi ( $K < 10^7$ ) la reazione procede in modo limitato; l'ordine di grandezza della sensibilità intesa come capacità dell'antisiero di riconoscere piccole quantità di antigene corrisponde all'incirca ad  $1/K$  (ad esempio per un dosaggio in cui  $K = 10^{12}$  la sensibilità è di  $10^{-12}$  mol/litro).

Modelli razionali più complessi o maggiori approfondimenti sulle deviazioni dall'andamento lineare dello Scatchard non implicano consumi aggiuntivi in fase di prova di un kit ma solo la disponibilità e l'applicazione di programmi di calcolo più complessi, in quanto implicano espressioni matematiche implicite o relazioni iperboliche. La trattazione di questi modelli esula però dagli scopi di questo lavoro.

#### *Valutazione in metodi non competitivi*

Nei metodi non competitivi (IRMA, IFMA, ILMA etc.) in cui il rivelatore della reazione è un secondo anticorpo marcato, l'approccio più semplice consiste nel considerare l'equazione complessiva di formazione dell'immunocomplesso, trascurando gli stadi intermedi attraverso cui si completa il processo. L'equazione è:



la cui costante termodinamica del processo globale è fornita dalla formula:

$$K = \frac{[Ab_1 - Ag - Ab_2^*]}{[Ab_1] [Ag] [Ab_2^*]}$$

in cui:

$[Ab_1 - Ag - Ab_2^*]$  = frazione di antigene legato in immunocomplesso

[Ab1] = massa 1° anticorpo libero (adeso alla fase solida);  
 [Ag] = massa antigene libero;  
 [Ab2] = massa 2° anticorpo libero.

Dai dati numerici del saggio sono consentite le sostituzioni:

[Ab1-Ag-Ab2\*] = B  
 [Ab1] = C1-B;

poiché  $C1 \gg B$ , si ha:

Ab1 = C1  
 [Ag] = X - B  
 [Ab2\*] = F = C2\*-B

dove

C1=concentrazione totale di antigene adeso alla fase solida;  
 C2\*=concentrazione totale del 2° anticorpo;  
 B=concentrazione di immunocomplesso = C2\* (Bound/Totale);  
 F=concentrazione 2° anticorpo libero=C2\* (Totale-Bound)/Totale;  
 X=concentrazione totale antigene.

Eseguendo le vane sostituzioni si ottiene

$$B/F = K C1 (X-B)$$

(3)

La (3) può quindi essere utilizzata riportando B/F in funzione di (X-B) per ciascuna dose, ed ottenendo una retta la cui pendenza fornisce il prodotto spurio (K C1); questo rappresenta in ogni caso un primo parametro indicativo dell'intero procedimento, inseribile in una iniziale scheda del prodotto. E' chiaro che questo dato non consente previsioni e/o affermazioni certe sulla qualità del saggio. Queste si possono ricavare con modelli più complessi, gestibili solo con microcalcolatore ed il cui uso non è di facile applicazione in fase di valutazione iniziale di screening di un prodotto immunochimico.

Ricordiamo comunque come particolarmente utile il modello di Jackson-MarshallEkins per i metodi sequenziali. In esso gli Autori descrivono il processo di legame dell'antigene all'anticorpo adeso alla fase solida con una equazione del tipo MichaelisMenten e, trattando l'equazione complessa con il metodo dei minimi quadrati, calcolano le costanti di formazione del primo e del secondo immunocomplesso, la costante di aspecificità del sistema e la quantità di anticorpo adeso alla fase solida. Non è questa la sede per esplicitare tutto il modello e la relativa tecnica di risoluzione. Per gli interessati ad approfondire comunque questo argomento è stata riportata un'ampia selezione bibliografica cui fare riferimento.

## 6) Monitoraggio delle condizioni di reazione

Per la corretta esecuzione di un test immunochimico devono essere pedissequamente seguite le indicazioni del protocollo operativo consigliato. Pur tuttavia, per poter considerare la stabilità alle variazioni, possono essere valutate le prestazioni del kit a seguito di variazioni dei tempi e delle temperature di incubazione o anche di modifiche delle quantità dei reagenti. In particolare l'approccio termodinamico fornisce utili indicazioni su robustezza e stabilità di un metodo.

Le premesse teoriche, brevemente, si basano sulle equazioni relative alla definizione della variazione di energia libera di un sistema isotermico ed alla sua relazione con la costanza di equilibrio, definite dalle espressioni:

$$G = H - T \Delta S \quad (4);$$

$$G = -RT \ln(K) \quad (5)$$

in cui:

G = variazione energia libera (kcal/mol)

H = variazione entalpia (kcal/mol)

S = variazione entropia (cal/mol/K)

T = temperatura assoluta

R = costante dei gas (1.98 cal/mole/grado)

K = costante di equilibrio

Dalla combinazione della (4) e della (5) Si ottiene:

$$R \ln(K) = + \Delta S - (\Delta H/T)$$

che descrive come varia K in funzione di 1/T.

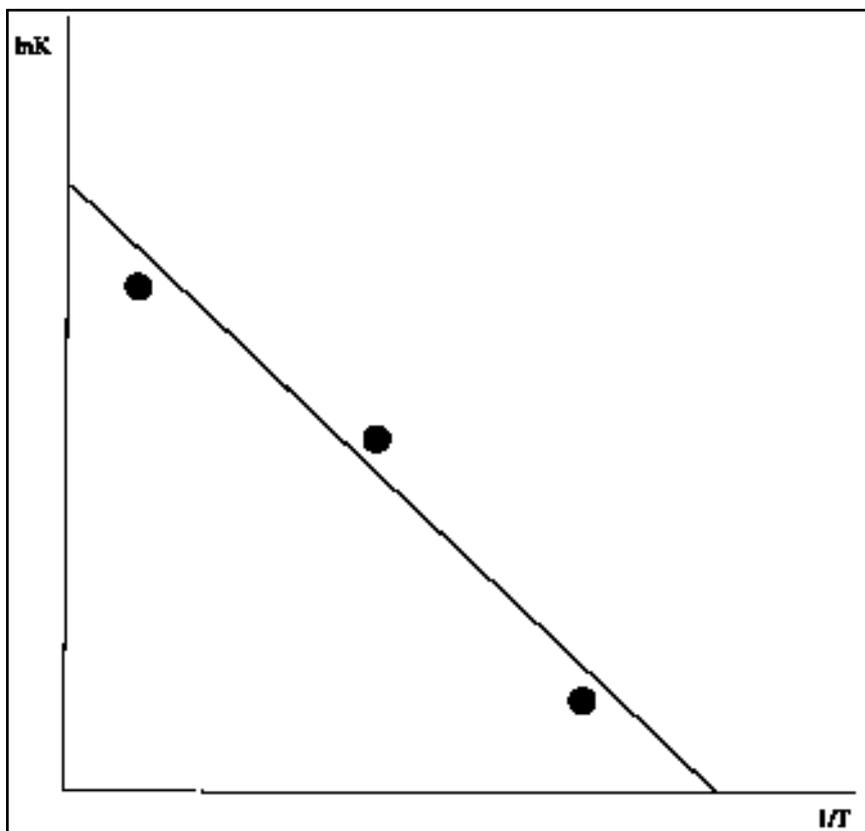
Conducendo un dosaggio a tre temperature differenti e rigorosamente controllatesi possono ricavare le relative K con uno dei metodi descritti in precedenza; riportando  $R \ln(K)$  in funzione di  $1/T$  si ottiene una retta la cui pendenza rappresenta  $-\Delta H$  e la cui intercetta rappresenta  $\Delta S$ , come ad esempio in Fig. 9.

La conoscenza delle grandezze termodinamiche G, H, e S, possono rendere conto in modo approfondito del grado di spontaneità e completezza della reazione, dell'influenza della temperatura sul saggio e su alcune considerazioni di carattere molecolare. Infatti:

\* G, in genere compreso tra -5 e -17 Kcal/mol, indica la spontaneità della reazione, tanto più tale quanto maggiore è il valore assoluto;

\* H è una misura delle forze di legame intra ed intermolecolari e quindi il suo valore assoluto è direttamente proporzionale alla stabilità dell'immunocomplesso, mentre il segno(+) o (-) indica rispettivamente se la reazione è endotermica o esotermica;

\* S esprime il numero di stati microscopici (velocità e posizione degli atomi) che sostanziano l'immunocomplesso;



**Figura 9. Dipendenza dell'equilibrio dalla temperatura. Il grafico di  $\ln K$  funzione di  $1/T$  è in teoria una retta con pendenza pari a  $-H/R$ .**

\* la scomposizione di  $\Delta G$  nelle due quote  $\Delta H$  e  $\Delta S$  fornisce informazioni sui legami tra ligando e legante. Infatti quando la quota entropica predomina si può ipotizzare un rilascio di molecole d'acqua dal sito di legame di un ligando apolare e di piccole dimensioni, indice di una predominanza di legami idrofobici, se invece si ha un predominanza della quota entalpica o una sostanziale equivalenza tra i due valori ~ probabile -secondo la termodinamica statistica- che ciò derivi da un migliore adattamento del sito di legame e da zone di formazione dello stesso molto più ampie;

\* l'esame dei segni di  $\Delta H$  e  $\Delta S$  permette di interpretare il grado di spontaneità della reazione secondo lo schema riportato in Tabella 2.

Questo approccio in definitiva rende conto in maniera dettagliata dei principali aspetti della reazione immunochimica e consente una differenziazione sostanziale tra kit; presenta però il difetto di un consumo notevole di materiale (infatti bisogna eseguire la curva standard ad almeno due differenti temperature) e pertanto non si presta ad un approccio di screening iniziale.

H	S	Comportamento della reazione
-	+	Spontanea a tutte le T
-	-	Spontanea a basse temperature
+	+	Spontanea ad alte temperature
+	-	Mai spontanea

**Tabella 2. Analisi della spontaneità di una reazione immunochimica in funzione delle quote entalpica ed entropica.**

## 7) Minima dose rilevabile

Occorre dire subito che spesso gli autori di articoli scientifici e le ditte produttrici usano indifferentemente il termine minima dose rilevabile (MDR) e quello di sensibilità come sinonimi. Precisiamo subito che il concetto di sensibilità fa riferimento alla più piccola variazione di concentrazione che il metodo è in grado di rilevare, ed è calcolabile dividendo la variazione di risposta per la variazione di dose che l'ha provocata; è in pratica un concetto legato a quello di risoluzione, che viene espresso con la pendenza della curva dose-risposta e che quindi può determinare differenti valori di sensibilità del metodo per differenti ambiti di concentrazione.

La MDR è la più piccola quantità di ligando presente in una matrice chimica e/o biologica, distinguibile con probabilità statisticamente definita dalla dose zero; essa riflette in un unico dato alcune caratteristiche della curva standard, l'affinità dell'anticorpo, l'attività specifica del tracciante, il contributo del bianco reagenti al segnale di fondo.

Se è chiara la definizione letterale della MDR non è altrettanto univoca quella numerica, non essendoci completo accordo tra le Organizzazioni Internazionali accreditate (NCCLS, IFCC, IUPAC, IBWM) sull'interpretazione del termine "probabilità statisticamente definita". Infatti vengono proposti - ed adottati - differenti approcci, che se pur tutti formalmente corretti, portano a risultati anche sostanzialmente diversi della MDR. I criteri in genere più usati sono:

- calcolo della imprecisione della dose zero;
- calcolo dal profilo di imprecisione.

### *Calcolo della MDR dalla imprecisione della dose zero*

Si esegue un numero sufficientemente elevato di replicati dello standard zero; il valore medio di risposta, decrementato o incrementato di due deviazioni standard (a seconda se il metodo sia rispettivamente competitivo o non competitivo) viene interpolato sulla curva standard e rappresenta il valore di dose distinguibile dallo zero con limiti di confidenza del 95%. Anche quest'approccio non è del tutto definitivo; infatti sono possibili diverse varianti tra cui:

- numero di replicati (non definito ed in genere compreso tra 10 e 20);
- uso della deviazione standard teorica (desunta dalla RER) relativa alla risposta media sperimentale ottenuta per la dose zero;
- uso del decremento o incremento di 3 deviazioni standard (per avere limiti di confidenza del 99%).

Comunque poiché lo standard zero è spesso un campione chimicamente modificato (siero deprivato, tampone, etc.) la imprecisione di tale misura può differire da quella di una reale "dose zero".

### *Calcolo della MDR dal profilo di imprecisione*

Il calcolo della MDR può essere affrontato anche determinando con il profilo di imprecisione a quale dose corrisponda un valore di CV del 50%.

Per questo valore si ha infatti la più piccola dose distinguibile da se stessa attraverso due deviazioni standard, che non implichi valori negativi. Infatti per definizione:

$$CV\% = 100 (DS/X);$$

pertanto quando:

$$\begin{aligned} X &= 2 DS \\ X - 2 DS &= 0 \\ \text{da cui:} \end{aligned}$$

$$CV\% = 50$$

Ricordiamo che se il metodo presenta una MDR non soddisfacente, piccole modifiche possono essere tentate secondo noti principi dell'immunochimica utili anche in fase di verifica della stabilità a variazioni delle condizioni di reazione.

Tra gli altri ricordiamo:

- aumento della quantità di campione;
- diluizione dell'antisiero (nei dosaggi competitivi);
- aumento della quantità di antisiero (nei dosaggi sandwich);
- aggiunte sequenziali dei reagenti.

Naturalmente queste variazioni implicano successivi controlli sulla affidabilità complessiva del metodo modificato.

## 8) Accuratezza

Il termine accuratezza riassume un concetto complesso che esprime la capacità di misurare il valore vero dell'analita. Un dosaggio accurato deve essere specifico e sensibile, ed a tali qualità contribuiscono l'assenza di errori sistematici (dovuti ad esempio a cross reazioni o a scarso recupero), la giusta quantità di tracciante, la costante elevata specificità dell'anticorpo, una buona precisione.

Poiché le componenti che determinano l'accuratezza sono numerose non è possibile verificarle attraverso un solo parametro. Tra i test più diffusi, ampiamente riportati nei manuali di istruzioni d'uso dei kit, ricordiamo:

- \* parallelismo
- \* recupero
- \* verifica delle cross reazioni
- \* verifica degli interferenti.

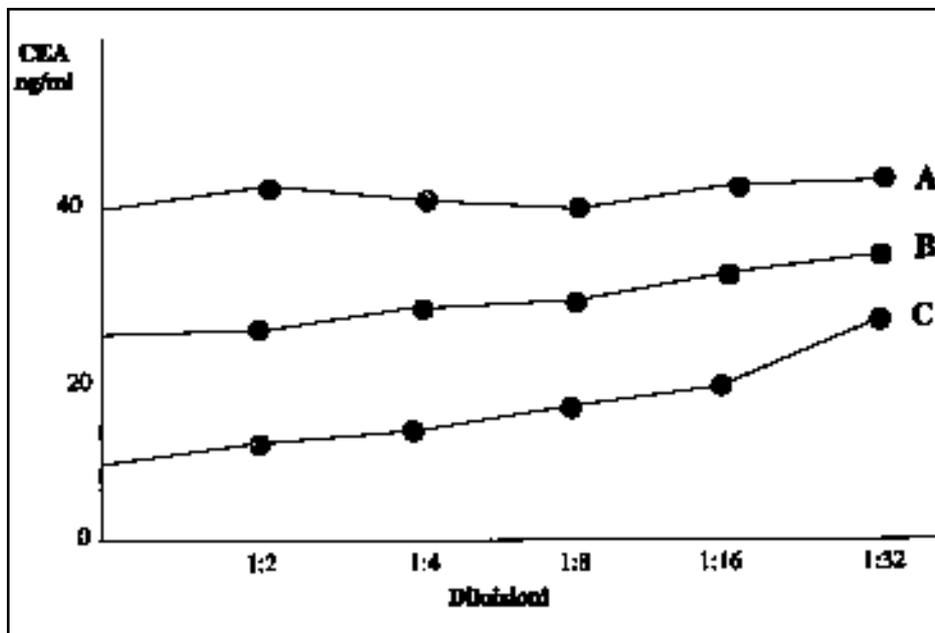
### *Parallelismo*

Il test controlla il parallelismo della risposta tra diluizioni di analita ignoto e standard. In pratica il test risponde alla domanda se, in caso si diluisca un campione relativo ad un paziente si ottenga, dopo correzione per il fattore di diluizione, un valore identico a quello del campione indiluito; ed in caso negativo quale sia il valore vero. In altri termini se il valore dell'analisi possa essere considerato indipendente dalla quantità di campione.

Il test consiste nell'eseguire con un diluente appropriato più diluizioni (almeno 3) di differenti campioni di pazienti e dello standard più elevato del kit e di porre in grafico i risultati modo migliore per evidenziare la linearità ed il parallelismo consiste nel calcolare le concentrazioni finali corrette per le diluizioni e nel riportarle in funzione del rapporto di diluizione, come in Fig. 10; un buon parallelismo fornisce una linea orizzontale, entro i limiti dell'errore di misura. In un grafico del genere differenti campioni possono essere rappresentati contemporaneamente e dovrebbero essere paralleli tra loro. Anche la semplice ispezione visiva, se non si dispone di test statistici per apprezzare differenze significative dal comportamento ideale, è sufficientemente adeguata a dare indicazioni di massima.

Scostamenti dal parallelismo dello standard impiegato o dei campioni possono suggerire:

- eterogeneità dell'analita; ciò vale anche per lo standard in quanto spesso i valori degli standard di un kit non sono basati su diluizioni di quantità misurate con un metodo indipendente, ma sono stati "aggiustati" per avere continuità nella curva di taratura e nei valori dei campioni di controllo;
- eterogeneità dell'antisiero;
- misure eseguite nella zona di curva standard a maggiore imprecisione;
- scelta inappropriata del diluente (standard zero, soluzione fisiologica, tampone etc.).



**Figura 10. Parallelismo.** Lo standard del kit a concentrazione 40 ng/ml di CEA in siero umano (A) mostra un andamento delle diluizioni sostanzialmente parallelo con quella del siero di paziente a concentrazione 25 ng/ml (B); l'andamento non è parallelo con le diluizioni del campione C, che parte da una bassa concentrazione, con conseguente perdita di accuratezza ad elevate diluizioni.

#### Recupero

E' un test che consente di verificare se una quantità nota di analita aggiunta al campione venga misurata quantitativamente dal saggio. Si può eseguire aggiungendo quantità misurate con sicurezza di analita puro: tale prassi non è sempre agevole in quanto non sempre è possibile reperire con facilità l'analita puro. Pertanto spesso alcuni autori fanno riferimento all'uso di sieri per il controllo di qualità intralaboratorio, che in genere sono in matrice umana e possono presentare la concentrazione dichiarata per il metodo in esame, che in tal caso viene assunta come esatta.

Spesso i sieri di controllo sono a tre livelli e consentono la verifica del recupero su tutto il range di curva. Il calcolo del recupero può essere eseguito mediante due formule:

\*)  $R\%+ = (\text{valore misurato} - \text{valore basale}) \times 100 / \text{quantità aggiunta}$ ;

\*\*\*)  $R\% = (\text{valore misurato}) \times 100 / \text{valore atteso}$ ;

i quali danno risultati equivalenti se il metodo è accurato, mentre in caso contrario differiscono anche in modo consistente.

Così nella situazione di seguito esemplificata:

valore basale 100 ng/ml;  
 quantità aggiunta 50 ng/ml;  
 valore misurato 140 ng/ml;  
 valore atteso 150 ng/ml;

con il primo metodo si ottiene:

$$(140-100) \times 100/50=80\%$$

mentre con il secondo metodo il risultato è

$$(140) \times 100/150=93\%$$

Il primo metodo, che è il più adottato e senz'altro da preferire, può rivelare una inaccuratezza sistematica dovuta per esempio alla matrice.

Il valore del test può essere espresso accorpando i risultati percentuali relativi a vari livelli di dose aggiunta e mediandoli. È accettabile una dispersione dei risultati contenuta entro il 95-105%.

#### *Cross-reazioni*

La reattività crociata è la capacità relativa di una specifica molecola di reagire con un anticorpo prodotto verso una differente molecola.

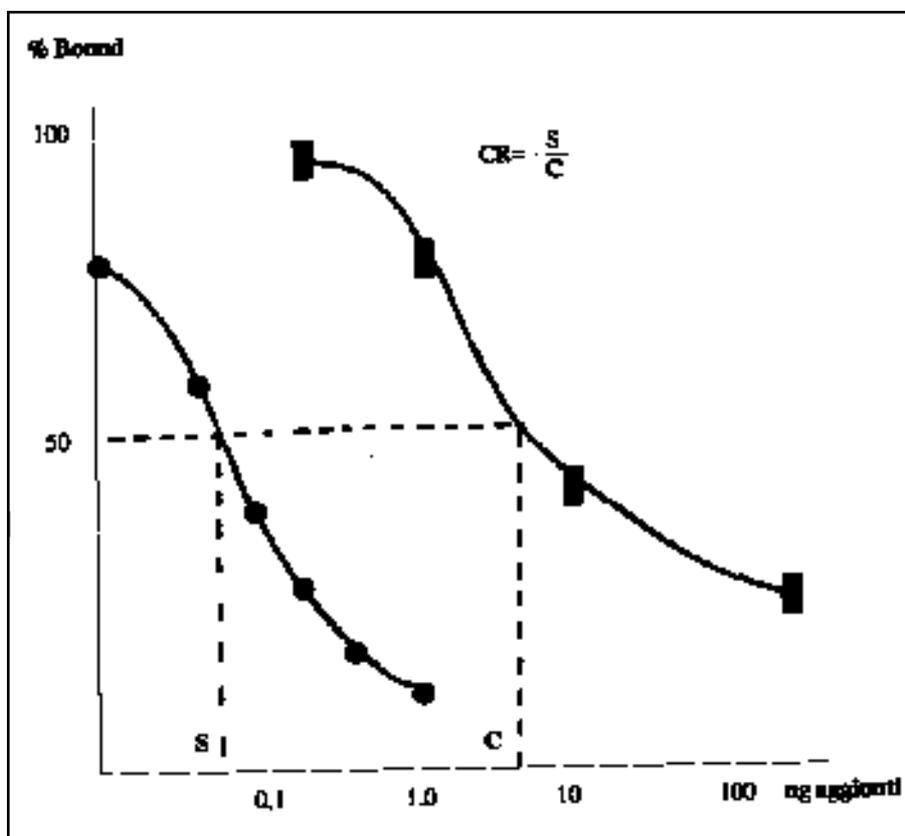
Valutare le reazioni crociate di un kit è quindi difficile e costoso, dovendo il Laboratorio in teoria disporre di un elevato numero di composti. Pertanto in generale per quanto attiene questa valutazione si fa spesso riferimento a quanto dichiarato dal produttore. In ogni caso ricordiamo che la reattività crociata viene espressa come dose richiesta per abbassare del 50% la capacità massima del tracciante. L'esperimento viene condotto eseguendo una curva di taratura con la sostanza cross reagente simultaneamente ad una curva standard. La reattività crociata viene convenzionalmente espressa con la formula seguente ed un esempio è illustrato nella figura 11:

$$CR = \frac{\text{massa analitica corrisp. al 50\% (B}_0\text{)}}{\text{massa cross-reagente corrisp. al 50\% (B}_0\text{)}}$$

#### *Interferenti*

Nel valutare l'accuratezza non si può non tenere conto del ruolo di eventuali interferenti spesso presenti nella matrice biologica. Le prove consistono nell'analizzare un pool di sieri al quale vengono aggiunti separatamente gli interferenti.

Il grado di interferenza si esprime in percentuale del valore riscontrato rispetto al valore di partenza del pool.



**Figura 11. Cross-reattività.** La curva di spiazzamento della sostanza cross reagente (■) viene confrontata con la curva standard (●). Al 50% di legame, il valore di dose standard *S* diviso per il valore di dose cross-reagente *C* rappresenta la cross-reattività frazionaria.

Nella fase di valutazione iniziale è opportuno fare riferimento ad almeno tre potenziali interferenti plasmatici e cioè

- emoglobina;
- bilirubina;
- proteine,

i quali possono contribuire ad inaccuratezza soprattutto nei metodi non isotopici, basati su esplicitazione fotometrica del segnale analitico.

Può inoltre essere utile stabilire gli eventuali effetti interferenti degli anticoagulanti maggiormente in uso, per eliminare incertezze se sia da preferire il campione sierico a quello plasmatico.

### Emoglobina

L'Hb derivante da una lisi piP o meno elevata delle emazie può interferire in letture fotometriche o anche avere effetti sulla cinetica di reazione, mentre l'emolisi in generale crea l'inconveniente del passaggio nel plasma di sostanze indesiderate che a loro volta possono interferire.

Il test di interferenza può essere eseguito secondo il seguente protocollo.

1) Preparazione dell'emolisato

- a) prelevare 10 ml di sangue con eparina;
- b) centrifugare (1000 g, 10) ed aspirare il plasma;
- c) lavare le emazie con sol. fisiologica;
- d) prelevare 4 ml di emazie impaccate;
- e) aggiungere 16 ml H<sub>2</sub>O dist. e 1.6 ml di toluolo;
- f) tappare ed agitare su agitatore rotante per 15';
- g) centrifugare (3000 g, 10);
- h) aspirare lo strato superficiale e filtrare;
- i) determinare la concentrazione di Hb (circa Sg%);

2) Diluire l'emolisato totale (E) con acqua distillata 1/200, 1/100, 1/50, 1/25 per un volume finale di almeno 20 ml. Le concentrazioni di Hb risultanti sono rispettivamente pari a circa 25, 50, 100, 200 mg% e riflettono le condizioni di emolisi più probabili da trovare in pratica, da un livello debole ad uno intenso.

3) Ricostituire con le 4 soluzioni e con l'emolisato totale (F) altrettanti sieri di controllo commerciali ad uno o più livelli dell'analita da dosare.

4) Eseguire il dosaggio e confrontare i risultati ottenuti, che definiamo Emolisi, con quelli di altrettanti sieri di controllo ricostituiti con acqua distillata (C).

5) Il grado di interferenza si può esprimere con la formula:

$$\text{grado interferenza} = (\text{Emolisi} - C/C) 100$$

e la significatività statistica ai vari livelli di emolisi testati può essere controllata verificando se il valore supera di almeno due volte il CV% intrasaggio.

Per rendere meno oneroso il metodo si può snellire la prova ad un numero più ridotto di livelli di emolisi e di livelli di concentrazione dell'analita.

### Bilirubina e proteine

Il modo più semplice è quello di eseguire un test di recupero e/o di diluizione su campioni che contengano quantità incongrue di tali componenti, e confrontare il risultato con il rispettivo test eseguito su sieri con concentrazioni normali di bilirubina o proteine.

E' anche possibile procedere con un metodo simile a quello descritto per l'Hb, dove le soluzioni madre sono rispettivamente:

- proteine: miscela albumina/globuline in rapporto 70:30 con concentrazione totale pari a circa 8 g%;
- bilirubina: 20 mg di bilirubina Merck +2 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ 10 ml acqua distill.; mescolare fino a completa dissoluzione e portare a 100 ml con acqua distillata.

Anticoagulanti

Si consiglia di allestire provette contenenti:

eparina	20
EDTA	2 m g / m l
Citrato di Na	1 0 0 μ g / m l
Ossalato di Na	2 μ g / m l
-NaF	4mg/ml
-assenza di anticoagulante (siero).	

Dopo aver eseguito la determinazione, considerando arbitrariamente il campione sierico più accurato, calcolare l'inaccuratezza prodotta dall'impiego di anticoagulante con la formula:

$$\% = (\text{Plasma} - \text{Siero} / \text{Siero}) 100$$

Lo scostamento percentuale ( %) sarà significativo se uguale o superiore al doppio del CV% intrasaggio.

Dopo essersi accertati della eventuale inaccuratezza prodotta dall'anticoagulante può essere utile determinare se l'azione di quest'ultimo avviene a livello di cinetica di reazione o sulla struttura dell'analita con test di diluizione e di verifica della massima capacità legante, in presenza di elevate concentrazioni dell'anticoagulante studiato.

Conservazione dei reagenti

Può essere utile verificare la robustezza dei reagenti anche a livello della loro stabilità quando non conservati alle condizioni richieste. In tal caso si può introdurre nel protocollo di studio un momento di valutazione dei principali parametri della curva standard (massima capacità legante, NSB, MDR, pendenza, intercetta, valore in concentrazione di uno o più sieri di controllo) relativi a tre dosaggi svolti conservando i reagenti rispettivamente a 40 C, a temperatura ambiente ed a -20° C.

## 9) Varie

Non vanno trascurati, nell'ambito di uno studio veramente completo di una metodologia, alcuni aspetti minori che hanno comunque un peso nel giudizio finale di qualità del sistema. Tra questi ricordiamo:

- il tempo delle incubazioni ed il tempo complessivo di dosaggio, che devono essere compatibili con orari e sistema di lavoro del laboratorio;
- la necessità di attrezzature particolari, quali ad esempio pipette in grado di prelevare volumi non consueti di reagenti, agitatori, degassatori di liquidi (per sistemi basati su letture fotometriche);
- la necessità di reagenti particolari non forniti;
- la necessità di estrazione o di particolare preparazione dei campioni per l'analisi;
- il costo del kit valutato globalmente ed anche unitariamente per provetta e per analisi.

Infine solo un accenno ad un aspetto fondamentale e critico che, pur non essendo oggetto di questa trattazione più strettamente analitica, è doveroso ricordare, rinviano alla letteratura specifica per una documentazione completa: la valutazione clinica.

Questa può essere effettuata mediante:

- confronto con un metodo di riferimento;
- confronto con il metodo in uso;
- definizione dei valori di riferimento;
- valutazione della performance clinica (sensibilità, specificità, valore predittivo ed efficienza), che nel loro insieme permettono il giudizio definitivo sulla capacità del kit a rispondere a precise problematiche cliniche e diagnostiche.

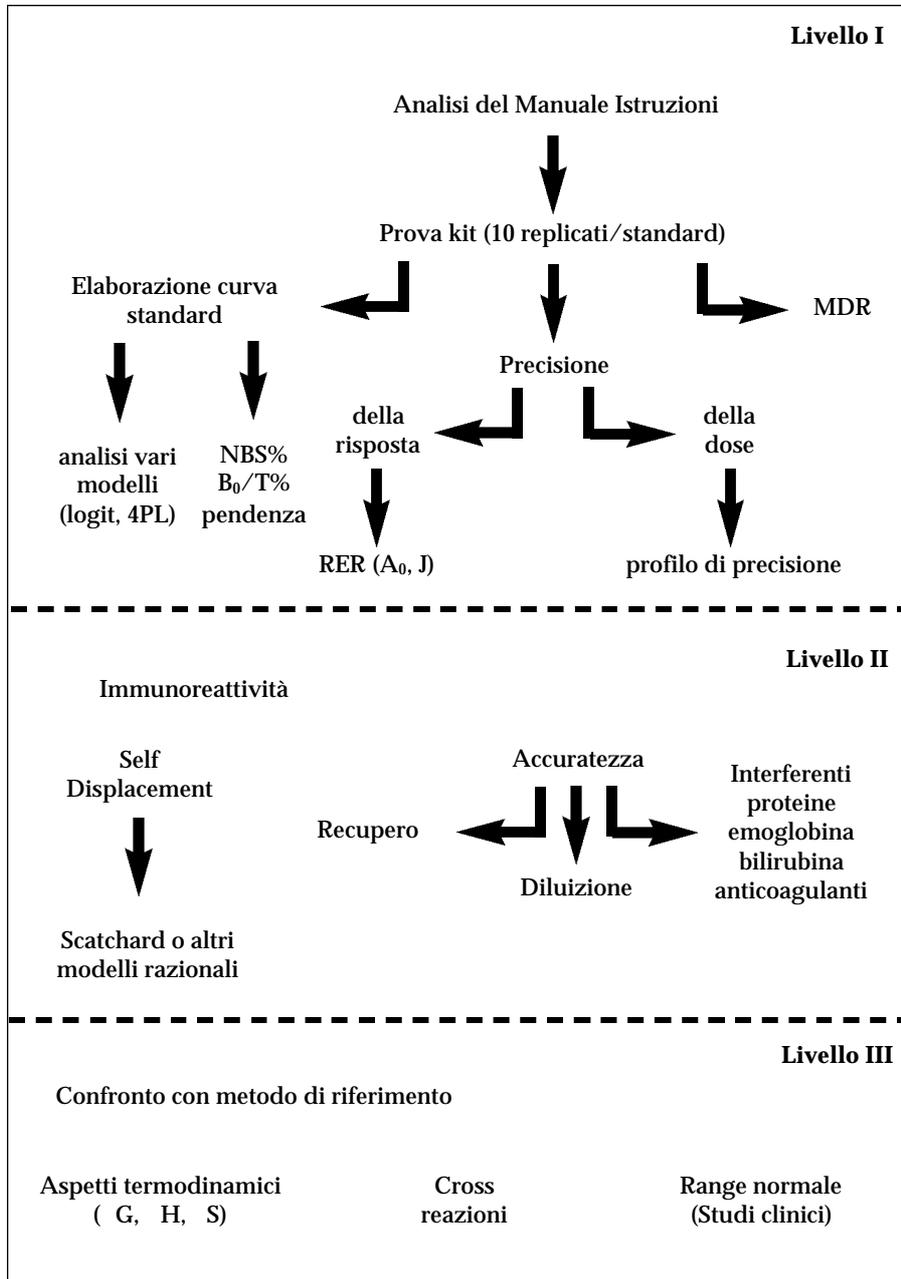
## **Protocollo di valutazione**

Combinando la maggior parte dei test precedentemente descritti è possibile allestire un protocollo per valutare un nuovo metodo o confrontarne diversi.

Lungi dal voler proporre un protocollo di valutazione definitivo, compito sicuramente demandato a società scientifiche, riteniamo comunque utile riportare una ipotesi di assemblaggio logico di alcuni test, da attuare con l'uso di circa 400 tubi ed un numero limitato di sedute analitiche (vedi Schema 4).

Naturalmente a seconda degli scopi che ciascun Laboratorio si pone ed a seconda del numero di tubi disponibili per le prove il protocollo potrà essere ridotto, arricchito o modificato con la sostituzione di alcuni test.

Abbiamo comunque indicato come Livello I quelle prove ritenute irrinunciabili ed utilizzate dalla quasi totalità degli autori della letteratura dedicata a questo aspetto; la fascia di Livello II accorpa quei test che permettono di giungere ad una più precisa definizione delle caratteristiche di un kit; il Livello III permette una serie di informazioni più sofisticate e la definizione del range di riferimento. La conduzione dei dosaggi relativi a ciascuno dei primi due Livelli si articola all'incirca su 100 tubi, mentre il Livello III ne richiede almeno 200.



**Schema 4. Esempio di protocollo per la valutazione di un metodo immuno-chimico.**

## Bibliografia

1. Benson JR., Connelly D.P. and Burke M.D. - Symposium on Test selection strategies. *Clin. Lab. Med.* 110,13, 1982.
2. Bland J.M. and Altman D.G. - Statistical methods for assessing agreement between measurement. *Lancet* 8,306, 1986.
3. Bremner W.S. and Chase G.D. - Some concept of RIA theory, data reduction, and quality control. *Ligand Quarterly* 33,21, 1980.
4. British Standard Institution (BSI) - Precision of test methods I: Guide for the determination and reproducibility for a standard test method (BS 5491 part 1). Londra BSI 1979.
5. Butt W.R. - *Practical immunoassay: the state of the art.* Marcel Dekker, New York 1984.
6. Chan D.W. and Perlstein M.T. - *Immunoassay : a practical guide.* Academic Press, Londra 1987.
7. Chard I. - *An introduction to radioimmunoassay and related techniques.* Elsevier Biomedical, Amsterdam 1982.
8. Clayton C.A., Hines J.W. and Elkins P.D. - Detection limit with specified assurance probabilities. *Anal. Chem.* 59,2506, 1987.
9. Collins W.P. - *Complementary immunoassays.* John Wiley & Sons, Chichester 1988.
10. Commission "Methodes de reference" de la societe Francaise de Biologie Clinique - *Methodes de reference et methodes selectionnees en biochimie clinique.* *Ann. Niol. Clin.* 334,235, 1976.
11. Ekins R. - The precision profile : its use in RIA assessment and design. *Ligand Quarterly* 4,33, 1980.
12. Englebienne P., Slegein G. - Estimation of specific activity of radioiodinated gonadotropins; comparison of three methods. *J. Immunol. Methods* 56,135, 1983.
13. European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) - *Guidelines for evaluation of analyzers in clinical chemistry.* 1986.
14. Feldman H., Rodbard D. and Levine D. - Mathematical Theory of cross-reactive radioimmunoassay and ligand-binding systems at equilibrium. *Anal. Biochem* 45,530, 1972.

15. Fernandez A.A. and Loeb HG. - Practical applications of radioimmunoassay theory. A simple procedure yielding linear calibration curve. *Clin. Chem.* 21,1113, 1975.
16. Fernandez A.A., Stevenson G.W. Abraham G.E. and Chiamori N.Y. - Interrelations of the various mathematical approaches to radioimmunoassay. *Clin. Chem.*29,284, 1983.
17. Finney D.J. - Statistical methods in biological assay. Griffin, Londra 1978.
18. Fraser C.G. - Analytical goals in clinical biochemistry. *Prog. Clin. Pathol.* 8,101, 1981.
19. Garrett P.E. - Method evaluation : screening assays with insert package data. *J. Clin. Immunoassay* 8,57, 1985.
20. Garrett P.F. and Krouwer J S. - Method evaluation : precision and sensitivity considerations. *J. Clin. Immunoassay* 8,165, 1985.
21. Gosling P.G. - A decade development in immunoassays methodology. *Clin. Chem.*36,1408, 1990.
22. Griner PE. and Glaser RI. - Misure of laboratory tests and diagnostic procedures. *N. Engl. J. Med.* 107,1336, 1982.
23. Hollemans H.J.G. and Bertina R.M. -Scatchard plot and etherogeneity in binding affinity of labeled and unlabeled ligand. *Clin. Chem.* 21,1769, 1975.
24. Homsher R. - Effect of data reduction on accuracy assessment in immunoassays. *J.Clin. Immunoassay* 8,230; 1985.
25. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) - Improvement of comparability and compatibility of laboratory results on life sciences. IFCC Master discussion. Acta of "The First Bergmeyer Conference" 1989.
26. Jackson T.M., Marshall N.J. and Ekins R.P. - Immunoassay for Clinical Chemistry. Churchill Livingstone, Londra 1983.
27. Kubasik N.P. - Il dosaggio radioimmunologico (1) - Caleidoscopio (n.9.) Medical Sustems, Genova 1984.
28. Kubasik N.P. - Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima- Caleidoscopio (n.10.) Medical Systems, Genova 1985.
29. Kubasik N.P. - Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda - Caleidoscopio (n.11.) Medical Systems, Genova 1985.

30. Kubasik N.P. -Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima - Caleidoscopio (n.12) Medical Systems, Genova 1985.
31. Kubasik N.P. -Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda - Caleidoscopio (n.16.) Medical Systems,Genova 1985.
32. Long G.L. and Winefordner J.D.- Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55,712, 1983.
33. McNeil B.J. and Adelstein S.J. - Determining the value of diagnostic and screening tests. *J. Nucl. Med* 17,439, 1976.
34. National Committee for Clinical Laboratory standards (NCCLS) - Guidelines for standard to assess the quality of radioimmunoassay systems - Tentative guideline TSLA 01 - 1,03, 1980.
35. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Reference method for by radioimmunoassay - Proposed standard J/LAO9-P 1,03, 1985.
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) - Assessing the quality of radioimmunoassay systems - Approved guideline LAOI-A 1,05, 1985.
37. Perlstein MT. - Parallelism: effect of protein matrixes and mathematical treatment of data. *Ligand Quarterly* 2,6, 1979.
38. Perlstein M.T. , Chan D.W. and Bill .M.J. - Parallelism: a useful tool for troubleshooting. *Ligand Quarterly* 3,34, 1980.
39. Pilo A. and Zucchelli G.C. - Automatic treatment of radioimmunoassay data : an experimental validation of results. *Clin. Chim. Acta* 64,1, 1975.
40. Pilo A., Zucchelli G.C., Malvano R. and Masini S. - Main features of computer algoritms for RIA data reduction; comparison of some different approaches for the interpolation of the dose response curve. *J. Nucl. Med. All. Sci.* 26,235, 1982.
41. Ringhini R. - L'elaborazione dei dati dal dosaggio immunochimico. *Ligand Quarterly ed. ital.* 5,3(suppl.) ,69, 1986.
42. Ringhini R. - Approccio teorico alla elaborazione dati in immunometria - *Biochimica Clinica (suppl.)* 12,33, 1986.
43. Rodbard D., Rayford P.L., Cooper J.A. and Ross G.T. - Statistical quality control of radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol.* 28,1412, 1968.
44. Romano L. and Marseglia S. - Proposta di un modello razionale esatto

- peril rilevamento dell'effetto gancio. *Ligand Quarterly* ed. ital. 1,5, 1988.
45. Romano L. and Marseglia S. - 11 dosaggio immunometrico. Fondamenti e metodi dell'elaborazione dati. Liguori Editore, Napoli 1988.
  46. Romano L. and Marseglia S. - Note a margine su un modello razionale di interpretazione dell'effetto gancio. *Ligand Quarterly* ed. ital. 4,376, 1988.
  47. Romano L. and Marseglia S. - Programma di elaborazione dati per i dosaggi immunometrici (sandwich) con algoritmo logit-log pesato a normalizzazione ottimizzata (WON-LL). *Biochimica Clinica* 13,1091, 1989.
  48. Romano L. and Marseglia S. - Il programma gancio : modifica e sviluppi . *Ligand Quarterly* ed. ital. 3,450; 1990.
  49. Romano L. and Marseglia S. - IRMA: guida al dosaggio radioimmunometrico. *Gior. Ital. Clin. Chim.* 15,99, 1990.
  50. Rota G. - Il controllo di qualità in radioimmunologia. *Biodata*, Milano 1980.
  51. Rota G. , Prandini B., Spandrio L. and Ferlin G. - Cause di variabilità extraanalitiche in immunometria. *Biochimica Clinica* 9,87, 1985.
  52. Scatchard G. - The attraction of proteins for small molecules and ions. *A.N.Y.Acad. Sci.* 51,660; 1949.
  53. Yalow R.S. and Berson SA. - Parallelism and cross-reactivity, in Odell, Daughaday (editors) : Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, J.B. Lippincott pp 374-400, 1971.
  54. Westgard JO.; Burnett R.W and Bowers G.N. - Quality management science in clinical chemistry: a dynamic framework for continuous improvement of quality. *Clin. Chem.* 36,1711, 1990.
  55. Wilkins T.A. - Elaborazione automatica della curva del dosaggio radioimmunologico mediante modelli basati sulla legge di azione di massa. *Ligand Quarterly* Ed. Ital.4,74, 1985.
  56. World Health Organization (WHO) - Biological substances, International Standards, Reference Preparations and Reference Reagents. Ginevra 1989.
  57. Zettner A. - Principles of competitive binding assays (saturation analysis). Equilibrium techniques. *Clin. Chem.* 19,699, 1973.

## Indice

Editoriale .....	»	3
Introduzione .....	»	5
Criteria generali di valutazione di un kit .....	»	6
1) Caratteristiche di composizione, qualit� e procedimento operativo dichiarati dal produttore .....	»	7
2) Precisione .....	»	9
3) Standard e curva dose-risposta .....	»	15
4) Tracciante .....	»	21
5) Antisero .....	»	25
6) Monitoraggio delle condizioni di reazione .....	»	29
7) Minima dose rilevabile .....	»	32
8) Accuratezza .....	»	34
9) Vane .....	»	40
Protocollo di valutazione .....	»	41
Bibliografia .....	»	43
Indice .....	»	47

# Caleidoscopio

Italiano

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali del - l'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfofunzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.

31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.

**Caleidoscopio**  
**Rivista mensile di Medicina**  
anno 9, numero 61

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassu  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
Tel.-Fax 079 270464  
Tel. mobile 0338 2202502  
E-mail: rassu@ssnet.it

**Responsabile Commerciale**

Alessandra Pater

**EDITORE**

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**

Carmela Tiberti

**Servizio Abbonamenti**

Fina Grandepieno  
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);  
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>  
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,  
Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,  
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

Tipolitografia ATA  
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.  
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/1984  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Maggio 1991  
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e  
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento  
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:  
"L'ECO DELLA STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 - Milano