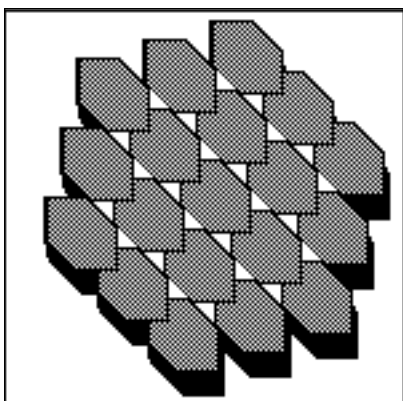


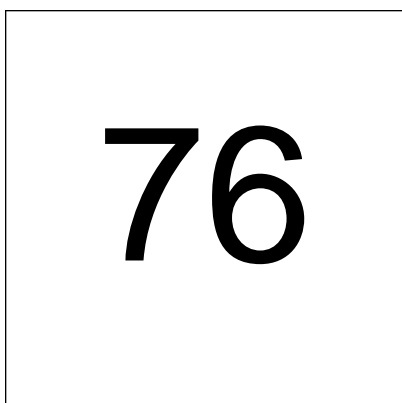
ISSN 0394 3291

# Caleidoscopio



**Sergio Ferrara**

## Manuale di Laboratorio (II)



**Direttore Responsabile**  
**Sergio Rasso**

 **MEDICAL**  
**SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova

Tel. 010 83.401

Stampato a Genova 1993



## Radiometria

### Concetto di radioattività e unità di misura

Allorché un nucleo di un atomo si trasforma spontaneamente emettendo radiazioni ionizzanti, particelle o radiazioni elettromagnetiche, cambiando a causa di ciò la composizione del nucleo, l'atomo viene detto radioattivo.

Le radiazioni ionizzanti si distinguono in tre tipi:

- 1) Radiazioni (Alfa) : un nucleo di Elio con due cariche negative
- 2) Radiazioni (Beta): la trasformazione di un protone in neutrone comporta l'emissione di un positrone o carica positiva
- 3) Radiazioni (Gamma): Lunghezza d'onda molto corta (Ca.  $10^{-10}$  nm) che vengono emesse da un nucleo eccitato fino a che non assume uno stato energetico stabile.

L'emissione di particelle radioattive, fino a che non si arriva ad uno stato energetico stabile, avviene in tempi diversi per ciascun nuclide e può durare da milionesimi di secondo a milioni di anni. Il tempo occorrente a che il numero di atomi in decadimento è proporzionale alla quantità di nucleotide presente, viene definito tempo di dimezzamento. Il tempo di dimezzamento si definisce quindi come il tempo occorrente a metà degli atomi radioattivi per decadere. L'unità di misura della radioattività è il Curie (Ci), (1 Ci corrisponde a  $37 \times 10^{10}$  disintegrazione al secondo o  $2,2 \times 10^{12}$  disintegrazione al minuto) ed il Bequerel (1 Bq corrisponde ad 1 decadimento per secondo). Un Curie è uguale a 37,17 Bequerel. Nella comune pratica l'unità di misura più usata per la radioattività è il millicurie (mCi) che corrisponde a  $10^{-6}$  Curie.

Nelle misurazioni della radioattività si usa anche il termine "colpi per minuto" (Cpm); questa misura non corrisponde al

numero di disintegrazioni al minuto in quanto i colpi per minuto o impulsi per minuto dipendono dall'efficienza dello strumento che misura la radioattività che, per quanto preciso sia, non avrà mai un'efficienza del 100%. Per lo  $I^{125}$  l'efficienza di un contatore sufficientemente preciso è di circa il 75%. L'efficienza di un apparecchio dipende da vari fattori quali la sua geometria ed il materiale di cui è fatta la provetta che contiene la radioattività. Per calcolare l'efficienza occorre conoscere la quantità di radioattività. Se una provetta contiene 0,04 mCi di  $I^{125}$  la sua attività corrisponde a 88.000 disintegrazioni al minuto (dpm). Con una semplice equazione si arriva all'efficienza conoscendo naturalmente quante disintegrazioni per minuto misura per quella quantità di radioattività di  $I^{125}$  l'apparecchio di conta:

Se per esempio l'apparecchio ha contato 53.000 dpm l'efficienza sarà:

$$\frac{53000 \text{ dpm}}{88000 \text{ dpm}} \times 100 = 60\%$$

### Concetto di isotopo. I radioisotopi

Molti sono in natura gli elementi chimici; la loro natura chimica viene caratterizzata dal loro nucleo e quindi dai protoni. Le varie posizioni degli elementi chimici nella tavola periodica evidenziano le caratteristiche chimiche degli elementi a seconda del numero dei protoni presenti nel nucleo. Oltre i protoni, nel nucleo di un elemento chimico, troviamo i neutroni il cui numero può variare per uno stesso elemento chimico. Varia in tal modo il peso atomico anche se le proprietà chimiche dell'elemento non vengono mutate (fa eccezione in questo l'idrogeno) poiché queste sono conferite dai protoni. Uno stesso elemento, può avere dunque stesso numero di protoni e quindi stesso numero atomico e numero diverso di neutroni e quindi differente peso atomico. L'elemento ha cioè più isotopi o atomi con stesso numero di protoni e differente numero di neutroni. Molti isotopi possono emettere radiazioni. Questi vengono chiamati Radioisotopi. Non è detto comunque che tutti gli isotopi sono radioattivi perché in natura si hanno innumerevoli isotopi che non emettono

radiazioni. Per uno stesso elemento possiamo avere radioisotopi e isotopi non radioattivi. Ad esempio l'idrogeno ha 3 isotopi e cioè l'isotopo con un neutrone (Idrogeno), con due neutroni (Deuterio), con tre neutroni (Trizio). Nella tavola periodica l'idrogeno ha numero atomico 1 cioè ha un solo protone.

1	2	3
H	H	H
1	1	1
<i>Idrogeno</i>	<i>Deuterio</i>	<i>Trizio</i>

Il simbolo dell'idrogeno è H, il numero atomico viene scritto in basso a sinistra, il numero dei neutroni in alto a sinistra. L'idrogeno ed il deuterio non sono radioattivi, ma il trizio è un radioisotopo in quanto emette radiazioni con tempo di dimezzamento di 12,5 anni, tempo occorrente cioè per ridurre della metà l'attività radioattiva del trizio.

### I contatori beta e gamma

I contatori beta sono così definiti perché contano, emissioni beta soprattutto carbonio 14 e Trizio; questo perché i composti biologici contengono soprattutto idrogeno e carbonio. Sia il trizio ( $^3\text{H}$ ) che il carbonio 14 ( $^{14}\text{C}$ ) decadono per emissione di particelle beta che vengono rivelate mediante sistemi a scintillazione in fase liquida. Come già accennato le radiazioni beta, che tra i vari tipi di radiazione sono le più frequenti, possono essere costituite da:

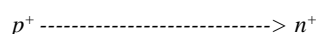
- a) emissioni di elettroni negativi ( $e^-$ );
- b) emissioni di elettroni positivi ( $e^+$ ).

I raggi  $\beta^-$  sono composti da fasci di elettroni veloci emessi da nuclei instabili nei quali un neutrone si trasforma in un protone con emissione di un elettrone (negativo):



I raggi  $\beta^-$  hanno carica negativa, velocità paragonabile a quella della luce e grosso potere di penetrazione (superiore ai raggi  $\alpha$ ).

Un nucleo instabile che emette una particella  $\beta^-$  darà origine ad un nuovo nucleo con numero atomico maggiorato di una unità. L'emissione di elettroni positivi o positroni o  $\beta^+$  comporta invece la trasformazione di un protone in un neutrone:



Nei beta contatori si prende in considerazione la trasformazione del neutrone in protone con emissione di neutrone ( $\beta^-$ ).

Per tale ragione vengono usati per scopi analitici quegli isotopi beta emettitori che hanno un numero di neutroni superiore al numero di protoni. Il trizio ad esempio ha 3 neutroni ed un protone. Esso si trasforma in nucleo stabile, cioè l'elio con due neutroni e due protoni, emettendo un elettrone. Il carbonio 14 ( $^{14}\text{C}$ ) che ha 8 neutroni e 6 protoni si trasforma in isotopo stabile dell'azoto ( $\text{N}^{14}$  ovvero 7 neutroni + 7 protoni). Queste proprietà vengono usate negli scintillatori in fase liquida.

Il termine scintillatore in fase liquida o contatore viene usato perché per permettere la conta radioattiva viene aggiunto al campione in soluzione un cocktail di solventi e soluti organici (oxazolo, naftalina). Questi solventi e soluti organici catturano l'energia delle particelle beta rilevandone la loro quantità. Nella soluzione le particelle beta hanno una traiettoria molto breve, valutabile in pochi millimetri, e trasferiscono una parte della loro energia al "cocktail di scintillazione". La molecola scintillatrice eccitata riemette in brevissimo tempo (pochi nanosecondi) questa energia sotto forma di quanti di luce. La presenza dei soluti nel cocktail permette di assorbire l'energia dei fotoni prodotti dal solvente e di riemettere altri fotoni a lunghezza d'onda superiore che vengono meglio rilevati dal fotomoltiplicatore.

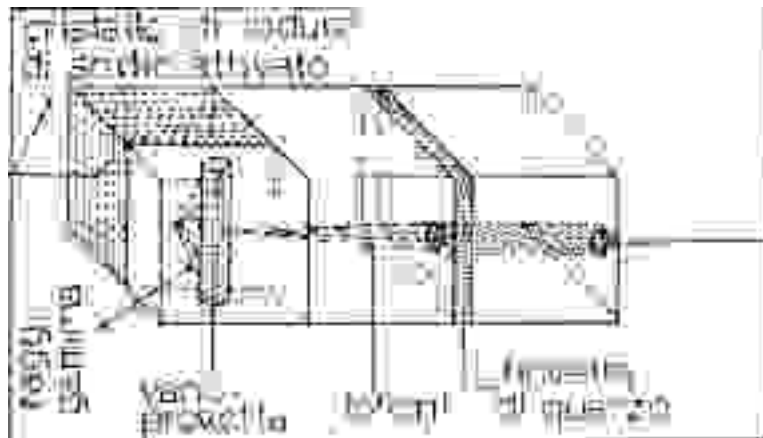
I quanti di luce vengono amplificati da uno scintillatore secondario ed inviati ad un fotomoltiplicatore al quale sono collegati moltiplicatori secondari; quindi trasformati in impulsi elettrici per mezzo di un opportuno apparecchio di trasformazione.

L'indubbio vantaggio nell'usare i beta-counter sta nel disporre di isotopi radioattivi che hanno tempi di dimezzamento molto

lunghi (Trizio 12,5 anni) ed in tal modo si riducono notevolmente i costi. Uno svantaggio è rappresentato dal costo del beta-counter sempre notevole. Un altro svantaggio sta nel fatto che i liquidi di scintillazione esposti a luce solare o artificiale subiscono effetti di chemiluminiscenza dando luogo a migliaia di colpi anche in assenza di radioattività. Vi sono anche altri svantaggi oltre a quelli annunciati; questo potrebbe essere il motivo per cui oggi l'uso dei beta-counter è estremamente limitato.

I Contatori Gamma (Fig. 24) misurano attività di sostanze liquide o solide che emettono radiazioni gamma. I raggi gamma sono parte dello spettro magnetico; hanno velocità paragonabile a quella della luce; seguono sempre l'emissione di variazioni alfa o beta in quanto gli atomi instabili emettendo radiazioni  $\alpha$  e  $\beta$  pervengono ad uno stato eccitato; la successiva emissione di raggi gamma rende gli atomi stabili; hanno elevato contenuto energetico e pertanto sono particolarmente penetranti e pericolosi. La loro corsa viene inibita o rallentata notevolmente da materiale assorbente come il piombo.

La rilevazione dei raggi gamma sotto forma di quanti di luce è possibile usando sostanze inorganiche quali un cristallo di ioduro di sodio con tracce di tallio. Questi cristalli emettono luce con lunghezza d'onda intorno ai 410 nm. I raggi gamma emessi in modo casuale colpiscono il cristallo di ioduro di sodio attivato al tallio ed ogni volta che ciò avviene la loro energia viene convertita



**Figura 24. Strutturazione generale di un contatore gamma.**

in quanti di luce e fotoni. I fianchi del cristallo riflettono questi fotoni e li dirigono verso una finestra di quarzo collegata ad un tubo fotomoltiplicatore.

Questo è un dispositivo elettronico che, ogni volta che viene eccitato al suo ingresso da un fotone, fornisce all'uscita un impulso elettrico di ampiezza proporzionale all'energia del fotone che l'ha colpito e di frequenza proporzionale all'attività della sorgente radioattiva. Sia il cristallo che il fotomoltiplicatore sono montati in un unico involucro per proteggere il fotomoltiplicatore dalla luce esterna ed il cristallo dall'umidità. Al fine di aumentare la superficie di rivelazione, nel cristallo si pratica un foro nel quale viene posizionata la provetta da contare. Si distinguono due tipi di cristalli forati:

- a) a foro passante (Holetype);
- b) a pozzetto (Well Type).

La principale caratteristica tecnica dei cristalli è l'efficienza ( $E$ ) cioè il rapporto tra la reale attività della sorgente ( $dpm$  = disintegrazione per minuto) ed il numero degli impulsi di corrente ( $cpm$  = colpi per minuto) che sono stati contati all'uscita del fotomoltiplicatore:

$$E = \frac{cpm}{dpm}$$

Questo valore che ovviamente deve essere il più elevato possibile dipende non solo dalle dimensioni del cristallo ma anche da diversi altri fattori e varia in funzione dell'energia delle radiazioni. Un fattore importante è la dimensione del cristallo. Infatti, poiché i raggi gamma hanno un alto potere di penetrazione, occorre che il fotone perda tutta la sua energia nel cristallo stesso. Ad esempio una radiazione gamma di 200 Kev perde tutta la sua energia in 2,5 cm di cristallo; per lo  $^{125}\text{I}$  che ha energia media di 27 Kev bastano millimetri di cristallo.

Normalmente il contatore gamma misura un certo numero di colpi anche in assenza di radiazioni. Questa attività spontanea chiamata "fondo" o "back ground" è causata da radiazioni cosmiche, da eventuali sorgenti poste nelle vicinanze, da emissioni spontanee di elettroni dei dinodi (componenti elettronici dei fotomoltiplicatori) ecc.. Per eliminare gli effetti dovuti alle radiazioni ambientali e cosmiche, si usa schermare il cristallo di ioduro di sodio attivato al tallio, con il piombo.



Naturalmente la schermatura con il piombo sarà proporzionale alla grandezza del cristallo. Inoltre per provocare il fenomeno di emissione dei dinodi, occorre che gli elettroni siano accelerati tra un dinodo e l'altro. Per fare ciò si applica al fotomoltiplicatore una tensione costante di valore elevato, circa 1200 volts stabilizzati.

Gli impulsi di corrente che escono dal fotomoltiplicatore sono comunque troppo deboli per essere analizzati; occorre perciò amplificarli in modo opportuno, tenendo conto anche degli impulsi provenienti da gamma ad alta energia. C'è da dire infine che il contatore gamma deve portare un analizzatore di segnale la cui funzione si esprime nella necessità di diminuire l'influenza del fondo e separare gamma emettenti di diversa origine. L'analizzatore di segnale è composto da un insieme di circuiti discriminatori di impulsi (selettori di isotopi). Questi circuiti hanno due soglie: la prima chiamata "soglia di discriminazione inferiore (DI)" che fa passare tutti gli impulsi che superano in ampiezza questo livello; la seconda chiamata "soglia di discriminazione superiore (DS)" eliminano tutti gli impulsi che superano il suo valore. La differenza tra DI e DS viene definita "Finestra" o "Window" ed in pratica determina il campo (Range) degli impulsi accettati e contati. La misura di un particolare isotopo è diversa se il conteggio è effettuato nella propria finestra o nella finestra integrale; questo perché ogni specifica finestra lascia passare solo gli impulsi della propria energia, mentre la finestra integrale conta tutto lo spettro e quindi anche impulsi non dovuti all'isotopo in esame. Il vantaggio di lavorare con una specifica finestra sta dunque nel fatto che il valore del fondo (back-ground) risulta inferiore.

Oggi il gamma counter è molto usato e le ditte che producono radio diagnostici usano in prevalenza  $^{125}\text{I}$  come isotopo. Lo svantaggio dello  $^{125}\text{I}$  sta nel fatto che avendo esso emivita di 60 gg, i kits radioattivi marcati con questo radioisotopo hanno breve durata e scadono mediamente tra le 4 e le 7 settimane. Naturalmente più usato è questo sistema di rilevazione, più le ditte produttrici di gamma counter migliorano i loro apparecchi, per cui attualmente, dai gamma counter manuali con un solo pozzetto di lettura e con il visore digitale sul quale compare il numero di cpm si passa a sistemi più elaborati che oltre ad effettuare la lettura in modo automatico, esprimono dati secondo la programmazione dell'operatore integrandoli con riferimenti

matematici (espressione del coefficiente di correlazione, deviazione standard percentuale, coefficiente di variazione percentuale, pendenza ed intercetta della retta di calibrazione nelle regressioni, ed infine, alcuni dati di controllo di qualità).

### **I componenti di un saggio RIA**

Per l'esecuzione di un saggio RIA (Radio Immuno Assay) è necessario effettuare una serie di operazioni utilizzando ad esempio un antigene marcato con un radioisotopo ed uno specifico antisiero. L'antisiero (anticorpo) viene aggiunto alla sostanza da determinare (antigene) che può essere saggiato su siero, su plasma o su altro liquido biologico. L'anticorpo sarà liquido ed in tal caso parleremo di metodica in "fase liquida"; l'anticorpo viene aggiunto al materiale biologico da esaminare (siero, plasma, urine, liquor ecc..) e si parlerà di metodica in fase solida o "Coated Tube", in questo caso il materiale da esaminare viene aggiunto alla provetta e interreagirà con l'anticorpo adeso ad essa. L'antigene sconosciuto sarà ovviamente in quantità variabile. L'anticorpo avrà concentrazione costante e substechiometrica nel senso che in assenza di antigene sconosciuto solo una piccolissima quantità di tracciante si legherà ad esso. Il tracciante che nel sistema RIA classico è un antigene è marcato con radioisotopo ha anch'esso concentrazione costante per cui si avrà competizione tra l'antigene da determinare ed il tracciante per i siti anticorpali dell'anticorpo. In tal modo quanto più antigene sconosciuto si legherà ai siti anticorpali, tanto meno antigene marcato potrà legarsi e la valutazione di questa quantità di antigene marcato con gamma counter o con beta counter darà in sostanza un basso numero di colpi per minuto che corrisponderà ad una elevata concentrazione dell'antigene sconosciuto. Al contrario, se nella competizione si legherà all'anticorpo più antigene marcato, avremo un elevato numero di cpm con conseguente bassa concentrazione dell'antigene sconosciuto.

Per conoscere la concentrazione dell'antigene sconosciuto è necessario poter disporre di riferimenti noti o standard che abbiano caratteristiche simili al materiale biologico che viene saggiato. Se si lavora in "fase liquida" è necessario avere a disposizione un rapido e semplice metodo di separazione per isolare la fase legata da quella libera. E' ovvio che in queste

metodiche un ruolo importante è da ascrivere al materiale biologico da analizzare per quanto concerne eventuali interferenze che esso può esprimere sui componenti della reazione. Occorre inoltre avere a disposizione un antisiero estremamente puro ed altamente specifico ed un antigene marcato altrettanto puro con elevata attività immunologica. Gli antisieri usati per la reazione di competizione Ria sono per lo più ottenuti immunizzando animali con Ig G che sono le più abbondanti nel siero.

Occorre tener presente che una molecola di anticorpo non possiede una struttura fissa ma può girare intorno ad una parte della sua molecola. Questa flessibilità della molecola anticorpale viene sfruttata nel metodo del cosiddetto doppio anticorpo per separare la fase libera da quella legata. Tale metodo viene ottenuto iniettando in un animale (pecora, capra ecc..) Ig G o frammento Fc delle molecole di Ig G prelevate dall'animale dal quale è stato ottenuto il primo anticorpo. Si avrà un secondo anticorpo che in un saggio radioimmunologico reagisce con il complesso solubile antigene-anticorpo nella regione della parte Fc della molecola, formando un complesso solubile che viene precipitato per centrifugazione. Come già detto nei saggi Ria occorrono quindi sostanze che iniettate nell'animale devono evocare la risposta immunitaria con produzione di anticorpi specifici per avere l'antisiero marcato e non. E' necessario allora che tali sostanze siano in forma purificata e abbiano la caratteristica della immunogenicità perché l'animale le riconosca come sostanze estranee e formi anticorpi. La caratteristica dell'immunogenicità è posseduta da proteine, peptidi, glicoproteine ecc., siano esse naturali o sintetiche.

Infatti usando calcitonina umana sintetica ed iniettandola in un animale, questa funziona come immunogeno con produzione di anticorpi. E' necessario considerare che la produzione di anticorpi dipende dal tempo e dal peso molecolare della sostanza iniettata, tenendo presente che è necessario, per produrre anticorpi, iniettare una sostanza invece che somministrarla per via orale dal momento che, in tal caso, gli enzimi proteolitici dello stomaco e dell'intestino convertono le proteine ad alto peso molecolare in peptidi ed aminoacidi con basso peso molecolare perdendo in tal modo la proprietà dell'immunogenicità. Si avranno così sostanze che hanno proprietà antigeniche ma non immunogeniche; tali sostanze vengono definite "apteni".

La tiroxina (T4) e la triiodotironina (T3), il cortisolo ecc..hanno peso molecolare inferiore a 100 e sono Apteni. Per dare agli apteni la caratteristica dell'immunogenicità è necessario accoppiarli con proteine ad alto peso molecolare; queste proteine sono definite "carrier". Allorché un aptene viene iniettato con la sua proteina carrier, dopo l'iniezione l'animale produrrà differenti popolazioni di anticorpi contro differenti parti della molecola che include la proteina carrier ed anche differenti determinanti sulla molecola dell'aptene. Importante è effettuare sinteticamente l'accoppiamento carrier-aptene operando ad esempio sull'aptene (conversione di un gruppo ossidrilico con anidride succinica ottenendo in tal modo un emisuccinato) tanto da avere un gruppo attivo da coniugare con il carrier.

Dopo aver controllato il grado di purezza del gruppo attivo (determinando ad esempio il punto di fusione, od effettuando una cromatografia su strato sottile) si effettua la coniugazione con il carrier utilizzando vari metodi (l'impiego ad esempio di una base di Schiff con conseguente reazione di riduzione). E' importante sapere quante molecole di aptene si sono associate alla proteina carrier perché il numero di molecole di aptene influenza la reazione immune dell'animale. Il numero delle molecole di aptene coniugata al carrier può essere calcolato o spettrofotometricamente (il testosterone forma complessi con la proteina carrier che assorbono a 250 nm) o usando traccianti radioattivi.

Dopo essersi accertati della "bontà" di questo complesso si può procedere ad immunizzare l'animale. La produzione di antisieri perfettamente adatti al dosaggio RIA deve essere effettuato tenendo presente altri importanti fattori oltre a quelli già citati. Questo vale non solo per le molecole a basso peso molecolare che verranno rese immunogene attraverso il carrier, ma anche per le macromolecole che posseggono di per sé la caratteristica della immunogenicità. Tra i fattori da considerare sono la concentrazione dell'antigene, il tipo di adiuvante da accoppiare all'antigene che verrà iniettato, la scelta dell'animale usato, il metodo di immunizzazione, il tempo tra le iniezioni successive ed infine la conservazione dell'antisiero.

Per quanto attiene la scelta della specie animale è bene dire che molto spesso la tendenza è quella di utilizzare conigli, polli o maialini di guinea, animali cioè che facilmente si possono custodire senza avere la disponibilità di grossi locali o altre infrastrutture. D'altra parte occorre individuare un determinato

animale da immunizzare anche in funzione dell'anticorpo che si vuole produrre, perché, se si vuole un anticorpo sostanza-specifico (nel gergo comune degli addetti corrisponde al primo anticorpo), occorre disporre di animali di piccolo taglio che verranno sottoposti ad iniezioni successive; se invece si vuole produrre un anticorpo specie-specifico (comunemente detto secondo anticorpo), poiché tale anticorpo viene usato a concentrazioni piuttosto alte (titolo 1:20, 1:50) si possono usare animali di taglia consistente quali capre, suini o pecore. Qualunque sia il tipo di anticorpo da produrre, sarebbe opportuno conoscere e studiare la sequenza aminoacida dell'antigene da iniettare; di seguito iniettare tale antigene in più specie diverse di animali paragonandolo alla sequenza aminoacidica umana, scegliendo l'animale in cui la sequenza aminoacidica è più differente.

In tali casi si avranno anticorpi migliori perché l'antigene presente nell'animale ha le maggiori differenze in proprietà chimiche e fisiche se paragonate con l'antigene umano. Come già accennato l'antigene da usare per l'immunizzazione dell'animale viene accoppiato ad un adiuvante al fine di ridurre il tasso di assorbimento dell'antigene la cui tossicità può essere notevole e allo stesso tempo i ricettori sulla superficie dei linfociti dell'animale da immunizzare entrano in contatto con una concentrazione di immunogeno per un periodo di tempo molto più lungo. L'adiuvante usato è l'adiuvante completo di Freund. Sarebbe opportuno immunizzare l'animale con piccole quantità di immunogeno mescolato all'adiuvante. In tal modo soltanto i recettori con elevata affinità reagiscono con l'immunogeno e si avrebbe così una popolazione di anticorpi molto specifica e con elevata affinità. Questo è il principale motivo per cui emulsioni composte da immunogeni e adiuvanti di Freund hanno avuto grosso successo.

Una volta ottenuta la produzione di anticorpi occorre testare l'antisiero con prelievi di sangue dall'animale al fine di valutare il titolo anticorpale, la specificità e l'affinità dell'antisiero. Poniamo come esempio di voler saggiare sangue di coniglio cui sia stato iniettato calcitonina umana. Dopo aver sierato il sangue prelevato, si effettuano diluizioni scalari del siero ottenuto adoperando un tampone come diluente. Si aggiunge quindi calcitonina marcata a tutte le diluizioni e, dopo opportuna incubazione, operando la

separazione della fase libera da quella legata, si calcola la radioattività nella fase legata. Per risparmiare tempo ed antisiero il primo stadio di diluizione si effettua con un fattore 1:10 e non di 1:2. A minori concentrazioni di anticorpo si può iniziare con diluizioni di 1:2. Il titolo di anticorpi si può determinare dalla curva ottenuta dalla serie di diluizioni.

Occorre definire esattamente il concetto di "Titolo Anticorpale" perché diverse sono le interpretazioni che autori e produttori di antisieri danno a tale concetto. Si intende per titolo dell'antisiero la diluizione operante finale di un antisiero usato in un sistema esattamente definito con un legame O (Bo/T) fissato. Per esempio se viene indicato come titolo operante il numero 1:10000 significa che l'antisiero è stato diluito 1:10000 prima di essere usato nel sistema test. Per calcolare il titolo ciascuna diluizione dell'anticorpo è effettuata in doppio; si preparano altresì due provette con tampone più tracciante per il legame aspecifico e due provette con il solo tracciante per l'attività totale. Dallo schema si può vedere che per una soluzione di anticorpo diluito 1:16000 è legato il 32% del tracciante; sottraendo da questa percentuale il legame aspecifico (5%), il 27% dell'attività è legata specificamente.

Tali percentuali di legame specifico si sono avute attenendosi sia ad un prefissato tempo di incubazione e temperatura, nonché al volume dei reagenti ed alla sequenza con la quale sono stati aggiunti durante l'esecuzione del test.

Ciò significa che quanto indicato nelle metodiche dei kits commerciali è vincolante per l'operatore al fine di evitare insuccessi. Naturalmente non è sufficiente conoscere il titolo anticorpale senza considerare la specificità dell'antisiero usato. Infatti l'anticorpo può interreagire oltre che con sostanze da determinare e ad esso = "specifiche", anche con sostanze chimicamente simili all'antigene da dosare; ad esempio le glicoproteine quali TSH, FSH, LH, hCG ecc.. sono composte tutte di due subunità (alfa e beta) e le differenze tra queste sostanze si individuano nei differenti residui carboidratici o per la sequenza amminoacidica della catena beta.

Se l'anticorpo reagisce con la sostanza da dosare per quasi il 100% diremo che esso è fortemente specifico. Se la percentuale di reattività con l'antigene da dosare è molto inferiore al 100%, significa che l'anticorpo reagisce in maniera aspecifica e che ha cross reazioni con sostanze chimicamente simili all'antigene.

Una volta ottenuto un antisiero puro e specifico questo viene

<i>Tubo N.</i>	<i>Diluizione Anticorpo</i>	<i>Cpm</i>	<i>Attività</i>	<i>%Attività -Legame Aspecifico</i>
1	1:10	19527	97,4	92,5
2	1:10	19483		
3	1:100	1922		
4	1:100	19278	96,1	91,1
5	1:1000	18875		
6	1:1000	18625	93,6	88,6
7	1:2000	18200		
8	1:2000	18200		
9	1:4000	15005		
10	1:4000	14980	74,9	69,9
11	1:8000	10363		
12	1:8000	10100	51,2	46,2
13	1:16000	6400		
14	1:16000	6407	32,0	0
15		1067		
16	<i>Tampone</i>	939	5,0	0
17	<i>Totale Attività</i>	20030		100%=20000
18	<i>(Solo Marcato)</i>	19970		

**Schema di Determinazione del titolo e del legame radioattivo.**

liofilizzato e conservato. In tal modo l'antisiero ha lunga validità (anche qualche anno); quando occorre l'antisiero questo viene ricostituito e, frazionandolo in quote, viene congelato. Si tenga presente che gli anticorpi non dovrebbero essere conservati in forma molto diluita per qualsiasi periodo di tempo perché si potrebbe avere la denaturazione dell'anticorpo o l'adsorbimento di esso alla parete del contenitore con la conseguente alterazione dell'anticorpo stesso. E' inteso che congelamenti e scongelamenti ripetuti per lo stesso antisiero sono assolutamente sconsigliati! è E' consigliabile aggiungere un batteriostatico all'antisiero da usare in un saggio radioimmunologico, ad esempio sodio azide allo 0,5-0,1%. Se il dosaggio è immunoenzimatico occorre evitare l'aggiunta del sodio azide perché potrebbe reagire con l'enzima legato all'anticorpo, specialmente se questo è una perossidasi.

Il discorso accennato sulla assoluta specificità dell'anticorpo

non può essere convalidato fintantoché l'antisiero viene ottenuto immunizzando animali, infatti mai si può avere con questa tecnica un antisiero assolutamente e fortemente specifico, perché ad esempio, quando si procede alla immunizzazione di un animale l'antisiero ottenuto varierà in qualità a seconda del tempo di prelievo durante il programma di immunizzazione.

In effetti il sistema immune dell'animale sviluppa cloni di cellule diverse che produrranno anticorpi con relativa specificità per gli antigeni iniettati. L'antisiero che verrà ottenuto conterrà in sostanza anticorpi diretti verso parti differenti dell'antigene iniettato all'animale. In tal modo si ottengono anticorpi che riconoscono più antigeni presenti sulla superficie di una stessa cellula; o anche anticorpi che riconoscono singoli determinanti antigeni presenti su una molecola proteica di elevato peso molecolare, oppure anticorpi che riconoscono parti leggermente diverse di un determinante antigenico come succede negli ormoni steroidei che sono apteni a bassissimo peso molecolare e quindi molto piccoli. In definitiva la produzione di antisiero nell'animale immunizzato porta alla presenza di più anticorpi prodotti da molti linfociti diversi; questi antisieri contengono più anticorpi (policlonali) tra i quali non si può identificare esattamente chi contribuisce di più o di meno alla specificità, avidità ed attività dell'antisiero.

Un classico esempio di ciò è l'antigene Carcino Embrionale (CEA). Questa glicoproteina è antigenica ed immunogena verso molte specie animali che sono in grado di produrre sieri policlonali specifici anti CEA. La risposta immunitaria di un animale sensibilizzato con antigene CEA è estremamente variabile; così come variabile è la reazione alla immunizzazione anti CEA per singole specie animali. Questa variabilità è dovuta alla struttura molecolare del CEA che è costituito, come già detto, da una glicoproteina con una componente proteica e una glucidica; ciascuna di queste componenti porta un certo numero di determinanti antigenici che peraltro sembra vari anche per specie animali (immunizzando una scimmia si sono riconosciuti nell'antisiero prodotto 10 determinanti antigenici, mentre in un antisiero di coniglio i determinanti sarebbero 18).

Variando la specie animale addirittura varia la specificità dell'antisiero.

I problemi intervenuti con queste considerazioni hanno portato da una parte le ditte produttrici a porre nella immunizzazione di



un animale regole sempre più condizionanti per cui si punta generalmente sulla cavia per la scelta dell'animale, si somministrano piccole quantità di antigene (10mg) per lunghi periodi di tempo effettuando richiami ogni 20-30 giorni e si utilizza per l'iniezione scatenante un adiuvante completo, mentre per le successive somministrazioni un adiuvante incompleto. I gruppi di ricerca dall'altra hanno individuato strade alternative per produrre antisieri con elevata affinità e specificità. Si è così giunti alla scoperta degli anticorpi *monoclonali*, cioè anticorpi prodotti artificialmente con la tecnica degli ibridoni e senza iniezioni successive nell'animale. La tecnica di produzione degli anticorpi monoclonali elimina tutti gli inconvenienti dei policlonali ed offre un prodotto di qualità superiore.

Essa si basa essenzialmente sull'immunizzazione di topi con antigeni solubili non eccessivamente purificati o con antigeni corpuscolari. Dopo un mese si sacrifica l'animale e viene prelevata la milza ottenendo da essa i linfociti splenici. Questi linfociti vengono fusi (fusione cellulare) con cellule di mieloma murino ottenendo così un ibrido cellulare (Ibridoma) in cui sono conservate le caratteristiche delle cellule d'origine. Infatti l'ibrido è in grado di produrre anticorpi di una definita specificità e con una omogeneità strutturale simile a quelle delle immunoglobine mielomatose (dove il nome di anticorpo monoclonale).

Questi ibridi sono in grado di moltiplicarsi in terreno di cultura o in peritoneo di topo continuando a produrre anticorpi. Per produrre anticorpi monoclonali occorre avere a disposizione due linee cellulari che verranno modificate ad esempio per fusione somatica (è questo il metodo più usato).

Usando cellule della milza di un animale immunizzato per la fusione somatica, in pratica si rende immortale ognuna delle cellule responsabili per la produzione di anticorpi. Ottenere un anticorpo mononucleare specifico significa impiegare non meno di tre mesi oltre che affrontare notevoli costi.

Per derivare linee cellulari capaci di produrre anticorpi monoclonali specifici occorre osservare una serie di tappe fondamentali e cioè:

- 1) Immunizzazione a scelta del mieloma;
- 2) Fusione;
- 3) Controllo del surnatante;
- 4) Clonaggio;
- 5) Produzione degli Anticorpi monoclonali selezionati.

Nella immunizzazione e scelta del mieloma si identifica la specie animale capace di produrre molte cellule spleniche; si preferisce allo stato attuale immunizzare due specie diverse e cioè topo e ratto. Quindi è importante scegliere il mieloma adatto che sarà della stessa specie dell'animale prescelto per cui avremo mieloma di topo o di ratto.

Sono attualmente disponibili mielomi di topi e di ratti con caratteristiche fenotipiche diverse per la secrezione di catene peptidiche delle immunoglobine. Se si usa un mieloma che produce immunoglobine, gli ibridi derivanti produrranno sia gli anticorpi codificati dal corredo genetico delle cellule della milza usate, sia quelle codificate dal genoma del mieloma. Nel surnatante di tali ibridi o nel siero dell'animale in cui tali ibridi verranno fatti crescere, gli anticorpi specifici saranno sempre mescolati con proteine mielomatose.

Sarebbe comunque opportuno usare per la fusione quei particolari mielomi che sono stati selezionati per la loro caratteristica incapacità a produrre immunoglobuline mielomatose. Perché la fusione sia ottima è necessario avere a disposizione linee cellulari in buono stato. Dopo aver ottenuto gli ibridi per fusione occorre che questi vengano "Clonati" che cioè si ottenga una sola linea cellulare che sia effettivamente monoclonale e quindi specifica per l'antigene verso cui si è orientata la produzione dell'anticorpo. Per il clonaggio degli ibridi si procede con diluizioni al limite di meno di una cellula per coltura. Usando medium semisolidi come l'agar o l'agarosio. La clonazione viene ripetuta più volte per avere la certezza di avere selezionato linee veramente monoclonali.

Occorre tener presente che tutti gli ibridi durante la crescita tendono a perdere cromosomi; tale perdita veloce dopo la fusione rallenta gradatamente dopo un certo numero di divisioni cellulari. Per riconoscere le linee cellulari che potranno dare anticorpi monoclonali si usa un antisiero antiimmunoglobuline marcato. Una volta identificata la linea desiderata sviluppando test che indirizzeranno al selezionare quella linea, si produrrà l'anticorpo monoclonale in quantità sufficiente per utilizzarlo.

## Gli standards

Per quantizzare una sostanza incognita c'è bisogno di riferimenti a concentrazione nota definiti standard.

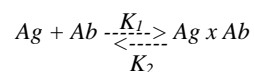
Questo concetto che si applica a tutte le metodiche di laboratorio, è valido anche per i dosaggi RIA. Le caratteristiche degli standard devono essere quanto più possibili simili al campione da esaminare. Occorre che gli standard siano stabili per lunghi periodi di tempo; che non siano contaminati, cioè che non contengano sostanze che possano in qualche modo influenzare il dosaggio; che siano in quantità sufficienti per conservarsi per anni mantenendosi al contempo validi dal punto di vista della qualità. Gli standard nei dosaggi RIA assumono vitale importanza in quanto, saggiati allo stesso modo del campione, daranno i dati necessari a costruire una curva detta di "Taratura" dalla quale verrà estrapolato il valore del campione incognito.

Un metodo radioimmunologico sarà tanto più accurato quanto più il siero del paziente e gli standard reagiscono con l'anticorpo allo stesso modo. Sia il campione da esaminare che gli standard con i quali si appronterà la curva di taratura sono antigeni che si legheranno con un specifico anticorpo (antisiero).

Soffermiamoci brevemente sulla natura del legame chimico che si instaurerà. Diciamo subito che il complesso antigene-anticorpo non è tenuto insieme da legami chimici covalenti: si tratta di legame intermolecolare dovuto ad interazioni aspecifiche aminoacido-aminoacido.

Queste interazioni s'instaurano solo su distanze molto brevi e sono prevalentemente legami idrogeno, forze di Van der Waals, legami ionici ecc. È importante pertanto la conformazione e la struttura tridimensionale che si ottiene dalla reazione tra i due componenti perché da questo dipende l'efficienza dei legami.

Il legame che si ottiene nella formazione di un complesso antigene-anticorpo è reversibile per cui si può ritornare ai componenti originari rompendo lo stesso legame. Cimentando un antigene con un anticorpo dopo un opportuno tempo di incubazione, si raggiungerà un equilibrio ottenendo la seguente reazione.



Per la legge di azione di massa avremo l'equazione:

$$1) \quad \frac{Ag \times Ab}{Ag \times Ab} = \frac{K_1}{K_2} = K_c$$

Dove per  $K_c$  s'intende la costante di affinità di equilibrio. La costante di equilibrio viene misurata in  $1/\text{mol}$  ed è in funzione della temperatura. Per quanto detto, allora, un componente un dosaggio reagisce con un altro per avere, secondo la legge di azione di massa, una reazione all'equilibrio. In realtà nei saggi comunemente effettuati non si otterrà mai una situazione di reazione perfettamente all'equilibrio in quanto due variabili in particolare possono essere invalidanti, alterando di conseguenza la costante di affinità. Queste due variabili sono identificabili nella sensibilità che nel tempo di reazione di un dato sistema test. Se infatti l'equilibrio della reazione 1) è opposto a destra, la costante di affinità risulterà alta tenendo presente che la costante di affinità rispecchia l'affinità di un anticorpo per l'antigene. Quando sono occupati per esempio il 50% dei siti di legame dell'anticorpo, la concentrazione  $Ag \cdot Ab$  sarà uguale ad  $Ag$ . Se noi sostituiamo questo nella reazione 1), troviamo che:

$$K_a = \frac{1}{Ag}$$

cioè la costante di affinità è il valore reciproco della concentrazione dell'antigene libero. Da questa equazione possiamo desumere che quando è presente un'elevata costante di affinità, la concentrazione di antigene richiesta per saturare il 50% dei siti di legame è molto piccola. La costante di affinità dunque dipende in massima parte dai siti di legame. Un antisiero policlonale, formato cioè da più anticorpi, avrà più di un sito legante per cui la costante di affinità è diversa per ogni legante; in tal caso si parla di siti di legame eterogenei sulla molecola degli anticorpi.

Come si vede importante è lo stabilire l'affinità dell'antigene con l'anticorpo per ottenere un complesso antigene-anticorpo stabile e come già detto il comportamento dello standard deve essere simile a quello del campione nella formazione del complesso antigene-anticorpo. Perché uno standard si comporti

validamente sono stati approntati riferimenti standard per molte sostanze singole; tali standard vengono definiti a livello internazionale e le ditte produttrici di kits dovrebbero uniformarsi, nel preparare gli standard dei kits, ai preparati di riferimento internazionali. Per esempio per il TSH è stato approntato uno standard internazionale cioè il WHO-standard-68/38; tale standard diventa di riferimento per tutti gli standard TSH. Quanto detto vale anche per gli standard sintetizzati chimicamente quali quelli del  $T_3$ ,  $T_4$ , cortisolo ecc.. Tali standard chimici avranno come riferimento quello internazionale corrispondente e dovranno essere preparati nella forma più pura possibile. Per adeguare gli standard a quello internazionale occorrono operazioni di taratura delle quali si dovrebbero costantemente preoccupare le ditte produttrici di kits RIA. Un kit contiene normalmente non meno di 5 standard a diversa concentrazione. Il numero degli standard è importante per la buona riuscita di un saggio perché più standard si usano meglio viene definita la curva di taratura.

E' sempre preferibile trattare gli standard in doppio, ottenendo in tal modo la media dei valori; l'attendibilità aumenta notevolmente. Addirittura sarebbe opportuno saggiare lo standard 0 (zero) tre o anche quattro volte visto che tale standard è importante per il calcolo di approntamento della curva nonché per elaborare importanti parametri di controllo di qualità. Poiché le curve di taratura si approntano utilizzando assi cartesiani in cui compaiono scale logaritmiche, è necessari riportare la concentrazione degli standard convertita in logaritmo.

Ciò rende le distanze tra standard successivi più o meno uguali e facilita una proiezione normale delle curve standard. Prima di descrivere dettagliatamente come si costruisce una curva standard è opportuno accennare alle trasformazioni che si operano su assi cartesiani e di conseguenza alle modificazioni che si effettuano sulla curva per ottenere gli intervalli utilizzabili delle stesse. Vediamo subito di chiarire cosa è una curva di regressione lineare. Nella osservazione e nello studio di diversi fenomeni fisici, meccanici, chimici governati da funzioni  $f(x, y)$  non lineari, è utili esprimere questi mediante una funzione che li approssima. E' da precisare che tra queste due funzioni, nella maggior parte dei casi, non esiste una corrispondenza. Di conseguenza la regressione lineare consiste nello interpolare con retta, che minimizza la

sommatoria degli scarti quadratici, i punti effettivi della  $f(x, y)$  e quelli della retta di regressione. In pratica si rappresenta su assi cartesiani una retta che meglio approssima i punti della curva  $f(x, y)$ . Può verificarsi il caso in cui la validità o meno dell'approssimazione fatta ci viene misurata dal coefficiente di correlazione che può essere calcolato dalle variabili indipendenti  $(x, y)$  e dai parametri della retta di regressione. Di conseguenza il nostro problema si riduce al calcolo dei parametri della retta (R) ed al calcolo del coefficiente di correlazione (r).

La retta nella rappresentazione cartesiana ha equazione:

$$y = mx + b$$

dove:

m= coefficiente angolare;

b= intercetta con l'asse y.

Il coefficiente di correlazione (r) è un numero compreso tra 0 e 1 ed indica il grado di approssimazione con il quale sono stati interpolati i punti standard di un dosaggio RIA. Molti gamma-counter automatici, nella fase di Programmazione, richiedono il coefficiente di correlazione minimo con il quale si vuole lavorare. Questo dato serve all'elaboratore integrato al gamma-counter per stabilire se scartare o meno dal calcolo dei parametri della retta di calibrazione il punto più aberrante. Infatti, terminata l'analisi di tutti gli standard, il computer ricerca e stabilisce il valore dei parametri della retta che meglio interpola i punti da essa determinati calcolando così il coefficiente di correlazione. Come caso limite un coefficiente di correlazione uguale a 1 indica che i punti interpolati appartengono alla retta calcolata. Se il valore calcolato è maggiore (e quindi migliore) del valore minimo desiderato che è stato impostato durante la fase di programmazione, i parametri della retta appena calcolata saranno quelli che caratterizzeranno la retta di calibrazione che si utilizzerà nella valutazione della concentrazione dei campioni da esaminare i cui valori sono sconosciuti. Se si utilizzano delle buone concentrazioni standard ed oculatamente si sceglie di lavorare con la regressione (tra le diverse disponibili) che meglio interpreta l'andamento reale della curva di calibrazione, il coefficiente di correlazione calcolato assumerà dei valori compresi

tra 0,95 e 0,999. Se il coefficiente di correlazione calcolato sarà al di fuori del raggio indicato e inferiore, quindi peggiore, si ricercherà il punto che più incide sull'abbassamento del coefficiente di correlazione e lo si scarta. La formula per il calcolo del coefficiente di correlazione è la seguente

$$\text{Coeff. Correl.} = \frac{xy - \frac{x \cdot y}{n}}{\sqrt{\left[ x^2 - \frac{(x)^2}{n} \right] \cdot \left[ y^2 - \frac{(y)^2}{n} \right]}}$$

dove con x e y sono indicate le coordinate degli n punti standard.

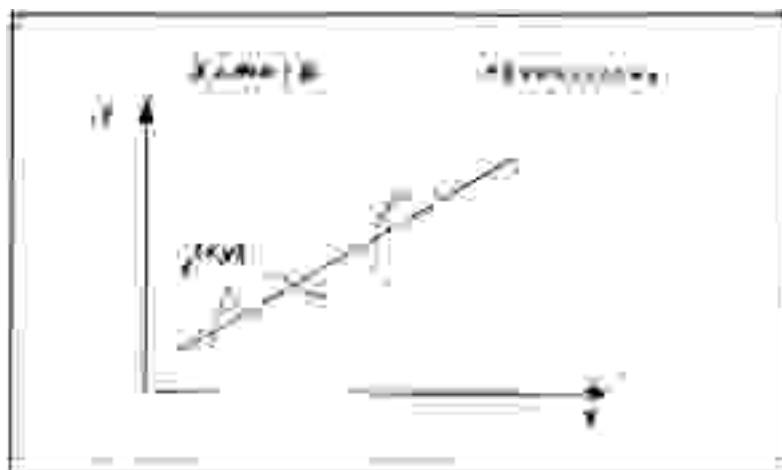
Da quanto detto una regressione lineare consiste nell'interpolare con una retta i punti della f(x, y) e quelli della retta di regressione. Parlando di regressione ci si è riferito a funzioni linearizzabili e quindi interpolabili mediante una retta R.

Vi sono dei fenomeni (fisici, chimici, ecc..) descritti da funzioni complesse o discontinue la cui linearizzazione completa non è possibile in quanto la retta di interpolazione non è più rappresentativa del fenomeno osservato (Figura 25).

In molti casi è possibile linearizzare dei pezzi di queste funzioni scegliendo opportuni intervalli del loro campo di definizione. Diversi sono i mezzi di interpolazione dei tratti linearizzabili di queste funzioni. Supponiamo di avere una serie di valori rappresentativi dei punti della curva; questa viene trattata (manualmente o mediante un elaboratore) su carta millimetrata o su carta con una scala logaritmica e si evidenziano gli intervalli in cui questa è linearizzabile. I metodi di linearizzazione possono suddividersi in:

a) Metodi di confronto tra il fenomeno osservato e un altro simile descritto da logaritmi più semplici. Questo metodo è poco attendibile in quanto la semplificazione implica l'analogia tra due fenomeni che non saranno mai descritti dalle stesse variabili o implica la loro riduzione.

b) metodo di descrizione delle curve ottenute. Questo metodo consiste nel deformare e quindi approssimare tratti della curva ottenuta a curve note. Ne sono esempio le trasformazioni logit-log e semilog, le quali stirano le curve nella direzione (x, y) la prima e



**Figura 25. Rappresentazione di una regressione per una funzione  $xy$ .**

in direzione  $(y, x)$  la seconda. L'inconveniente di questo metodo (anche se è il più usato) è la non individuazione del punto Zero e soprattutto, nel caso della logit-log, la eccessiva estensione delle scale di rappresentazione dà luogo ad errori di lettura sia per valori molto bassi che molto alti.

Quindi usando questo metodo è consigliabile usare l'interpolazione semilog (Figura 26).

c) Metodo di risoluzione analitica. Questo metodo consiste nell'approssimare la curva ad una poligonale e quindi nella ricerca e nella soluzione del polinomio di grado  $n$  che regola tale spezzata. Ne è tipico esempio la rappresentazione Punto a Punto (Figura 27).

È da tener presente che questo metodo implica l'esecuzione di numerosi calcoli impegnativi che molto spesso non sono ripagati dai risultati che si ottengono.

Comunque la scelta del metodo di interpolazione da adottare deve essere dettata sia dall'esperienza di chi opera sia dalla osservazione e studio del fenomeno considerato, tenendo presente che in tutti i casi si commette un errore che può essere ridotto solo se si fanno le scelte giuste e se il risultato ottenuto rispecchia la realtà dell'evento.



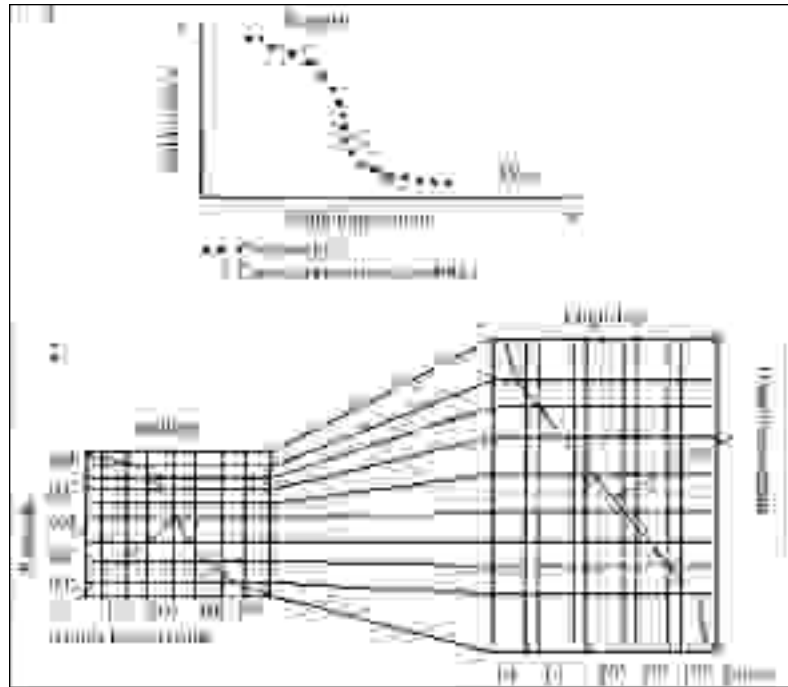


Figura 26.

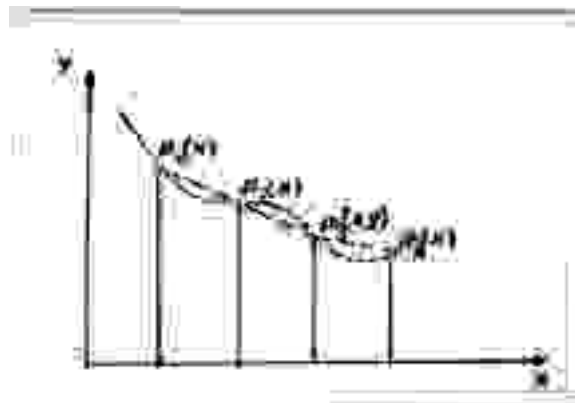


Figura 27.

Le rette costruite con gli standard con gli artifici descritti vengono disegnate calcolando in cpm il  $B/B_0$ , dove per B si intende il numero di cpm dello standard in conteggio (S1, S2 ecc..) e  $B_0$  il numero di cpm per lo standard O. Con il termine cpm esprimiamo due concetti:

- 1) Colpi;
- 2) Minuto di conta;

I Colpi o Cross Count sono quelli che, rientranti nella finestra dell'isotopo selezionato, vengono contati durante il tempo di permanenza in provetta.

Partendo dalla considerazione che l'attività di un radioisotopo non è un dato Statico ma Statistico, possiamo dire che la sua misura si avvicina al valore esatto con una probabilità tanto più grande quanto maggiore è il numero di disintegrazioni contate. Esprimendo il valore della deviazione standard percentuale si dà quindi una indicazione circa la precisione con la quale viene dato il risultato della misura. La misura è tanto migliore quanto più bassa è la deviazione standard che viene espressa dalla seguente formula:

$$DS \% = \frac{100}{\sqrt{\text{Gross Count}}}$$

dalla formula espressa la D.S. non dipende dal tempo ma unicamente dal numero di colpi contati durante quel periodo di tempo. Ciò significa che se ad esempio si contano 10.000 colpi al minuto in 10, secondi o in 10 minuti, l'errore statistico che si commette è lo stesso. In ogni caso ogni conta di cpm viene effettuata su replicati rilevando anche il coefficiente di variazione percentuale; esso è un indice che informa circa la congruenza dei diversi replicati rispetto al valore medio che verrà preso come risultato. Se per esempio si lavora in doppio ed entrambi i replicati dovessero dare valore perfettamente uguale, il coefficiente di variazione percentuale sarà uguale a 0. Quanto più il valore dei replicati sarà diverso tanto più alto sarà il valore del coefficiente di variazione percentuale che così si calcola:

$$\text{Coeff. Var. \%} = \frac{100}{\bar{x}} \cdot \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Dove  $x$  = valore singolo replicato

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \text{media dei valori replicati}$$

$n$  = numero dei replicati

Il calcolo del valore del coefficiente di variazione percentuale assume notevole importanza per stabilire un limite di accettabilità oltre il quale ci si deve preoccupare di indagare circa l'origine dell'incongruenza tra i diversi replicati.

Da quanto detto finora sugli standard e sulla loro utilizzazione ai fini della costruzione delle curve, è necessario ribadire che più punti standard si hanno a disposizione, meglio è. Normalmente i kits commerciali presentano 6 o più standard. La curva standard dovrebbe essere eseguita sempre in duplicato o addirittura, dato che lo 0 standard viene usato per elaborare la curva stessa, sarebbe opportuno ripetere lo 0 standard tre o anche quattro volte. Nell'approntare un saggio Ria sarebbe opportuno inserire nel conteggio una o due provette contenente solo il tracciante al fine di valutare l'attività radioattiva totale. Inoltre occorre approntare una o due provette per il legame aspecifico utilizzando tampone al posto dell'antigene e cimentandolo con il marcato. Il legame aspecifico che viene calcolato secondo la formula:

$$\frac{\text{cpm NSB}}{\text{cpm Att. Totale}} \quad (\text{non specific binding})$$

viene utilizzato per eliminare l'aspecificità di legame del marcato e viene sottratto sia ai cpm dello 0 standard sia a quelli degli standard e dei campioni.

Il set di standard a disposizione è generalmente costituito da concentrazioni diverse di analita che si vuole dosare. Il primo standard (S1) potrebbe essere nella regione di più basso limite di rivelazione; l'ultimo standard dovrebbe avere 5-10 volte la concentrazione dello standard a più bassa concentrazione.

Lo 0 standard per convenzione viene approntato per un determinato analita da analizzare con una concentrazione di quell'analita inferiore di almeno dieci volte rispetto al primo standard. Pertanto non è da considerare lo 0 standard come uno standard nel quale manchi l'analita da saggiare, anche perché, se

così fosse, non parleremo di standard. Lo 0 standard contiene, anche se a piccolissime concentrazioni, l'analita da saggiare; la curva quindi non partirà mai dallo zero. Gli standard dei kits commerciali vengono preparati in maniera differente sia riguardo alle concentrazioni usate, sia riguardo al sistema tampone nel quale vengono disciolte e conservate le sostanze standard. Queste differenze maggiormente valutabili per quei laboratori che si preparano gli standard senza usare kits commerciali, si percepiscono fortemente in termini di risultati; infatti i dati di un esame di controllo di qualità interlaboratorio hanno dimostrato notevoli variazioni per uno stesso campione anche se il valore diagnostico dei risultati di ciascun laboratorio, preso individualmente, risultava accettabile. Gli standard che vengono acclusi alle confezioni commerciali possono trovarsi in forma liofilizzata, ed in tal caso occorrono particolari accorgimenti nella ricostituzione, primo tra tutti lo scrupoloso dissolvimento del liofilizzato attendendo almeno mezz'ora dopo la ricostituzione prima dell'uso. Sarebbe opportuno congelare le quote di standard avanzato dopo il dosaggio. Vi sono kits che contengono standard già disciolti in opportuno tampone e presentano il vantaggio di non essere ricostituiti evitando errori che conseguono tale operazione ed inoltre, essendo già in soluzione, possono non essere congelati in quanto la loro solubilizzazione avviene in un opportuno tampone che non ne altera le caratteristiche.

In ogni caso, specialmente per gli standard di proteine ed ormoni peptidici è necessario considerare l'assoluta importanza di unificare i loro valori, o meglio la loro taratura, per evitare problemi di consistenti difformità come già accennato in precedenza. Se si considera, ad esempio, che le proteine vengono spesso estratte da materiale biologico, e nonostante la purificazione con tecniche cromatografiche, contengono ancora sostanze contaminanti, si può comprendere come risulta necessario paragonare questo materiale con un preparato di riferimento internazionale in cui la quantità di ormone è stata calcolata sia con l'uso di radioisotopi sia biologicamente ed è stata definita in termini di unità e di massa.

In teoria sarebbe auspicabile avere a disposizione uno standard internazionale ottenendo in tal modo perfetta affidabilità e uniformità di tutti i laboratori che lo usano; purtroppo ciò non è possibile perché pur esistendo un organismo internazionale, il WHO, che raccoglie e analizza materiale per la produzione di

standard internazionali, la quantità di tali standard prodotta è del tutto scarsa e certamente non sufficiente per soddisfare le richieste di tutti i laboratori del mondo. Per questo motivo si è scelto di produrre preparati di riferimento internazionali che, oltre ad essere usati per scopi sperimentali, sono disponibili per le ditte produttrici di kits commerciali; in tal modo possono essere standardizzate le preparazioni ed usate di conseguenza come materiale standard.

Esistono alcuni istituti che preparano in forma liofila tali materiali internazionali di riferimento quali il The United Medical Research Council, divisione degli standard biologici che ha sede a Londra, ed il National Institute Of Arthritis Metabolic And Digestive Disease ed il National Institute Of Health che hanno sede negli Stati Uniti.

Questi organismi forniscono in quantità limitata le varie ditte e laboratori che preparano soluzioni standard. Tutti i kits in commercio dovrebbero essere accompagnati da una carta di controllo (Figura 28) dove viene indicato il lotto dei reagenti, l'attività totale radioattiva, l'efficienza, il legame aspecifico, la capacità legante che viene espressa dalla seguente formula:

$$\frac{Bo - NSB}{T - NSB}$$

Dove:

$Bo =$  Cpm standard 0

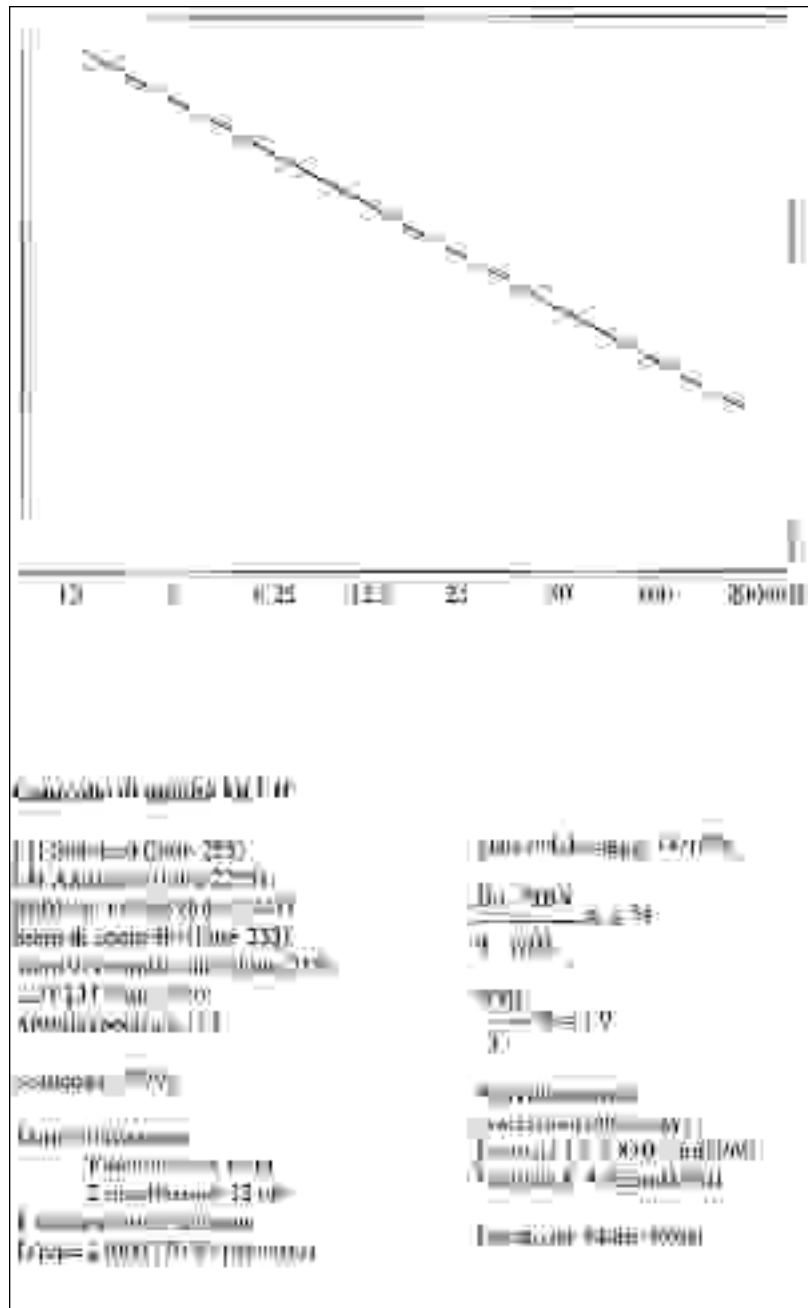
$NSB =$  Legame aspecifico ovvero  $\frac{\text{cpm Diluente+Radioat.}}{\text{cpm Totale}}$

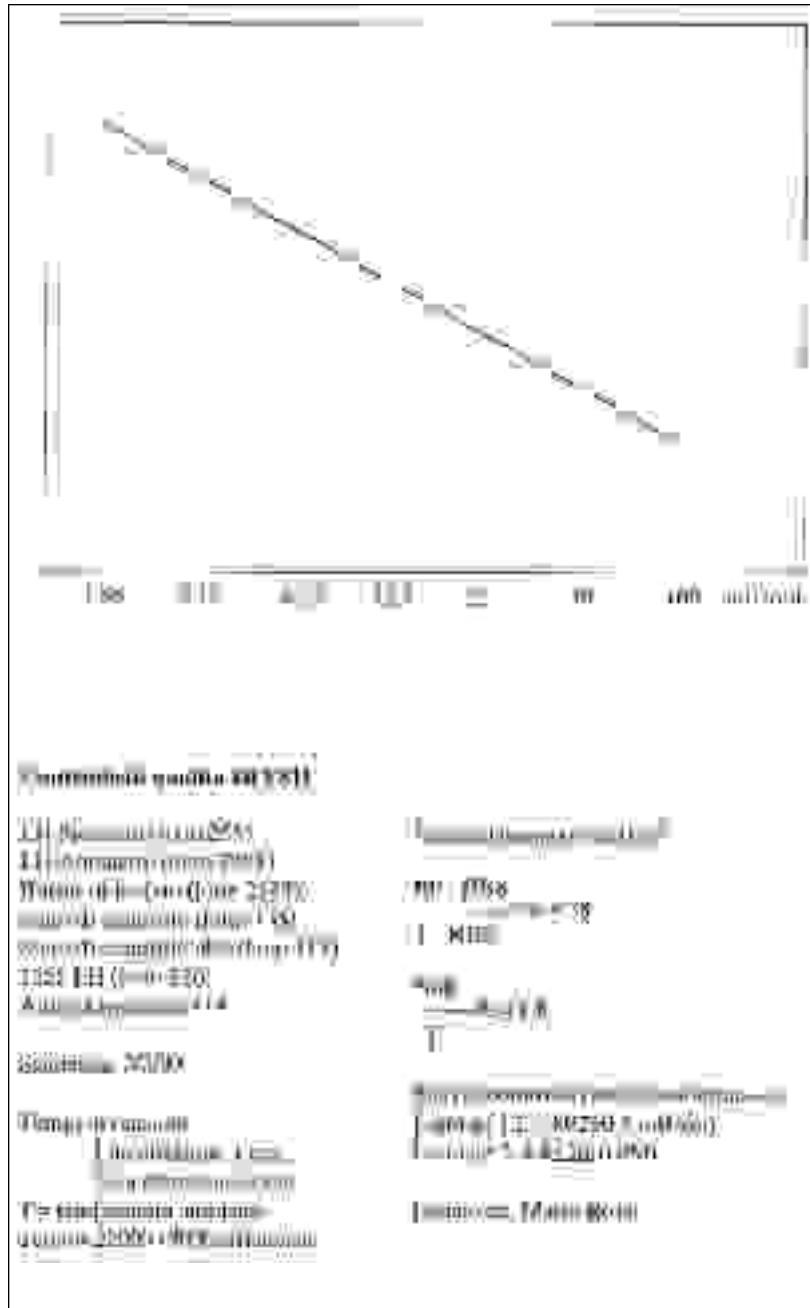
$T =$  Cpm della radioattività totale.

La carta di controllo evidenzia il tipo di curva ottenuto (a seconda della regressione considerata) ed il valore alla concentrazione del 50% detto ED50 ed al 25% detto ED25.

Inoltre sulla carta di controllo oltre ad indicare la data in cui è stato effettuato il controllo, occorre indicare la scadenza del tracciante ed i valori dei sieri di controllo a meno di 2 s di deviazione standard. Sarebbe opportuno che il kit contenesse due sieri di controllo a livelli diversi ad esempio un livello normale ed uno patologico. Di seguito si evidenziano carte di controllo di ditte differenti.









Aspetti generali	Descrizione qualitativa dell'analisi
Reagenti	Reagenti utilizzati
Strumenti	Strumenti utilizzati
Procedura	Procedura di lavoro
Resultati	Resultati ottenuti
Conclusioni	Conclusioni raggiunte
Commenti	Commenti
Autore	Autore

## Il tracciante o marcato radioattivo

Nelle metodiche RIA per competizione il tracciante è un antigene marcato che compete con “l’antigene freddo” del siero per saturare i siti anticorpali. E’ importante che l’antigene marcato abbia la stessa fisionomia dell’antigene freddo anche se non è necessaria la perfetta identità. Un requisito per il successo del saggio radioimmunologico è che la molecola marcata sia quanto più stabile possibile; che nel processo di marcatura la molecola venga poco alterata nella sua struttura molecolare; che venga di conseguenza mantenuta quanto più elevata possibile l’affinità e la specificità della molecola marcata.

I traccianti possono essere distinti in due preponderanti categorie:

1) Traccianti interni dove l’atomo radioattivo è interno alla struttura della molecola. L’inserimento dell’atomo radioattivo nell’interno della molecola da marcare viene effettuato sostituendo un atomo stabile con l’atomo radioattivo. Questo metodo per sostituzione viene usato per marcare molecole con il Trizio.

2) Traccianti esterni dove gli atomi radioattivi sono posizionati esternamente alla molecola da marcare. E’ questo il caso delle molecole marcate con  $^{125}\text{I}$ . La iodazione deve avvenire previa ossidazione dello ioduro che è parzialmente inattivo a iodio; l’ossidante più usato è la Clorammina T (metodo di Hunter e Greenwood); vengono usate anche altre sostanze come la lattoperossidasi, il monocloruro di iodio ecc.. La iodazione può essere rivolta sia a molecole che contengono gruppi iodabili (gruppi tirosinici o istidinici, sostanze polipeptidiche) ed in tal caso la marcatura è diretta; se la molecola da marcare non contiene gruppi iodabili si effettua un processo di condensazione con un gruppo già radioiodato unito ad un gruppo funzionale adatto alla coniugazione (Metodo di Bolton e Hunter). Un vantaggio di questo metodo è che il reagente di Bolton-Hunter viene a contatto con il reagente di ossidazione. Indubbiamente la marcatura con  $^{125}\text{I}$  offre vantaggi rispetto ad altre sostanze radioattive, in quanto lo  $^{125}\text{I}$  che è un puro emettitore di raggi gamma è disponibile in forma quasi pura. I moderni gamma-counter hanno un grado di

efficienza per lo  $^{125}\text{I}$  di circa il 75%. Al contrario lo  $^{131}\text{I}$  non è un puro emettitore di raggi gamma in quanto ha emissione di radiazioni beta che interferiscono notevolmente; inoltre lo  $^{131}\text{I}$  è puro al 15-30% per cui la sua purezza corrisponde ad un quarto di quella dello  $^{125}\text{I}$ ; lo  $^{125}\text{I}$  ha tempo di dimezzamento di 60 giorni mentre lo  $^{131}\text{I}$  ha tempo di dimezzamento di soli 8 giorni. Lo  $^{125}\text{I}$  è quindi l'isotopo di elezione a causa del tempo di dimezzamento più lungo e della sua minore energia di emissione. Sia lo  $^{131}\text{I}$  che lo  $^{125}\text{I}$  hanno il vantaggio sul trizio ( $^3\text{H}$ ) e Carbonio 14 ( $^{14}\text{C}$ ) di possedere un'attività specifica indubbiamente più elevata.

Una volta preparato il tracciante è opportuno e necessario operare una purificazione per rimuovere l'eccesso di agente marcante. E' inoltre importante stabilire la quantità di numero di atomi radioattivi introdotti nella molecola (grado di iodazione nel caso dello  $^{125}\text{I}$ ) perché da essa dipende l'attività specifica del tracciante.

## I metodi di separazione

Nella maggior parte dei sistemi di test biochimici la risposta è direttamente misurabile con opportune apparecchiature; il test radioimmunologico, il cui punto finale è un immunocomplesso radiattivo, non è direttamente misurabile dato che la miscela di reazione oltre al legato radioattivo porterà quote di antigene o di anticorpo non legante (le cosiddette Free) che devono essere allontanate dalla miscela di reazione attraverso una vera Separazione. La separazione della frazione legata all'anticorpo dalla frazione libera è, in un dosaggio immunologico, un'operazione di elevata importanza, in quanto errori nei processi di separazione comportano conseguenze notevoli e sicuramente invalidanti sui risultati. Vari sono gli obiettivi da tenere presente nel considerare un metodo di separazione. In primo luogo il metodo di separazione ideale non dovrebbe alterare l'equilibrio antigene-anticorpo permettendo la separazione completa dell'antigene legato dall'antigene libero in modo riproducibile. Occorre inoltre prendere in considerazione la semplicità del metodo, la velocità della sua attuazione e naturalmente il costo del

metodo stesso. Se si pensa che in genere il complesso antigene-anticorpo da quantizzare è presente in concentrazioni molto basse ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M), si può facilmente capire come, oltre alle caratteristiche già descritte, il metodo di separazione ottimale deve corrispondere ad una grande specificità. Al fine di eliminare possibili fonti di errore, sarebbe opportuno, nell'effettuare la separazione, ricorrere non già a pipette manuali ma a dispensatori e diluitori; è auspicabile insomma automatizzare il metodo. Attualmente esistono vari metodi di separazione; tutti presentano vantaggi e svantaggi.

Incominciamo col dire che un metodo di separazione ideale dovrebbero permettere la misurazione della frazione libera (free) e di quella legata (bound) senza modificare la concentrazione di ciascuna frazione. Per giungere alla realizzazione di un metodo di separazione ottimale è importante valutare l'aspetto cinetico delle reazioni facendo comunque un distinguo tra esse e considerando se si lavora con un sistema omogeneo o un sistema disomogeneo. Nel sistema omogeneo o di Fase Liquida si avranno a disposizione molecole di antigene e di anticorpo distribuite uniformemente nella soluzione che dovranno interreagire per formare l'immunocomplesso.

Tra questa molecole diverse (antigene e anticorpo) non esistono, in seno alla soluzione, forze di attrazione ma vi è un casuale movimento di tipo Browniano o di diffusione; quando una molecola di antigene viene ad incontrare una molecola di anticorpo specifico, si avrà unione se il contatto avviene nei siti di legame delle due molecole; solo in tal modo si formerà l'immunocomplesso. Pertanto per una determinata concentrazione di antigene la velocità di collisione, in un sistema omogeneo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo. Da quanto detto comunque, se la concentrazione dell'anticorpo diminuisce, la velocità di collisione e quindi la velocità di reazione diminuisce aumentando di conseguenza il tempo perché venga raggiunto un sufficiente grado di reazione. In un sistema omogeneo standardizzando le concentrazioni dell'antigene e dell'anticorpo, si può standardizzare il tempo di reazione che comunque dipende dalla temperatura in cui avviene la reazione e dalla viscosità della soluzione.

Ben diversa è la situazione quando la molecola di antigene deve reagire con la molecola di anticorpo adeso su una superficie inerte

con legame covalente (parete della provetta, sferetta ecc.). In questo sistema Disomogeneo o in Fase Solida (Coated Tube se si tratta di provette sensibilizzate) ci troviamo di fronte a cinetiche di reazione completamente diverse in quanto innanzitutto, contrariamente alla fase omogenea, le molecole di anticorpo non possono diffondere per cui non si ha la casuale collisione per diffusione; inoltre la distanza tra le molecole di antigene e quelle di anticorpo nella fase solida è maggiore per cui, da quanto già detto, la velocità di collisione diminuisce. Nella fase solida avremo prima il movimento o trasporto delle molecole di antigene nelle vicinanze dell'anticorpo fissato su un supporto inerte e poi la reazione dell'antigene con l'anticorpo.

Le molecole di antigene che sono nelle immediate vicinanze dell'anticorpo adeso reagiranno più rapidamente di quelle che sono più distanti. Per avere la possibilità che anche le molecole di antigene distanti possano venire a contatto con l'anticorpo, basta agitare energicamente la soluzione per cui si otterrà una velocità di trasporto maggiore e maggiori possibilità di collisioni.

Bisogna considerare che nella fase solida solo una parte della quantità totale di antigene può interreagire con l'anticorpo. Ciò non succede nella fase liquida dove, nonostante la casualità della collisione, la frazione dell'antigene che si lega all'anticorpo è superiore. Questo determina, per le reazioni in fase solida, una diminuzione della sensibilità che può essere ovviata aumentando il tempo di incubazione; in tal modo viene aumentato lo spazio di diffusione delle molecole e ci si riconduce così ad una sensibilità simile alla fase liquida.

Da quanto accennato sulle cinetiche di reazione si può comprendere come, proprio per effetto della separazione libero-legata, si possono avere modificazioni più o meno ingenti della curva di risposta e quindi influenza sulla qualità del saggio. Diversi sono i metodi di separazione della fase libera da quella legata. Potremmo raggruppare i metodi di separazione in tre gruppi principali:

- 1) Rimozione dal miscuglio di reazione dell'antigene libero che comprende il tracciante non legato mediante carbone, resine a scambio ionico oppure diversi tipi di silicati.

- 2) Precipitazione del complesso antigene-anticorpo o mediante alte concentrazioni di sali o usando solventi organici o, metodo abbondantemente usato, precipitazione al doppio anticorpo.

3) Metodo di separazione in fase solida dove, senza centrifugazione come per il metodo del doppio anticorpo, si aspira direttamente la quota libera in quanto la quota "legata" rimane "Adsorbita" covalentemente alle pareti della provetta o su altro materiale inerte usato.

### **I campioni nei dosaggi RIA**

L'attendibilità dei risultati analitici, a somiglianza di quanto accade in chimica clinica, deve essere continuamente monitorata sia utilizzando una serie di accorgimenti sui prelievi ed il trattamento di essi considerando anche le condizioni del paziente, sia con un sistematico, preciso ed indicativo controllo sulle apparecchiature e sulle metodiche.

In radioimmunologia occorre standardizzare le condizioni del paziente all'atto del prelievo considerando alcuni parametri fondamentali:

- 1) Stato di digiuno;
- 2) Situazione posturale;
- 3) Situazione di stress del paziente;
- 4) Eventuale assunzione di farmaci, ovvero situazioni fisiologiche quali ciclo mestruale, stato di gravidanza, o patologiche quali iperglicemie, ipertensione ecc..

Occorre ricordare che per molti dosaggi RIA esistono problemi derivanti dal dosaggio di ormoni che vengono prodotti secondo ritmi precisi (bioritmi); è quindi importante conoscere questi bioritmi per stabilire l'orario del prelievo. Anche il trattamento dei campioni nella fase preanalitica può costituire una fonte di errore. Occorre pertanto considerare attentamente tutte le operazioni nella fase preanalitica, iniziando dal prelievo alla separazione del plasma o siero dalla parte corpuscolata del sangue e dal tipo di anticoagulante usato. Occorre evitare assolutamente l'emolisi perché questo fenomeno, determinando un passaggio nel siero o plasma di sostanze normalmente contenute nei globuli rossi, prima tra tutti l'emoglobina, che è una proteina, influenza negativamente il dosaggio. E' altresì importante ricordare che su alcuni analiti si ha un'azione pressoché immediata di alcuni enzimi.

Ad esempio già durante il sieraggio la gastrina viene degradata da un enzima. E' allora preferibile, qualora ci si trovasse di fronte a simili evenienze, usare plasma e non siero. Anche la scelta degli anticoagulanti (Edta, citrato sodico, fluoruro di potassio, eparina) possono inibire la reazione antigene-anticorpo su cui si fonda il dosaggio RIA. E' perciò opportuno trattare il campione in brevissimo tempo dal prelievo, separare il siero o il plasma centrifugando per circa 10 minuti a 1000-1500 giri/min e a bassa temperatura (4 gradi) e, nel caso non viene eseguito subito il dosaggio, conservare a +4 gradi centigradi il campione se questo viene trattato nel giro di poche ore o a -20 gradi se il dosaggio viene effettuato nei giorni successivi.

### **Problemi comuni in corso di dosaggio RIA**

Problema:	1) Mancanza di legame
Possibile causa:	1.1) Mancanza di anticorpo 1.2) Separazione errata
Accertamento della causa:	1.1) I tubi hanno gli stessi cpm dello NSB 1.2) Mancanza di precipitato (per dosaggi in fase liquida) oppure tutto il tracciante (per dosaggi in fase liquida) adsorbito
Soluzione suggerita:	1.1) Assicurarsi che è avvenuta l'aggiunta di tutti i reattivi attraverso un pipettaggio più idoneo 1.2) Verificare il precipitato prima di decantare o aspirare (per dosaggi in fase liquida)

<b>Problema:</b>	2) Basso legame
<b>Possibile causa:</b>	2.1) Tracciante scaduto 2.2) Tracciante non idoneamente diluito 2.3) Anticorpo troppo diluito
<b>Accertamento della causa:</b>	2.1) Verificare la data di scadenza del tracciante 2.2) Calcolare i cpm che dovrebbero esserci in dosaggio 2.3) Verificare la ricostituzione dell'anticorpo
<b>Soluzione suggerita:</b>	2.1) Non utilizzare tracciante scaduto o impropriamente conservato 2.2) Contare 100 ul del tracciante per verificare i cpm prima dell'impiego nel dosaggio 2.3) Accertarsi che la quantità di Ab utilizzato sia stata sufficiente per tutte le provette previste per il dosaggio
<b>Problema:</b>	3) Curva piatta con NSB e Bo normali
<b>Possibile causa:</b>	3.1) Mancata aggiunta degli standard 3.2) Mancata diluizione degli standard
<b>Accertamento della causa:</b>	3.1) Le provette dello standard hanno gli stessi cpm del Bo 3.2) Il legame della curva standard è molto basso (B/Bo 20%)
<b>Soluzione suggerita:</b>	3.1) Assicurarsi l'aggiunta di tutti i reattivi attraverso un pipettaggio più idoneo 3.2) Fare la diluizione seriale degli standard laddove è necessario, solo al momento del dosaggio



<b>Problema:</b>	4) Elevato NSB
<b>Possibile causa:</b>	4.1) Anticorpo aggiunto nei tubi del NSB 4.2) Tracciante scaduto 4.3) Tracciante danneggiato o mal conservato
<b>Accertamento della causa:</b>	4.1) Cpm NSB = cpm Bo; i cpm nei restanti tubi sono inferiori 4.2) Verificare data scadenza del tracciante 4.3) Il legame è basso per tutte le provette del dosaggio. Il dosaggio è nettamente fuori controllo
<b>Soluzione suggerita:</b>	4.1) Lavorare abituandosi a separare nettamente le provette dell'NSB dalle altre 4.2) Non utilizzare tracciante scaduto o impropriamente conservato
<b>Problema:</b>	5) Bassa sensibilità
<b>Possibile causa:</b>	5.1) Standards troppo diluiti 5.2) Troppo tracciante per tubo 5.3) Troppo AB per tubo 5.4) Tracciante scaduto
<b>Accertamento della causa:</b>	5.1) Verificare il procedimento della diluizione seriata degli standards 5.2) Calcolare i cpm teoricamente presenti nel dosaggio (basso Bo) 5.3) Verificare la data di scadenza del Tracciante
<b>Soluzione suggerita:</b>	5.1) Fare la diluizione seriale degli standards solo al momento del dosaggio 5.2) Contare 100 µl del tracciante per

	verificare i cpm prima dell'im- piego nel dosaggio
	5.3) Accertarsi che la quantità di Ab utilizzato sia stata sufficiente per tutte le provette previste per il dosaggio
	5.4) Non utilizzare tracciante scaduto
<b>Problema:</b>	6) Troppa sensibilità
<b>Possibile causa:</b>	6.1) Standards poco diluiti 6.2) Poco tracciante per tubo 6.3) Poco AB per tubo 6.4) Tracciante scaduto
<b>Accertamento della causa:</b>	6.1) Verificare il procedimento della diluizione della diluizione seriata degli standards 6.2) Calcolare i cpm teoricamente presenti nel dosaggio (elevato Bo) 6.3) Verificare la diluizione dell'AB (basso Bo) 6.4) Verificare la data di scadenza del Tracciante
<b>Soluzione suggerita:</b>	6.1) Diluire gli standard solo al momento del dosaggio 6.2) Contare 100 µl del tracciante per verificare i cpm prima dell'im- piego nel dosaggio 6.3) Accertarsi che la quantità di AB utilizzata sia sufficiente per tutte le provette previste per il dosag- gio 6.4) Non utilizzare tracciante scaduto o impropriamente conservato
<b>Problema:</b>	7) Sieri di controllo Elevati
<b>Possibile causa:</b>	7.1) Standards troppo diluiti

- 7.2) Elevato NSB causato da traccianti scaduto o impropriamente conservato
- 7.3) Siero di controllo vecchi o impropriamente conservati
- Accertamento della causa:
- 7.1) La curva sarà piatta nei primi punti, tutti i valori saranno elevati
  - 7.2) Abnormemente elevato NSB (2 o 3 volte la norma)
  - 7.3) Verificare la scadenza dei sieri di controllo
- Soluzione suggerita:
- 7.1) Fare la diluizione seriale degli standard solo al momento del dosaggio
  - 7.2) Non utilizzare tracciante scaduto o impropriamente conservato
  - 7.3) Conservare i reattivi come da istruzione e non utilizzarli dopo la scadenza
- Problema:
- 8) Sieri di controllo Bassi
- Possibile causa: Come per il punto 7.1-7.2-7.3
- Accertamento della causa:
- 8.1) La curva sarà con maggiore pendenza nei primi punti; tutti i valori saranno bassi
  - 8.2) Vedi punto 7.2
  - 8.3) Vedi punto 7.3
- Soluzione suggerita:
- Vedi soluzioni 7.1-7.2-7.3
- Problema:
- Duplicati troppo disomogenei
- Possibile causa:
- 9.1) Mediocre tecnica manuale
  - 9.2) Pipetta inadeguata o starata

	9.3) Reattivi scaduti o danneggiati
Accertamento della causa:	9.1) Problemi con tutti i dosaggi eseguiti da "una persona" 9.2) Controllo pipette 9.3) Verificare la data di scadenza e la conservazione dei reagenti
Soluzione suggerita:	9.1) Sviluppare un programma di addestramento del personale tecnico 9.2) Pipettare una soluzione di $^{125}\text{I}$ in 10 provette e verificare il coefficiente di variazione 9.3) Conservare i reattivi come da istruzioni e non utilizzarli dopo la scadenza
Problema:	10.1) Scarsa riproducibilità
Possibile causa:	10.1) Dispensamento mediocre 10.2) Reattivi scaduti o danneggiati 10.3) Diversa tecnica da parte di più tecnici
Accertamento della causa:	10.1) Il volume è diverso da provetta a provetta 10.2) Verificare data di scadenza e conservazione dei reagenti 10.3) Risultati diversi in dosaggi eseguiti da più laboratoristi
Soluzione suggerita:	10.1) Come per il punto 9.2 10.2) Come per il punto 9.3 10.3) Codificare un controllo di qualità con sieri del commercio esterni al kit fornito.

## Procedure di dosaggio

### Schema per il <sup>125</sup>I-E2 con separazione liquida

Reattivi	Standards	Campioni	Bo	NSB	Radioattività totale
Campioni e siero controllo	---	0,05	---	---	---
Tampone	---	---	---	0,1	---
Standard 0	---	---	0,05	0,05	---
Standard 25 50-100-200 500-1000 2000pg/ml	0,05	---	---	---	---
Antisiero bEstradiolo	0,1	0,1	0,1	---	---
<sup>125</sup> I Estradiolo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Mescolare ed incubare per 4 ore a temperatura ambiente

Doppio anticorpo	0,1	0,1	0,1	0,1	---
PEG 8% a +4C (Polietilenglicole)	1,0	1,0	1,0	1,0	---

Mescolare su vortex, centrifugare, aspirare o decantare (esclusa la radioattività totale) Leggere tutte le provette.

(segue)

### Calcolo dei risultati

Sottrarre a tutti i conteggi, eccetto che alla radiattività totale la media dei cpm degli NSB. La media dei cpm legati nei Bo viene usata per calcolare la percentuale di legame in assenza di ormone freddo (capacità legante o legame massimo-C.L.)

$$C.L. = \frac{\text{Media cpm legati nei Bo}}{\text{Media cpm radioattività totale}} \times 100 = \% \text{ di legame}$$

Calcolare la percentuale per ogni dose standard campione e siero controllo con la seguente formula (espress come B/Bo):

$$\frac{\text{Media cpm legati (standard campioni e sieri controllo)}}{\text{Media cpm legati nei Bo}} \times 100 = \% \text{ di inibizione.}$$

N.B. Alcune ditte e la maggior parte degli utilizzatori indicano di sottrarre dal numeratore e dal denominatore della precedente frazione l'NSB per cui:

$$\frac{\text{Media cpm legati (B) - NSB}}{\text{Media cpm Bo - NSB} \times 100} = \% \text{ di inibizione}$$

Disegnare la curva standard ponendo le percentuali di inibizione ottenute per ogni dose standard contro le varie concentrazioni di standard. Usare carta semilog o ritmica riportando le dosi standard sulle ascisse (scala logaritmica) e le % di inibizione sulle ordinate (scala lineare)

<i>Tubo</i>	<i>Media cpm % di legame Concentraz.</i>			
<i>Radioattività totale</i>	14665	---	---	
<i>NSB</i>	724	4%	---	
<i>Bo</i>	9778	66%	---	
<i>Standard 1-S1</i>	8604	88%		25 pg/ml
“ “ 2-S2	8017	82%	50	“
“ “ 3-S3	6844	70%	100	“
“ “ 4-S4	5182	53%	200	“
“ “ 5-S5	3128	32%	500	“
“ “ 6-S6	2053	21%	1000	“
“ “ 7-S7	1466	15%	2000	“
<i>Campione 1</i>	4750	46%	275	“

#### Avvertenze contenute nel kit:

Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza;

Non mescolare reagenti di lotti differenti;

Dopo la ricostituzione i reagenti devono essere conservati a 4 gradi centigradi per 3 giorni; dopo i 3 giorni congelare in aliquote. Per scongelare lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente gradualmente, evitando l'uso di bagnomaria a 37 gradi. Evitare di scongelare i reagenti più di una volta. Campioni contaminati da radioattività esogena possono fornire risultati inaccurati.

Il significato clinico della determinazione dell'estradiolo circolante può essere inficiato dalla somministrazione di alcuni tipi di farmaci (cortisone o estrogeni) che possono alterare i normali livelli di estradiolo nonché da condizioni patologiche come alterazioni epatiche.

#### Specificità del kit:

La specificità è stata valutata in base all'interferenza dei seguenti composti a struttura steroidea. La percentuale di interferenza è calcolata secondo Abraham ( $x/y \times 100$ ) dove x e y sono rispettivamente il peso dell'estradiolo e dell'interferente tali da causare un abbassamento del 50% della capacità legante:

1	17 estradiolo	100	%
2	Estrone	1,3	%
3	Estriolo	0,4	%
4	Testosterone	0,016	%
5	Cortisolo	0,006	%
6	Aldosterone	0,0009	%
7	Progesterone	0,0005	%
	Ecc.....		

### Altro esempio di risultati e di curve

	<i>Cpm</i>	<i>Media</i>	<i>M-NSB</i>	<i>B/Bo</i>	<i>mUI/ml</i>	
<i>T</i>	13707-13333	13520	13046			
<i>NSB</i>	456 - 493	474				
<i>Bo</i>	5378-5363	5370	4896			
<i>S1</i>	5085 -4988	5036	4562	93	1,0	
<i>S2</i>	4605 - 4314	4459	3985	81	2,5	
<i>S3</i>	3541-3706	3623	3149	64	5,0	
<i>S4</i>	2661-2601	2631	2157	44	10,0	
<i>S5</i>	1524 -1697	1609	1135	23	20,0	
<i>S6</i>	1101-1067	1084	610	12	40,0	
<i>S7</i>	763-717	740	266	5	80,0	
<i>P</i>	1764-1771	1767	1293	26	17,5	18,5 +0 - 1,75 3,78
<i>N</i>	4185 -4327	4256	3782	77	3,0	+0 - 0,49 16,8
*	1904 - 1944	1924	1450	29	15,5	16,8
**	2817 - 2883	2850	2376	48	8,1	8,1
***	3000 - 2945	2957	2483	50	8,1	

\* = *Basso Amerscham*  
 \*\* = *Medio Amerscham*  
 \*\*\* = *Alto Amerscham*  
*P* Patologico Controllo  
*N* Normale "



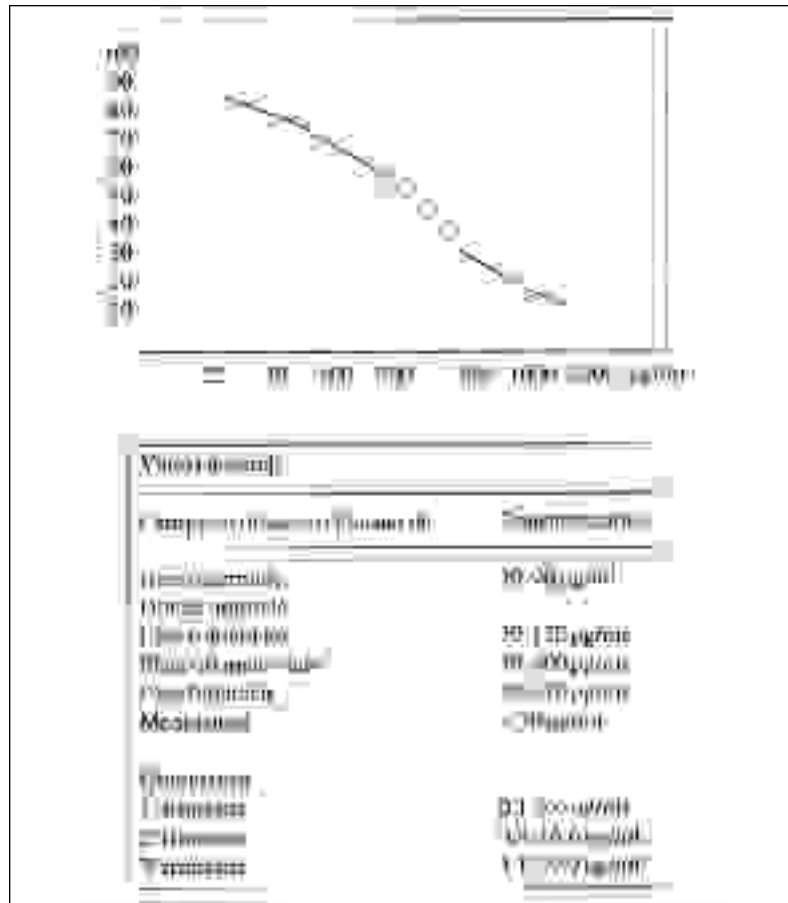
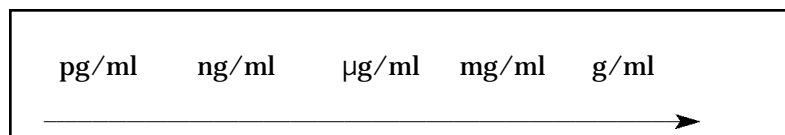


figura 29.

## I metodi immunoenzimatici

L'utilizzo di tests immunologici si è talmente affermato che non c'è laboratorio di analisi, di base o specialistico, che non adotta metodiche immunologiche. La possibilità di dosare e studiare in laboratorio ormoni peptidici, steroidei o di altra natura ha fatto sì che questi dosaggi entrassero nella routine quotidiana; d'altra parte le metodiche Ria spesso comportano problemi notevoli sia in termini di attrezzature che dal punto di vista organizzativo. Per questo la ricerca ha battuto strade alternative al Ria puntando sull'immunologia.

Il problema fondamentale stava nell'approntare metodiche che riuscissero ad evidenziare sostanze biologicamente attive ed interessanti dal punto di vista clinico presenti nell'organismo in quantità molto piccole nell'ordine dei nanogrammi e dei picogrammi.



### **Intervalli di misura dei parametri diagnostici usati in chimica clinica.**

Mentre con i metodi di determinazione enzimatici viene raggiunto nel siero un limite di determinazione inferiore di 5-10 µg/ml, i procedimenti immunologici possono dosare sostanze nell'ordine dei picogrammi ( $10^{-12}$  g). Nel 1959 Yalow e Berson applicarono all'immunologia l'uso dei radioisotopi dosando l'insulina. Con il progredire degli studi si è potuto effettuare una combinazione della reazione immunologica oltre che con un radioisotopo, con un enzima. Sia il radioisotopo che l'enzima diventano indicatori della reazione immunologica. In pratica l'enzima nelle reazioni immunoenzimatiche non solo agisce da rivelatore, ma se è altamente sensibile, aumenta l'effetto immunologico della reazione evidenziando anche piccolissime

quantità di sostanze. Con queste sensibili e specifiche (perché si tratta di reazioni antigene-anticorpo) metodiche è possibile evidenziare e quantizzare di tutto come per esempio ormoni, farmaci, proteine, vitamine e anche componenti di agenti patogeni come batteri, virus, protozoi. Nelle reazioni immunoenzimatiche la base del principio è la reazione antigene-anticorpo dove ricorrono sempre i soliti concetti di immunogenicità, caratteristica precipua di tutte le sostanze ad elevato peso molecolare e specificità, che porta l'antigene a legarsi solo con il rispettivo anticorpo come una chiave che riesce ad aprire solo la "Sua" serratura ( Figura 30).

Quanto detto per i dosaggi Ria si applica tal quale per i dosaggi



**Figura 30. Reazione antigene anticorpo (Chiave-Serratura).**

immunoenzimatici considerando al posto del radioisotopo un enzima. Nel 1871 due gruppi di sperimentatori (Van Weemen-Schuurs e Engvall-Perlmann) hanno dimostrato che, quando gli enzimi si attaccano agli antigeni, le loro proprietà immunologiche rimangono intatte ed anche gli enzimi mantengono la loro attività catalitica. Sono uscite così, e successivamente al Ria, le metodiche Eia (Enzyme-Immunoassay). La sensibilità richiesta per la determinazione viene raggiunta grazie all'elevata velocità della reazione enzimatica che rappresenta un'amplificazione notevole del segnale, così che anche le piccole concentrazioni possono essere rilevate.

I dosaggi immunoenzimatici si dividono in due grossi gruppi:

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Economicità e disponibilità in un alto gradi di purezza</li> <li>2. Elevata attività specifica</li> <li>3. Stabilità nella conservazione e nelle condizioni del test</li> <li>4. Solubilità</li> <li>5. Misure semplici, sensibili e rapide</li> <li>6. Assenza della sostanza che deve essere analizzata</li> <li>7. Substrati inibitori e fattori interferenti nel materiale di dosaggio non devono influenzare il test</li> <li>8. L'attività non deve essere ridotta in seguito alla coniugazione</li> <li>9. L'attività deve rimanere costante nelle condizioni del test</li> <li>10. Il prodotto deve avere una forte estinzione in un ambito facilmente misurabile</li> </ol>	<table border="0"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;"><i>ENZIMA</i></th> <th style="text-align: left;"><i>ORIGINE</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Malato deidrogenasi</i></td> <td><i>Mitocondri da cuore di maiale</i></td> </tr> <tr> <td><i>Glucosio ossidasi</i></td> <td><i>Aspergillus Niger</i></td> </tr> <tr> <td><i>Perossidasi (POD)</i></td> <td><i>Rafano</i></td> </tr> <tr> <td><i>Fosfatasi alcalina (PA)</i></td> <td><i>Mucosa (vitello) Escherichia Coli</i></td> </tr> <tr> <td><i>Lisozima</i></td> <td><i>Albume</i></td> </tr> <tr> <td><i>Galattosidasi Coli</i></td> <td><i>Escherichia</i></td> </tr> <tr> <td><i>Glucoamilasi</i></td> <td><i>Rhizopus Nivens</i></td> </tr> <tr> <td><i>Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G-6-PDH)</i></td> <td><i>Leucon-Stoc Mesenteroides</i></td> </tr> </tbody> </table>	<i>ENZIMA</i>	<i>ORIGINE</i>	<i>Malato deidrogenasi</i>	<i>Mitocondri da cuore di maiale</i>	<i>Glucosio ossidasi</i>	<i>Aspergillus Niger</i>	<i>Perossidasi (POD)</i>	<i>Rafano</i>	<i>Fosfatasi alcalina (PA)</i>	<i>Mucosa (vitello) Escherichia Coli</i>	<i>Lisozima</i>	<i>Albume</i>	<i>Galattosidasi Coli</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Glucoamilasi</i>	<i>Rhizopus Nivens</i>	<i>Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G-6-PDH)</i>	<i>Leucon-Stoc Mesenteroides</i>
<i>ENZIMA</i>	<i>ORIGINE</i>																		
<i>Malato deidrogenasi</i>	<i>Mitocondri da cuore di maiale</i>																		
<i>Glucosio ossidasi</i>	<i>Aspergillus Niger</i>																		
<i>Perossidasi (POD)</i>	<i>Rafano</i>																		
<i>Fosfatasi alcalina (PA)</i>	<i>Mucosa (vitello) Escherichia Coli</i>																		
<i>Lisozima</i>	<i>Albume</i>																		
<i>Galattosidasi Coli</i>	<i>Escherichia</i>																		
<i>Glucoamilasi</i>	<i>Rhizopus Nivens</i>																		
<i>Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G-6-PDH)</i>	<i>Leucon-Stoc Mesenteroides</i>																		
<p><i>Condizioni da seguire per la scelta dell'enzima</i></p>	<p><i>Enzimi usati nelle reazioni immunoenzimatiche</i></p>																		

#### A) Dosaggio immunoenzimatico Omogeneo

Il complesso antigene anticorpo viene inibito dall'enzima o attivato dall'attività catalitica dell'enzima. Nel sistema omogeneo non è necessario operare la separazione bound-free per cui è possibile automatizzare il dosaggio; lo svantaggio di questo sistema sta nel fatto che tutti i reagenti sono presenti in un'unica miscela, anche durante la reazione indicatrice enzimatica, per cui l'attività dell'enzima può subire interferenze da parte dei costituenti del siero. Inoltre l'inibizione dell'attività enzimatica è talmente esigua che la colorazione finale della miscela di reazione risulta molto sfumata con estinzioni basse; questo rende la

metodica molto critica per cui c'è bisogno, per valutare la reazione inibita e quella non inibita di disporre di un ottimo fotometro e controllare attentamente la temperatura di reazione che spesso deve essere di 37 gradi centigradi con variazioni di +1 -1 gradi.

Proprio per le piccole differenze di estinzione riscontrabili il dosaggio Eia omogeneo è meno sensibile del dosaggio Ria o del dosaggio Eia eterogeneo. Il sistema Eia omogeneo viene usato per dosare concentrazioni di apteni relativamente elevate (es. monitoraggio farmaci).

#### *B) Dosaggio Immunoenzimatico Eterogeneo*

Il dosaggio Eia eterogeneo detto anche Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) si differenzia da quello omogeneo in quanto il reattivo libero viene sempre separato dal reagente coniugato marcato dopo che si fa avvenire l'incubazione immunologica ad una certa temperatura e per un certo periodo di tempo. Il sistema Eia eterogeneo è detto anche "Sistema in fase solida" in quanto gli antigeni o gli anticorpi sono legati alle pareti delle provette o a sferette o alle pareti dei pozzetti di una piastra. La separazione bound-free avviene pertanto per svuotamento o aspirazione della soluzione di incubazione. Con le tecniche Elisa è possibile dosare sostanze ad elevato peso molecolare, come proteine ed ormoni, utilizzando come enzima rivelatore in particolare la perossidasi estratta dal rafano che ha particolare affinità con alcuni cromogeni tipo il fenilendiammina. Le tecniche Elisa si sono dimostrate particolarmente sensibili e precise per cui possono essere quasi sovrapposte alle metodiche Ria. In tal senso esistono ormai numerosissime pubblicazioni; da esse si evince inequivocabilmente la completa affidabilità delle tecniche Elisa riferite alle stesse tecniche eseguite con il Ria. Uno svantaggio delle tecniche Elisa sta nella difficoltà di automatizzare le metodiche in quanto i passaggi sono piuttosto articolati; allo stato attuale anche se si sono compiuti enormi progressi ancora non si è potuto realizzare un automatismo completo.

Le metodiche Elisa si distinguono a seconda della natura del sistema in:

- 1) Competitive
- 2) Non competitive

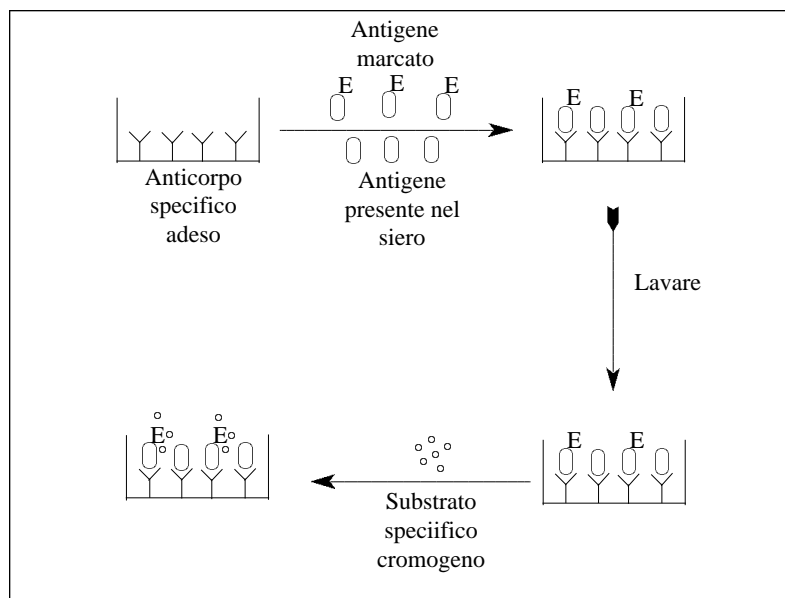
E a seconda della natura del coniugato avremo:

- 1) Antigene legato all'enzima
- 2) Anticorpo legato all'enzima

### Principio di competizione

Il principio di competizione si basa sulla competizione tra l'antigene del siero e l'antigene marcato con l'enzima per una limitata quantità di anticorpi adesi alla parete della provetta o alla sferetta di poliacrilamide, destrano, vetro ecc. Questo principio è uguale a quello usato nel Ria con la differenza che al posto del radioisotopo si usa l'enzima (Figura 31).

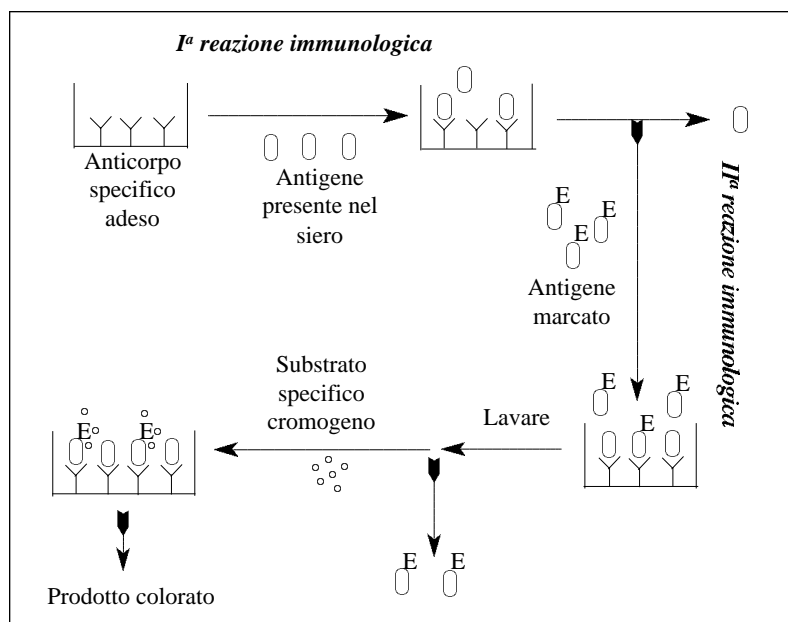
Come si può vedere dal disegno nella prima incubazione si cimentano sia l'antigene del siero sia quello marcato con l'enzima con l'anticorpo adeso alla superficie inerte. Dopo un opportuno



**Figura 31. Dosaggio ELISA per competizione.**

tempo e temperatura di incubazione, avvenuta la competizione per i siti di legame dell'anticorpo da parte dei due antigeni, si rimuove il "Free" con opportuni lavaggi ed il "Bound" formato cioè anticorpo-enzima viene fatto reagire con un cromogeno specifico per l'enzima per cui si otterrà un complesso colorato valutabile ad una determinata lunghezza d'onda ad un fotometro. Come per il Ria più è alta la concentrazione di antigene nel siero, inferiore sarà la quota di antigene-enzima in reazione e di conseguenza il legame del cromogeno sarà basso con scarsa colorazione finale. Se si hanno a disposizione degli standard a concentrazione nota si potrà, allestendo opportuna curva di taratura, quantizzare l'antigene del siero.

Una modifica al principio di competizione è il principio di Titolazione ovvero di Saturazione Sequenziale che permette di elevare la sensibilità del dosaggio da 10 a 100 volte. Con questo metodo si esegue prima la reazione antigene del siero-anticorpo adeso a superficie inerte (Figura 32).



**Figura 32. Dosaggio ELISA con competizione sequenziale.**

Dopo aver lavato rimuovendo tutti i componenti del siero compreso gli interferenti, si aggiunge l'antigene marcato con l'enzima che andrà ad occupare i rimanenti siti di legame dell'anticorpo rimasti liberi dalla prima reazione immunologica.

#### 2° Reazione Immunologica

La quantità di complessi anticorpi-antigeni-enzima esprime la quantità dell'antigene contenuto nel campione, evidenziata dal legame dell'antigene con il cromogeno.

Anche in questo caso è possibile quantizzare approntando una curva di taratura con opportuni standard.

### **Principio “Sandwich”**

In questo tipo di metodica Elisa l'enzima è agganciato all'anticorpo e non all'antigene. L'uso di questo metodo è rivolto al dosaggio di macromolecole che hanno molti siti per il legame anticorpale. L'anticorpo si ottiene per immunizzazione di un animale o secondo la tecnica monoclonale.

Nella prima incubazione immunologica, l'antigene del siero viene cementato con l'anticorpo adeso su superficie inerte che è in eccesso rispetto all'antigene: (Figura 33)

Nella seconda incubazione viene aggiunto l'anticorpo marcato con enzima che andrà a legarsi ai determinanti antigenici rimasti liberi (si è parlato di molecole con molti determinanti antigenici).

Il complesso così formato Anticorpo-marcato con enzima viene fatto reagire con un cromogeno.

Il metodo sandwich si presta molto bene ad evidenziare macromolecole quali l'antigene Australia (HB, Ag) per il quale sono stati messi in commercio kits con doppio anticorpo monoclonale, quindi altamente specifici.

Naturalmente, come già descritto abbondantemente per le metodiche Ria, è importante nella fase di realizzazione delle metodiche immunoenzimatiche assolvere a determinate condizioni quali:

a) I kit Elisa devono essere conservati a temperatura di frigorifero; l'uso di essi deve essere limitato assolutamente al periodo indicato dalle ditte per la scadenza.

b) Pipette starate, passaggi durante l'esecuzione della metodica



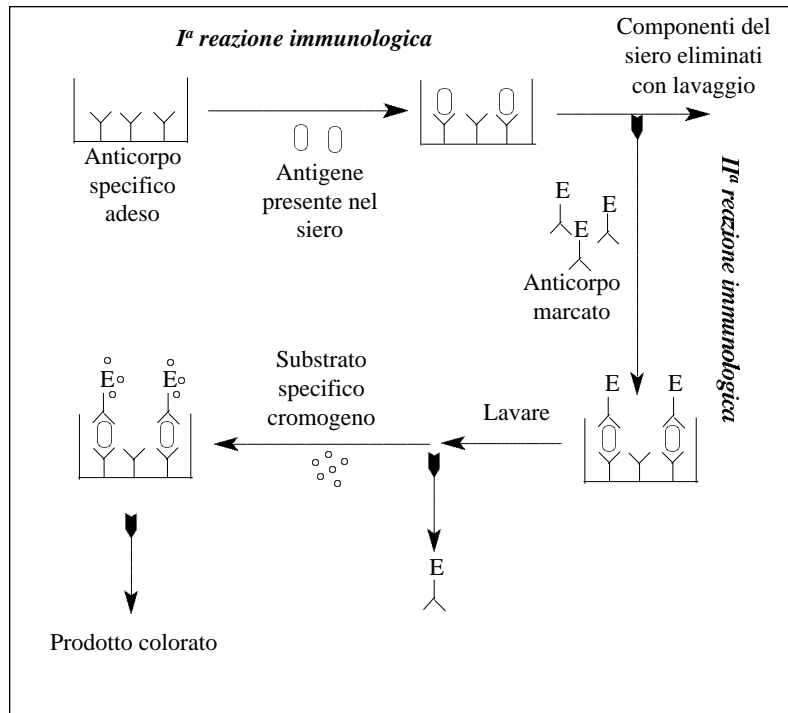


Figura 33. Dosaggio ELISA con competizione sequenziale.

invertiti, lavaggi mal eseguiti, uso di pipette a puntale fisso, uso di campioni mal conservati od emolizzati o itterici, influenzano sostanzialmente il dosaggio.

c) I supporti inerti cui sono adesi gli antigeni o gli anticorpi devono essere utilizzati con molta cura e tenuti sempre a contatto con le sostanze di conservazione (es. capsule essiccanti).

d) Una inadeguata conservazione di standard e sieri di controllo può portare a falsi risultati oltre che ad un appiattimento della curva di calibrazione.

e) L'appiattimento della curva può essere ottenuto sia per cattiva conservazione dei supporti inerti perché vi può essere un distacco degli anticorpi o degli antigeni; sia per ricostituzione dei reattivi con acqua contaminata che agisce sull'enzima e sul

cromogeno distruggendoli. Le cause di frequente contaminazione dell'acqua sono i microrganismi provenienti da sistemi a scambio ionico o i residui di detergenti nei flaconi di reagenti o nelle pipette.

f) L'alterazione del cromogeno è denunciata da un decremento di colore.

g) Se non si riscontrano differenze di estinzione determinando gli standard, il siero di controllo ed i campioni, si può ipotizzare che da parte dell'operatore sia stata dimenticata l'aggiunta dell'enzima coniugato al tampone di incubazione.

h) Gli standard, i sieri di controllo ed i campioni devono essere pipettati in rapida successione. Non possono intercorrere più di 20 minuti tra il pipettaggio del siero o dello standard e l'aggiunta delle soluzioni di incubazione.

L'effetto che si avrebbe determina scarsa riproducibilità.

i) Occorre costruire una curva di taratura ogni qualvolta si esegue un dosaggio, in quanto le reazioni immunologiche possono avvenire in maniera diversa (cinetica della reazione) ogni volta che si esegue il dosaggio. Inoltre poiché si lavora per quantizzare analiti il cui ambito di concentrazione è molto basso, occorre eseguire i dosaggi in doppio o addirittura in triplo.

Coefficienti di variazione superiori a 8-10% impongono determinazione in triplo.

l) Le temperature di incubazione sono importantissime come i tempi di incubazione. Discostarsi da questi due parametri significa avere alterazioni nella curva.

#### Effetto gancio

L'uso dei cromogeni comporta notevoli problemi. Sino a qualche tempo fa, ad esempio, il cromogeno specifico per l'enzima perossidasi era l'O- fenilandiammina, sostanza a forte fotosensibilità. Tale cromogeno viene generalmente prodotto in compresse che qualche minuto prima dell'uso vengono ricostituite con un substrato specifico. La ricostituzione presuppone l'utilizzo di recipienti a parete scura e l'operazione di scioglimento della compressa nel suo substrato deve avvenire al buio o per lo meno in ambiente senza forti sollecitazioni luminose. L'uso delle compresse di cromogeno per OPD ha comportato notevoli problemi per l'automazione perché qualsiasi sistema automatico

deve, per funzionare, disporre di reati liquidi. Al problema della ricostituzione delle compresse l'industria ha risposto prendendo in considerazione un altro cromogeno, la tetrametilbenzidina (TMB) come per la *s*-fenilendiammina, mantenendo come questa, la caratteristica della fotosensibilità.

La TMB viene ricostituita anch'essa con un substrato specifico ma, essendo liquida, si presta per l'uso in sistemi automatici venendo aggiunta dal sistema di pipettaggio facilmente (Si aggiunge prima la TMB e quindi il suo substrato<sup>7</sup>).

m Effetto gancio possibile in metodi di dosaggio per competizione. Tale effetto si ha testando diluizioni della standard ottenendo risposte superiori a quelle che si hanno con lo standard 0. Dal momento che lo 0 standard esprime la massima capacità legante, l'effetto gancio è un effetto interferente probabilmente dovuto a formazione di legami anticorpali aspecifici.

## **Il controllo di qualità**

Qualsiasi risultato di un dosaggio fornito da un laboratorio, indipendentemente dalla più o meno elevata specializzazione, necessita che sia quanto più prossimo alla attendibilità. Naturalmente si capisce bene come questa esigenza di attendibilità sia sentita non soltanto dagli operatori ma anche dagli utilizzatori dei risultati che servono loro per supportare una diagnosi od aggiustare una terapia. Perché un risultato di laboratorio sia “Credibile” occorre che si determinino contemporaneamente due condizioni:

1) Il metodo usato sia attendibile perché sensibile, specifico ed accurato.

2) Le apparecchiature usate e l'operatore siano efficienti.

Naturalmente queste due condizioni non sono le sole che determinano l'attendibilità di un risultato, anche se rispetto ad altre e numerose cause esse sono di gran lunga le più importanti. E' utile soffermarsi brevemente sul significato dei termini sensibile, specifico, accurato.

### **Sensibilità**

Con questo termine si intende la capacità con la quale un metodo analitico riesce a rilevare la più piccola quantità di sostanza. Un metodo è tanto più sensibile quanto più rileva quantità la cui concentrazione si avvicina allo zero. Un'ottima sensibilità di un metodo è quella che corrisponde al doppio della deviazione standard ottenuta con un controllo di precisione.

### **Specificità**

Si intende per specificità la capacità di un metodo analitico di dosare solo la sostanza ricercata senza subire interferenze da parte di altre sostanze.

## Accuratezza

Si intende con questo termine la concordanza tra il valore medio ottenuto nell'esecuzione di più dosaggi ed il valore teorico.

Sensibilità, specificità, ed l'accuratezza possono comportare un errore sistematico per quel metodo che lo è di meno (sensibile, specifico, accurato) rispetto ad un altro. Poiché queste tre "condizioni" appartengono al metodo usato, esse dipendono dall'operatore che può intervenire soltanto scegliendo oculatamente un metodo.

L'attendibilità, si è detto, dipende dal metodo usato e dal laboratorio nonché dall'operatore che vi lavora. E' necessario che le attrezzature siano efficienti e l'operatore sia abile ed esperto. Solo se si determinano queste condizioni possiamo avere risultati Precisi intendendo per "Precisione" la Ripetitività di risultati ottenuta per uno stesso campione più volte dosato.

Infatti dosando più volte uno stesso analita e facendo la media dei risultati ottenuti, diciamo che il saggio è preciso se i valori ottenuti si avvicinano alla media. Un metodo può essere preciso ma non accurato, cioè può discostarsi dal valore teorico. Un metodo eseguito con precisione deve essere ripetibile e riproducibile.

Per ripetibilità si intende la deviazione dal valore medio che si ha effettuando determinazioni nelle stesse condizioni di lavoro, compreso lo stesso operatore, su una stessa serie. La ripetibilità viene identificata con la precisione nella serie. Quando le determinazioni vengono effettuate su serie diverse e quindi in tempi diversi consideriamo la riproducibilità o precisione tra le serie, intesa come deviazione dal valore medio di determinazione tra le serie. La precisione, o al contrario, l'imprecisione viene stabilita dal calcolo della Deviazione Standard (DS).

Poiché la deviazione standard dipende dai valori ottenuti, o meglio dalla media dei valori ottenuti, ed esprime la deviazione da tale media, vediamo innanzitutto come si calcola la media dei valori ottenuti:

$$\text{Media aritmetica} = \frac{x}{n} \quad \text{dove:}$$

$x$  = singolo valore;

$n$  = numero dei valori.

La deviazione standard ( $s$ ) si calcola:

$$s = \sqrt{\frac{(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{dove } \bar{x} \text{ è il valore medio}$$

dove:  $x$  = singolo valore ottenuto

$\bar{x}$  = valore medio

$n$  = numero di determinazioni eseguite e considerate

Tendendo presente che il rapporto sotto radice  $\frac{(x-\bar{x})^2}{n-1}$

viene definito varianza ( $s^2$ ) pertanto la radice quadrata della varianza è la deviazione standard.

Nell'esempio successivo viene calcolata la deviazione standard per otto determinazioni di uricemia:

Campione	Uricemia (mg%)	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$
1	7,00	-0,025	0,0006
2	7,10	0,075	0,0056
3	6,90	-0,125	0,0156
4	7,00	-0,025	0,0006
5	7,20	0,175	0,0306
6	7,10	0,075	0,0056
7	6,80	-0,225	0,0506
8	7,10	0,075	0,0056
	$\bar{x} = 7,025$		tot. 0,1148

$$S = \sqrt{\frac{0,1148}{7}} = \sqrt{0,0164} = 0,128$$

La deviazione standard può essere espressa anche come percentuale della media ovvero come coefficiente di variazione percentuale (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Nell'esempio dell'uricemia sarà:

$$CV = \frac{0,128}{7,025} \times 100 = 1,82\%$$

Prima di vedere come è possibile controllare in un laboratorio la precisione e l'accuratezza di un metodo è necessario specificare quali sono i possibili errori che si commettono (e se ne commettono sempre!) e quanto ed in che misura questi errori possono influenzare i risultati.

Precisando che un errore si definisce in laboratorio come differenza tra valore ottenuto e valore "Vero", bisogna dire che le possibilità di errore sono moltissime a cominciare dal prelievo ematico e dal trattamento di esso, per continuare con il considerare la ricostituzione dei reattivi, la staratura del materiale ed apparecchiature usate, le distrazioni dell'operatore e tanti altri errori. Sarebbe opportuno pertanto una classificazione degli errori dividendoli in due grossi gruppi (classificazione di Grant):

1) Errori evitabili che a loro volta si distinguono in errori che interessano tutta una serie di esami dovuti per esempio ad errata preparazione di un reattivo, ed errori che interessano un solo campione, molto difficili da scoprire.

2) Errori inevitabili che si identificano in imprecisione ed inaccuratezza.

Un'altra classificazione più generica ma altrettanto indicativa è quella che distingue gli errori in:

- 1) Grossolani
- 2) Sistemati
- 3) Casuali

1) Errori grossolani: sono gli errori più pregiudizievoli per i risultati; dipendono dalla scarsa organizzazione del laboratorio e scarsa attenzione degli operatori. Un esempio di errore grossolano è lo scambio di campioni, l'errore di trascrizione, la cattiva conservazione del campione, l'inquinamento del reattivo ecc.. Gli errori grossolani possono essere identificati.

2) Errori sistematici: anche gli errori sistematici possono essere identificati ed eliminati; essi si verificano per tutta una serie di determinazioni, e l'errore viene sempre ripetuto nelle varie determinazioni.

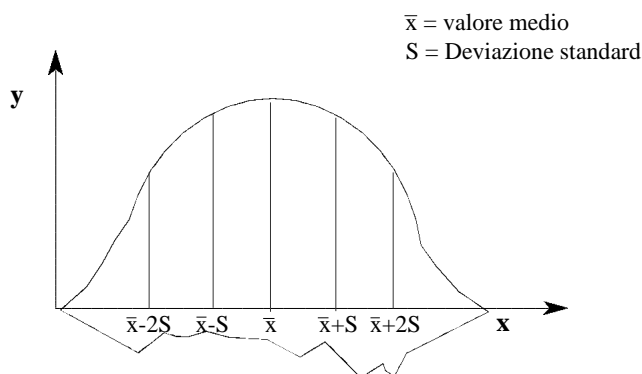
Un errore sistematico può essere la staratura della vetreria, uno standard mal ricostituito, un apparecchio di lettura non efficiente (lampada non allineata), reattivi scaduti o poco sensibili ecc..

3) Gli errori casuali sono i più numerosi. Come dice la stessa parola si verificano in modo casuale, sono piccoli errori che determinano le differenze in dosaggi ripetuti su uno stesso campione; gli errori casuali si identificano con la imprecisione, vengono rilevati dal calcolo della deviazione standard e sono monitorizzati da una curva di tipo "Gaussiano" (Figura 34).

Gli errori casuali possono verificarsi anche se l'operatore lavora in condizioni ottimali, prestando molta attenzione e ripetendo più volte il dosaggio su di uno stesso campione.

Oltre gli errori descritti esistono degli errori cosiddetti Preanalitici che vengono compiuti al di fuori del laboratorio e, per questo motivo, sono difficilmente controllabili e talvolta identificabili. Negli errori preanalitici si considerano tre tipi di errore fondamentali:

- a) Scambio del prelievo;
- b) Prelievo effettuato in modo errato;



**Figura 34. Rappresentazione schematica della distribuzione degli errori casuali.**



c) Conservazione del campione fino al momento della ricezione dello stesso laboratorio.

Più volte si è accennato a possibili errori preanalitici insistendo su molti accorgimenti da usare al fine di evitare l'emolisi del sangue, l'inquinamento dell'urina ecc... Perché allora un dato di laboratorio sia attendibile è assolutamente necessario approntare e realizzare un discorso di Controllo di Qualità tendente ad eliminare gli errori commessi (almeno in gran parte) e a dare risposte quanto più "Vere" sui vari dosaggi eseguiti. La realizzazione di un controllo di qualità è sempre di tipo statistico e si effettua in due direzioni:

a) All'interno del laboratorio puntando soprattutto sull'accuratezza e precisione del metodo ed in tali casi si parla di controllo di qualità intralaboratorio;

b) Tra più laboratori per verificare non solo l'attendibilità dei risultati a parità di metodo tra i vari laboratori che aderiscono al controllo, ma anche, oltre all'efficienza del laboratorio che partecipa al controllo, a verificare per differenze di metodi, quello che meglio risponde, che cioè si avvicina al valore "Vero". Inoltre il controllo di qualità interlaboratorio è un formidabile stimolo a migliorarsi, avvicinandosi sempre più al dato "Vero".

I laboratori che aderiscono ai controlli di qualità interlaboratorio ricevono sieri di controllo cosiddetti "Ciechi" i cui valori non sono conosciuti.

### **Controllo di qualità intralaboratorio**

Innanzitutto per realizzare un controllo di qualità intralaboratorio o controllo continuo di qualità è importante controllare gli apparecchi di misura, la vetreria, in particolar modo la taratura delle pipette, la scadenza dei reattivi ecc..

Occorre insomma evitare nel modo più assoluto di incorrere in errori grossolani e sistematici. Il controllo continuo di qualità si rivolge principalmente alla precisione del metodo e viene effettuato considerando più analiti possibili ogni giorno. Abbiamo già detto che l'imprecisione di un metodo viene rilevata dalla deviazione standard; con il calcolo di essa si hanno informazioni sul limite di affidamento del metodo e sul coefficiente di variazione.

Per controllare la deviazione standard si può ripetere per più giorni consecutivi la determinazione analitica sullo stesso campione che può essere un siero di controllo a concentrazione nota (si può così stabilire anche l'accuratezza oltre alla precisione). Al posto del siero di controllo che comporterebbe costi elevati, si può usare un pool di sieri ottenuto da soggetti sani e giovani per un controllo normale o da pazienti con indici alterati per un controllo patologico. Il pool di sieri non deve essere positivo all'HB, Ag e HIV e non deve contenere sieri emolizzati o lipemici. Si appronta un matraccio che viene tenuto in congelatore (-25 gradi) ed ogni giorno si aggiungono i sieri fino ad avere 500 ml.

Dopo aver scongelato il pool di sieri e determinato l'antigene Australia, ed eseguito il test all'HIV si procede alla centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti per allontanare eventuali filamenti di fibrina. Per aumentare la concentrazione di alcune sostanze si possono aggiungere quantità di tali sostanze, e, dopo aver suddiviso il pool così trattato in aliquote le si congela usandole giorno per giorno per il controllo di Precisione.

Il dosaggio viene ripetuto sul campione 30-40 volte ed i valori ottenuti si distribuiranno attorno ad un valore medio ponendo attenzione a che si realizzi una curva di tipo gaussiano. Figura 35.

Si calcola il valore medio dei risultati e la deviazione standard:

$$s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

In questa gaussiana si rileva che la distribuzione è buona anche se vi è una interferenza da fattori casuali (errori casuali).

Tanto più è impreciso il metodo tanto maggiore sarà la deviazione standard. Il limite accettabile di imprecisione viene considerato nell'ambito del doppio di deviazione standard (2s). Non è possibile considerare 1s di deviazione standard come limite accettabile di controllo perché si potrebbe avere un buon terzo di valori che fuoriescono dalla deviazione standard (1s).

Né d'altra parte è utile considerare come limite il 3s perché si avrebbero il 99,7% dei valori compresi in tale intervallo.

Ecco perché viene considerato come limite accettabile il 2s e sulla base di questo dato si è potuto asserire che la sensibilità di un metodo corrisponde al doppio della deviazione standard, considerando in questo limite gli errori casuali sempre inevitabili

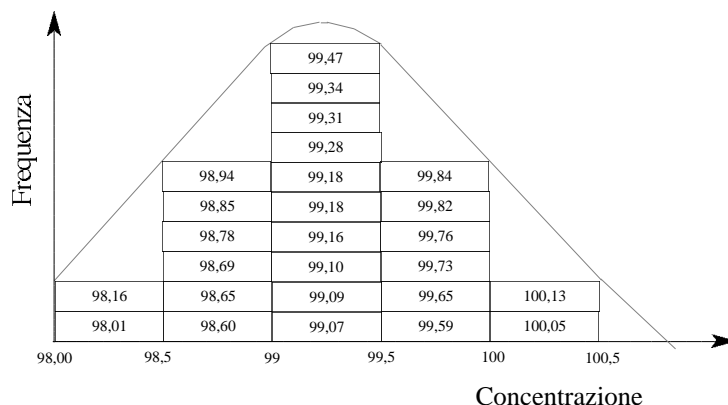
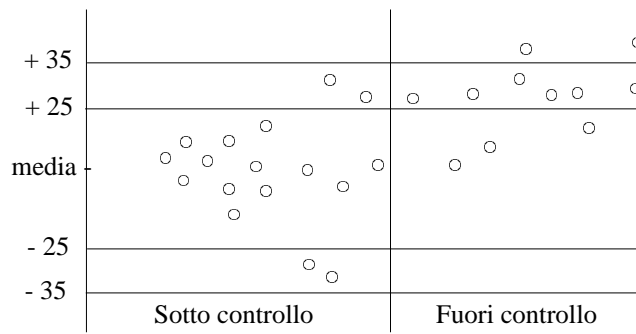


Figura 35.

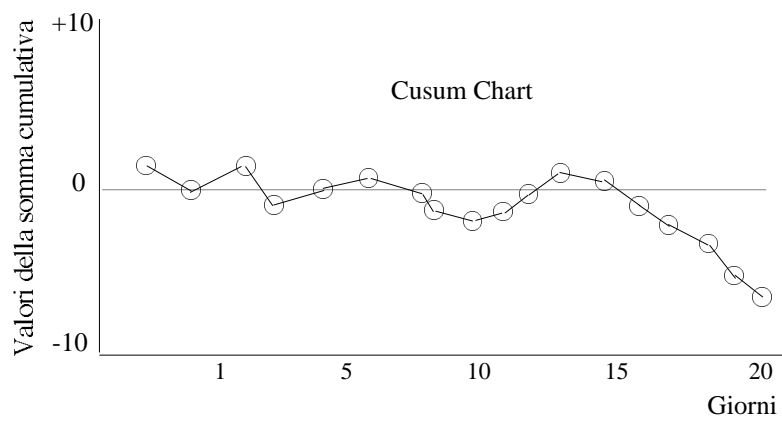
e definendo questo limite di allarme o *limite fiduciario*. Il limite di allarme che corrisponde al  $2s$  e che indica la “Fiducia” nel metodo si contrappone al cosiddetto limite di azione definito dal  $3s$  che denuncia già errori non più di tipo casuale

Nella rappresentazione della carta fuori controllo si nota che i valori non solo si allontanano dalla media ma hanno tendenza a salire uscendo anche fuori dal limite di azione. Figura 36.

Una modifica alla carta di controllo della media è la carta delle somme cumulative detta Cusum Chart dove si esegue la somma algebrica delle deviazioni positive e negative dei risultati ottenuti rispetto al valore atteso. Si avrà una linea spezzata che andrà nella zona negativa e nella zona positiva. Se l'andamento in positivo è sovrapponibile all'andamento in negativo, oscillando attorno al valore “vero” il metodo sarà sotto controllo. Su questa carta è possibile riconoscere deviazioni e avere informazioni anche in che periodo si commettono errori che portano fuori controllo (Fig. 37).



**Figura 36. Esempio di carta di controllo della media secondo Levey e Jennings.**



**figura 37. Rappresentazione schematica di una Cusum Chart.**

Giorni di misurazione	Valori misurati	Differenza x-x (media)	Quadrati delle differenze (x-x)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Data.....

Analita .....

Metodo usato.....

Valore medio  $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Deviazione standard  $S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$

Coefficiente di variazione  $CV = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}}$

**Tabella XX. Schema di scheda di controllo intralaboratorio**

## Controllo di qualità interlaboratorio

Nel controllo interlaboratorio, come già detto, il laboratorio riceve uno o più sieri di controllo "Ciechi".

Ora è noto che i dosaggi biochimici ricoprono un ampio spettro di valori che vanno dai valori normali ai valori patologici. Per questa ragione è importante fare uso di due o più controlli allo scopo di garantire che il controllo di qualità sia omogeneamente esteso su tutto l'intervallo di valori che si intende misurare. Così come per il controllo continuo di qualità intralaboratorio, anche per il controllo interlaboratorio si può visualizzare graficamente, cioè con una carta di controllo, l'andamento e l'affidabilità di un metodo. I risultati vengono visualizzati sul cosiddetto diagramma di Youden; su questa carta di controllo si riportano i risultati di due sieri di controllo, uno a concentrazione normale N ed uno a concentrazione patologica P. Tutti i laboratori inviano i loro risultati per i due controlli; la media di questi risultati viene utilizzata per tracciare il diagramma di Youden.

Spesso alcuni laboratori possono risultare inaffidabili per cui si preferisce costruire il diagramma di controllo intralaboratorio

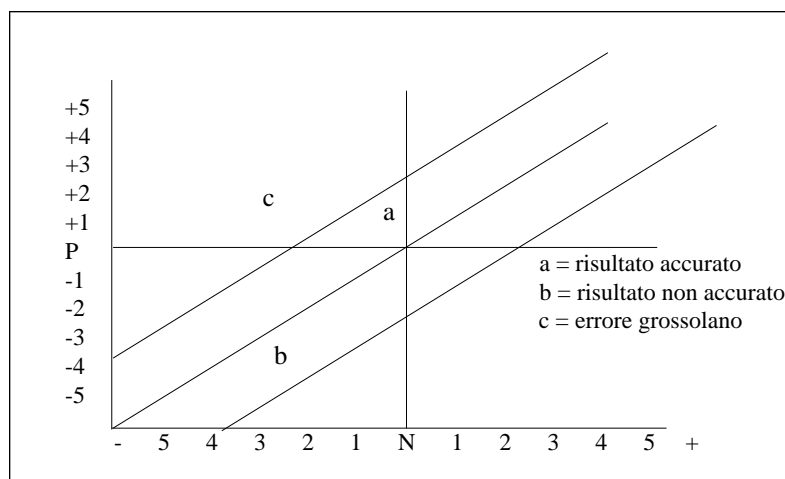
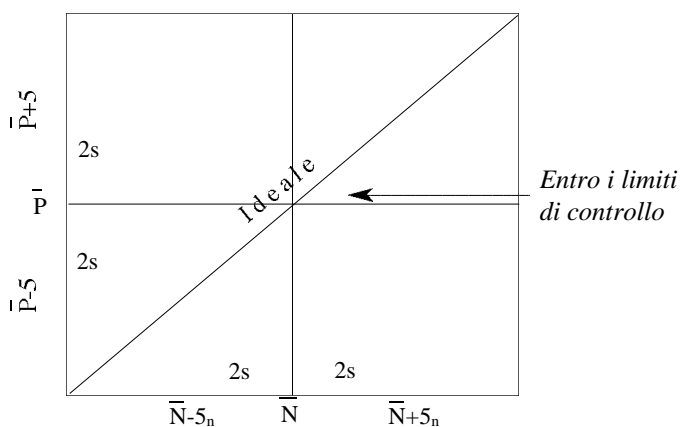


figura 38. Diagramma di Youden..

considerando alcuni laboratori di riferimento naturalmente molto affidabili. Per costruire il diagramma di Youden si considera un sistema di assi cartesiani. Sulle ascisse ed esattamente al centro si pone il valore medio del controllo normale e a sinistra e destra di questo valore si pongono i valori  $1s$ ,  $2s$ ,  $3s$ ,  $4s$ ,  $5s$ . Lo stesso procedimento si effettua per il controllo patologico che viene sistemato sulle ordinate. Si tirano dall'asse delle ascisse e da quello delle ordinate due linee mediane che si incroceranno in un punto intorno al quale si disegna un cerchio che corrisponde nel suo raggio alla zona compresa da  $2s$ , sempre che risultati elaborati abbiano considerato tutti i valori compresi in  $2S$ .

Si traccia per il centro del cerchio una linea inclinata di  $45$  gradi e due linee tangenti al cerchio e parallele alla linea centrale. L'interno del cerchio indica che il controllo è valido mentre l'esterno dà informazioni sulla non validità del controllo. Se dalle ordinate e dalle ascisse tiriamo due linee corrispondenti a due risultati analitici o alle loro deviazioni standard queste due linee si incontreranno in un punto che, se cade nell'interno del cerchio, indica che i due dosaggi sono sotto controllo. Il contrario si ha se il punto va fuori dal cerchio (Figura 39).



**Figura 39. Rappresentazione linearizzata del diagramma di Youden..**

E' bene precisare che sia nel controllo intralaboratorio che in quello interlaboratorio, al di là della preoccupazione di approntare carte di controllo per mantenere "sotto osservazione" il metodo usato, è indispensabile disporre di sieri a diversi livelli di concentrazione della sostanza da esaminare. L'ideale sarebbe di poter utilizzare sieri con concentrazione di analiti di almeno tre livelli di cui uno con valori fisiologici, uno con valori compresi nel "bordeline" cioè tra valori nettamente fisiologici e valori patologici, ed un altro con valori nettamente patologici. I motivi per i quali si ravvisa la necessità di utilizzare, nel controllo statistico delle qualità, sieri con concentrazioni di sostanze a vario livello, derivano soprattutto dal fatto che in fotometria, non tutte le sostanze, perlomeno oltre determinati limiti, riescono a seguire la legge di Lambert e Beer, secondo la quale la luce assorbita da uno strato di soluzione è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza in essa disciolta.

Ogni analita, ad una determinata lunghezza d'onda, ha un range di linearità specifico che deve essere ricercato e precisato al momento dell'adozione di un metodo mediante l'impiego di soluzioni standard o di sieri artificiali a titolo noto.

Successivamente, nell'applicazione routinaria occorre verificare il range di linearità della reazione i cui limiti possono essere modificati ogni giorno per vari motivi quali il cattivo funzionamento degli apparecchi, le alterazioni delle caratteristiche dei reattivi e degli standards e gli errori operativi.

Ecco perché è allora preferibile usare almeno due sieri di controllo a due diversi livelli, uno normale ed uno patologico; si è visto che, anche se non in modo proporzionale, l'entità degli errori casuali varia al variare della concentrazione degli analiti contenuti nel campione. Oltretutto gli stessi fattori che possono modificare il range di linearità di una reazione biochimica possono anche condizionare il corretto allestimento di una curva di taratura con standard di riferimento o con sieri artificiali a titolo noto.

Quindi anche nelle determinazioni in cui si usano curve di taratura sarebbe auspicabile l'uso di sieri di controllo a tre livelli, proprio per verificare se in tutti i punti della curva dose-risposta di bassa, media e alta concentrazione dell'analita, si ottengono risultati contenuti entro i limiti di affidabilità del metodo. Se questo avviene la curva può essere utilizzata per valutare la concentrazione dei campioni; in caso contrario è doveroso non



considerare la curva ma ripeterla cercando di individuare gli errori commessi. L'utilizzazione dei sieri di controllo a vari livelli, raccomandabile in tutte le analisi di chimica clinica è indispensabile nel controllo di qualità dei metodi di determinazione dell'attività biologica degli enzimi. Per gli enzimi infatti sorge l'esigenza di controllare, oltre i fattori già descritti, anche quelli legati al rapporto enzima-substrati nell'ambiente di reazione. Occorre ricordare che la velocità delle reazioni enzimatiche dipende direttamente dalla concentrazione e dall'integrità dell'enzima, quando il composto (substrato) che deve subire la trasformazione è in largo eccesso.

In queste condizioni la velocità di reazione enzimatica si mantiene lineare e dipende esclusivamente dalla concentrazione dell'enzima. Il metodo delle determinazioni delle attività enzimatiche in condizioni di eccesso di substrato è attualmente la metodica più diffusa perché consente di seguire la reazione al fotometro e con attrezzature automatiche. Pertanto in queste determinazioni occorre prefissare la concentrazione dell'enzima, del substrato ed i tempi di lettura in modo tale che il substrato sia sempre in eccesso rispetto all'enzima per l'intera durata della reazione enzimatica che viene seguita al fotometro,.

Si tenga presente, comunque, che quando si lavora in eccesso di substrato, la cinetica di reazione dell'enzima può essere alterata da un effetto di inibizione esercitato dallo stesso substrato. Comunque un effetto di inibizione del substrato può aversi per variazioni del pH e della temperatura, che possono, singolarmente o insieme, determinare l'inattivazione e la denaturazione dell'enzima oppure l'attivazione del processo di reazione.

In conclusione per garantire l'attendibilità dei risultati occorre utilizzare di norma soluzioni standards (primari) o sieri di controllo artificiali (standards secondari) come riferimento, e sieri di controllo del commercio dosati con metodi specifici e non dosati, o pools di sieri con concentrazioni di analita di vario livello per il controllo statistico dei procedimenti analitici.

A conclusione di questo discorso sul controllo di qualità è utile sottolineare, analizzandolo brevemente, il concetto sui valori normali di un dosaggio. Per valore normale viene intesa la quantità di sostanza presente a livello biologico; per cui il soggetto che non ha spostamenti nella concentrazione di quella sostanza sarebbe clinicamente sano o apparentemente sano rispetto a quella

sostanza. Questo non è del tutto valido perché lo stato di apparentemente sano non esclude che stia insorgendo un processo morboso. In ogni caso per valori normali si intende il valore che più frequentemente si riscontra in una popolazione per quella sostanza, considerando comunque i soggetti testati per quella sostanza apparentemente sani. Naturalmente in un discorso del genere non potremo mai avere un dato assoluto ma considerare un range di variabilità di valori normali (cioè un minimo ed un massimo). Per prassi si considerano il 95% dei risultati ottenuti in una popolazione sana e l'intervallo in cui sono compresi questi valori si definisce Range di Normalità. Il calcolo del range di normalità è molto difficile perché molte sostanze biologiche risentono di numerosissimi fattori quali l'età, il sesso, il tipo di alimentazione, lo stress ecc... Per cui un range di normalità stabilito per es. per la Sicilia non è detto che abbia lo stesso valore per la Campania ed ancora un range di normalità in una città campana può essere dissimile da quello di un centro più piccolo. Per stabilire i valori normali in una popolazione si considera un certo numero di persone (non meno di 300) che verranno testate per quella sostanza. I valori ottenuti vengono riportati su assi cartesiani; se questi si distribuiranno secondo una gaussiana avranno cioè una distribuzione "normale", cioè saranno distribuiti in maniera tale da avvicinare equamente alla media, allora il range di normalità sarà dato dalla media più o meno il doppio di deviazione standard (Figura 40).

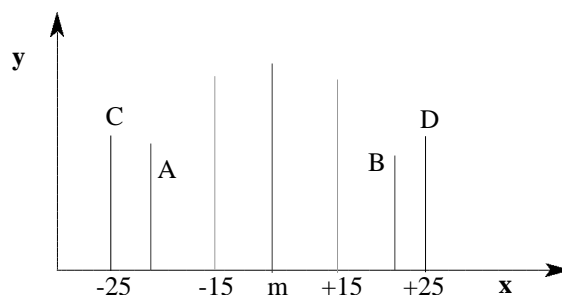
Vediamo un esempio:

$$AB = Da - 1s \text{ a } +1s \text{ ——— } 80\% \text{ dei valori trovati}$$

ma già nel  $-2s$  e  $+2s$

$$CD = Da - 2s \text{ a } +2s \text{ ——— } 98\% \text{ dei valori trovati}$$

Per avere maggiore sicurezza sarebbe meglio escludere i valori che pur insistendo nel  $2s$  danno una zona grigia di valori limite che dovrebbero essere scartati per cui si considera solo l'80% dei valori. Nel caso non si dovesse avere una gaussiana, i calcoli statistici sarebbero molto complessi. In ogni caso l'uso del termine valore normale va rivisto perché da troppa incertezza mentre indubbiamente più attendibile è l'uso del termine Valore di Riferimento o Intervallo di Riferimento.

**Figura 40.**

Con l'introduzione di questo termine si considera non più il dato ottenuto a sé stante ma considerato in base all'età, al sesso, al gruppo etnico, alla classe sociale, alla dieta ecc..

Il valore di riferimento si riferisce dunque ad una popolazione che ha certe caratteristiche e che è stata testata in particolari condizioni (modalità di prelievo).

I valori di riferimento così determinati dovrebbero essere segnalati sulle risposte perché costituiscono una traccia unica ed attendibile cui il Medico può riferirsi.

Nel ricordare che la ripetizione di un dosaggio di un'analisi dovrebbe essere effettuata dallo stesso laboratorio, occorre che al momento del prelievo si attingano il maggior numero di informazioni su eventuali terapie in atto, eventuale stato di gravidanza, e quant'altro può essere utile per evitare notevoli interferenze nei dosaggi.

Negli esempi di risposta che il centro fornisce, di seguito riportati, si è seguito il criterio di creare dei veri e propri profili di valori di riferimento indicando anche, là dove necessario, alcune condizioni di variabilità possibile nel caso di assunzione di sostanze quali ad esempio gli anticoncezionali.

E' pur vero che un simile comportamento produce, in caso di richiesta di più esami, numerosi fogli-risposta, ma, tale svantaggio, ripaga certamente in termini di maggiore chiarezza per il medico.

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

---

Paziente : CONTROLLO 6 Inviato da:  
 Data di Nascita : // Data prelievo: 11/07/92  
 Identificazione : 0711006 Data referto: 11/07/92  
 Note: 2 MESE DI GRAVIDANZA

---

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
TOXOPLASMA IgG	67.8	IU/ml	
TOXOPLASMA IgM	NEGATIVO		
ROSOLIA IgG	89.0	IU/ml	
ROSOLIA IGM	NEGATIVO		
C M V IgG	POSITIVO		
C M V IgM	NEGATIVO		
HERPES 1 IgM	NEGATIVO		
HERPERS 2 IgM	NEGATIVO		
HERPES 1 IgM	NEGATIVO	mIU/ml	

IgG	IgM	INTERPRETAZIONE
Negativo	Negativo	Soggetto Recettivo
< 500 IU/ml	Negativo	" Immune
> 500 IU/ml	Positivo	" Infetto (Infezione in atto)

---

Il Responsabile

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)  
LABORATORIO ANALISI CLINICHE  
Primario: Dott. A. PAGANO  
SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

---

Paziente : CONTROLLO 7 Inviato da:  
Data di Nascita : // Data prelievo: 11/07/92  
Identificazione : 0711007 Data referto: 11/07/92  
Note: SOMMINISTRAZIONE ENDOVENA 400 MICROG. TRH

---

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
ORMONE TIREOSTIMOLANTE	5.34	µUI/ml	0.46 - 4;98
TSH 30'	12.3	µUI/ml	
TSH 60'	9.83	µUI/ml	
TSH 90'	7.87	µUI/ml	
TSH 120'	7.43	µUI/ml	

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

Paziente : CONTROLLO 5 Inviato da:  
 Data di Nascita : // Data prelievo: 11/07/92  
 Identificazione : 0711005 Data referto: 11/07/92  
 Note: 4 MESE DI GRAVIDANZA

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
BETA HCG	54000	mUI/ml	

Periodo Gravidanza	HCG Sierica (mUI/ml).
1 <sup>a</sup> Settimana →	10 - 50
2 <sup>a</sup> Settimana →	30 - 300
3 <sup>a</sup> Settimana →	100 - 2.000
4 <sup>a</sup> Settimana →	500 - 10.000
2 <sup>o</sup> -3 <sup>o</sup> Mese →	10.000 - 100.000
2 <sup>a</sup> Trimestre →	5.000 - 50.000
3 <sup>a</sup> Trimestre →	3.000 - 30.000

Il Responsabile

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

---

Paziente : CONTROLLO 3 Inviato da:  
 Data di Nascita : // Data prelievo: 11/07/92  
 Identificazione : 0711003 Data referto: 11/07/92  
 Note:

---

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
CORTISOLO	343.2	nmol/l	

PRELIEVO ORE 8,15

VALORI DI RIFERIMENTO DEL CORTISOLO IN nmol/l (m/100 ml= nmol/l: 27.6)

	Ora prelievo	Intervallo siero	Intervallo urina 24/h
DONNE NORMALI	casuale	48.3 - 663	34 - 229
"	8 -9 am	218 - 876	
DONNE GRAVIDE			
II trimestre	casuale	163 - 1234	
III trimestre	"	489 - 1288	
UOMINI NORMALI	casuale	72.3 - 599	34 - 229
"	5 - 6 pm	84.1 - 331	
"	mezzanotte	27.4 - 391	
SINDR. CUSHING	9 am	819	
"	mezzanotte	783	
MORBO ADDISON	9 am	38	
"	mezzanotte	40	

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

---

Paziente	:	CONTROLLO 1	Inviato da:
Data di Nascita	:	//	Data prelievo: 11/07/92
Identificazione	:	0711001	Data referto: 11/07/92
Note:	AMENORREA		

---

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
FOLLICOLOSTIMOLANTE	5.89	mIU/ml	
ORMONE LUTEINIZZANTE	10.14	mIU/ml	
- ESTRADIOLO	237	ng/ml	
PROLATTINA	57,89	ng/ml	
PROGESTERONE	0.02	ng/ml	

VALORI DI RIFERIMENTO: SCREENING ORMONI FERTILITA'

	FSH	LH	- Estradiolo	Prolattina	Progesterone
Unità di misura	mIU/ml	mIU/ml	pg/ml	ng/ml	ng/ml
Uomini Adulti	3.0 - 15.0	0.68 - 5.0	N.D. - 44	N.D. - 15	N.D. - 0.4
Prepubertà	N.D. - 2.9				
Donne Adulte:	3.3 - 17.5			N.D. - 20	
- Fase Follicolare	3.3 - 17.5	1.3 - 5.3	60 - 200		0.1 - 1.5
- " Metà Ciclo		6.0 - 65.0	120 - 375		5.7 - 28
- " Luteinica	2.5 - 15.1	0.2 - 7.1	60 - 260		2.5 - 28
- " PostMenopausa	40.4 - 137.4	> 10	N.D. - 14		N.D. - 0.2
Contraccettivi orali		< 6.6			0.1 - 0.3
Gravidanza:					
I trimestre				7 - 31	9 - 47
II trimestre				31 - 182	17 - 146
III trimestre				84 - 232	55 - 255

---

Il Responsabile



**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

---

Paziente	:	CONTROLLO 4	Inviato da:
Data di Nascita	:	//	Data prelievo: 11/07/92
Identificazione	:	0711004	Data referto: 11/07/92
Note:	VACCINAZIONE ANTI EPATITE B		

---

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
HBsAg	NEGATIVO		
ANTICORPO ANTI - S	NEGATIVO		
ANTI - CORE IgM	NEGATIVO		
ANTI - CORE	NEGATIVO		
ANTIGENE E	NEGATIVO		
ANTICORPO ANTI -E	NEGATIVO		

Marcatori dell'Epatite (B)

I N T E R P R E T A Z I O N E

Durata ----->	Portatore sano	Incubazione	Fase Acuta			Fase Post-Acuta	Fase Post-Infettiva	
		4-12 gg.	2-12 mesi			2-16 mesi	5 mesi a anni	
			Infezione in atto			Evoluzione della malattia con sieroconversione		Stato Immune
HBsAg	R		R	R	R			
HBsAg			R	R				
Anti-HBc IgM				R	R	R	R	
Anti-HBc				R	R	R	R	R
Anti-HBs							R	R
Anti-HBe	R/NEG				R	R	R	R

LEGENDA: R = POSITIVO

---

Il Responsabile

**REGIONE CAMPANIA UNITA' SANITARIA LOCALE N.7**  
**ENTE OSPEDALIERO "M. DELLE GRAZIE" - CERRETO SANNITA (BN)**  
**LABORATORIO ANALISI CLINICHE**  
 Primario: Dott. A. PAGANO  
 SEZIONE IMMUNOMETRIA DIRETTORE: Dott. S. FERRARA

Paziente : CONTROLLO 2 Inviato da:  
 Data di Nascita : // Data prelievo: 11/07/92  
 Identificazione : 0711002 Data referto: 11/07/92  
 Note: 3 MESE DI GRAVIDANZA

E s a m e	Esito	U.M.	Valori di riferimento
ORMONE PLACENTARE	4.87	µG/ml	
ESTRIOLO PLASMATICO	12.67	ng/ml	
BETA HCG	13465	mUI/ml	
ESTRIOLO URINARIO	143	mg/24h	

**MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA**

Settimana Gravidanza	HPL Val. Med.± DS	Estriolo Plas. Val. Med.± DS	Estriolo Urin. Val. Med.± DS	-HCG Sierica
1				10-50
2				30-300
3				100-2.000
4				500-10.000
7-10	0.16 ± 0.11			10.000-100.000
11-14	0.68 ± 0.46			
15-18	1.23 ± 0.43			5.000-50.000
19-21	1.92 ± 0.53	26.5 ± 10.0	fino a 5	
	22-24	2.95 ± 0.75	68.1 ± 18.9	8.3 ± 6.6
25-30	5.23 ± 1.50	83.3 ± 30.7	15.1 ± 6.1	
31-33	5.91 ± 1.71	91.4 ± 38.9	17.1 ± 8.4	3.000-30.000
34-36	6.45 ± 1.92	161.0 ± 85.3	20.0 ± 8.4	
37-39	7.88 ± 2.60	212.0 ± 113.0		
40-42	7.12 ± 2.79	213.0 ± 109.0	36.8 ± 17.6	

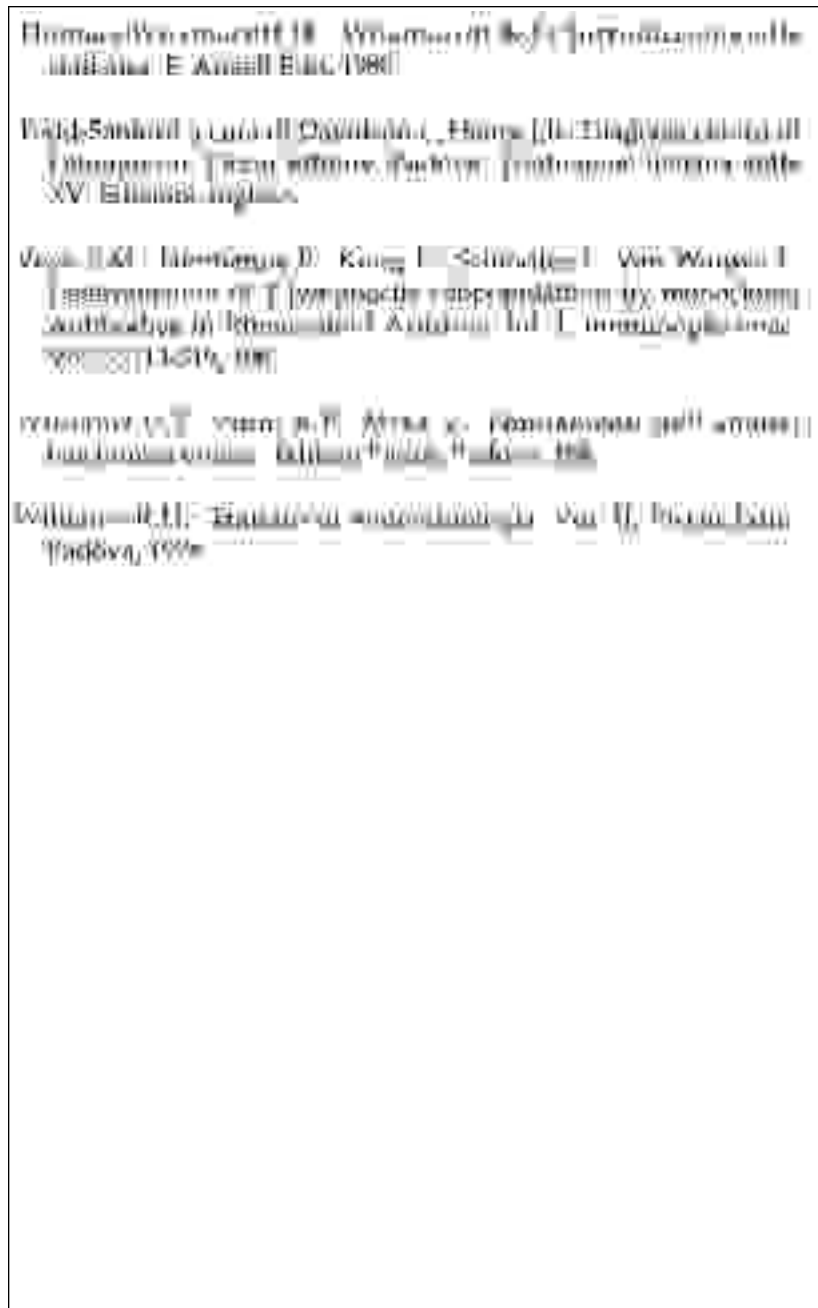
Il Responsabile

## Indice

Radiometria.....	pag. 3
Concetto di radioattività-unità di misura.....	» 3
Concetto di isotopo. I radioisotopi.....	» 4
I contatori Beta e Gamma.....	» 5
I componenti di un saggio RIA (Radio Immuno Assay)....	» 10
Gli standards.....	» 19
Il tracciante o marcato radioattivo.....	» 34
I metodi di separazione.....	» 35
I campioni dei dosaggi RIA.....	» 38
Problemi comuni in corso di dosaggio RIA.....	» 39
Procedure di dosaggio.....	» 45
Altro esempio di risultati e di curve.....	» 48
Metodi immunoenzimatici.....	» 50
Principio di competizione.....	» 54
Principio "Sandwich".....	» 56
Controllo di qualità.....	» 60
Sensibilità .....	» 60
Specificità.....	» 60
Accuratezza.....	» 61
Controllo di qualità intralaboratorio.....	» 65
Controllo di qualità interlaboratorio.....	» 70
Indice.....	» 83



- Ishikawa E., Kawai T., Miyai K.: Dosaggi immunoenzimatici. Piccin. Padova, 1986.
- Katzner K., Lanjor et al.: Specificity and sensitivity of RIA and EIA in detecting anti HBs antibodies. *Auztl. Lab.* 29, 1983.
- Mancini, Carbonara A.O., Hermans J.F.: Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2, 235, 1965.
- Mazzarella C., Baldi A.: Schemi di laboratorio. Tecniche e diagnostica. Ed. Medica Salernitana. III Ediz.
- Müller Ferdinand: Stato attuale della diagnostica immunologica. *La ricerca, Suppl.* 2, 59, 1980.
- Nakamuro R.M.: Fluorescent immunoassay. *Clinical immunochemistry*, 1984.
- Olli H. Herman: Diagnostica delle malattie virali. *La ricerca*, 69, 1981.
- Ouo T., Kitaguchik et al.: Serum constituents analysis effect of duration and temperature of stora of clotted blood. *Chim. Chem.* 27, 35, 198..
- Pensabeni L., Maselli E. et al.: Il controllo di qualità in radioimmunologia: verifica statistica della precisione. *Pandora Anno 3, N.2*, 1992.
- Romano L., Marseglia S.: IRMA. Guida al dosaggio immunoradiometrico RADIM, 1988.
- Rondanelli, Gerna: Virus. Farmitalia, Kallestad.
- Shafrits D.A., Liebermann H.M. et al.: Monoclonal RIA hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5675, 1982.
- Soini E., Hemmila L.: Fluoroimmunoassay; present status and key problems. *Clin. Chem.* 25, 353, 1979.





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 dell'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 morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimimmunologico ed 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. Caffero 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 coriogonadotropina 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 neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M., Biorci L., Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.



65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D. *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T. *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M. *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Maggio '92.
72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Giugno '92.

## Caleidoscopio

*Rivista mensile di Medicina*

anno xx, numero xx



### Direttore Responsabile

Sergio Rassu  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
☎ Tel.-Fax 079 270464

### Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



### Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

### Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

### Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno  
Giuseppe Gambetta



Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

☎ Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 809737- 802257.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola, Caleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed.,- Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

### Stampa

ATA-Azienda Tipografi Associati  
Via G. Torti, 32 C Rosso  
16143 Genova - ☎ Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa no 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: xxx 199x  
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:

Associata all'USPI  
Unione Stampa Periodica Italiana

"L'ECO DELLA  
STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 -  
Milano



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.