

Influenza del tracciamento «ad occhio» della curva di taratura nei dosaggi radioimmunologici

FRANCO TAGGI(*) e ONOFRIO LOSTIA

Laboratori di Chimica

Riassunto. — Il tracciamento «ad occhio» della curva di taratura introduce una variazione non controllabile sui risultati in un dosaggio radioimmunologico. La stima di questa variabilità è stata effettuata esaminando i risultati ricavati da sette operatori su dati prefissati (relativi al dosaggio di insulina umana), per curve tracciate sia nello spazio dose-risposta (B/B_0 vs. Dose) che nello spazio trasformato linearizzante logit-log.

I risultati degli operatori presentano una dispersione attorno alla loro media (per medie $> 15 \mu\text{U/ml}$) con coefficiente di variazione relativamente costante nei due spazi (4-8 %). Questa variabilità aumenta per risultati ricavati nello spazio logit-log su curve di taratura non sufficientemente lineari.

Le medie delle concentrazioni ricavate dagli operatori nello spazio logit-log sono mediamente superiori del 5 % delle corrispondenti dello spazio dose-risposta, per dosi superiori a $50 \mu\text{U/ml}$. Anche in questo caso la differenza aumenta all'aumentare della non-linearità della curva di taratura e raggiunge valori intorno al 10 %.

La variabilità studiata non sembra influire nello studio dinamico della dose, mentre appare chiara la sua importanza nella valutazione del singolo risultato.

Summary (*Influence of the «by eye» plotting of the standard curve on a radioimmunoassay*). — The «by eye» plotting of the standard curve introduces a random variation on the results in a radioimmunoassay.

The evaluation of this variability was carried out from the results obtained by seven operators on prefixed data (relative to a human insulin assay) for curves traced either in dose-response space (B/B_0 vs. Dose) or in logit-log space.

The results obtained by the operators show a scattering around their mean (for means $> 15 \mu\text{U/ml}$) with a fairly constant variation coefficient in the two spaces (4-8 %).

(*) Borsaista dei Laboratori di Chimica.

This variability is increased by results obtained in logit-log space for insufficiently linear standard curves.

The means of the concentrations obtained by the operators in logit-log space are averagely 5 % higher than the corresponding ones in dose-response space for doses $> 50 \mu\text{U/ml}$.

This observed difference increases with the increasing of non-linearity of the standard curve and reaches values around 10 %.

This variability does not seem to affect the dynamic study of the dose, while it's importance in evaluating the single result is evident.

INTRODUZIONE

Nei dosaggi radioimmunologici la stima delle concentrazioni incognite si effettua utilizzando opportuni segnali relativi ai campioni in esame ed una curva di taratura che rende conto di come varia la grandezza misurata al variare della concentrazione dell'antigene non marcato presente nel sistema di reazione (LOSTIA, 1973).

A parità di segnale la concentrazione risultante dipenderà perciò dall'andamento della curva di taratura. In generale, se non viene utilizzato un procedimento matematico, si avrà sul risultato una variazione dipendente esclusivamente da come l'operatore ha tracciato la sua curva, variazione che andrà ad aggiungersi a quelle che già influenzano il risultato stesso. Da più parti è stata posta in luce la necessità di automatizzare in questi dosaggi le operazioni di calcolo, sia per risparmio di tempo che per una maggiore affidabilità dei risultati. A questo scopo sono stati messi a punto diversi programmi di elaborazione che automatizzano l'intero procedimento di calcolo delle concentrazioni, compresa la determinazione della curva di taratura (ARRIGUCCI *et al.*, 1972; BURGER *et al.*, 1972; COSTANTINI *et al.*, 1974; DUDDLESON *et al.*, 1972; RODBARD & COOPER, 1970; [RODBARD & LEWALD, 1970; ROLLERI *et al.*, 1973; VIVIAN & LABELLA, 1971; WILSON *et al.*, 1971).

Una realistica alternativa ai grossi computers impiegati nei lavori succitati appare l'uso di microcomputers, la cui presenza nel laboratorio di analisi è per il momento limitata, ma per i quali sono stati già realizzati numerosi programmi.

Dunque, l'uso corrente per ricavare le concentrazioni dei campioni incogniti è ancora quello di tracciare « ad occhio » la curva di taratura e questo sia per la difficoltà dei più ad accedere ad un centro di calcolo opportunamente attrezzato, sia per la complessità d'utilizzo dei programmi da parte dei non specialisti.

Poiché la situazione non sembra destinata a modificarsi sostanzialmente a breve termine, appare di interesse valutare l'ordine di grandezza della

variazione introdotta dall'operatore sulla concentrazione stimata, in modo da poterne tenere debito conto nella fase di utilizzazione dei risultati del dosaggio, in particolar modo quando questi debbano venire esaminati singolarmente e non come insiemi di valori tra loro dipendenti (curve di stimolazione).

Lo studio descritto nel seguito è stato effettuato al fine di valutare indicativamente questa influenza.

MATERIALI E METODI

Nei dosaggi radioimmunologici per il tracciamento della curva di taratura possono essere utilizzati diversi tipi di rappresentazione che riportano su un asse una misura della concentrazione ed in corrispondenza sull'altro asse il valore del segnale o una sua trasformata.

Tra le possibili abbiamo scelto le due che, in base ad un esame della letteratura, sono risultate le più diffuse e rappresentative.

La prima rappresentazione utilizza come variabile indipendente la concentrazione di antigene non marcato e come segnale il rapporto B_1/B_0 , dove B_1 rappresenta la frazione di radioattività legata all'anticorpo in presenza di una generica quantità di antigene non marcato e B_0 la frazione legata quando la concentrazione di quest'ultimo è uguale a zero. Nel seguito ci riferiremo a questa rappresentazione indicandola per brevità come « spazio dose-risposta ». La seconda rappresentazione, che utilizza invece come variabile indipendente il logaritmo della concentrazione di antigene non marcato e come segnale il logaritmo della quantità $(B_1/B_0)/(1 - B_1/B_0)$, viene comunemente indicata come trasformazione logit-log e fu introdotta con l'intento di linearizzare l'andamento della curva di taratura (RODBARD *et al.*, 1968), che nello spazio dose-risposta presenta caratteristiche non-lineari di tipo iperbolico decrescente. Indicheremo nel seguito questa rappresentazione come « spazio logit-log ».

Nella prova sono stati utilizzati i dati di tre esperienze eseguite nel nostro reparto di radiochimica, relative al dosaggio radioimmunologico di insulina umana. Le tre esperienze sono state scelte in base al diverso grado di linearizzazione delle rispettive curve di taratura nello spazio logit-log. Una misura di tale linearizzazione può ricavarsi dall'esame congiunto del coefficiente di correlazione r e dell'errore standard SE della regressione.

L'esperienza indicata nel codice interno del laboratorio come n. 8 è stata classificata « buona » ($r = -0.997$; $SE = 0.129$); la n. 13 « normale » ($r = -0.990$; $SE = 0.306$); la n. 10, sensibilmente non-lineare, « sigmoideale » ($r = -0.983$; $SE = 0.408$).

Per ognuna di queste esperienze sette operatori (due chimici, due fisici e tre tecnici di laboratorio) hanno ricevuto i dati necessari per il tracciamento della curva di taratura (concentrazioni di antigeni standard utilizzate e rapporti di competizione medi B_i/B_0 corrispondenti (*)).

Agli operatori è stato inoltre fornito per ogni esperienza un certo numero di rapporti di competizione $\{B_i/B_0\}$, da cui ricavare tramite la curva già tracciata le concentrazioni corrispondenti. L'insieme $\{B_i/B_0\}$ è stato costruito in maniera da esplorare ogni curva nel suo complesso. Agli operatori è stato anche chiesto di utilizzare per i loro tracciati una scala prestabilita, in modo da uniformare l'approssimazione grafica e da poter effettuare un immediato confronto delle varie curve tracciate. Le concentrazioni ricavate dagli operatori ed altri dati di interesse sono stati elaborati tramite calcolatore con programmi in FORTRAN IV appositamente preparati (v. Appendice).

L'impostazione generale ora mostrata permette di isolare, tra le molte variabili che influenzano i risultati di un dosaggio, quella di nostro interesse, in quanto nella variabilità delle concentrazioni così ricavate interviene soltanto il diverso modo di tracciare la curva di taratura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella Fig. 1 sono riportate sovrapposte le curve tracciate dai diversi operatori negli spazi dose-risposta e logit-log. Risulta evidente dall'esame delle curve la diversa interpretazione data da ogni operatore ai punti sperimentali. In particolare, nell'esp. 13 il punto di ascissa $72\mu\text{U/ml}$ è stato considerato aberrante da un operatore, per cui la curva così tracciata sottostima sistematicamente nell'intervallo $30-150\mu\text{U/ml}$.

Un'idea della variabilità dei risultati dei vari operatori può ricavarsi in parte dalla Fig. 2 che mostra un esempio di uscita del programma CON-TRACCIA, relativo all'esp. 13 (spazio dose-risposta), e in termini più completi dalla Fig. 3 dove sono riportati i « range » delle determinazioni per tutte le prove. I risultati ricavati nello spazio logit-log sembrano soggetti ad una maggiore variazione che non i corrispondenti dello spazio dose-risposta, in particolare alle alte dosi.

(*) Nell'esp. n° 10 sono stati forniti per il tracciamento della curva di taratura un numero doppio di dati rispetto alle altre due esperienze esaminate; alcuni risultati ad essa relativi non sono quindi direttamente confrontabili con i corrispondenti della n° 8 e n° 13. Di questo è stato tenuto conto nella fase di interpretazione dei risultati. Abbiamo preferito perdere alcune informazioni, piuttosto che rinunciare ad utilizzare per la prova i dati completi di un'esperienza realmente eseguita.

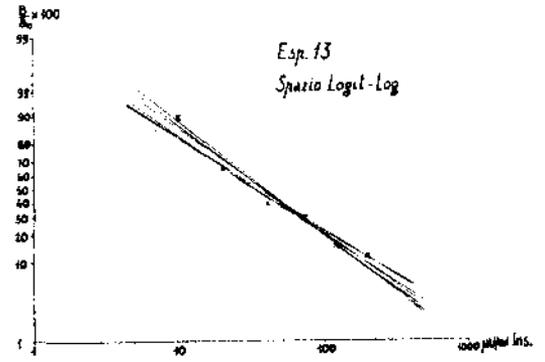
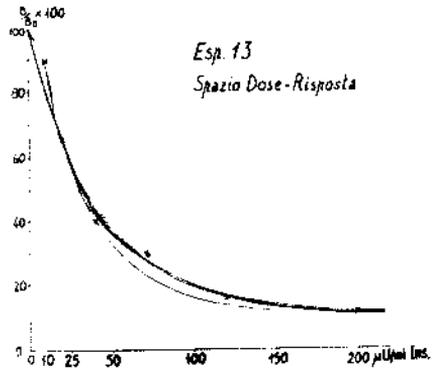
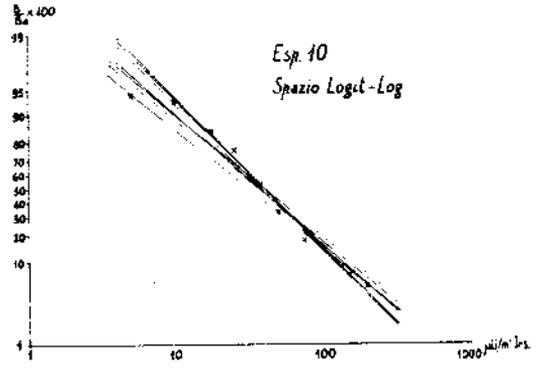
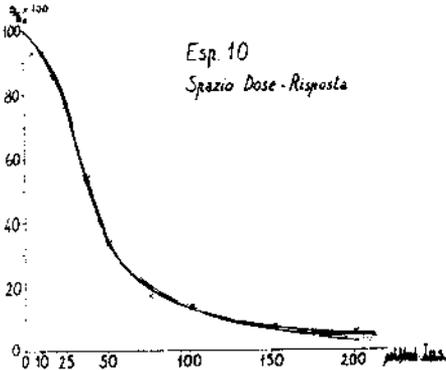
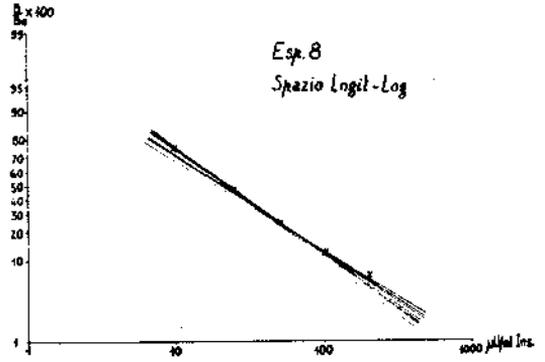
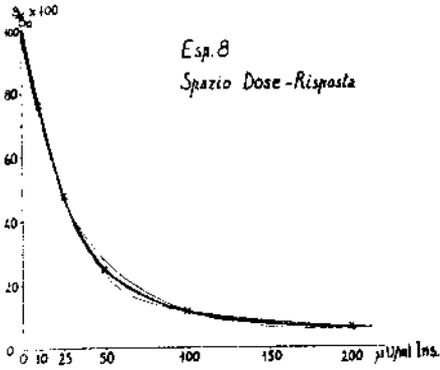


Fig. 1. — Curve tracciate dai diversi operatori nello spazio dose-risposta e nello spazio logit-log.

INSULINA *** 14-7-72 *** ESPERIENZA NO. 13 ***** [SPAZIO DOSE-RISPOSTA]

RAPPORTI DI COMPETIZIONE

DOSI RICAVATE DAI DIVERSI OPERATORI

| | OP.1 | OP.2 | OP.3 | OP.4 | OP.5 | OP.6 | OP.7 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 86.70 | 6.70 | 6.00 | 7.00 | 7.20 | 11.00 | 11.00 | 10.10 |
| 81.70 | 9.50 | 9.00 | 9.00 | 10.20 | 13.00 | 13.00 | 12.00 |
| 80.90 | 9.80 | 10.00 | 9.50 | 10.80 | 13.00 | 13.50 | 12.00 |
| 67.20 | 18.60 | 19.00 | 18.00 | 20.20 | 18.00 | 19.00 | 18.00 |
| 61.50 | 23.00 | 24.00 | 22.00 | 24.60 | 22.00 | 21.50 | 21.00 |
| 54.40 | 28.80 | 31.00 | 27.50 | 31.00 | 26.00 | 26.50 | 26.00 |
| 48.70 | 34.00 | 37.00 | 33.00 | 37.00 | 31.00 | 32.00 | 32.00 |
| 41.60 | 43.00 | 47.00 | 41.00 | 45.80 | 40.00 | 42.00 | 40.00 |
| 32.90 | 58.30 | 63.00 | 56.00 | 59.00 | 53.00 | 59.00 | 57.00 |
| 23.70 | 81.50 | 85.00 | 84.00 | 81.00 | 74.00 | 85.00 | 83.00 |
| 18.80 | 100.00 | 103.00 | 108.00 | 103.00 | 82.00 | 109.00 | 103.00 |
| 16.40 | 114.00 | 116.00 | 124.00 | 120.00 | 100.00 | 120.00 | 119.00 |
| 11.70 | 189.00 | 170.00 | 185.00 | 195.00 | 175.00 | 165.00 | 190.00 |

INSULINA *** 14-7-72 *** ESPERIENZA NO. 13 ***** (SPAZIO DOSE-RISPOSTA)

| HC | MED | VAR | SD | S/F/S | SE | V/M | SD/M | XMIN | XMAX | RANGE | RAN/M | RAN/FS | GAMMA |
|-------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| 86.70 | 6.43 | 4.74 | 2.18 | 1.09 | 2.01 | 58.27 | 25.84 | 6.00 | 11.00 | 5.00 | 59.32 | 2.50 | 148.31 |
| 81.70 | 10.81 | 3.27 | 1.81 | 0.90 | 1.67 | 30.28 | 16.73 | 9.00 | 13.00 | 4.00 | 36.99 | 2.00 | 73.98 |
| 80.90 | 11.23 | 2.60 | 1.61 | 0.81 | 1.49 | 23.18 | 14.37 | 9.50 | 13.50 | 4.00 | 35.62 | 2.00 | 71.25 |
| 67.20 | 18.69 | 0.65 | 0.81 | 0.40 | 0.75 | 3.49 | 4.32 | 18.00 | 20.20 | 2.20 | 11.77 | 1.10 | 12.95 |
| 61.50 | 22.61 | 1.91 | 1.38 | 0.69 | 1.28 | 8.44 | 6.11 | 21.00 | 24.80 | 3.80 | 16.80 | 1.90 | 31.93 |
| 54.40 | 28.11 | 4.84 | 2.20 | 1.10 | 2.03 | 17.22 | 7.83 | 26.00 | 31.00 | 5.00 | 17.78 | 2.50 | 44.46 |
| 48.70 | 33.71 | 9.90 | 2.43 | 1.71 | 2.25 | 17.51 | 7.21 | 31.00 | 37.00 | 6.00 | 17.80 | 3.00 | 53.39 |
| 41.60 | 42.69 | 7.69 | 2.77 | 1.39 | 2.56 | 18.07 | 6.50 | 40.00 | 47.00 | 7.00 | 16.40 | 3.50 | 57.40 |
| 32.90 | 57.90 | 9.50 | 3.08 | 1.54 | 2.85 | 16.41 | 5.32 | 53.00 | 63.00 | 10.00 | 17.27 | 5.00 | 86.36 |
| 23.70 | 81.93 | 14.70 | 3.63 | 1.92 | 3.55 | 17.95 | 4.68 | 74.00 | 85.00 | 11.00 | 13.43 | 5.50 | 73.84 |
| 18.80 | 101.14 | 81.14 | 9.01 | 4.50 | 6.33 | 80.23 | 8.91 | 82.00 | 109.00 | 27.00 | 26.69 | 13.50 | 360.38 |
| 16.40 | 119.00 | 137.00 | 11.70 | 5.85 | 10.87 | 115.13 | 9.84 | 100.00 | 139.00 | 39.00 | 32.77 | 19.50 | 639.08 |
| 11.70 | 181.29 | 128.24 | 11.32 | 5.66 | 10.47 | 70.74 | 6.25 | 165.00 | 195.00 | 30.00 | 16.55 | 15.00 | 248.23 |

Fig. 2. — Esempio di « output » del programma CONTRACCIA. Accanto ai rapporti di competizione proposti sono riportate in alto le concentrazioni ricavate in corrispondenza dagli operatori e nella parte sottostante della figura una serie di parametri per lo studio dei risultati. Le sigle dei parametri utilizzati nel presente lavoro sono: MED = media aritmetica delle concentrazioni ricavate; SD = deviazione standard; SD/M = coefficiente di variazione; XMIN = concentrazione minima ricavata; XMAX = massima concentrazione ricavata; RANGE = « range » delle concentrazioni.

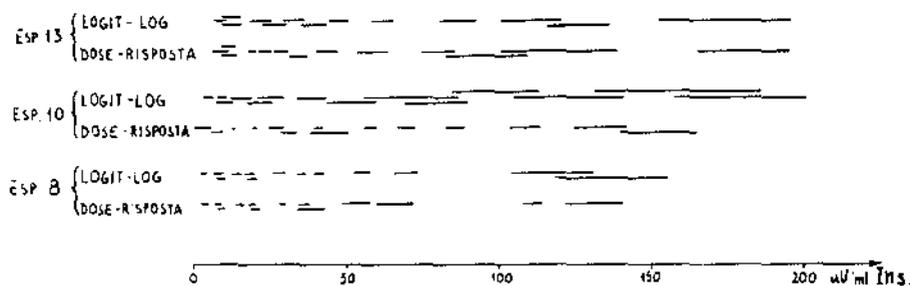


Fig. 3. — Insieme dei « range » (valore massimo - valore minimo) delle concentrazioni ricavate dagli operatori. Per maggiore chiarezza, i « range » in parte sovrappontisi sono stati sfalsati nel disegno.

La Fig. 4 riporta l'andamento del coefficiente di variazione (CV) delle varie determinazioni verso le medie delle concentrazioni ricavate dagli operatori, sia nello spazio dose-risposta che nello spazio logit-log.

Confrontando ogni coefficiente di variazione del primo spazio con il corrispondente del secondo è possibile utilizzare il test dei segni per valutare se esiste una sistematicità nelle differenze osservate tra i coefficienti di variazione nei due spazi. Il test applicato non mostra significatività per le esperienze 8 e 13 (si ha rispettivamente $P < 0.50$ e $P < 0.62$), mentre le differenze osservate appaiono altamente significative per la 10 ($P \ll 0.01$). Una conferma di quanto emerso in precedenza si ricava dal test *t* di Student per dati appaiati, eseguito sulle corrispondenti deviazioni standard delle determinazioni degli operatori nei due spazi, che porta alle stesse conclusioni del test dei segni per i coefficienti di variazione (esp. 8: $P < 0.25$; esp. 13: $P < 0.70$ esp. 10: $P \ll 0.01$).

Considerando in prima approssimazione casuali le fluttuazioni del CV per dosi maggiori di $15 \mu\text{U/ml}$ (per valori inferiori a questa quantità il CV tende a crescere molto rapidamente e perde in gran parte il suo significato) possono essere valutati dei coefficienti di variazione medi (CVM): questi valori, riportati in Tab. 1, sembrano indicare una maggiore stabilità dei risultati ricavati nello spazio dose-risposta: si osservi il sensibile aumento del CVM per l'esp. 10 nel passaggio dallo spazio dose-risposta a quello logit-log. Tutto questo mette in luce come al diminuire del grado di linearizzazione della curva di taratura diventi sempre più rischioso servirsi della rappresentazione logit-log per ricavare « ad occhio » le dosi incognite. La Tab. 2 riporta alcuni risultati di un'analisi per regressione di diversi gruppi di dati esaminati.

L'accordo tra le medie dei valori ricavati dagli operatori nello spazio logit-log e i valori calcolati adattando nello stesso spazio ai punti sperimen-

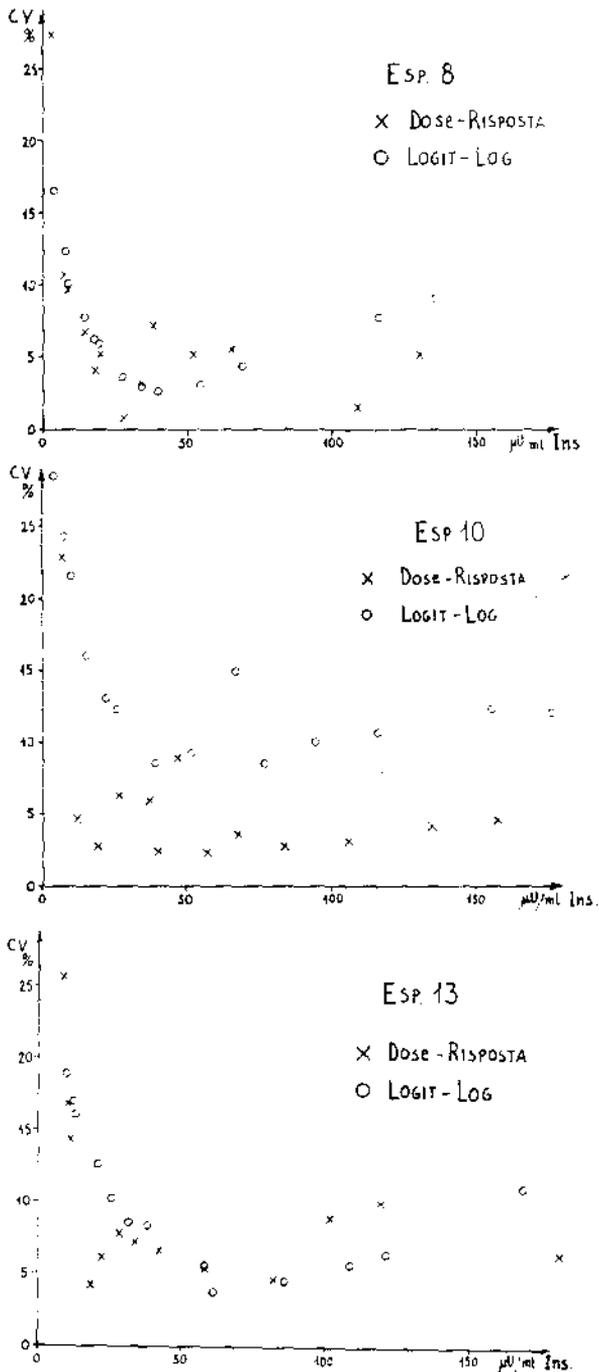


Fig. 4. — Andamento del coefficiente di variazione delle concentrazioni rievate dagli operatori verso la media delle concentrazioni stesse.

tali l'equazione di una retta col criterio dei minimi quadrati, risulta molto buono. Meno soddisfacente è il confronto tra le medie dei valori degli operatori nello spazio dose-risposta e i valori calcolati mediante un polinomio di 4° grado, i cui coefficienti sono stati determinati applicando il criterio dei minimi quadrati nello stesso spazio. L'esame dei dati rivela in questo caso che il disaccordo si verifica esclusivamente alle alte concentrazioni ($> 100 \mu\text{U/ml}$). Il confronto tra le medie degli operatori nello spazio logit-log e nello spazio dose-risposta mostra una soddisfacente linearità.

L'esame dei dati mette tuttavia in luce una tendenza dei valori ricavati nello spazio logit-log a superare i corrispondenti dello spazio dose-risposta alle medie-alte concentrazioni ($> 50 \mu\text{U/ml}$), con la sola eccezione di una coppia di valori dell'esp. 13, dove la relazione si inverte sensibilmente. Questa impressione è pienamente confermata dal test dei segni che, applicato alle coppie di medie corrispondenti che differiscano tra loro di almeno $1 \mu\text{U/ml}$, porta ai seguenti valori di rischio: esp. 8: $P \ll 0.01$; esp. 10: $P < 0.19$; esp. 13: $P \sim 0.01$.

Il valore non critico trovato per l'esp. 10 ($P < 0.19$) deriva dal fatto che, essendo in questo caso sigmoidale la curva di taratura nello spazio logit-log, gli operatori in questo spazio sottostimano in media alle basse concentrazioni e soprastimano alle alte; di qui la mancanza di sistematicità rilevata dal test dei segni, che deve però interpretarsi come somma di due sistematicità opposte che si eliminano tra loro agli effetti del test. Si può quindi concludere che per concentrazioni superiori a circa $50 \mu\text{U/ml}$ i valori determinati « ad occhio » nello spazio logit-log tendono realmente (in media) ad essere sistematicamente superiori a quelli ricavati nello spazio dose-risposta.

TABELLA 1

Valori assunti dal coefficiente di variazione medio CVM (media dei coefficienti di variazione relativi a concentrazioni medie superiori a $15 \mu\text{U/ml}$) nello spazio dose-risposta (DR) e in quello logit-log (LL) per le tre esperienze esaminate

| Esperienza \ Spazio | DR | LL |
|---------------------|-----|------|
| 8 | 4.5 | 5.1 |
| 10 | 5.2 | 11.6 |
| 13 | 6.7 | 7.7 |

Una stima di questa differenza può ricavarsi dall'esame delle differenze percentuali $\left(\frac{\text{media logit-log} - \text{media dose-risposta}}{\text{media dose-risposta}} \right) \times 100$, per le coppie di valori considerate in precedenza.

TABELLA 2

Analisi per regressione di alcuni gruppi di dati di interesse (medie degli operatori nello spazio dose-risposta e logit-log; valori delle concentrazioni calcolati tramite computer nello spazio dose-risposta con polinomio di 4° grado e nello spazio logit-log con regressione lineare non pesata).

Per ogni esperienza sono riportati i seguenti parametri: a = intercetta; b = pendenza; s_b = errore standard della pendenza; SE = errore standard della regressione; r = coefficiente di correlazione.

| MEDIE OPERATORI (spazio logit-log) vs. LOGIT COMPUTER | | | |
|-------------------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | Esperienza 8 | Esperienza 10 | Esperienza 13 |
| a | 0.31 | - 0.49 | - 1.98 |
| b | 0.97 | 1.01 | 1.02 |
| s_b | 0.001 | 0.005 | 0.010 |
| SE | 0.13 | 1.01 | 1.61 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

| MEDIE OPERATORI (spazio dose-risposta) vs. POLINOMIO COMPUTER | | | |
|---------------------------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | Esperienza 8 | Esperienza 10 | Esperienza 13 |
| a | - 3.68 | 4.21 | - 3.16 |
| b | 1.14 | 0.90 | 1.10 |
| s_b | 0.042 | 0.056 | 0.112 |
| SE | 5.06 | 10.64 | 17.34 |
| r | 0.993 | 0.977 | 0.948 |

| MEDIE OPERATORI (logit-log) vs. MEDIE OPERATORI (dose-risposta) | | | |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | Esperienza 8 | Esperienza 10 | Esperienza 13 |
| a | - 0.69 | - 3.99 | 4.60 |
| b | 1.05 | 1.15 | 0.95 |
| s_b | 0.007 | 0.019 | 0.023 |
| SE | 1.07 | 3.26 | 4.13 |
| r | 1.000 | 0.998 | 0.997 |

Questo tipo di analisi indica che tale differenza sistematica è valutabile mediamente intorno al 5 % per esperienze tipo la 8 o la 13, che rispondono sufficientemente alla trasformazione logit-log, e può raggiungere valori intorno al 10 % in esperienze con curve di taratura scarsamente linearizzabili, come la 10. La Tab. 3 riporta i risultati del test dei segni, effettuato in ogni esperienza rispetto alle medie delle determinazioni degli operatori.

Si osservi che due degli operatori in un caso sottostimano e in un altro soprastimano significativamente rispetto alle medie. Nell'ipotesi che tali medie siano un riferimento rappresentativo, segue che la variabilità introdotta dall'operatore può essere anche di tipo casuale, oltre che sistematico. Non sembra quindi ragionevole sperare di poterla in qualche modo sottrarre sulla base di un certo numero di esperienze precedenti.

Per valutare indicativamente l'influenza della variabilità studiata su un andamento dinamico (curva di stimolazione) sono stati utilizzati parte dei risultati ricavati dagli operatori, scegliendo valori medi di dose quali quelli che possono presentarsi in una curva di carico orale da glucosio. Le curve così ottenute sono riportate in Fig. 5. Dall'esame di questi andamenti non sembra che la variabilità introdotta dall'operatore influisca in maniera sensibile nello studio dinamico della risposta alla stimolazione.

CONCLUSIONI

Alla luce dell'analisi dei dati raccolti si può concludere che il tracciamento « ad occhio » della curva di taratura introduce una variabilità non controllabile sul risultato finale del dosaggio, della quale il coefficiente di variazione medio CVM in precedenza introdotto può fornire una stima.

Dai valori osservati del CVM e dall'esame dei risultati degli operatori si può inferire che le dosi ricavate dai diversi operatori potranno differire tra loro fino a 15-25 %, sia per risultati ricavati attraverso tracciamento della curva di taratura nello spazio dose-risposta che in quello logit-log. Questa variabilità sembra aumentare molto rapidamente sino a valori intorno al 45 % per risultati ricavati nello spazio logit-log su curve di taratura sensibilmente non-lineari, come rilevato nell'esp. 10.

I risultati ricavati nello spazio logit-log risultano in media superiori del 5 % di quelli ricavati nello spazio dose-risposta, per concentrazioni maggiori di 50 μ U/ml. Tale differenza si accentua e raggiunge valori in media intorno al 10 % nel caso di curve non sufficientemente linearizzabili, il cui andamento porta, d'altro canto, a sottostimare le basse dosi. La variabilità tra operatori tuttavia non sembra influenzare sensibilmente l'andamento dinamico della risposta ad una stimolazione.

TABELLA 3

Test dei segni applicato ai risultati di ogni operatore rispetto alla media delle determinazioni

Accanto al livello di significatività è indicato se l'operatore ha soprastimato (+) o sottostimato (—) rispetto alla media (n. s. sta per « non significativo »)

| | Operatore 1 | Operatore 2 | Operatore 3 | Operatore 4 | Operatore 5 | Operatore 6 | Operatore 7 |
|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Esperienza 8 (dose-risposta) | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | $P < 0.01$ + | n. s. | n. s. |
| Esperienza 8 (logit-log) | $P < 0.05$ + | n. s. | $P < 0.01$ + | $P < 0.01$ + | n. s. | n. s. | n. s. |
| Esperienza 10 (dose-risposta) | n. s. | n. s. | $P < 0.05$ + | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| Esperienza 10 (logit-log) | n. s. | $P < 0.01$ — | n. s. |
| Esperienza 13 (dose-risposta) | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | $P < 0.01$ — | n. s. | n. s. |
| Esperienza 13 (logit-log) | $P < 0.05$ — | n. s. | $P < 0.05$ + | $P < 0.01$ + | n. s. | $P < 0.01$ — | $P < 0.01$ — |

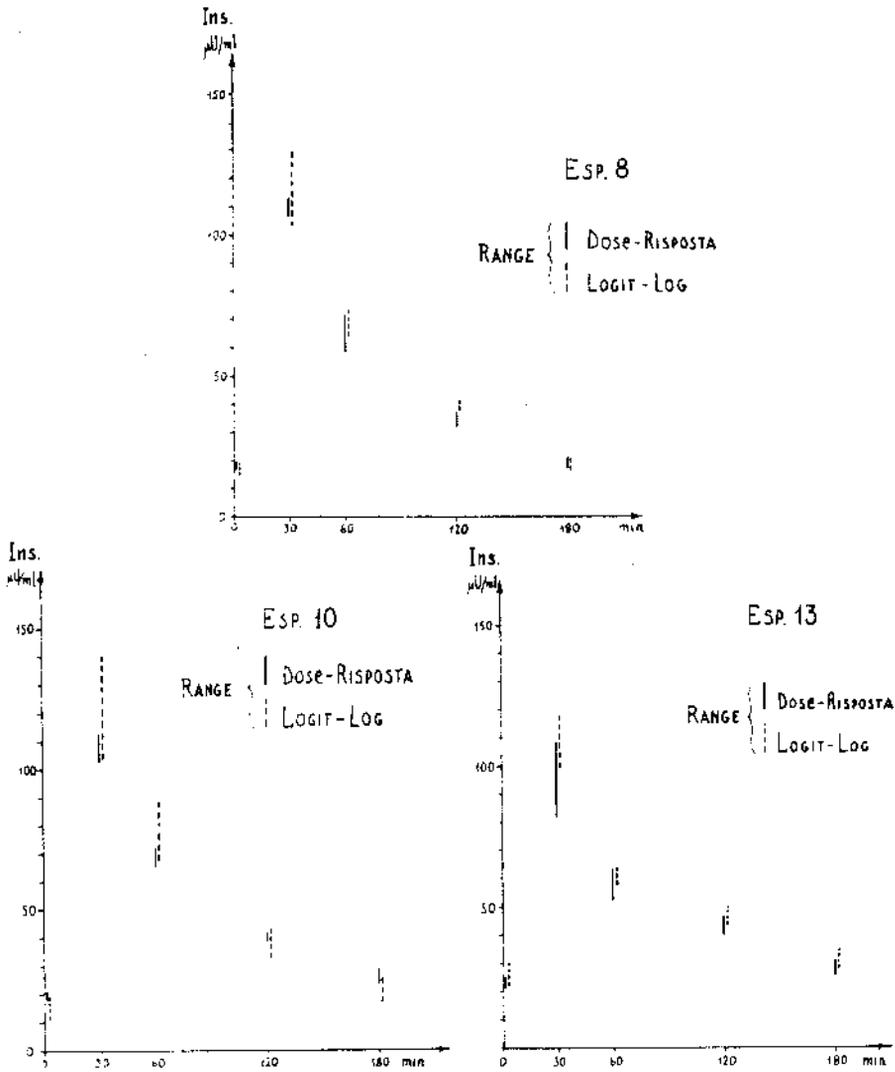


Fig. 5. — Andamenti sotto carico simulati utilizzando parte dei risultati degli operatori. Nella figura sono stati riportati i « range » delle concentrazioni ricavate nello spazio logit-log e nello spazio dose-risposta.

Appare raccomandabile, in particolar modo quando in sede clinica debbano essere utilizzati valori singoli e non curve di stimolazione, servirsi di procedure matematiche per il calcolo delle concentrazioni incognite.

Se questo non fosse possibile per mancanza di un idoneo sistema per l'elaborazione automatica dei dati, è consigliabile ricavare le dosi direttamente nello spazio dose-risposta (B_i/B_0 vs. dose), essendo i risultati ivi ottenuti dall'operatore meno influenzati dalla posizione relativa dei punti della curva di taratura che non quelli ricavati tramite la rappresentazione logit-log.

APPENDICE.

Programma CONTRACCIA. Questo programma analizza l'insieme delle concentrazioni ricavate dagli operatori, calcolando in corrispondenza di ogni gruppo di dati una serie di parametri di interesse (media, varianza, deviazione standard, errore standard della media, coefficiente di variazione, valore massimo e minimo, range, ecc.). Il programma esegue anche altri controlli non riportati nel presente lavoro. CONTRACCIA fa uso delle SDU (subroutines di utilità) MEVAS, MORDIN, MAXMIN (TAGGI, 1974 a) e LOGIT (TAGGI, 1974 b). La lista di CONTRACCIA è riportata alla fine della presente appendice (Fig. 6).

Programma REGRI. Questo programma esegue l'analisi completa delle regressioni di interesse. REGRI fa uso delle SDU RET3 e CORE (TAGGI, 1974 b).

Programma TSD. Questo programma è stato realizzato per l'esecuzione del test t di Student per dati appaiati sulle deviazioni standard delle determinazioni degli operatori nello spazio dose-risposta e logit-log.

TSD fa uso della SDU TITEST (TAGGI, 1974 a).

Programma LOGITFIT. Questo programma determina i parametri della retta di regressione nello spazio logit-log e i coefficienti del polinomio di 4° grado nello spazio dose-risposta; calcola, inoltre, le dosi corrispondenti ai rapporti di competizione utilizzati dagli operatori per ricavare le concentrazioni incognite.

LOGITFIT è stato costruito con i moduli matematico-statistici di base del programma SATAN (TAGGI, 1974 c) e fa uso delle SDU LOGIT, MULRE, SELNO ed INVERT (TAGGI, 1974 b).

Gli AA. desiderano ringraziare il Prof. C. Rossi per i consigli riguardanti l'impostazione generale del lavoro; S. Colimegno, A. Costantini, E. Maroccia, G. Persichelli e D. Zorretta per aver partecipato alla prova; il Prof. G. Farchi che ha messo a disposizione l'elaboratore IBM 7040 dei Laboratori di Fisica per l'analisi dei dati; l'operatore B. Giuli per la cortese assistenza durante la messa a punto dei programmi.

Le esperienze di insulina utilizzate nella prova sono state eseguite dai Sigg. E. Maroccia e D. Zorretta.

```

DIMENSION X(20,20),K(20),TITLE(16),SERV(10),TITPUN(1,2)201
DIMENSION UNIT(4),KOD(1)201,KODUS(2)
DIMENSION PUNTI(20)
DIMENSION KLGT(20),VLGT(20),OML(20)
DIMENSION XLAV(20,10)
DIMENSION OP(10)
DATA OP(1),OP(2),OP(3),OP(4),OP(5),OP(6),OP(7)
+SH OP.1,SH OP.2,SH OP.3,SH OP.4,SH OP.5,SH OP.6,SH OP.7
1 READ(5,100) TITLE
100 FORMAT(16A5)
READ(5,700) TITPUN
READ(5,700) UNIT
+30 FORMAT(4A5)
READ(5,101) KRAP,KOP,XPOSCA
101 FORMAT(19,F10.2)
+EAD(5,101) TR(1),1=1,KRAP)
DO 33 J=1,KOP
33 READ(5,102) (XIJ,J),J=1,KRAP)
102 FORMAT(10F5.1)
READ(5,105) A,B
105 FORMAT(2F)0.4)
DO 41 I=1,KRAP
41 KODIN(I)=1
CALL WORDIN(KRAP,A,KODIN,3,2,KODUS,0,IRANA)
DO 77 J=1,KRAP
KA=KODUS(I)
DO 77 J=1,KOP
OML(J)=0
PUNTI(J)=0
77 XLAV(I,J)=KIRK(J)
DO 37 J=1,KOP
37 X(I,J)=XLAV(I,J)
DO 137 J=1,KRAP
137 R(I)=Z(I)
CALL LOGIT(I,KRAP,R,VLGT)
WRITE(6,900) TITLE
WRITE(6,290)
290 FORMAT(10H,25H RAPPORTI DI COMPETIZIONE,13X,
+14H OSSI RICAVATE DA1 DIVERSI OPERATORI,77)
WRITE(6,301) (OPSK),K=1,KOP)
301 FORMAT(10H,3X,10C2K,45)
DO 31 I=1,KRAP
31 WRITE(6,300) R(I), (X(I,J),J=1,KOP)
300 FORMAT(10H,10X,F7.2,20X,10P7.2)
409 FORMAT(10H,10F7.2)
FAP=FLQAT(KOP)
FAP+FLQAT(KOP)
WRITE(6,800) TITLE
WRITE(6,300)
800 FORMAT(10H,10X,10A5,77)
300 FORMAT(10H,12H RAPPORTO DI,10X,10M MEDIA DEI,10X,10M RANGE DEI,
+10X,9H RAPPORTO,10X,9H RAPPORTO,7,44H COMPETIZIONE,9X,
+10H RISULTATI,10H,10H RISULTATI,10X,12H RANGE/MEDIA,2X,
+10H RANGE/FONDI SCALA,7,9H (B/101,10X,9A5,2X,
+4A5,2H,11H PERCENTO),7,11H PERCENTO),10X,5H RANGE,9X,5H GAMA,77)
DO 21 I=1,KRAP
KLGT(I)=VLGT(I)-A1/B
KLGT(I)=EMPIKLGT(I)
+EFAN=0.
DO 23 J=1,KOP
23 XMEAN=XMEAN+X(I,J)
XMEAN=XMEAN/FKOP
DO 27 J=1,KOP
27 SERV(J)=R(I,J)
CALL MAXMIN(KOP, SERV, XMAX, XMIN)
CALL MEVASIO(KOP, SERV, 95, CA, VA, SDA, SEAI)
SUN=100, +SDA/SPOSCA
DO 83 JOP=1,KOP
OML(JOP)=OML(JOP)+ISEXV(JOP)-KLGT(I)++2
83 PUNTI(JOP)=PUNTI(JOP)+I*SERV(JOP)-KA)++2
+SUM=100, +VA/KA
CLFYA=100, +SDA/KA
RANGE=XMAX-XMIN
SQOMA=XI/RANGE/XMEAN+100.
+ASUP=1/RANGE/SPOSCA+100.
GAMA=SQOMASASUFO
346 FORMAT(10H,9X,2HC,4K,3MED,9X,3HVAR,9X,2HSD,5X,4HS/FS,0X,
+3HSE,4X,3HFS,5X,
+4HSD/MS,4HVAR/MS,4HVAR/KA,4HSD/KA,5H RANGE,3H,5HVAR/MS,2X,4HVAR/FS,1X,
+5HGAMA)
WRITE(6,345) R(I),CA,VA,SDA,SUN,SEAI,SUM,COEVA,KNIN,XMAX,RANGE,
+SQOMASASUFO,GAMA
345 FORMAT(10H,10F10.2)
WRITE(6,345) R(I),XMEAN,MIN(XMAX, SQOMA, SASUFO, RANGE, GAMA
C 345 FORMAT(10H,10,2,13X,FT,2,5X,F7,2,7M +-----,F7,2,5X,F7,2,10X,FT,2,
C +9X,F7,2,5X,F12,1)
C 401 FORMAT(10,2,4A5)
21 CONTINUE
WRITE(6,356)
106 FORMAT(10H,777)
DO 97 I=1,KOP
XIN=SQRT(PUNTI(I)/FLOAT(KRAP-1))
XOUT=SQRT(OML(I)/FLOAT(KRAP-1))
97 WRITE(6,321) OP(I),PUNTI(I),RAB,OML(I),VLGT
321 FORMAT(10H,5X,45,015X,F12.1)
WRITE(6,900)
900 FORMAT(1H)
WRITE(6,920)
920 FORMAT(10H,25H CONFRONTO DEGLI OPERATORI)
WRITE(6,921) (OP(J),J=1,KOP)
921 FORMAT(10H,1017X,45)
DO 50 J=1,KRAP
DO 92 J=1,KOP
51 SERV(J)=R(I,J)
CALL MEVASIO(KOP, SERV, 95, CA, VA, SDA, SEAI)
+J 52 JOP=1,KOP
92 PUNTI(JOP)=PUNTI(JOP)-KA)++2
WRITE(6,923) (PUNTI(J),J=1,KOP)
923 FORMAT(10H,10F12.4)
+0 CONTINUE
WRITE(6,409) (KLGT(I),I=1,KRAP)
LU IO I
END

```

Fig. 6. — Programma CONTRACCIA. Lista delle istruzioni (linguaggio FORTRAN IV).

BIBLIOGRAFIA

- ARRIGUCCI, A., G. FORTI, G. FIORELLI, M. PAZZAGLI & M. SERIO, 1972. In: *The Endocrine Function of the Human Testis*, James, Martini & Serio, Eds, Academic Press, N. Y.
- BURGER, H. G., V. W. K. LEE & G. C. RENNIE, 1972. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 302.
- COSTANTINI, A., O. LOSTIA & F. TAGGI, 1974. RIACLIN SYSTEM: Collection, Elaboration, Presentation and Filing of RIA Data, presentato per la pubblicazione.
- DUDDLESON, W. G., A. R. MIDGLEY & G. D. NISWENDER, 1972. *Comput. Biomed. Res.* **5**, 205.
- LOSTIA, O., 1973. Il metodo radiimmunoologico: principi, modalità e trattamento dei dati, *Appunti del Corso Intern. Aggiornamento Dieta ed Arteriosclerosi*, Istituto Superiore di Sanità, Roma 1-3 nov., 1973.
- RODBARD, D. & J. A. COOPER, 1970. In: *In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine*, IAEA, Vienna, p. 659.
- RODBARD, D. & J. E. LEWALD, 1970. *Acta Endocrinol.*, **64**, suppl. 147, 79.
- RODBARD, D., P. L. RAYFORD, J. A. COOPER & G. T. ROSS, 1968. *J. Clin. Endocrinol.*, **28**, 1412.
- ROLLERI, E., P. G. NOVARIO & B. PAGLIANO, 1973. *J. Nucl. Biol. Med.*, **17**, 128.
- VIVIAN, S. R. & S. LABELLA, 1971. *J. Clin. Endocrinol.*, **33**, 225.
- WILSON, D., G. SARFATY, B. CLARRIS, M. DOUGLAS & K. CRAWSHAW, 1971. *Steroids*, **18**, 77.
- TAGGI, F., 1974 a. Programmi e sottoprogrammi di utilità per elaborazione elettronica - parte I, *Rapp. ISS, Laboratori di Chimica, RDR/74.01*.
- TAGGI, F., 1974 b. Programmi e sottoprogrammi di utilità per elaborazione elettronica - parte II, in corso di stampa.
- TAGGI, F., 1974 c. SATAN - Un programma per l'elaborazione di dati di analisi per saturazione di legame, in preparazione.