

## Significato dei dosaggi radioimmunologici come strumento di ricerca clinica (\*)

L. DONATO

*Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa*

L'aspetto che rende il dosaggio radioimmunologico particolarmente interessante per l'impiego in campo clinico è la possibilità di quantizzare le sostanze regolatrici dell'organismo e di valutare così l'efficienza dei meccanismi regolatori.

Se vogliamo tentare una collocazione in quelle che sono le tendenze della medicina moderna, potremmo dire — con un'estrapolazione però molto azzardata — che il dosaggio radioimmunologico degli ormoni, ed in generale delle sostanze regolatrici, si proietta verso la prevenzione dei danni di organo in quelle malattie che sono primitivamente dovute a danno dei meccanismi di regolazione. È chiaro che se in una malattia dovuta primariamente a disfunzione del meccanismo di regolazione possiamo svelare la tendenza verso la malattia prima che essa induca un danno a livello di un organo o tessuto, evidentemente è possibile una prevenzione; nello stesso tempo, possiamo vedere una proiezione del dosaggio radioimmunologico delle sostanze regolatrici verso la prevenzione così detta « terziaria » del danno riflesso, di natura sistemica generalizzata, che può conseguire ad un primitivo danno d'organo.

È certamente questa la prospettiva nella quale vanno oggi viste le possibilità offerteci dai dosaggi radioimmunologici. Questa visione estremamente promettente ed ottimistica va mitigata però da due ordini di fattori, uno di natura teorica, e relativo alla correttezza dei dosaggi, e l'altro relativo alla correttezza di interpretazione dei risultati attraverso l'analisi della univocità di significato di una determinata alterazione della concentrazione di un ormone rispetto ad una determinata condizione patologica.

Quando andiamo a considerare il comportamento della concentrazione plasmatica di una sostanza regolatrice dell'organismo, dobbiamo tenere presenti due elementi che condizionano in realtà il livello di questa concentrazione. Uno è dato dal meccanismo di regolazione in cui questa sostanza è inserita:

---

(\*) Testo ripreso dalla registrazione effettuata durante il Convegno.

ogni volta che un sistema di controllo di una funzione dell'organismo comporta interrelazione tra due o più fattori, è chiaro che la variazione di concentrazione di una qualunque di queste sostanze deve essere valutata sempre alla luce del comportamento dell'intero sistema regolatorio. Ad esempio, se prendiamo il sistema angiotensina-renina-aldosterone, non possiamo pretendere una univocità di comportamento tra livello reninico e grado di ipertensione, perché questo rapporto è modulato dal comportamento di altri elementi che intervengono in questo sistema regolatorio. D'altra parte, è da tenere presente che i meccanismi di controregolazione e di adattamento tendono in generale a riportare i livelli di concentrazione verso il valore ottimale medio. Di qui il fatto che molto spesso il puro e semplice livello di una sostanza non riflette la situazione di danno all'interno di un sistema di regolazione, perché quest'ultimo si è adattato al danno, aggiustando i parametri dei vari termini coinvolti in modo tale da mantenere una concentrazione che può risultare del tutto normale.

Qualora il livello delle concentrazioni basali sia non significativo per l'indicazione di un certo danno, si ricorre alla forzatura del sistema mediante stimolazione (con carico di sodio per il meccanismo angiotensina-renina-aldosterone, con carico di glucosio per il meccanismo insulinico, ecc.) e, conoscendo il meccanismo regolatorio, si interpreta la risposta. La modifica di concentrazione fornisce perciò elementi più validi di quelli che si ottengono dalla semplice concentrazione basale e consente spesso di differenziare situazioni diverse.

Indipendentemente dalla radioimmunologia e dalla endocrinologia sperimentale, il concetto di forzatura del sistema e di valutazione della risposta per una miglior stima dello stato del sistema è ben chiaro alla mente del medico, in base a procedure correnti di semeiotica funzionale.

Ma a parte questo aspetto dei meccanismi regolatori — le cui interazioni rendono non univoca l'interpretazione dei dati di concentrazione — esiste un'altra classe di fattori più propriamente di natura cinetica, i quali fanno sì che non solo i livelli di concentrazione basale, ma spesso anche le curve di risposta di concentrazione di una sostanza alla stimolazione, non abbiano quei caratteri di univocità che noi vorremmo.

Se, ad esempio, da un livello di concentrazione insulinica pretendiamo di estrapolare delle considerazioni di carattere generale sullo stato del sistema insulinico, o se da una misura di concentrazione dell'ormone di crescita (HGH) pretendiamo di trarre delle deduzioni sullo stato del sistema HGH, dobbiamo tenere sempre presente alcuni limiti. Questi diventano evidenti se pensiamo che in realtà andiamo a valutare una concentrazione in un punto di un sistema complesso, che ha una certa dimensione ed ha soprattutto come caratteristica peculiare un afflusso e deflusso di sostanze a velocità generalmente molto elevata.

Se si considera questo aspetto, la pretesa di giudicare lo stato di un sistema regolatorio mediante una determinazione di concentrazione può essere considerata equivalente a quella di un ingegnere che volesse giudicare lo stato di un bacino idraulico dal livello dell'acqua in un certo punto; tutti quanti saremmo d'accordo nel giudicare quell'ingegnere un folle, perché se non conoscesse le dimensioni del bacino e la portata del fiume, dal puro e semplice livello dell'acqua ci potrebbe dire evidentemente assai poco sullo stato del bacino. Ebbene, non trovandoci in condizioni molto diverse da queste, è chiaro che quando noi parliamo di variazioni della concentrazione dobbiamo sempre chiederci se esse riflettano una effettiva variazione della quantità di sostanza disponibile o non, ad esempio, una estensione del bacino di distribuzione della sostanza.

Supponiamo che questo non sia vero, che le dimensioni del bacino della sostanza siano cioè rimaste invariate e si possa quindi presumere che un aumento di concentrazione corrisponda ad un effettivo aumento della quantità di sostanza. Di fronte a questo aumento della quantità si è portati quasi istintivamente a ritenere che esso derivi da un aumento di secrezione della sostanza. In realtà questa analogia concettuale — alta secrezione-alta concentrazione — non esiste, o quanto meno il discorso non è così semplice. L'analogia è valida infatti soltanto a condizione che il meccanismo di deflusso sia rimasto inalterato. Se questo non è, come accade in alcune situazioni, sia l'interpretazione di una concentrazione basale che l'interpretazione di una curva da carico possono essere errate. È chiaro, ad esempio, che una curva di iper-risposta insulinemica in un diabetico si può interpretare come dovuta sia ad una esagerata secrezione insulinica, sia semplicemente ad un ritardato allontanamento dal circolo dell'insulina secreta. Ecco la non univocità del discorso.

Questo tipo di argomentazione va tenuta presente tutte le volte che si interpretano dei dosaggi radioimmunologici di ormoni. Ma come?

Non è un discorso semplice: l'interpretazione dei livelli di concentrazione di una sostanza regolatrice, basali ed in risposta ad un carico, in una determinata condizione morbosa deve presumere una certa conoscenza, per lo meno di carattere generale, di quelle che sono le alterazioni dei due fattori prima descritti: le dimensioni del bacino ed il meccanismo di allontanamento della sostanza dal sistema.

È noto ad esempio (mi riferirò a ricerche del prof. R. Navalesi) che nel diabetico il livello della somatotropina risulta spesso innalzato. Che cosa vuol dire? Per poter ritenere che questo corrisponda ad un effettivo aumento della somatotropina si deve essere sicuri di due aspetti: che le dimensioni del bacino di distribuzione della somatotropina sono rimaste invariate (infatti se si fossero ristrette si potrebbe avere una concentrazione più alta pur restando la secrezione del tutto normale) e che il meccanismo di allon-

tanamento della somatotropina non sia alterato (se si avesse nel diabetico una compromissione del catabolismo della somatotropina potrebbe verificarsi un aumento della concentrazione). Esiste un modo specifico per studiare nel diabetico il comportamento del meccanismo degradativo di una sostanza come la somatotropina. Ricerche fatte dimostrano che il meccanismo di *clearance*, cioè la velocità con cui la somatotropina che si trova in circolo viene allontanata dall'organismo, nel diabetico è invariato. Si può dire pertanto con tranquillità che le variazioni di concentrazione della somatotropina nel plasma riflettono variazioni di secrezione. Ciò non significa che per interpretare le variazioni della concentrazione somatotropinica nel diabetico si debba misurare in tutti i pazienti la *clearance* metabolica, però si deve conoscere che quella particolare situazione è associata ad un meccanismo di allontanamento di un certo tipo; acquisita questa conoscenza, si è in grado di interpretare le variazioni di concentrazione in quella condizione morbosa in modo corretto.

Un altro esempio: il ricambio dell'insulina nel diabetico. Le ricerche eseguite hanno stabilito che nel soggetto normale la velocità di allontanamento dell'insulina dal sangue è costante ed indipendente dalla concentrazione, per cui si può dire che in linea di massima — se le dimensioni del bacino insulinico rimangono invariate — tanto più alto è il livello secretorio di insulina, tanto più alta è la concentrazione plasmatica, dato che il meccanismo di allontanamento opera in modo proporzionale alla concentrazione.

Ma quando si passa da una situazione normale ad una situazione patologica, si deve essere sicuri di poter usare lo stesso criterio interpretativo. Nel diabetico questo criterio interpretativo non è più affidabile, essendo il bacino insulinico enormemente aumentato. Tessuti che normalmente accumulano poca insulina ne accumulano molta nel diabetico e quindi la concentrazione che si rileva nel sangue, anche se non differisce rispetto al normale, va sovente riferita ad un *pool* più grande. Nel diabetico inoltre l'insulina si accumula in zone da cui viene allontanata con maggior difficoltà ed utilizzata molto più lentamente; anche il meccanismo di allontanamento dell'insulina dall'organismo è quindi compromesso. La variazione della concentrazione insulinica nel diabetico deve pertanto essere valutata alla luce del fatto che l'individuo diabetico ha una estensione del bacino insulinico ed una compromissione del meccanismo di allontanamento. È chiaro quindi che la curva di iper-risposta nel diabetico può essere dovuta unicamente alla diminuita velocità di allontanamento dell'insulina secreta; contribuirà anche, più o meno, l'alterazione della componente secretiva, ma l'esistenza di questo fattore va considerata dopo che sia stato caratterizzato con metodi opportuni il meccanismo degradativo dell'insulina.

Un'altro esempio abbastanza interessante è dato dalla regolazione di sostanze vasoattive come l'angiotensina.

L'angiotensina ha un livello ematico estremamente basso perché il soggetto normale la allontana velocemente dai tessuti. Il soggetto iperteso obbedisce invece ad una regola completamente diversa: allontana l'angiotensina dal circolo con una velocità che è proporzionale, praticamente, al livello della sua pressione arteriosa e ad altri fattori. È chiaro quindi che se si pretende di interpretare la concentrazione di angiotensina (o di renina) nel soggetto normale o nell'iperteso applicando lo stesso criterio, si può commettere un sostanziale errore, perché la componente di allontanamento è profondamente diversa nelle due condizioni.

Per concludere, si possono trarre alcune indicazioni di carattere pratico: laddove il meccanismo regolatorio di un sistema è noto, almeno in gran parte, è facile per il medico interpretare la direzione delle variazioni di concentrazione delle sostanze regolatrici, ma ciò non è sufficiente ad interpretarle univocamente. Per arrivare ad una informazione univoca occorre avere dati indipendenti e di carattere generale sul comportamento del sistema dal punto di vista cinetico, in quella particolare situazione morbosa in cui il dosaggio radioimmunologico viene applicato.

Via via che si accumula questo tipo di conoscenze si è meglio in grado, evidentemente, di impiegare quello strumento potentissimo che sono i dosaggi radioimmunologici. Non tenendo presenti queste limitazioni di carattere fisiopatologico e concettuale, ma soltanto quelle di tipo tecnico-metodologico, ci si potrebbe trovare in serie difficoltà. Per il medico che si appresta ad impiegare il dosaggio radioimmunologico nella pratica clinica, è necessario quindi non soltanto acquisire le basi metodologiche del dosaggio, per valutarne criticamente difficoltà e limitazioni, ma soprattutto rendersi conto che la corretta utilizzazione di questo mezzo di indagine particolarmente potente, richiede necessariamente un'introspezione più profonda del sistema funzionale su cui sta indagando.

## Problemi di metodologia nei dosaggi radioimmunologici (\*)

U. ROSA

Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

È chiaro che avendo a che fare con una metodologia di analisi che, soprattutto in questi ultimi anni, dalla sua originale applicazione agli ormoni proteici si è estesa agli ormoni steroidei, dai farmaci agli allergeni, coprendo ormai un campo di applicazione estremamente vasto, il tentativo di unificare un discorso metodologico in questo campo è compito non lieve.

L'unica via possibile per un discorso di questo tipo è quella di individuare una matrice comune a tutti i dosaggi radioimmunologici. Questa matrice trova consistenza nella struttura stessa del metodo analitico, nelle definizioni dei parametri che controllano accuratezza e precisione, nella descrizione delle tecniche e delle vie metodologiche che oggi si stanno battendo — o che si sono battute nel passato — per portare questo tipo di metodologia ad un livello accettabile di accuratezza e di precisione analitica.

### *Il metodo radioimmunologico (RIA)*

Il RIA consiste essenzialmente nella reazione che intercorre tra la forma marcata di un antigene e un anticorpo diretto a quell'antigene; il risultato della reazione è la formazione di un complesso antigene-anticorpo.

La radioattività legata all'antigene presente nella reazione, in forma tutta libera al tempo zero, sarà ripartita all'equilibrio fra una frazione indicata con *bound* (B) e una frazione indicata con *free* (F).

Il segnale analitico, l'analogo dell'indicazione spettrofotometrica nel caso di analisi che utilizzano metodi ottici, è costituito dalla misura della radioattività legata alle due frazioni B e F, o alla radioattività legata ad una delle due e riferita alla radioattività totale (si tratta di modi diversi di esprimere lo stesso tipo di risultato).

Quando la reazione analitica avviene in presenza anche dello stesso antigene in forma nativa e non marcata, il processo può essere schematizzato come il decorso di reazioni competitive che hanno un reattivo in comune, l'anticorpo (Fig. 1).

---

(\*) Testo ripreso dalla registrazione effettuata durante il Convegno.

L'effetto della seconda reazione sulla prima sarà quello di modificare i valori del parametro di misura, cioè della distribuzione della radioattività, diminuendo la quota di antigene radioattivo che all'equilibrio si troverà in forma libera. Il parametro analitico « ripartizione della radioattività » ( $B/F$ ) è chiaramente legato alla concentrazione dell'antigene non marcato presente nel mezzo.

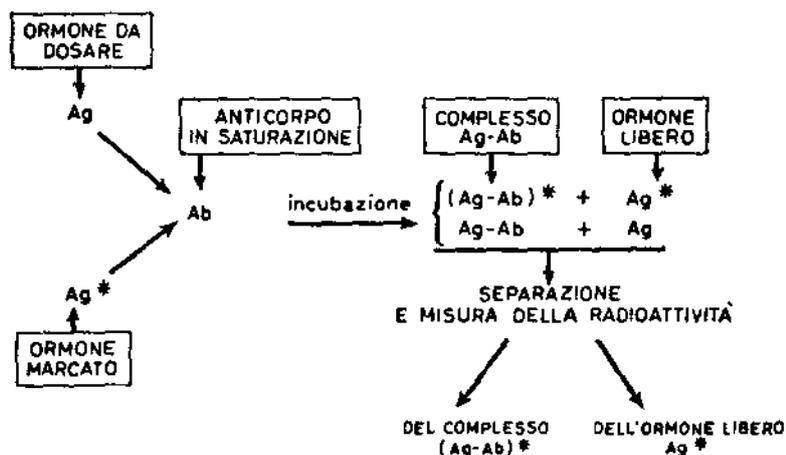


Fig. 1. — Schema dell'analisi per saturazione applicata al dosaggio radioimmunologico degli ormoni — (Da: *Ann. Ist. Super. Sanità*, 7, 208 (1971).

Va aggiunto a complemento di questa succinta descrizione (\*) che il RIA, utilizzando reazioni che non hanno risposta lineare, è per definizione un metodo nel quale si deve procedere costruendo un sistema di taratura in cui i valori del parametro analitico  $B/F$  sono correlati alla concentrazione mediante la misura di campioni a concentrazione nota di antigene non marcato. Alla curva di taratura ci si riferirà per definire la concentrazione dell'antigene nel campione incognito, qualora si sia stabilito qual'è la variazione del rapporto  $B/F$  determinato dall'introduzione del campione in esame nel sistema.

Il problema principale in questo tipo di metodologia — come del resto anche in ogni altro tipo di metodologia analitica — sta nelle caratteristiche del reattivo chiave, che nel caso in oggetto è l'anticorpo. Tutti coloro che si occupano di RIA sono d'accordo nel ritenere che nelle caratteristiche dell'anticorpo e nel tentativo di migliorarle vanno ritrovati da una parte i limiti e dall'altra le ragioni del progresso di questo metodo negli ultimi 5 anni.

(\*) Per maggiori dettagli v.: ROSA, U. & L. DONATO. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 7, 208 (1971).

## Problemi di metodologia nei dosaggi radioimmunologici (\*)

U. ROSA

*Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa*

È chiaro che avendo a che fare con una metodologia di analisi che, soprattutto in questi ultimi anni, dalla sua originale applicazione agli ormoni proteici si è estesa agli ormoni steroidei, dai farmaci agli allergeni, coprendo ormai un campo di applicazione estremamente vasto, il tentativo di unificare un discorso metodologico in questo campo è compito non lieve.

L'unica via possibile per un discorso di questo tipo è quella di individuare una matrice comune a tutti i dosaggi radioimmunologici. Questa matrice trova consistenza nella struttura stessa del metodo analitico, nelle definizioni dei parametri che controllano accuratezza e precisione, nella descrizione delle tecniche e delle vie metodologiche che oggi si stanno battendo — o che si sono battute nel passato — per portare questo tipo di metodologia ad un livello accettabile di accuratezza e di precisione analitica.

### *Il metodo radioimmunologico (RIA)*

Il RIA consiste essenzialmente nella reazione che intercorre tra la forma marcata di un antigene e un anticorpo diretto a quell'antigene; il risultato della reazione è la formazione di un complesso antigene-anticorpo.

La radioattività legata all'antigene presente nella reazione, in forma tutta libera al tempo zero, sarà ripartita all'equilibrio fra una frazione indicata con *bound* (B) e una frazione indicata con *free* (F).

Il segnale analitico, l'analogo dell'indicazione spettrofotometrica nel caso di analisi che utilizzano metodi ottici, è costituito dalla misura della radioattività legata alle due frazioni B e F, o alla radioattività legata ad una delle due e riferita alla radioattività totale (si tratta di modi diversi di esprimere lo stesso tipo di risultato).

Quando la reazione analitica avviene in presenza anche dello stesso antigene in forma nativa e non marcata, il processo può essere schematizzato come il decorso di reazioni competitive che hanno un reattivo in comune, l'anticorpo (Fig. 1).

---

(\*) Testo ripreso dalla registrazione effettuata durante il Convegno.

Alla reazione analitica fondamentale possono affiancarsi due tipi di processi competitivi paralleli. Il primo si verifica nel caso della presenza, nel sistema, di una sostanza dotata anch'essa di reattività nei confronti dell'antigene la quale si pone in competizione con il reattivo principale.

Il secondo processo competitivo è dovuto alla presenza nel sistema di una sostanza che non sia l'antigene che si vuol misurare, ma agisca in competizione con l'antigene stesso nei confronti dell'anticorpo. Avendo a che fare con antigeni che, in genere, si trovano nel campione in presenza di precursori o in presenza di prodotti di degradazione metabolica a struttura simile, è abbastanza evidente come questo tipo di evenienza rappresenti il tallone di Achille, il rischio più grosso del RIA.

Arriviamo così al tema principale: come garantire che le perdite di accuratezza, dovute a fenomeni del genere indicato, possano essere recuperate in un dosaggio radioimmunologico?

Sostanzialmente le vie sono tre. La più ovvia è quella di far sì che il reattivo immunologico « anticorpo » abbia una specificità tale da eliminare dal gioco gli effetti competitivi.

La seconda via, altrettanto importante, consiste nell'integrare il RIA con metodi di separazione non immunochimica, che consentano di riportare il campione a condizioni analitiche più favorevoli perché la reazione si possa verificare senza interferenze; essa può consistere, per esempio, in uno spettro cromatografico preliminare al dosaggio, che consenta di separare l'antigene dal competitore a struttura simile. Questa è stata la via battuta originariamente nel caso del RIA degli steroidi, classico esempio di gruppo di sostanze a struttura estremamente simile.

La terza soluzione infine è quella di far precedere il RIA da un trattamento estrattivo che consenta di separare l'antigene da misurare dalle sostanze trasportanti che possono competere con l'anticorpo nella reazione. Questo si risolve, per esempio, con una estrazione dal plasma ed è ancora caratteristico per gli steroidi nella misura in cui consente l'allontanamento delle proteine del siero, leganti nei confronti degli steroidi.

### *L'accuratezza nel RIA.*

Le principali sorgenti di errore sistematico che influiscono sull'accuratezza del RIA possono derivare: 1) da una cattiva classificazione del peso della dose, e questo ha come origine una cattiva definizione del valore dello standard; 2) dalla interferenza sulla reazione antigene-anticorpo; 3) dalla possibilità che il metodo di misura delle frazioni B e F sia tale da produrre una misclassificazione delle due frazioni, cioè che valuti la quota B come F, e viceversa. Queste tre sorgenti di errore meritano di essere commentate una per una, cominciando dalla seconda, che è la più importante, ed abbiamo

già in parte considerata. Il problema della specificità del reattivo immunologico ha avuto sostanzialmente due soluzioni differenti collegate alla distinzione, ovvia dal punto di vista della nomenclatura, fra antigeni ed apteni: la prima classe corrisponde a quelle sostanze in grado di produrre anticorpi, la seconda a quelle sostanze che non essendo dotate di potere antigenico, lo acquistano quando sono accoppiate chimicamente ad un supporto di peso molecolare sufficientemente elevato.

Procedure di questo tipo hanno consentito l'applicazione del RIA a una serie di sostanze che una volta si ritenevano escluse da questo metodo, dai farmaci agli ormoni steroidei e così via.

Il recupero di specificità e quindi di accuratezza si verifica sostanzialmente con l'attuazione di due operazioni. L'una, di valore universale per entrambe le classi di sostanze sopra citate e di gran lunga più importante, è la selezione nella risposta individuale degli anticorpi ottenibili per un dato ormone. È lungo questa strada che negli ultimi anni il RIA ha ottenuto una serie di risultati interessanti, e soprattutto ha recuperato per molti dosaggi le condizioni di specificità minime richieste per garantire una accuratezza tollerabile.

Sotto tale profilo un buon esempio è dato dal sistema angiotensina II, caratterizzato dall'esistenza di un precursore a struttura molto simile, l'angiotensina I e da una serie di metaboliti dell'angiotensina II anch'essi a struttura molto simile. Il sistema pone così al meccanismo di riconoscimento immunologico un grosso test da risolvere. Quando all'angiotensina II, come dose, si sostituisca il suo precursore, l'anticorpo può essere perfettamente in grado di riconoscere la differenza tra queste due strutture, ma non riconoscere invece affatto la differenza tra la struttura dell'angiotensina II e quella di alcuni metaboliti. La selezione della popolazione di anticorpi ottenuti in uno stesso ciclo di immunizzazione può però consentire di separare un anticorpo diverso che riconosce di nuovo l'angiotensina I, ma riconosce come diverse anche altre strutture simili.

L'altra operazione, tendente al recupero di specificità e quindi di accuratezza, consiste nell'intervenire sulla struttura chimica dell'antigene accoppiando l'aptene al supporto e cercando in qualche maniera di influenzare o di pilotare la risposta immunologica.

Questa alternativa è stata applicata agli steroidi.

La tecnica di preparazione dei complessi steroidi-proteina necessari per ottenere la risposta immunologica avviene con l'instaurazione di un legame chimico fra una delle funzioni disponibili sul nucleo steroideo e la proteina di supporto.

Per ottenere, ad esempio, degli anticorpi anti-estradiolo si hanno teoricamente alcune possibilità utilizzando le funzioni presenti sull'anello D della struttura dello steroide per realizzare la posizione di accoppiamento, ma in

questo caso si può già teoricamente prevedere quello che può essere il meccanismo della risposta immunologica davanti ad un simile coniugato: un accoppiamento lungo questo anello ha molte probabilità di dare origine a siti immunologici che non sono in grado di distinguere tra l'estradiolo, l'estrone e l'estriolo; si ha infatti la probabilità di schermare, attraverso meccanismi che non è il caso di discutere qui, quella parte della molecola che identifica lo steroide rispetto ai suoi competitori. Si può tentativamente pensare di ottenere risultati migliori considerando la struttura globalmente e utilizzando come punto di attacco una posizione della molecola più caratteristica, in grado di dare una risposta che identifichi le differenze esistenti tra questa struttura e le sue due strutture competitive. È la strada che è stata percorsa in questi ultimi anni e che, vista nei termini delle considerazioni fatte all'inizio, porta ad una migliore specificità e quindi ad una migliore accuratezza.

Se lungo questa strada sono stati risolti alcuni dei grossi problemi che influenzavano pesantemente l'accuratezza del RIA, altri se ne sono presentati, relativi allo stadio successivo del dosaggio cioè alla separazione delle due frazioni, B ed F, necessaria per quantificare l'andamento della reazione.

Quando la reazione antigene-anticorpo ha raggiunto il suo equilibrio e ci troviamo davanti alla necessità di separare la quota B dell'antigene dalla quota F, possiamo scegliere tra due linee di condotta: la prima, più ovvia e banale essendo il RIA sviluppatosi, in origine, per il dosaggio delle proteine, era quella di applicare alla separazione della quota B dalla quota F le tecniche classiche fondate sulla differenza di peso molecolare (P. M.) che caratterizza le due fasi; il complesso antigene-anticorpo è chiaramente sempre in vantaggio, in termini di P. M., rispetto all'antigene libero. Inizialmente tutte le tecniche erano fondate sul recupero di questa quota, e lungo il cammino del RIA ci si è accorti, per motivi che poi vedremo, che ciò era molto vantaggioso.

La seconda linea di condotta prende in considerazione il recupero dell'antigene libero che può avvenire attraverso diversi meccanismi: la caratteristica fondamentale delle procedure di questo tipo è che tutte, in misura maggiore o minore, perturbano l'equilibrio che è stato raggiunto dalla reazione e — nella misura in cui lo perturbano — introducono una potenziale sorgente di inaccuratezza che può essere recuperata solo a condizione che l'effetto perturbante sia distribuito egualmente lungo tutti i punti della curva di taratura e sia garantito uguale per tutti i campioni analizzati.

Questa non è impresa facile. Una delle tecniche oggi abbastanza diffusa per la misura della quota F, consiste nell'utilizzare degli adsorbenti che siano in grado di fissare l'antigene libero, lasciando inalterato il complesso antigene-anticorpo. Questi adsorbenti si prestano a separazioni banali, per esempio mediante flocculazione, ma portano in sé un grosso rischio di errore,

tanto più elevato quanto più il reattivo immunochimico, « anticorpo », si presenta come un reattivo eterogeneo. Mentre la reazione antigene-anticorpo è un processo reversibile che ha raggiunto l'equilibrio, l'introduzione di un adsorbente nel mezzo di reazione comporta l'introduzione di un processo irreversibile di adsorbimento dell'antigene sull'adsorbente scelto; questo processo irreversibile si pone come competitore del processo di equilibrio, tendendo a spostare l'equilibrio da destra a sinistra e quindi a dissociare il complesso antigene-anticorpo. La conseguenza è chiaramente inevitabile e il problema diventa più grave se si pensa che questo tipo di schematizzazione non esprime la realtà, cioè che non si tratta di una sola popolazione omogenea di complessi antigene-anticorpo. Anche supponendo che l'antigene di partenza sia omogeneo, non lo è certamente l'anticorpo; abbiamo a che fare, cioè, con una serie di complessi antigene-anticorpo che riflette l'eterogeneità dell'antisiero d'origine, il quale reagisce in modi diversi all'effetto dissociante provocato dall'adsorbente.

La difficoltà di controllare questa grossa causa di errore analitico nel RIA è perciò un problema assai complesso. L'effetto perturbante del sistema dipenderà dai tempi di contatto, dalle concentrazioni dell'adsorbente, dalla natura dell'adsorbente scelto e si tradurrà sostanzialmente in fenomeni di progressiva diminuzione della quota F in presenza dell'adsorbente.

Questo tipo di causa di errori sistematici — che per importanza viene immediatamente dopo quello che deriva dalla specificità — non è caratteristico solo degli adsorbenti irreversibili, ma è proprietà generale di qualunque metodo che si proponga di intervenire su un sistema all'equilibrio cercando di definirne i parametri analitici B ed F.

Se lavorando in favore della specificità siamo riusciti ad eliminare alcune sostanziali cause di errore, se con una analisi più approfondita del meccanismo dei metodi di separazione siamo riusciti a ridurre alcune delle grosse cause di inaccuratezza metodologica, esiste in realtà un terzo problema sorgente di notevoli difficoltà analitiche. È la terza causa di inaccuratezza, quella dovuta a errore di classificazione nel peso di dose, che si ricollega con il problema degli standard.

Il RIA ha ereditato direttamente dal dosaggio biologico, di cui è naturale continuatore, il problema di definire la natura dello standard, e soprattutto di stabilire degli standard che rispondessero a quello che ad essi si richiede: garantire una continuità di misura ed una risposta confrontabile.

Il discorso degli standard nel RIA è estremamente difficile da fare, proprio per la varietà di applicazione che il RIA ha. Se non vi sono difficoltà nel caso di composti semplici come gli steroidi, esse sorgono invece nel caso di composti polipeptidici a struttura semplice, e sono dovute al fatto che polipeptidi puri difficilmente hanno caratteristiche di standard, malgrado

i progressi della sintesi. Il caso dell'angiotensina è clamoroso: dopo anni che si lavorava con l'angiotensina ci si è accorti che gli standard, considerati puri, avevano in realtà dei livelli di purezza che non superavano il 70-75% come conseguenza del tipo di tecnica utilizzata per separarli. A livello di ormoni proteici il problema è estremamente grave.

### *La precisione nel RIA.*

Accanto alle sorgenti di errori sistematici esiste un'altra categoria di errori, gli errori statistici che accompagnano la misura radioimmunologica; questi introducono immediatamente l'importante tematica della sensibilità del metodo di dosaggio.

Una delle caratteristiche insite nella struttura del RIA è che la sensibilità del metodo dipende completamente dall'affinità dell'anticorpo utilizzato.

La sperimentazione ha dimostrato che la realtà corrisponde in larga misura al modello elaborato in tal senso da Ekins, in base al quale il sistema risponderrebbe in modo diverso via via che la costante di affinità della reazione antigene-anticorpo cresce, acquistando in sensibilità, e — a parità di affinità — la sensibilità aumenterebbe via via che la concentrazione del reattivo immunochimico utilizzata per l'analisi diventa più piccola.

Questo concetto, che è un derivato diretto della applicazione della legge di massa ad equilibri di questo genere, assume degli aspetti estremamente importanti per quel che riguarda la standardizzazione del metodo e la precisione della risposta che si ottiene dall'analisi immunologica: ne deriva che dovremmo ricorrere ad anticorpi ad alta affinità, ma essendo questa una proprietà talvolta indissociata o spesso dissociata dalla specificità, è necessario selezionare gli anticorpi, ricorrendo alla risposta individuale, attraverso due criteri che possono risultare contrastanti. A livello dell'assemblaggio del metodo di dosaggio, sarà inoltre necessario realizzare dei sistemi analitici in cui la concentrazione dei reattivi sia molto piccola, e questo implica che — dovendo raggiungere comunque un valore di equilibrio della nostra reazione — dovremmo disporre di reattivi in grado di raggiungere l'equilibrio in tempi compatibili con un dosaggio analitico normale.

Il problema diventa gravissimo a livello dell'antigene marcato, ove incontriamo paradossalmente le maggiori difficoltà, non avendo disponibile un meccanismo di selezione, come nel caso dell'anticorpo.

È a questo livello che cerchiamo di dare al RIA, originalmente sviluppato per la ricerca, delle caratteristiche di praticabilità che lo rendano accettabile qualora esso venga considerato come necessario per la routine clinica.

Abbiamo quattro vie per produrre gli antigeni marcati essenziali per questo tipo di dosaggio.

Per gli antigeni proteici, che contengono residui di tirosina, la conversione in iododerivati mediante iodio radioattivo, è un'operazione apparentemente banale, ma difficile da realizzare nelle condizioni di purezza necessarie per l'antigene marcato. Per gli antigeni proteici senza tirosina, per i quali la marcatura acquista delle caratteristiche di difficoltà, si richiede l'uso di tecniche così pesanti sul piano chimico da provocare in essi delle forti degradazioni. La via di marcare l'antigene con radioiodio passa per esempio attraverso una sua coniugazione con un gruppo di tirosina, e poi la iodazione di quel gruppo; ma ciò provoca sempre delle modificazioni strutturali tali che in questo caso si ottengono antigeni marcati a immunoreattività molto bassa.

La via più appagante in termini di RIA per gli apteni che non reagiscono con lo iodio, è l'utilizzazione delle loro forme marcate con tritio. Una alternativa possibile è la loro coniugazione con un gruppo che sia stato previamente marcato con radioiodio; è questa la via che oggi si tende a seguire per la preparazione di estrogeni marcati con  $I^{125}$ .

Il poter disporre di antigeni marcati che abbiano conservato la quasi totalità della loro immunoreattività originale va oggi considerata come condizione essenziale se vogliamo che il RIA utilizzi in situazione favorevole la reazione analitica che ne è alla base; su questa via ci si sta muovendo con conseguenze estremamente positive.

### *La praticabilità del RIA nella routine clinica.*

La considerazione della praticabilità del metodo è essenziale quando il metodo debba transire da un livello d'impiego in laboratori di ricerca alla utilizzazione nella routine clinica, e propone il rispetto di una serie di condizioni che talvolta sono in contrasto con la natura stessa del metodo.

Gli elementi di praticabilità di più facile identificazione sono due: 1) la possibilità di dosaggio diretto nel campione. Sotto questo aspetto per quasi tutti gli ormoni proteici il problema non si pone e stiamo tentando di risolverlo per alcuni ormoni steroidei, ma esistono delle situazioni, come la presenza di proteine competitive, che rendono una soluzione di questo genere estremamente difficile; 2) il tempo di reazione ridotto. È questo un elemento apparentemente fondamentale che implica delle conseguenze pesanti a livello del dosaggio stesso in quanto dobbiamo accelerare in qualche modo la reazione analitica per renderla compatibile con tempi di dosaggio dell'ordine dell'ora. Per poter ottenere risultati di questo genere, le vie che si stanno seguendo sono: a) il tentativo di recuperare in antigenicità con l'antigene marcato; b) isolare all'interno della risposta immunologica antisieri che, oltre ad avere le caratteristiche di un'elevata affinità e di un'elevata specificità, siano caratterizzati da cinetiche di reazione estremamente veloci.

Le possibilità esistono, ma comportano rischi non lievi: il più grave è che, nella gerarchia di importanza che si dà ai vari quesiti specifici cui si vuole che il RIA risponda, i problemi della praticabilità -- come spesso purtroppo accade nel settore della chimica clinica in generale -- vengano fatti passare avanti agli altri, ben più importanti, di garantire al metodo l'accuratezza e la precisione che gli consentano una massima dignità analitica.

Il tema della validità clinica dell'informazione ottenuta dal RIA, di cui si discuterà in questo Convegno, va sempre visto anche alla luce delle considerazioni sopra esposte e si deve andare molto cauti nel pensare che procedimenti di questo tipo -- caratterizzati da grosse difficoltà metodologiche -- possano essere tranquillamente utilizzati nella routine clinica senza porsi il problema analitico.

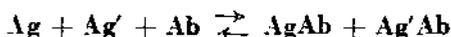
# Valutazione e standardizzazione dei dosaggi radioimmunologici

I. MASI

*Laboratori di Chimica Biologica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Gli ormoni dosabili con metodi radioimmunologici sono ormai molto numerosi; la lista riportata in Tab. 1 è certamente incompleta e suscettibile di continuo aggiornamento, ma ciò nonostante può dare un'idea della vastità di questo settore specialistico della chimica clinica.

Il dosaggio radioimmunologico (RIA) si basa sull'interazione di agenti chimici specifici, in accordo con la legge di massa, e sulla situazione di competizione che si crea — in presenza di una quantità limitata del reagente — tra la sostanza da dosare e l'analoga sostanza marcata, alla quale si attribuisce la funzione di indicatore:



Ag = Antigene (*ormone da dosare*)

Ag' = Antigene marcato (*ormone radioattivo, indicatore*)

Ab = Anticorpo specifico (*in quantità limitata rispetto ad Ag', reagente*).

Attraverso la separazione dei prodotti marcati presenti all'equilibrio e la misura della ripartizione della radioattività fra la forma libera dell'ormone marcato (Ag') ed il suo complesso (Ag'Ab) si ottiene una stima della quantità di ormone da dosare (Ag). In procedimenti analitici complessi, di cui il RIA applicato agli ormoni è un esempio, alcuni fattori non specifici possono influire sulla reazione chimica ed inoltre la presenza di fattori specifici quali, in questo caso, proormoni e frammenti molecolari, antigeni ormonali e anticorpi affini, ecc., possono alterare la specificità della immunoreazione provocando reazioni interferenti.

## *La standardizzazione dei dosaggi radioimmunologici*

Il termine « standardizzazione » può essere applicato al RIA, come del resto alla maggior parte delle procedure analitiche di laboratorio, per significare « definizione delle caratteristiche di qualità, compresa la con-

## Principali ormoni dosabili mediante metodi RIA

<i>Ormoni peptidici</i>	
Insulina	Adrenocorticotropina (ACTH)
Ormone di crescita (HGH)	Tirocalcitonina
Somatomamotropina corionica (HCS)	Angiotensina I
Gonadotropina corionica (HCG)	Angiotensina II
Ormone luteinizzante (LH)	Vasopressina
Ormone follicolostimolante (FSH)	Ossitocina
Tirotropina (TSH)	Bradikinina
Prolattina	Gastrina
Glucagone	Secretina
Ormone paratiroideo (PTH)	Colecistokinina
Ormone melanofofo stimolante (MSH)	
<i>Ormoni non peptidici</i>	
Aldosterone	Estriolo
Progesterone	Estrone
11-idrossiprogesterone	2-idrossiestrone
Testosterone	Prostaglandine
Diidrotosterone	Triiodotironina
Estradiolo	Tiroxina

servabilità di queste nel tempo, in modo da garantire nell'applicazione l'affidabilità del metodo per quanto riguarda la precisione e l'accuratezza dei risultati ottenibili»: il termine «metodo» sta a significare l'intero sistema «procedura analitica / reagenti specifici».

Lo stato di «standardizzazione» dei metodi può essere definito attraverso la valutazione di alcuni indici che, nel loro complesso, forniscono una stima del «livello» di standardizzazione. Il livello «ottimale» di standardizzazione raggiungibile è condizionato dallo stato dell'arte, ed è migliorabile con il progredire di questa; la ricerca del livello ottimale richiede un'attività specialistica che generalmente viene svolta in centri di studio specificamente interessati a problemi di standardizzazione.

Almeno altrettanto importante però è la valutazione del livello «attuale» di standardizzazione nel laboratorio che impiega il RIA nella ricerca clinica o nella diagnostica. Ciascun laboratorio, attraverso l'attuazione di un idoneo schema di controllo di qualità di tipo continuativo nel tempo, deve garantirsi all'interno lo «stato di standardizzazione» per tutti quei metodi di cui fa uso e cercare di migliorare, per quanto possibile, il suo livello «at-

tuale ». Non sempre però le suddette verifiche vengono svolte o sono sufficientemente approfondite. Per i metodi RIA l'impegno è piuttosto gravoso, ma questa motivazione va superata se non si vuole venir meno ad una esigenza di fondo.

In effetti l'onere della valutazione e della standardizzazione ricade non soltanto su coloro che sono interessati all'applicazione dei metodi, ma anche su quanti sono impegnati a livello di preparazione dei reattivi. Infatti la disponibilità di reattivi di lavoro uniformi e di riconosciuta affidabilità è di grande importanza soprattutto per i laboratori non specializzati, e quindi generalmente non attrezzati allo scopo.

Nella chimica clinica tradizionale si fa uso, per la preparazione dei reattivi, di materiali generalmente disponibili in forma stabile e preparati in grandi lotti, per i quali è possibile ottenere caratteristiche piuttosto costanti, tra cui una purezza sufficientemente definita e talvolta anche elevata. Già per materiali di questo tipo — ed ancora più se si ricorre a loro preparazioni in forma di reattivi commerciali pronti per l'uso — la valutazione preliminare al loro impiego per l'esecuzione di analisi di routine è buona regola. Provvedere a tale valutazione è tanto più indispensabile nel caso di reattivi richiesti per il RIA, ove si deve far ricorso a materiali di stabilità limitata (come nel caso degli ormoni marcati), non producibili in grandi lotti (come nel caso degli ormoni di origine umana da usare come riferimento), o di composizione complessa e scarsamente definita dal punto di vista chimico (come nel caso dell'anticorpo, che di fatto è un antisiero parzialmente purificato).

Per poter applicare in routine un dosaggio RIA è necessario che siano soddisfatte queste condizioni base:

- riconosciuta validità del dosaggio radioimmunologico dell'ormone, in relazione alla sua attività biologica;
- possibilità di disporre di antisieri sufficientemente specifici;
- possibilità di disporre di ormoni altamente purificati da impiegare sia come sostanza di riferimento sia per la preparazione dell'ormone marcato;
- stabilità dell'ormone marcato per un tempo ragionevole, alla attività specifica richiesta dalle esigenze del dosaggio;
- possibilità di standardizzare sia il procedimento di dosaggio che l'insieme dei reagenti e dei reattivi ad esso necessari.

Alcune di queste condizioni assumono più importanza delle altre da caso a caso, per i singoli tipi di dosaggio.

È pertanto necessario che siano definiti alcuni parametri di standardizzazione dei reagenti in base a:

- la scelta delle condizioni ottimali di marcatura e di purificazione dell'ormone marcato;

- la valutazione della stabilità dell'ormone marcato e la scelta delle condizioni ottimali di conservazione;
- la valutazione della sostanza usata come standard di riferimento;
- la caratterizzazione dell'antisiero e della sua costante di affinità;
- la scelta delle condizioni operative del dosaggio e del sistema di separazione « libero-legato », in funzione delle caratteristiche dei reattivi impiegati.

Prima di passare alla applicazione del metodo prescelto, al laboratorio utilizzatore competono ulteriori valutazioni e verifiche; da un lato la rispondenza e le caratteristiche di conservabilità dei reattivi, dall'altro il controllo di tutti gli altri fattori che condizionano la qualità del risultato all'interno del laboratorio. I gruppi di parametri da considerare sono:

- paziente:  
condizioni ed eventuali trattamenti terapeutici precedenti;  
condizioni di stimolazione della secrezione ormonale;
- campione:  
modalità di prelievo e trattamento;  
condizioni di conservazione;
- reattivi:  
antigene marcato;  
antisiero;  
ormone di riferimento (standard);  
tampone o diluente;  
altri reattivi previsti dal metodo;  
eventuali interferenti presenti nel campione;
- procedimento analitico:  
condizioni di reazione (pH, temperatura, tempo, precubazione, non-equilibrio);  
sistema di separazione « libero-legato »;  
sistema di conteggio;
- trattamento dei dati:  
tipo di rappresentazione usata per la curva di taratura;  
sistema applicato al trattamento dei dati.

Quando la procedura è stata valutata e standardizzata e si passa alla sua applicazione in routine il controllo di qualità deve investire tutte le fasi del dosaggio, non soltanto quelle strettamente analitiche, ma anche quelle precedenti e successive, per assicurare che i risultati ottenuti con la procedura prescelta abbiano il massimo valore clinico.

Il controllo di qualità deve pertanto garantire che siano eseguiti correttamente:

- la preparazione del paziente;
- il prelievo del campione;
- la preparazione del campione;
- la conservazione del campione;
- il procedimento analitico prestabilito;
- il calcolo dei risultati;
- l'espressione dei risultati;
- l'interpretazione dei risultati.

Altri tipi di verifiche — del cui onere devono farsi carico gli organismi tecnici centrali — sono infine necessari per stabilire il grado di confrontabilità dei risultati ottenuti dai diversi laboratori partecipanti ad attività di interesse collettivo i cui risultati dovrebbero essere sufficientemente omogenei se venissero adottati criteri adeguati di standardizzazione.

#### *Programmi collaborativi interlaboratori*

Nei singoli laboratori talvolta esistono cause sistematiche di errore rivelabili soltanto con verifiche indipendenti da quelle attuate all'interno dei laboratori stessi.

Una valutazione integrativa, basata sul confronto dei risultati ottenuti nei singoli laboratori, può essere realizzata mediante programmi collaborativi interlaboratori appositamente predisposti. Programmi di questo tipo sono già stati introdotti da tempo per la chimica clinica tradizionale, anche se la loro diffusione si è realizzata soltanto in questi ultimi anni.

Anche nel caso del RIA già disponiamo di alcune valutazioni. In particolare tre studi hanno per oggetto il dosaggio dell'insulina:

- il primo è stato realizzato a cura del « National Institute for Medical Research (U. K.) » su richiesta del « Polypeptide Hormone Sub-Committee of the Clinical Endocrinology Committee of the Medical Research Council », e i risultati sono stati riportati da Cotes e Coll. nel 1969 (1);

- il secondo studio è stato promosso e coordinato nel 1971 dalla « Medical Application Section, Life Science Division, International Atomic Energy Agency (IAEA) », e i risultati sono stati riportati da Garcia e Saracci nel 1972 (2);

- il terzo, promosso e coordinato dal nostro Istituto con la collaborazione del Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, è ora in fase avanzata di attuazione (3).

Ritornando al primo dei tre studi (1), è da notare che i laboratori partecipanti erano di ricerca più che di routine e pertanto questo studio si può considerare anche un esempio di valutazione del livello « ottimale » di standardizzazione del metodo al momento dello studio. L'impostazione è la seguente:

*1<sup>a</sup> rilevazione:*

Laboratori partecipanti: 5.

Campioni distribuiti: 1 serie di 24 campioni di plasma, di cui 21 differenti e 3 duplicati; 1 campione di standard di insulina umana (NIMR 66/304).

Esecuzione della analisi: tutti i campioni di plasma della serie in gruppo unico, eseguendo contemporaneamente due curve di taratura (una con lo standard abituale del laboratorio e una con lo standard inviato, comune per tutti i laboratori partecipanti).

*2<sup>a</sup> rilevazione:*

Laboratori partecipanti: 6.

Campioni distribuiti: 3 serie di 13 campioni di plasma, di cui 8 differenti (di cui uno deprivato di insulina ed uno deprivato e addizionato di quantità nota di insulina) e 5 duplicati; 1 campione di standard di insulina umana (NIMR 66/304).

Esecuzione delle analisi: ciascuna serie come gruppo unico, ma ogni serie in un giorno diverso, sempre con due curve di taratura.

Gli Autori hanno tratto alcune indicazioni sulla classificazione in sequenza della serie di campioni analizzati in funzione del contenuto di insulina (la sequenza è stata identica per tutti i laboratori partecipanti, senza alcuna inversione di posizione) e sulla riproducibilità delle analisi (i valori ottenuti per l'insulina contenuta nello stesso campione di plasma, esaminato in ogni laboratorio, sono risultati pari tra metà e il doppio della stima media ottenuta da tutti i valori riportati dai laboratori); altre indicazioni molto importanti riguardano i metodi, gli standard e il materiale impiegato per l'esecuzione della analisi nei singoli laboratori partecipanti.

Il secondo studio collaborativo (2) riguarda 12 laboratori di nazioni differenti. L'impostazione è la seguente: ai laboratori partecipanti è stata mandata una serie di 3 campioni di siero, ogni campione in duplicato, ed uno standard da usare per tracciare una curva di taratura in parallelo a quella che i laboratori preparavano con il loro standard abituale.

I valori ottenuti sono risultati anche in questo caso in sequenza omogenea, sia se riferiti allo standard comune che allo standard abituale; in un caso e nell'altro c'è una notevole dispersione dei dati. La seconda indicazione ottenuta si riferisce all'entità dei coefficienti di variazione fra replicati nei vari laboratori.

L'impostazione data al programma collaborativo interlaboratori attualmente in corso in Italia, progettato ed attuato dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa (3) si può così riassumere:

**Fasi operative:**

1. Distribuzione dello schema del progetto a 50 laboratori, invito a partecipare al programma, e raccolta adesioni (50 adesioni);
2. Preparazione dei campioni da distribuire (59 serie di più campioni in forma liofila);
3. Distribuzione dei campioni ai laboratori aderenti (invio a mezzo posta di 50 serie di campioni);
  4. Raccolta ed esame preliminare delle risposte (36 risposte);
  5. Elaborazione dei dati forniti nelle risposte (in corso);
  6. Distribuzione delle informazioni ottenute ai laboratori partecipanti.

Ai laboratori è stata inviata una serie di campioni comprendente:

- 1 campione di standard di insulina (da usare per curva di taratura);
- 5 campioni di plasma ottenuto con prelievi a tempi successivi da un unico soggetto volontario, sottoposto a stimolazione con carico orale di glucosio: 1 campione a bassa concentrazione di insulina (basale); 2 campioni identici a media concentrazione di insulina; 1 campione ad alta concentrazione di insulina; 1 campione deprivato dei componenti polipeptidici a basso peso molecolare e addizionato di quantità nota di insulina.

La serie era accompagnata dall'indicazione delle modalità operative da seguire.

Per la raccolta delle risposte sono stati inviati appositi moduli (Figg. 1 a e 1 b).

Ai partecipanti sono stati richiesti inoltre copia delle due curve di taratura, specificazioni sul tipo di calcolatore e relativo linguaggio, tipo di procedimento analitico eseguito (nel caso che il trattamento dati sia stato fatto con il sistema automatico) ed i criteri statistici seguiti per la stima dell'errore del risultato.

L'impostazione data a questo programma collaborativo dovrebbe consentire di ottenere una serie di informazioni su:

- l'andamento generale dei risultati ottenuti:
  - a) precisione delle misure sperimentali;
  - b) precisione dei risultati;

- c) stima dell'accuratezza dei risultati;
  - d) sensibilità del metodo;
  - e) influenza delle diverse variabili:
- i tipi di trattamento dati utilizzati per passare dalla misura al risultato:
    - a) influenza del tipo di rappresentazione utilizzata per il tracciamento della curva di taratura;
    - b) influenza del metodo di esecuzione del trattamento (manuale o automatico):
  - i metodi impiegati per la separazione « libero-legato »:
    - a) influenza del procedimento impiegato per la separazione « libero-legato »;
  - i preparati di insulina usati come standard per la curva di taratura:
    - a) influenza sulla stima dell'accuratezza dei risultati;
    - b) influenza sulla precisione dei risultati;
  - i « Kit » utilizzati, soprattutto per quelli di produttori diversi che seguono uno stesso metodo:
    - a) influenza dello standard contenuto nel « Kit » sulla curva di taratura;
    - b) influenza della preparazione dei reattivi;
    - c) capacità legante dell'anticorpo;
    - d) frazione aspecifica presente nell'ormone marcato.

Il programma comprende infine una parte facoltativa per i laboratori partecipanti più attinente al significato clinico dei dosaggi di routine (Fig. 2).

L'elaborazione dei dati comporta l'uso di un sistema di programmi per calcolatore. Un'elaborazione analoga è già stata realizzata ed applicata verso la fine dello scorso anno per le esigenze di un programma di interesse in chimica clinica. Il sistema di elaborazione riguardante lo studio sul dosaggio radioimmunologico dell'insulina sarà certamente più complesso, essendo più numerose le indicazioni che si dovrebbero ricavare dal programma in corso.

Nel campo dei programmi interlaboratori va ricordata anche l'attività svolta in questo settore dal « Centre for Disease Control (CDC) », USA, l'organismo centrale federale che realizza correntemente programmi detti « proficiency surveys », in applicazione della legislazione vigente negli Stati Uniti in base alla quale alcuni laboratori hanno l'obbligo di sottostare ad una valutazione da parte del CDC. Si tratta di programmi, stabiliti anno



Dati relativi all'analisi (segue):

STANDARD II (Riferimento) n° punti da effettuare 5; n° ripetizioni consigliate > 1; effettuato 

Concentrazioni in $\mu\text{U/ml}$	C O N T E G G I
1 12,5	.....
2 25	.....
3 50	.....
4 100	.....
5 200	.....

CAMPIONI DI RIFERIMENTO n° ripetizioni da effettuare 3

Codice	C O N T E G G I	Concentrazioni del campione in $\mu\text{U/ml}$ ricavate dalla curva di taratura relativa allo (1)	
		Standard I	Standard II
A	.....	..... ± .....	..... ± .....
B	.....	..... ± .....	..... ± .....
C	.....	..... ± .....	..... ± .....
D	.....	..... ± .....	..... ± .....
E	.....	..... ± .....	..... ± .....

(1)

Il calcolo delle concentrazioni è stato eseguito:

 attraverso il tracciamento manuale delle curve di taratura (allegare fotocopie di queste) tramite elaborazione automatica; in tal caso si prega di indicare:

- tipo del calcolatore .....
- tipo del linguaggio .....
- procedimento analitico scelto per il tracciamento automatico delle curve di taratura .....

Indicare, se possibile, oltre il valore medio della concentrazione anche il valore stimato dell'errore. In tal caso si ripoti

- livello di probabilità scelto .....
- metodo statistico seguito: deviazione standard .....   
errore standard .....   
errore standard con t di Student .....   
.....

N.B. Si prega di allegare al presente modulo, oltre alle fotocopie delle curve di taratura utilizzate, anche fotocopie del protocollo di raccolta dati normalmente usato nel vostro laboratorio

Fig. 1 b



per anno, ai quali partecipano oltre ai laboratori suddetti, altri laboratori considerati di riferimento, e laboratori volontari aventi caratteristiche pre-stabilite.

### *Materiali di riferimento*

Il problema della disponibilità di materiali standard è uno dei più importanti. Per quanto riguarda gli antisieri non si fa uso di preparazioni standardizzate e tantomeno si dispone di anticorpi standard. Le difficoltà di fornire antisieri standardizzati per dosaggi radioimmunologici sono parecchie e attualmente i vantaggi prevedibili sembrano essere pochi. Per gli antigeni invece si fa uso di preparazioni standardizzate dai singoli produttori; per la loro caratterizzazione e valutazione vengono quasi sempre eseguiti saggi differenti ed appare pertanto necessaria la definizione e l'adozione di saggi di impiego comune che renderebbe più confrontabile la valutazione degli antigeni standardizzati che sono prodotti da laboratori diversi.

L'esistenza del problema della disponibilità dei materiali di riferimento specifici per il RIA, la cui richiesta va aumentando rapidamente, è stata presa in considerazione fin dal 1968 dal Comitato di esperti che collabora con l'OMS ai problemi sulla standardizzazione biologica. Alcune raccomandazioni inerenti al problema sono contenute negli ultimi rapporti tecnici dell'OMS (4, 5).

Non prevedendosi però da parte dell'OMS la possibilità di estendere a questo settore specifico il servizio di disponibilità di standard e reagenti, nel 1972 il problema è stato portato all'attenzione del « Panel » sulla standardizzazione delle procedure per i dosaggi radioimmunologici, della IAEA (6).

In vista di questo nuovo campo di applicazione ed in attesa che da parte di questi ed altri organismi internazionali operanti nel settore possa essere promossa e avviata un'attività *ad hoc*, i centri nazionali di standardizzazione esistenti nel UK (\*) e negli USA (\*\*) stanno estendendo ai parametri immunologici la caratterizzazione di alcuni materiali prodotti come standard biologici. Alcuni dati di interesse relativi ad ormoni per dosaggi immunologici sono stati riportati recentemente da Cotes (7). In Tab. 2 è riportato un elenco di preparazioni standardizzate di ormoni, per la maggior parte umani, disponibili presso il centro inglese per la standardizzazione biologica.

---

(\*) Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Hampstead Laboratories, Holly Hill, London, N.W.3, UK.

(\*\*) Hormone Distribution Officer, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.

**Ormoni di uso previsto per dosaggi immunologici  
disponibili presso FNIBSC (U.K.)**

(Dati ricavati da: Cotes (7))

Hormone (human)	Code No.	Hormone (human)	Code No.
Angiotensin I . . . . .	71/328	Postmenopausal serum . .	69/157
Angiotensin II . . . . .	70/302	Prolactin . . . . .	71/222
Calcitonin . . . . .	70/234		Res. Std. A
Chorionic gonadotrophin .	WHO 2nd IS	Renin . . . . .	68/356
Corticotrophin . . . . .	73/548	Serum prolactin . . . . .	71/167
Erythropoietin . . . . .	WHO 2nd IRP 67/343	Thyrotrophin . . . . .	68/38
Gastrin I . . . . .	68/439	Urinary menop. gonad. .	WHO 2nd IRP HMG
Growth . . . . .	WHO IRP 66/217		
Insulin . . . . .	66/304		
Parathyroid . . . . .	72/3		
Pituitary FSH . . . . .	68/39		
Pituitary LH . . . . .	68/40		
Pituitary FSH and LH .	69/104		
Placental lactogen . . . .	70/144		
Postmenopausal plasma .	69/176		
		<b>Hormone (non-human)</b>	<b>Code No.</b>
		Glucagon porcine . . . . .	69/194
			WHO 1st IS
		Parathyroid bovine . . . .	71/324

*Conclusioni*

La valutazione e la standardizzazione delle analisi radioimmunologiche, per l'insieme delle implicazioni metodologiche connesse, richiede una consistente preparazione di chimica analitica, di biochimica, conoscenze matematiche e statistiche adeguate, e comporta l'esistenza di un diretto contatto con l'ambiente medico utente. Quest'ultimo è infatti uno dei presupposti indispensabili per poter realizzare interventi utili e talora determinanti per il miglioramento del livello di standardizzazione dei materiali e dei metodi.

L'esperienza indipendente di vari gruppi di ricerca e di studio operanti nel settore ha portato a formulare la richiesta, divenuta ormai un'esigenza, di adottare schemi-base che indichino, in maniera univoca, l'insieme delle informazioni di cui si deve poter disporre per ottenere la migliore definizione del dato analitico, soprattutto in vista del suo significato clinico.

L'applicazione generalizzata di schemi-base ben impostati renderà più affidabile a sua volta anche il confronto dei dati raccolti in sedi diverse, con indubbio vantaggio per l'intera comunità medica.

**Riassunto.** — Il termine « standardizzazione » può essere applicato ai metodi RIA per significare « definizione delle caratteristiche di qualità » il cui livello va definito attraverso la valutazione dell'intero sistema « procedura analitica reagenti specifici » e l'accuratezza. Ciascun laboratorio, attraverso l'attuazione di un idoneo schema di controllo di qualità di tipo continuativo nel tempo, deve garantirsi il mantenimento dello « stato di standardizzazione », per tutti i metodi di cui fa uso. Nel caso del RIA ciò è piuttosto gravoso, ma questa motivazione va superata se non si vuole venir meno ad una esigenza di fondo. Nel RIA infatti si utilizzano materiali di stabilità limitata, non producibili in grandi lotti, a composizione complessa e non sempre chimicamente definita. Notevole pertanto è anche il contributo alla standardizzazione che compete ai produttori dei reattivi speciali destinati al RIA.

Al fine di poter favorire la standardizzazione di metodiche RIA, in questi ultimi anni sono stati già realizzati alcuni programmi collaborativi interlaboratori. Tra questi si fa riferimento in particolare a tre studi aventi per oggetto il dosaggio dell'insulina, di cui il più recente è promosso e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa.

Molto importante è la disponibilità di materiali standardizzati; per gli antigeni già ne esistono alcuni, ma è auspicabile che da parte dei diversi produttori vengano seguiti criteri di standardizzazione più uniformi. Anche a livello di applicazione dei metodi RIA a scopo diagnostico esiste l'esigenza di fare uso di schemi-base standardizzati che comprendano e forniscano in maniera univoca le informazioni utili a meglio definire nel loro insieme il significato clinico dei dati analitici ottenuti.

**Summary** (*Evaluation and standardization of radioimmunological assays*). — The term « standardization » may be applied to RIA methods to indicate the « definition of quality characteristics » the level of which must be defined on the basis of the evaluation of the « analytical procedure , specific reagents » system. Each laboratory, by applying a suitable long-term quality control system, must assure the consistent maintenance of the « standardization status » established for all methods it uses. As a matter of fact, in the case of RIA, materials are used that have a limited stability, that cannot be produced in large quantities, and that possess a complex composition not always well defined chemically. However, a remarkable role in the standardization process belongs to the producers of special reagents intended for RIA.

In order to help the standardization of RIA methods, some programs of inter-laborator cooperation have been worked out in recent years. Among them mention is specifically made of three studies regarding the dosage

of insulin: the most recent of them is devised and coordinated by the Istituto Superiore di Sanità in cooperation with the Laboratory of Clinical Physiology of the National Research Council of Pisa.

The availability of standardized materials is extremely important: for antigens, some materials are already in existence, but it is desirable that the various manufacturers shall follow more uniform criteria in their standardization. As far as the application of the RIA methods in the diagnostic field is concerned, the need exists for the use of standardized basic schemes that would include and unambiguously express all the useful information available in order to define better the clinical significance of the analytical data obtained.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) COTES, P. M., M. V. MUSSETT, I. BERRYMAN, R. ERINS, S. GLOVER, N. HALES, W. M. HUNTER, C. LOWY, R. W. J. NEVILLE, E. SAMOLS & P. M. WOODWARD. *J. Endocrinol.*, **45**, 557 (1969).
- (2) GARCIA, E. J. & R. SARACCI. *Panel on Standardization of Radioimmunoassay Procedures*, IAEA, Vienna 3-7 luglio (1972).
- (3) COSTANTINI, A., O. LOSTIA, R. MALVANO, E. ROLLERI, F. TAGGI, E. G. ZUCHELLI. *J. Nucl. Biol. Med.*, **19** 164 (1975).
- (4) 20th Expert Committee on Biological Standardization. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **334** (1968).
- (5) 21th Expert Committee on Biological Standardization. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, **413** (1969).
- (6) OUTSCHOORN, A. S. *Panel on Standardization of Radioimmunoassay Procedures.*, IAEA, Vienna 3-7 luglio (1972).
- (7) COTES, P. M., *Proc. Symp. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, Istanbul, 10-14 Sept. 1973. IAEA, Vienna, **1**, 71 (1974).