

Errori di adattamento nell'utilizzo della funzione logistica a 4 parametri (4pl). Proposta di un modello di interpolazione sequenziale.

Vincenzo Miluccio¹, Adele Rolandi¹, Bruno Dente², Dario Spiteri³

¹Laboratorio Patologia Clinica - C.D. Molosiglio - Distretto 44 - ASL Napoli 1

²Laboratorio Patologia Clinica - Ospedale S.Paolo - ASL Napoli 1

³Laboratorio Patologia Clinica - Distretto 48 - ASL Napoli 1

Abstract

Fitting errors in 4PL methods. Proposal of a sequential interpolation model.

Transformation of a scattering graphic in a continuous function is realized with different methods. Frequently the fitting does not result good, owing to not availability theoretical models able to explain in exhaustive way the biochemical procedure dynamics. 4PL, is considered a very useful and versatile model, for fitting immunometric dosages, for the generation of mathematical functions best fitting signals/concentration pairs in immunoassay. However, it can originate bias making unreliable also the results from very good analytical systems. Statistical valuation and the search of a continuous graphic arising by two 4PL functions can eliminate or minimize bias.

Riassunto

La trasformazione di un grafico a dispersione in una funzione continua può essere realizzata con diverse tecniche di interpolazione. Non sempre l'adattamento risulta ottimale per l'indisponibilità di modelli teorici atti ad interpretare in maniera esaustiva la dinamica dei processi biochimici. Il modello Logistico a 4 Parametri (4PL), considerato il più utile e versatile per l'adattamento segnale-concentrazione nei metodi immunochimici, può originare inaccurately tali da far considerare inaffidabili anche sistemi analitici caratterizzati da un notevole grado di precisione. La stima statistica e la ricerca di un grafico continuo generato da due funzioni 4PL nell'ambito della stessa procedura di calibrazione possono contribuire ad eliminare o minimizzare le inaccurately.

Introduzione

Nei laboratori biochimici di norma si dispone di pochi dati sperimentali sui quali costruire curve segnale-concentrazione. In altri termini un numero limitato di osservazioni deve essere elaborato in maniera da individuare una funzione matematica idonea per definire la concentrazione dell'analita per qualsiasi risposta fornita dal sistema rilevatore. Tale procedura, nota come interpolazione, può appartenere a tre diverse linee di pensiero:

- a) attribuire molta fiducia alle osservazioni (interpolazione rettilinea ed interpolazione spline)
- b) associare alla disposizione dei punti una funzione matematica nota
- c) costruire un modello matematico descrittivo della dinamica del processo e rappresentativo, con i suoi parametri, delle entità chimico-fisiche in gioco.

Interpolazione lineare e interpolazione spline

Prescindono dal fenomeno oggetto di studio.

Nella prima l'obiettivo di trasformare una distribuzione dispersa di punti in un grafico continuo viene raggiunto unendo i punti consecutivi con segmenti. Gli intervalli internodali sono definiti ciascuno dall'equazione di una retta.

L'interpolazione "spline", introdotta dagli economisti

Poirier e Garber¹, segue la stessa logica: : ciascun intervallo internodale risulta definito da una polinomiale (generalmente del 3° ordine) per cui, anche in questo caso, più funzioni interpolatrici sono necessarie per la copertura del dominio della variabile indipendente.

Questi due modelli di interpolazione presentano dei limiti:

- 1) non consentono estrapolazioni
- 2) la bontà di adattamento delle rette o curve ai valori osservati non è stimabile con test statistici risultando imposto il passaggio per i punti di osservazione o in un loro intorno.
- 3) non realizzano la perequazione
- 4) pur presentando il vantaggio di non generare bias significativi sui nodi non si ha certezza che le distorsioni possano determinarsi all'interno degli spazi internodali.
- 5) per le funzioni spline necessita una disposizione ad intervalli regolari, crescente o decrescente, dei punti di osservazione; il che impone spesso la preventiva trasformazione delle variabili.

La costruzione del modello

Un saggio immunochimico (ma il concetto potrebbe essere facilmente estrapolato ad altre tipologie di applicazioni laboratoristiche) può essere, nelle sue linee essen-

ziali, ricondotto a due momenti fondamentali :

1) nel microsistema dove si sono sviluppate le reazioni residua una certa quantità di composto coniugato al tracciante (causa di natura biochimica)

2) il tracciante, agendo sul sistema rivelatore, lo induce ad emettere un segnale (effetto di natura fisica).

Sussiste quindi la relazione $y = f(c)$ con $y =$ segnale e $c =$ coniugato. Tale relazione può ritenersi almeno in prima istanza lineare (fig. 1) .

Se è "d" la risposta corrispondente ad una concentrazione nulla del tracciante (bianco o rumore di fondo del sistema) ed "a" la risposta massima corrispondente alla saturazione da parte del tracciante di tutti i siti "S" disponibili, la relazione assume la forma

$$y = \frac{(a - b)}{S} c + d \quad [1]$$

che è l'equazione di una retta.

Nei metodi immunochimici non competitivi ad ogni unità di coniugato corrisponde un'unità antigenica o anticorpale interessata alla formazione dell'immunocomplesso per cui sussiste l'uguaglianza $c = x$ con $x =$ analita da misurare. La relazione [1] si trasforma nell'altra

$$y = \frac{(a - b)}{S} x + d \quad [2]$$

capace di correlare la concentrazione dell'analita al segnale rilasciato dall'apparato rivelatore.

Nei metodi immunochimici competitivi l'analita da misurare ed un composto coniugato (molecola marcata con un tracciante) competono per i ligandi finendo con l'occupare un numero di siti proporzionale alle rispettive concentrazioni. La quantità di coniugato capace di fissare i siti, per la teoria delle probabilità, è pari a

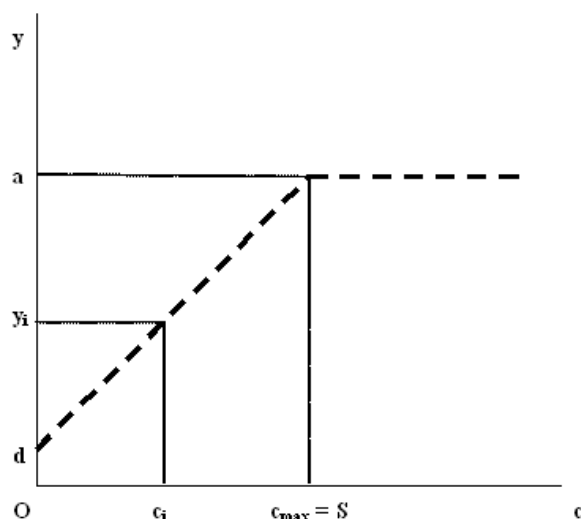


Figura 1

Modello teorico delle reazioni immunochimiche. Per tutte le tecniche sussiste sempre la relazione tra il segnale (y) e la concentrazione di coniugato (c) fissato all'immunocomplesso. Il numero di siti reattivi disponibili (S) definisce la concentrazione massima di coniugato complessabile (c_{max}) cui corrisponde il segnale analitico massimo (a). In assenza di coniugato ($c=0$) il sistema restituisce un segnale (d) corrispondente al bianco (rumore di fondo).

$$\frac{c}{x + c} S \quad [3].$$

Sostituendo la [3] al posto di "c" nella [1] si ottiene

$$y = (a - b) + \frac{c}{x + c} + d \quad [4]$$

e quindi

$$y = \frac{a - b}{1 + \frac{x}{c}} + d \quad [5]$$

ovvero

$$y = \frac{dx + ac}{x + c} \quad [6]$$

L'equazione [5], che potrebbe essere definita **curva logistica a tre parametri** (3PL), è identica alla [6] espressione di una funzione omografica.

La funzione omografica (fig 2). è definita negli assi x, y ed è parte dell'iperbole equilatera che si ottiene per traslazione dell'origine O in O' con assi X, Y

In questa funzione interessante è lo studio dei parametri. Il parametro "a" è l'intercetta sull'asse y per $x=0$; "d" è l'asintoto orizzontale traslato; "-c" è l'asintoto verticale all'asse traslato corrispondente nel suo valore positivo ($x = c$) alla concentrazione di analita per cui la risposta è quasi pari alla metà del valore massimo (Punto di rotazione P che individua il limite tra la prevalenza di x su "c" e viceversa). Dovendo sussistere per ogni punto del grafico la relazione

$XY = costante = (a - d)c$, il parametro "c", definisce il profilo del grafico.

I parametri "a" e "d" invece lo posizionano sul piano

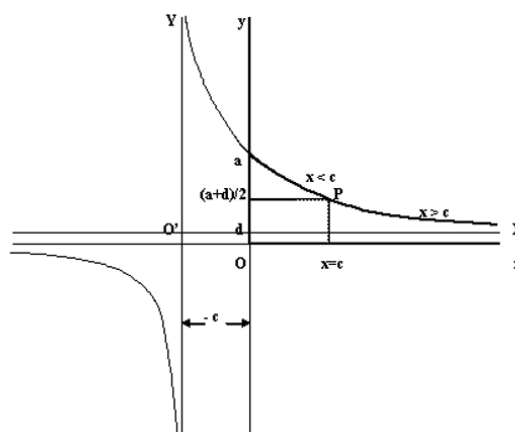


Figura 2

Funzione omografica . La porzione utile è quella limitata dai semiassi positivi del 1° quadrante del piano xOy . "a" e "d" sono i segnali corrispondenti alla concentrazione nulla o massima di analita e definiscono la posizione della curva nel quadrante. La concentrazione di coniugato "c" utilizzata per la reazione individua il punto di rotazione (P) e definisce la forma della curva.

cartesiano.

Lo studio del parametro "c" suggerisce che (fig.3) volendo privilegiare la stima di analiti presenti in concentrazioni molto basse bisogna operare con concentrazioni ridotte di coniugato (c") e viceversa per la migliore stima delle concentrazioni elevate (c').

I parametri "a" e "c" sono l'espressione delle entità biochimiche del sistema definendo "a" la risposta corrispondente al numero di siti reattivi disponibili e "c" la concentrazione di composto coniugato posto a reagire.

Alla funzione 3PL si perviene ipotizzando che la competizione tra analita e coniugato si sviluppa in maniera paritaria secondo la teoria classica delle probabilità non condizionate [3]. Per considerare le diversità tra le due specie molecolari in competizione che, seppur minime sono comunque esistenti, ed altri fenomeni (effetto matrice, natura del tracciante, isotopia, etc.) necessita trasformare la [3] nell'altra

$$\frac{c}{x^b + c} + SF [7],$$

implementante nel parametro esponenziale "b" le eventuali diversità, per cui la funzione 3PL diventa una funzione **logistica a 4 parametri (4PL)**

$$y = \frac{a - b}{1 + \frac{x^b}{c}} + d [8]$$

ovvero

$$y = \frac{dx^b + ac}{x^b + c} [9]$$

La [9] è una funzione omografica di ordine "b" (fig 4).

Nella 4PL si individuano quindi due parametri di forma ("c" e "b") e due parametri di posizione ("a" e "d"). Tale distinzione costituisce il fondamento delle curve master in quanto, potendosi ritenere inalterabili entro i limiti fissati dal produttore i parametri di forma, mediante l'utilizzo di

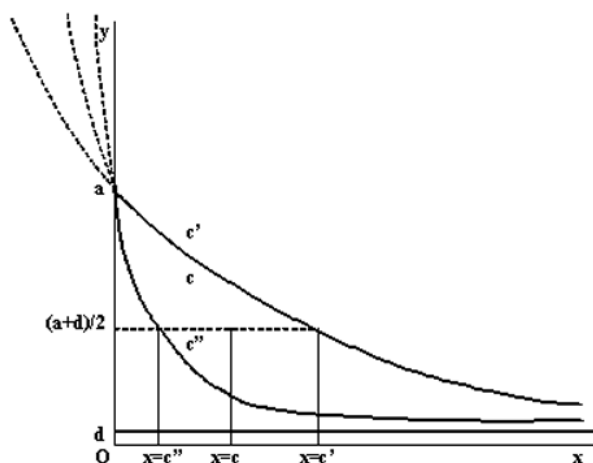


Figura 3
La concentrazione di coniugato "c" definisce l'andamento del grafico (parametro di forma). "a", in quanto corrispondente alla condizione in cui i siti reattivi sono tutti complessati dal coniugato, è la stima del numero di siti disponibili. "c" è la concentrazione di coniugato posto a competere con l'analita da dosare.

due soli punti è possibile ridefinire di volta in volta i parametri di posizione. Tali procedure sono comunque affidabili solo in regime di perfetta custodia dei reagenti (facilmente alterabili anche per protratte esposizioni all'aria per fenomeni di ossidazione e di evaporazione) e nell'ambito di un rapido consumo dei kit diagnostici.

Estensione del modello alle tecniche sandwich

La funzione 4PL [8] viene utilizzata anche per la tecnica sandwich. In questo caso non si tratta della costruzione di un modello matematico ma dell'utilizzo di una funzione nota che ben si adatta alla distribuzione dei punti osservati per cui i parametri sono in parte privi di significato biochimico. Se nella [8] è b < 0 la funzione si trasforma nell'equazione

$$y = \frac{a - b}{1 + \frac{1}{cx^b}} + d [10]$$

ovvero

$$y = \frac{acx^b + d}{cx^b + 1} [11]$$

con b > 0

La [11] è una funzione omografica di ordine "b" definita negli assi x,y derivata dall'iperbole equilatera che si ottiene per traslazione dell'origine O in O' con assi X,Y ed asintoti "- 1/c" e "a" (fig.5).

Le funzioni logistiche

La funzione omografica, nota da diversi secoli, fu inizialmente utilizzata (sotto la forma e con il nome di funzione logistica) per la valutazione dei metodi radioimmunologici (2-16) ed estesa poi a tutte le determinazioni

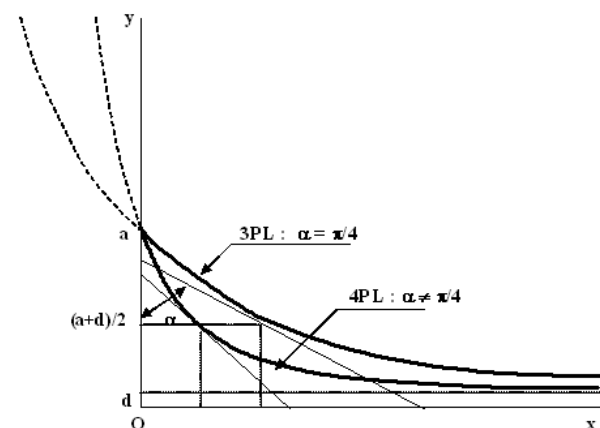


Figura 4
Funzione omografica di ordine b. La tangente al punto di rotazione (pari a 1 nella 3PL) può assumere, almeno in teoria, i valori : 0 < tg alpha < infinity. Il parametro "b" si associa al parametro "c" nel definire la forma della curva intervenendo, nel modellamento del grafico, senza spostare l'asintoto(d) e l'intercetta (a).

immunochimiche.

Non è noto quando il termine logistico fu utilizzato per la prima volta e neppure risulta in qualche modo spiegata la scelta di tale terminologia (17). Una funzione definita logistica fu introdotta dal matematico P. Verhulst per spiegare i trend di crescita

$$y = \frac{A}{1 + Ke^{-bx}} \quad [12]$$

Un'altra equazione, anch'essa definita logistica e dalla stessa per certi versi derivata, fu proposta da Gompertz per la rappresentazione dei fenomeni di farmacocinetica

$$y = Ke^{cx} \quad [13]$$

In generale le logistiche sono funzioni esponenziali in base "e" (stressando il ragionamento la stessa equazione di De Moivre utilizzata per la distribuzione delle frequenze potrebbe essere una logistica) rappresentate da grafici sigmoidali.

Altri Autori (18) hanno ipotizzato l'utilizzo della 4PL anche per i grafici sigmoidali.

In effetti tale curva può risultare utile nel rappresentare i fenomeni di saturazione disponendo di un ramo asintotico, ma non per la rilevazione delle dosi sub-efficaci (non sufficienti per indurre risposte rilevabili) trattandosi comunque di una curva direttamente derivata dall'iperbole equilatera.

L'adattamento con lo stimatore dei minimi quadrati.

Nei metodi immunometrici (e non solo) da un insieme di dati campionari (nello specifico i punti di calibrazione),

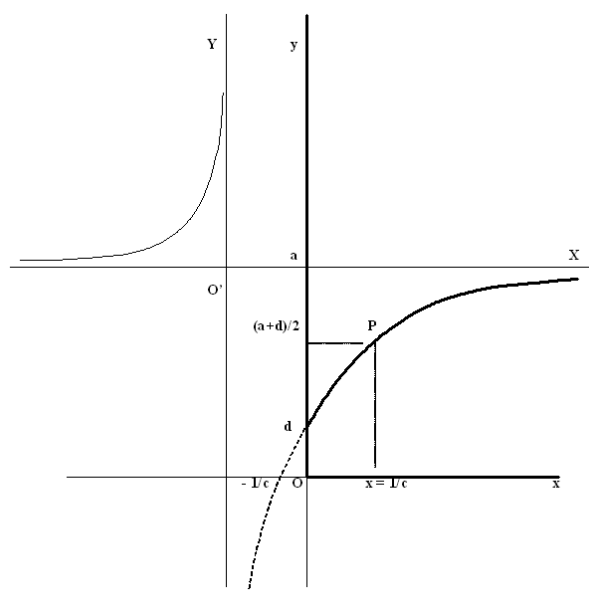


Figura 5

Funzione logistica a 4 parametri (4PL) nei metodi immunometrici non competitivi. Il grafico si sviluppa all'interno del 1° quadrante del sistema xOy (linee a maggior spessore). In "d" la concentrazione di analita (x) è nulla ed è massima in "a". Anche in questo caso il parametro "c" definisce la forma della curva.

nota la funzione interpolatrice, occorre utilizzare uno stimatore, ossia delle formule matematiche o dei metodi, per stimare i parametri ignoti.

Gauss e Markov, con un importante teorema, dimostrarono che nell'ambito degli stimatori lineari quello dei minimi quadrati ha la minima varianza. Tale dimostrazione non solo consentì a tale stimatore di diventare il metodo di elezione, ma costituì anche il fondamento per l'elaborazione dei più importanti metodi di valutazione statistica (correlazione, analisi della varianza, etc.).

Il metodo consiste nel rendere minima la sommatoria dei quadrati degli scarti tra valori osservati ed attesi

$$SS = \sum_{i=1}^n (y_o - y_a)^2 \quad [14]$$

e viene utilizzato in numerose varianti come la pesatura rispetto alla DS del campione ed altre.

Applicato a funzioni lineari consente di definire, con l'esattezza del rigore matematico, il valore dei parametri. Molti Autori (19) ritengono che l'utilizzo dei minimi quadrati debba appartenere solo alle funzioni lineari o linearizzabili; Altri (20) invece ritengono che la conversione in forma lineare della relazione determina una maggiore incertezza nella definizione dei parametri.

La 4PL può essere linearizzata nella forma

$$\ln \left(\frac{a-y}{y-d} \right) = b \ln x - \ln c \quad [15]$$

che viene di norma utilizzata dagli adattatori commerciali per una preliminare informativa sui valori dei parametri "b" e "c". La vasta disponibilità di strumenti informatici ha favorito l'utilizzo dei metodi di adattamento non lineari dei minimi quadrati. Tali packages utilizzano una combinazione dei metodi di Gauss-Newton e Levenberg-Marquardt (21-23). Il programma verifica inizialmente la differenza tra le somme dei quadrati degli scarti ottenute attribuendo valori diversi ai parametri.

Le derivate parziali del rapporto tra l'ammontare delle differenze e la variazione parametrica orientano per le successive modifiche da apportare ai parametri fino a che il sistema, procedendo per iterazioni, raggiunge la "convergenza" intorno a valori limite non ulteriormente decrementabili (24). Altre procedure di adattamento basate su algoritmi più semplici sono state descritte da Rodbard e coll. (25). Tali procedure, per la disponibilità di tecnologie informatiche sempre più sofisticate, sono oggi in disuso.

Nonostante l'accuratezza di tali sistemi di elaborazione non è infrequente osservare come l'adattamento di una 4PL ai dati empirici risulti insoddisfacente al punto da generare bias anche di notevole spessore lungo il profilo della curva (fig. 6).

Alcuni Autori (18) sostengono che ciò è dovuto ad un lieve grado di asimmetria della curva.

Prentice e coll. (13) nel tentativo di modificare tali asimmetrie hanno aggiunto alla 4PL un ulteriore parametro trasformandola in una 5PL

$$y = \frac{a - b}{\left(1 + \frac{x^b}{c}\right)^p} + d \quad [16].$$

Rodbard e coll(25) hanno elaborato ulteriori estensioni dei parametri fino a sette.

Tali innovazioni da una parte consentono migliori adattamenti, ma dall'altra appesantiscono i sistemi, necessitando un maggior numero di punti di calibrazione, e facendo anche perdere ai parametri originari della 4PL il proprio significato biochimico.

In realtà una funzione omografica, in quanto derivata da un'iperbole equilatera, deve essere necessariamente simmetrica rispetto agli assi traslati dovendo risultare verificata la relazione $X^b Y = (a - d)c$ [17] lungo l'intero profilo della curva.

Ciò che appare come un'asimmetria (figg. 2 e 5) è dovuto al fatto che la curva intercetta l'asse y in un punto, mentre rispetto all'asse x procede in maniera asintotica. Queste curve pertanto dispongono di un estremo dosabile e di un altro estremo che, in quanto tendente asintoticamente all'infinito, è solo stimabile mediante le procedure di fitting.

Analisi delle inaccurately

Se nel processo di interpolazione oltre a registrarsi scostamenti dovuti ad inevitabili fluttuazioni casuali si registrano anche dei bias è lecito ipotizzare che il modello non contiene tutti gli elementi per una corretta interpolazione o che qualche parametro non interpreta in maniera esaustiva il fenomeno. Nei sistemi immunochimici i livelli di difficoltà sono notevoli per l'indefinitone degli analiti spesso coinvolti nelle reazioni solo per una loro parte (epitopi), il che rende impossibile l'utilizzo di modelli convenzionali di stechiometria, termodinamica o termocineti-

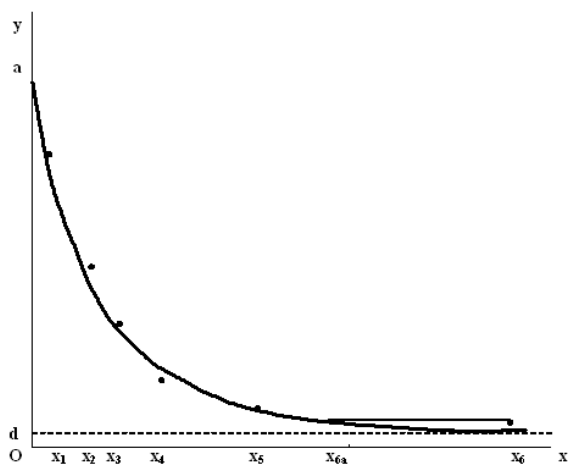


Figura 6
Adattamento con i minimi quadrati. Con le funzioni 4PL possono determinarsi dei bias capaci di incidere in maniera grave sulla stima dell'analita. In figura, per effetto dell'interpolazione, ad un campione con concentrazione pari al calibratore x_6 verrebbe attribuito un valore x_{6a} molto diverso dal valore vero

ca. Nella formulazione del modello 4PL il parametro "b" viene introdotto per l'adattamento del grafico ai dati empirici partendo dall'ipotesi che le specie molecolari in competizione possano avere un diverso grado di avidità per la molecola complementare ed in generale una diversa reattività dovute a concause diverse. Lo studio del parametro "b" attraverso un diagramma Logit/Log (fig. 7) mette in risalto come questi possa ritenersi più o meno costante nella zona di equivalenza intervenendo, nelle condizioni di netta prevalenza di un composto sull'altro in competizione, altri fenomeni (come gli effetti sterici), il tutto esaltato poi dagli andamenti asintotici con la conseguente comparsa di robuste distorsioni.

D'altro canto l'utilizzo di una variabile "b" dose dipendente renderebbe il modello ancora più complesso con ulteriori difficoltà nella stima dei parametri.

Per tali motivi l'utilizzo della 4PL, almeno nelle tecniche di competizione (e retrotitolazione), dovrebbe essere limitato alla zona di equivalenza. Tale scelta però non risulterebbe ottimale sia per motivi di ordine economico (frequenti ripetizioni in diluizione di misure fuori range) che di ordine tecnico (indisponibilità di diluenti per alcuni analiti; impossibilità di concentrare campioni a basso titolo). In molti casi si preferisce quindi accettare la sistematizzazione dell'errore.

Aspetti sperimentali : stima d'insieme e stima nodale.

La verifica della bontà di adattamento di una curva alle osservazioni, effettuata con procedure derivate dallo stimatore dei minimi quadrati (analisi della varianza, coefficiente di correlazione multipla, etc.) e la stessa stima dei parametri effettuata con metodi inferenziali, forniscono informazioni solo sulla globalità del risultato per cui, a parità di indici di stima, è possibile riscontrare in alcuni casi

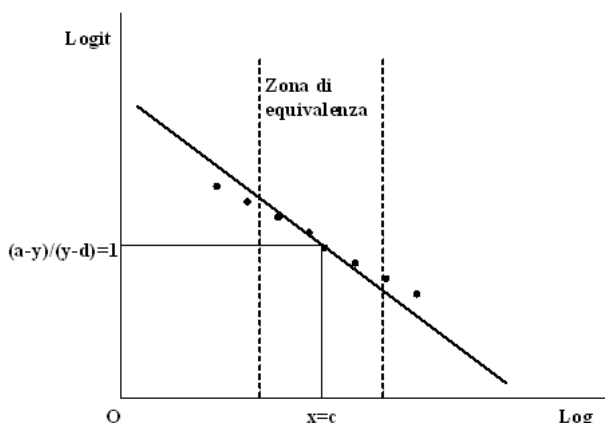


Figura 7
Stima del parametro "b" attraverso una rappresentazione Logit/Log. Gli scarti dei dati empirici dalla retta evidenziano come tale parametro possa ritenersi costante solo in un limitato intorno del punto di rotazione (zona di equivalenza)

il determinarsi di bias anche consistenti lungo il profilo del grafico (fig 8).

Una serie di verifiche realizzate nei nostri laboratori su sistemi ben affidabili del commercio (Axsym e Autodelfia) e con l'utilizzo di un sistema informatico per l'analisi statistica delle regressioni non lineari (20) ha fornito nella procedura di calibrazione i risultati delle tabelle 1,2,3 (che si riportano quale esempio rispetto alle molteplici esperienze realizzate). La verifica mediante la statistica F ha evidenziato nei tre casi un adattamento della curva ai punti di osservazione pressoché ottimale con probabilità di errore inferiore a 10^{-5} . Anche altri indicatori statistici (tutti comunque derivati dallo stimatore dei minimi quadrati) come il coefficiente di determinazione multipla e la varianza spiegata dalla regressione, si sono espressi in maniera sovrapponibile. Nella terza colonna sono stati riportati invece i valori di retrotitolazione (backfit) ossia le concentrazioni dei calibratori stimate mediante la funzione interpolatrice individuata con l'analisi statistica della regressione non lineare. Ciò che emerge dal confronto di tali risultati con i valori nominali dei calibratori è che l'affidabilità dei sistemi analitici utilizzati, capaci di esprimere una notevole precisione, risulta "mortificata" dalle inaccurattezze anche

notevoli generate dalla procedura di interpolazione. In altri termini la stima dell'adattamento della curva ai punti di campionamento non consente di individuare la presenza di inaccurattezze che a volte possono essere anche di notevole entità.

La calibrazione con due replicati, di norma utilizzata nei dosaggi immunochimici, permette di valutare mediante la distribuzione "t" l'entità degli errori sui nodi fissato il livello di significatività. La statistica "t", basata sul rapporto tra lo scarto della media dei valori di backfit rispetto al valore vero e l'errore standard dei valori di backfit, si riduce, nel caso di un sistema con un solo grado di libertà, alla semplice relazione

$$t = \frac{(x_v - x_a) + (x_v - x_b)}{x_a - x_b}$$

[18] con x_v = valore vero e x_a, x_b = valori di backfit. Valori di t superiori al valore tabellare sono indicativi della presenza di bias generati dalla procedura di interpolazione. Nella quarta colonna delle tabelle sono stati riportati i valori del test "t" risultato in molti casi notevolmente significativo. (Tabella 1,2,3).

L'interpolazione sequenziale

Il modello 4PL è considerato il più utile e versatile per l'adattamento dei dati segnale-concentrazione nei dosaggi immunochimici ed è quello di gran lunga più utilizzato nei sistemi in uso nonostante possa determinare errori di valutazione di una certa consistenza. In questi casi l'utilizzo di materiali di controllo non è di grande ausilio nell'individuazione degli errori in quanto, essendo per lo più definiti per consenso, contengono nel loro intervallo di stima (generalmente ampio) l'errore sistematizzato.

L'errore nell'interpolazione 4PL è essenzialmente dovuto all'estensione del range di misura e si determina, nelle tecniche per competizione, prevalentemente lungo l'asintoto orizzontale (fig. 6) dove escursioni anche modeste della risposta producono notevoli variazioni nella stima dell'analita. I bias sui nodi, rilevabili con la statistica "t", determinano poi inaccurattezze anche nei tratti internodali contigui.

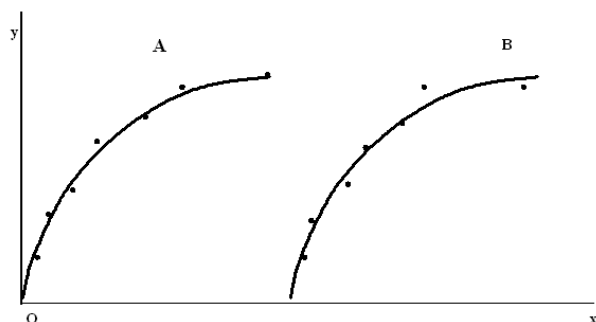


Figura 8
L'adattamento della curva ai dati empirici, a parità di sommatoria di scarti quadrato, può generare (B) o non generare (A) bias

Tabella 1
Verifica comparativa di due metodologie di interpolazione. Determinazione di FT3 con metodo immunochimico competitivo (Sistema Axsym)

Concentrazione (x) pmol/L	Segnale (y)	Interpolazione 4PL		Interpolazione sequenziale		
		Backfit	Test "t"	Backfit 1°	Backfit 2°	Test "t"
0,00	1221,2-1239,4	0,00-0,01	+1,000	0,00-0,02		+1,000
1,40	844,6-1035,4	1,91-1,07	-0,213	1,90-0,93		+0,030
3,50	593,5-612,0	3,36-3,23	-1,545	3,67-3,43		0,000
7,00	275,9-280,8	7,41-7,30	+6,180		7,04-6,97	0,000
15,0	101,5-101,6	17,8-17,8	+251,45		15,01-14,97	0,000
30,0	81,06-81,97	22,0-21,7	-68,428		32,04-28,42	+0,120

Stima della curva: F=259,1; Prob (F)=0,00001

Coordinate punto limite: P (5,09;428,9)

Stima sui nodi: significatività al test $t_{0,05}=6,314$

Tabella 2

Verifica comparativa di due metodologie di interpolazione. Determinazione di HCG con metodo immunochimico non competitivo /Sistema Autodelfia)

Concentrazione (x) pmol/L	Segnale (y)	Interpolazione 4PL		Interpolazione sequenziale		
		Backfit	Test "t"	Backfit 1°	Backfit 2°	Test "t"
0,00	334-362	0,00-0,00	+0,000	0,00-0,03		+1,00
2,00	1426-1489	1,45-1,57	-,8,160	1,94-2,05		0,00
10,0	6088-5936	10,2-9,90	-0,290	10,1-101,2		+0,02
100	55496-56814	100,2-102,51	+1,130	98,8-101,2		0,00
1000	545838-554027	992-1007	+0,050		998-1007	0,00
5000	2481505-2493426	4986-5014	+0,010		4986-5014	0,00
10000	4398137-4365422	10049-9951	+0,000		10049-9951	0,00

Stima della curva: F=183676; Prpb (F)=0,00001

Stima sui nodi: significatività al test_{0,05}=6,314

Tabella 3

Verifica comparativa di due metodologie di interpolazione. Determinazione di estradiolo con metodo immunochimico competitivo (Sistema autodelfia)

Concentrazione (x) pmol/L	Segnale (y)	Interpolazione 4PL		Interpolazione sequenziale		
		Backfit	Test "t"	Backfit 1°	Backfit 2°	Test "t"
0,00	103504-101239	0,00-0,00	+0,000	0,00-0-04		+1,000
13,60	91095-87076	14,97-19,94	-1,550	12,19-18,26		+0,530
40,90	75366-74576	35,19-36,30	-9,360	38,55-40,03		-1,850
136,00	30981-31247	157,00-155,37	+24,77	136,7-136,1		+1,210
409,00	17683-16894	305,61-322,98	-10,97		394,6-424,2	-0,030
1362,00	7572-7489	1089,61-1116,99	-18,90		1352,1372	-0,070
4089,00	3496-3512	∞-∞	-∞		3276-4071	-1,040

Stima della curva: F=259,1; Prob(F)=0,00001

Coordinate punto limite: P (222,17;22948)

Stima sui nodi: significatività al test_{0,05}=6,314

I metodi spline, non generando bias sui punti di calibrazione, costituirebbero sotto questo aspetto una valida alternativa. L'unione tra nodi contigui viene però realizzata con funzioni polinomiali e non con funzioni omografiche che meglio interpretano la dinamica dei processi. Per coniugare i vantaggi delle due tipologie di interpolazione abbiamo studiato un metodo di adattamento alternativo da utilizzare nei casi in cui la statistica "t" evidenzia la presenza di bias significativi nel fitting con la 4PL. Tale sistema prevede una doppia interpolazione escludente alternativamente i punti di calibrazione più lontani dei due rami dell'iperbole. Le due interpolazioni parziali, rese libere dal vincolo di dover minimizzare i quadrati degli scarti lungo l'intero dominio della variabile indipendente, si adattano meglio ai punti di osservazione generando due curve intersecatesi in un punto P (fig.9)

Utilizzando le equazioni linearizzate [14] si può determinare il valore limite (y_1) di utilizzo delle due funzioni.

$$y_1 = \frac{a_1 + d_1 + c_0 \ln \left[b_1 \left(\frac{\ln c_2 - \ln c_1}{b_1 - b_2} \right) + \ln c_1 \right]}{1 + c_0 \ln \left[b_1 \left(\frac{\ln c_2 - \ln c_1}{b_1 - b_2} \right) + \ln c_1 \right]} \quad [19]$$

Nelle colonne 5 e 6 delle tabelle sono riportati i valori di backfit dei calibratori stimati con i due fitting parziali. La stima con il t di Student (colonna 7) evidenzia in tutti i casi l'azzeramento o il notevole ridimensionamento dei bias. Nelle tecniche immunochimiche non competitive la funzione 4PL viene utilizzata in quanto ben si adatta alle osservazioni. Le due interpolazioni parziali, in questo caso, di norma non si intersecano (dal punto di vista matematico la [19] risulta indeterminata o impossibile) (fig. 10). In presenza di bias significativi è comunque possibile perseguire l'obiettivo del contenimento sempre con una tecnica sequenziale individuando con metodi iterativi il limite di utilizzo di ciascuna funzione.

Conclusioni

La costruzione di modelli teorici capaci di interpretare le dinamiche di processi biochimici complessi conduce inevitabilmente, per le molteplici variabili interdipendenti implicate, alla formulazione di modelli semplificativi. Ciò determina spesso un adattamento imperfetto della funzione analitica ai punti di osservazione con consequenziali errori di stima anche di notevole spessore. In questi casi l'affidabilità dei sistemi analitici risulta alquanto compro-

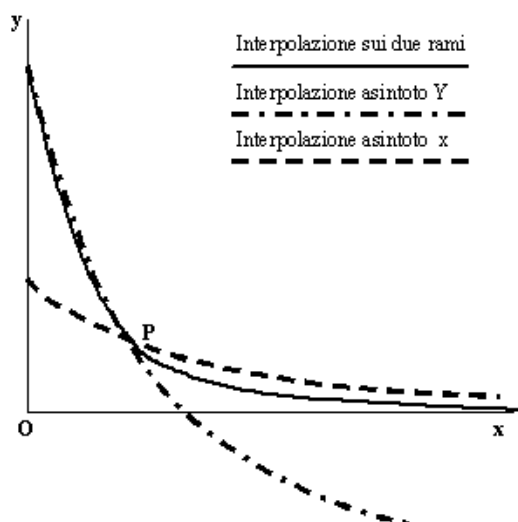


Figura 9
Interpolazione sequenziale. Tecnica di competizione. Le curve si intersecano nel punto P

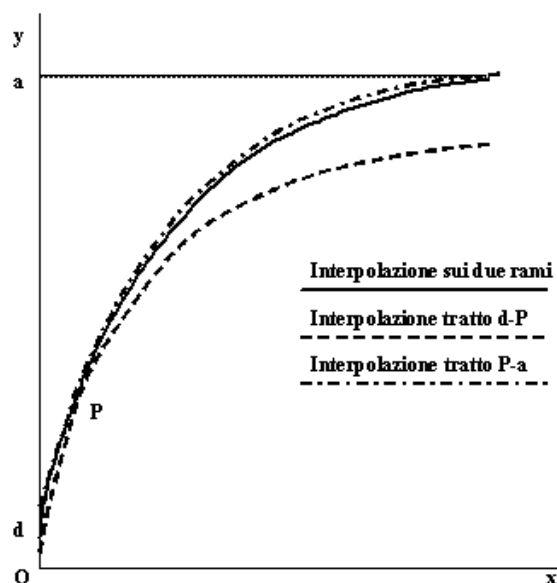


Figura 10
Interpolazioni parziali nel dosaggio immunochimico non competitivo. Le due curve possono presentare un punto P di tangenza o di minima distanza.

messa pur in presenza di tecnologie sofisticate capaci di assicurare una notevole precisione.

L'analisi dei limiti dei modelli teorici può consentire gli interventi correttivi più idonei per eliminare le inaccuratze.

Bibliografia

1. D.J. Poirier, S.G. Garber - The determination of aerospace profit rater 1951-1971 - Southern Economic Journal -1974; 41: 228-238.
2. Finney D.J - Response curves for radioimmunoassay. Clin.Chem 1983; 29: 1762-1766
3. Berkson J. : Application of the logistic function in to bioassay. J.Am.Statist Assoc. 1994;39: 357-365
4. Brown E.M., Fedak S.A. , Woodard S.A., Aurbach GD , Rodbard D. : Beta-adrenergic receptor interactions : Direct comparison of receptor interactio. Direct comparison of receptor interaction and biological activity. Journal of Biological Chemistry 1976 ; 251 : 1239-1246
5. Callard G.V. : Corticotropic effects on isolated interregal cell of the turtle.General and comparative Endocrinology 1975; 26 : 301-309
6. Chou SK, Liu SH : Comparison of pituitary gonadotropic extract and prolactin on ovarian and uterine response in immature rats. Proc.Soc.Exptl.Biol. 1937; 228-234.
7. Coy DH, Larbie F, Savary M, Schally EJ : Releasing activity of potent LH-RH analogs in vitro. Bioch. And Biophysical research Comm 1975 ; 67 : 576-582
8. Drouin J, De Lean A, Rainville D, Lachance R, Labrie F : Characteristics of interatio between TRH and somatostatin for TSH and prolactin release. Endocrinology 1976; 98:514-521
9. Emmens C. The dose-response relation for certain principles of the pituitary gland of the serum and urine of pregnancy; J.Endocrin. 1940; 2: 194-225
10. Eng LFR, Lee YL, Miles LM, Measurement of glial fibrillary acidic protein by a two-site immunoradiometric assay; Analytical Biochemistry 1976 ; 71:243-259
11. Finney DJ : Radioligand assay. Biometrics 1976 ; 32: 721-740
12. Healy MRJ : Statistical analysis of radioimmunoassay data ; Biochemical Journal 1972; 130:207-210
13. Prentice RLA : A generation of the probit and logit methods for dose-response curves; Biometrics 1976 ; 130: 761-768
14. Rodbard D : Apparent positive cooperative effects in cyclic AMP and corticosterone production by isolated adrenal cells in response to ACTH analogues. Endocrinology 1974; 94: 1427-1437
15. Rodbard D. : Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. Clin. Chem. ; 1974 ; 20: 1255-1270
16. Rodbard D, Hutt DM : Statistical Analysis of Radioimmunoassays and immunoradiometric (labelled antibody) assays. A generalized, Weighted, iterative least squares method for logistic curve fitting; Radioimmunoassay and related procedures in Medicine ; Vol 1, Vienna - Intl Atomic Energy Agency; 1974.
17. Batschelet E : Introduction to Mathematics in Life Science ; Berlin - Springer Verlag, 1971
18. Jungbauer A, Graumann K. : La funzione dose-risposta logistica : un affidabile strumento per la valutazione die fenomeni di transizione in campo biologico; Journal of Clinical Ligand Assay 2001 ; 24 : 281-285
19. Johnston J. : Econometrics Methods - 3^a edizione - Copy-

- right 1984,1972,1963 by Mac Graw Hill; Inc., New York; U.S.A.
20. Sherrod P.H. : Nonlinear Statistical Regression Program - Version 3.0 - Copyright 1992-1994 - by Mac Graw-Hill, Inc.; New York; U.S.A.
 21. Marquardt D.W. : An algorithm for least squares estimation of parameters - Journ. Soc. Ind. Appl. Math. 1963 ; 11: 431-441
 22. Shrager RI : Regression with linear constraints : an extension of magnified diagonal method. Journal Ass. Comp. Machinery 1970 : 17.
 23. Press WH, Flannery BP.,Teukolsky SA., Vetterling WT : Numerical Recipes. Cambridge U.K., Cambridge Univ. Press. 1986.
 24. Demis J.E. and coll. - ACM Transaction on Mathematical Software - 7,3 - Sett. 1981
 25. Rodbard D., Munson PJ, De Lean A., : Improved curve-fitting, parallelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation, and optimization for radioligand assay - Radioimmunoassays and related Procedures in Medicine 1977; Vienna, Intl Atomic Energy Agency, 1974