

Egyetemi doktori értekezés

A RADIOIMMUN ANALITIKAI
VIZSGÁLATOK KIÉRTÉKELÉSE

I r t a :

GYÖNGYÖSI JÓZSEF

S Z E G E D

1982



BEVEZETÉS	...	...	...	...	...	1
CÉLKITÜZÉSEK	...	...	...	...	...	2
A HP-9810/A asztali számítógép	...	...	...	...	...	4
A HP-9862/A rajzológép	...	...	...	...	...	5

1. A RADIOIMMUN ANALITIKA ELMÉLETE

1.1 A RIA alapparaméterei	...	...	6
1.2 A rendszer alapfeltételei	...	...	7
1.3 A RIA elméleti alapjai	...	...	9
1.4 A dózis-hatás összefüggések	...	...	13
1.5 Az aktivitás becslések hibája	...	...	16

2. A STANDARD GÖRBE ILLESZTÉSE

2.1 A standard görbe súlyozása	...	...	24
2.2 Vizsgálatainkban alkalmazott standard görbe	...	...	27
2.3 A monotonitás problémája	...	...	31
2.4 A mintameghatározás	...	...	32
2.5 Az alkalmazott eljárás	...	...	34

3. MINŐSÉGELLENŐRZÉS	...	...	...	38
3.1 A standard görbe alkalmazhatóságának elemzése	...	...	...	40
3.1.1 Az Assay-közép /MD ₅₀ /	...			41
3.1.2 A slope	...	...	...	41
3.1.3 A higitási hiba vizsgálata	...			42
3.1.4 A linearitás grafikus vizsgálata				44
3.1.5 A standard görbe precizitása				45
3.2 A vizsgálat belső ellenőrzése	...			46
3.2.1 Az alapparaméterek	...	...		46
3.2.2 A preciziós profil	...	...		47
3.2.2.1 Az empirikus preciziós profil				48
3.2.2.2 Az elméleti preciziós profil				52
3.2.3 A méréstartomány meghatározása				54
3.2.4 A legkisebb mérhető dózis	...			56
3.3 A vizsgálatok közötti ellenőrzés				58
3.3.1 A precizitás vizsgálata	...			59
3.3.2 Ellenőrzés minőségi indexekkel				62
3.3.3 Az Etinilösztadiol EE ₂ RIA meghatározása	...	...	...	65
MEGBESZELÉS	...	...	...	67
ÖSSZEFOGLALÁS	...	...	...	78
IRODALOM	...	...	...	83

Az endokrinológia alig 25 évvel ezelőtt még csaknem teljesen a biológiai vizsgálatokra támaszkodott. A klasszikus endokrinológiai vizsgálatokban a hormon hatásának tanulmányozása a szervi elváltozásokon keresztül történt. /Pl. a prolaktin vizsgálatára a galamb begy tesztet, a him nemi hormonok vizsgálatára a kakastaréj tesztet alkalmazták./ Ezek a vizsgálatok igen hosszadalmasak és költségesek voltak, és az állatok viselkedésének a megítélése is szubjektív volt. Később a hormonok hatására bekövetkezett változásokat közvetlenül az ép sejtek működésén keresztül figyelték. /18,19,28/

Előrelépést azonban csak a radioimmun analitika /RIA/ alkalmazása jelentett, melynek felfedezése Berson és Yalow /2,33/ nevéhez fűződik. Ők az inzulin metabolizmusát kívánták tisztázni, amikor inzulinnal már kezelt betegeknek radioaktív jelzett inzulint adtak. Azt tapasztalták, hogy a szérumok a jelzett inzulin egy részét megkötötték. Ebből arra következtettek, hogy a szervezetben az inzulinnal szemben ellenanyag termelődik. Ezt a felfedezésüket azonban 1956-ban közlésre nem fogadták el. 1960-ban leírták az inzulin és az inzulint kötő ellenanyag között lejátszódó reakciók kvantitatív alkalmazhatóságát. Ezért a felfedezésükért 1978-ban Nobel-díjat kaptak.

A radioimmun analitika bevezetése, valamint a fehérje kötési /33/ és a radioligand vizsgálatok /8/ alkalmazásával összefüggő technikák elterjedése vezetett az endokrinológia robbanásszerű fejlődéséhez. Sejt helyett itt már molekuláris szinten tanulmányozhatjuk a radioaktív jelzett és jelzetlen antigén kölcsönhatását

az antitesttel. A vizsgált szérumhoz ismert koncentrációju antitestet és jelzett antigént adunk. Ezt a reakciót a radioaktív jelzett és jelzetlen antigének vetélkedése jellemzi az antitest szabad kötőhelyeiért. Ha az egyensúlyi feltételek teljesülnek, akkor a reakcióban jelen lévő jelzetlen antigén koncentrációját a kötött antigén-antitest frakció radioaktivitásából számítással meghatározhatjuk. A módszer bevezetése nagymértékben megjavította a biológiai vizsgálatok megbízhatóságát, mivel itt a kémiai kinetika és az egyensúlyi feltételek betartása mellett 10^{10} molekula viselkedését vizsgáljuk, szemben az állatkísérletekkel, ahol 10 patkány esetleg szabálytalan viselkedését kellett megítélni. A méréstartomány is kiszélesedett, mert amíg a fotometriás vizsgálatoknál $\mu\text{g} / 10^{-6} \text{ g/}$, a fluorimetriás vizsgálatoknál $\text{ng} / 10^{-9} \text{ g/}$ addig itt már $\text{pg} / 10^{-12} \text{ g/}$ a méréstartomány alsó határa.

A radioimmun analitikai vizsgálat rutin módszerként való alkalmazása a megbízhatóság kérdésében új problémákat vetett fel. A minőségellenőrzés alapvetően fontossá vált a radioimmun analitika rutin klinikai gyakorlati alkalmazásában.

C É L K I T Ű Z É S E K

A Szegedi Orvostudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján az Egészségügyi Világszervezet /WHO/ klinikai kutatóközpontot szervezett, aminek egyik egysége a klinika laboratóriuma. Ebben 18 hormon /LH, FSH, Prolaktin, HPL, HCS, HCG, Digoxin,

Progesteron, Cortisol, 17- α -OH-Progesteron, Testosterone, Ösztron, Ösztriol, Ösztradiol EE₂, 17- β Ösztradiol, Pregnandiol, Andosztendion, CPA/ radioimmun analitikai meghatározását végzik.

Feladatomból volt, hogy kidolgozzam a laboratórium radioimmun analitikai vizsgálatainak belső minőségellenőrző rendszerét. Ezért a következő szempontok szerinti vizsgálatokat tűztem ki célul:

1. A standard görbe illesztését és kiértékelését a Rodbard /24/ által javasolt módszer szerint. A standard görbét rajzoló program és a paramétereket listázó program elkészítését;
2. Harmadfokú függvény alkalmazását standard görbéként, paramétereinek meghatározását a dózisszintek súlyozásával;
3. A standard görbe minőségellenőrzésének alkalmazását, a higitási hiba szerepének vizsgálatát;
4. A vizsgálat belső ellenőrzését, a precíziós profil, a méréstartomány és a minimális mérhető dózis meghatározását;
5. A radioimmun analitikai vizsgálatok ellenőrzését kontroll mintákkal, a kémiai vizsgálatokban alkalmazott minőségi indexek számítását a RIA-ban;
6. A kiértékelő rendszer alkalmazását az általunk kidolgozott Etinilöszttradiol EE₂ gyors radioimmun analitikai meghatározásaira.

A HP 9810/A asztali számítógép

A radioimmun analitikai vizsgálat megbízható kiértékelése, a bonyolult számítási eljárások szükségessé teszik a számítógép alkalmazását. A legtöbb laboratórium gyakorlatában az alkalmazás csak a standard görbe illesztését és a minták meghatározását jelenti. Erre a célra a kézi számológépek is megfelelnek, amennyiben ezeken a transzformációk és a regressziós görbe illesztése elvégezhető. Klinikánk egy Hewlett-Packard 9810/A asztali számítógéppel és egy rajzológéppel rendelkezik. Ez a számítógép könnyen kezelhető, egyszerűen programozható. Ha program nem fut rajta, akkor kalkulátor üzemmódban használható.

A számítógépbe három cserélhető ROM /Read Only Memory/ illeszthető. Ezek speciális mikroprogramokat tartalmaznak, amelyek a különböző típusú feladatok megoldását és a programok egyszerűsítését teszik lehetővé. Ilyen például a statisztikai ROM, a periféria kezelő ROM /Peripheral Control ROM/, a plottervezérlő ROM, amely a betűíró programokat tartalmazza. Négy Input-Output csatornával rendelkezik a számítógép, de a csatornák száma növelhető. Az illeszthető perifériák a következők: Lyukszalagolvasó, lyukszalag lyukasztó, kártyaolvasó, sornyomtató, rajzológép, digitalizáló, mágnesszalag háttértár, minidisc. Az eredmények a számítógépen lévő 16 karakter széles hőírón is kiirathatók.

A program tárolása mágneskártyán történik. Erre a célra mágneskártya író és olvasó van a gépbe építve.

Az adatok és a program utasítások az x, y, z numerikus display regisztereken jelezhetők ki. A számítógép a billentyükön feltüntetett utasítások segítségével programozható billentyű programozással.

A memória két egymástól független egységből áll: A program memóriából, mely maximálisan 2036 utasítást tartalmazhat, valamint a 0 - 48 adatregiszterből. A műveletek az x, y, z display regiszterek és a numerikus regiszterek között végezhetők. Az eredmények tárolása lebegőpontos alakban történik.

A Hewlett-Packard 9862/A rajzológép

Ez az X-Y rajzológép a számítógép FMT $\uparrow$ és FMT $\downarrow$ utasításaival vezérelhető. Az utasítások hatására a toll felemelt illetve leengedett tollállással az x és y regiszterek tartalmának megfelelő helyvektor végpontjába mozdul el. Az utasításokat csak akkor értelmezi, ha $0 \leq x, y \leq 9999$.

A rajzológép maximális lapmérete 10 x 15 inch /kb. 25 x 38 cm/. Két pont között a legkisebb elmozdulás 0.1 mm. A gép másodpercenként legfeljebb két elmozdulást tud végrehajtani. Ekkor a tollmozgás sebessége 40 cm/sec.

A radioimmun analitikai vizsgálatok kiértékelésénél az volt az igény, hogy a rajzológépet a szemléltetés céljainak megfelelően alkalmazzuk. Ez elsősorban a standard görbe rajzolását, a méréspontok ábrázolását és a minőségi jellemzők vizsgálatonkénti változásának ábrázolását jelentette. Ezért a radioimmun analitikai vizsgálat kiértékelésének programját ennek a célnak megfelelően készítettem el.

1. A RADIOIMMUN ANALITIKA ELMÉLETE

1.1 A RIA alapparaméterei

A radioimmun analitikai rendszerben az antigén és az antitest kölcsönhatását vizsgáljuk. Az élő szervezetben az antigén többféle anyag lehet. Általában ezek kinyerhetők a szérumból, és igen tisztán előállíthatók. A reproduktív endokrinológiában az antigének fehérje vagy szteroid természetű hormonok.

A különböző tisztítási eljárások után nyert kémiaileg egynemű antigéneket izotopokkal jelezzük. Ez ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I -nek az antigén molekulába történő beépítését jelenti. Ezeket a molekulákat nevezzük jelzett antigéneknek.

Az antitest molekula a sejt azon részét reprezentálja, amihez az antigén molekula kötődik. Előállítására kísérleti állatban /nyulban, kecskében, szamárban/ történik. Lényeges, hogy az antigének már kis koncentrációban specifikus aktivitást /reakcióképességet, kötőképességet/ mutassanak az antitesttel szemben.

A radioimmun analitikai vizsgálat célja, hogy a testnedvekben előforduló hormonok koncentrációját az izotóp technika felhasználásával számítsuk. Itt kihasználjuk azt a törvényszerűséget, hogy ha a jelzett antigén koncentrációját arányosan változtatjuk, akkor ennek megfelelően változik az elegy radioaktivitása. Ha a jelzett és jelzetlen antigének fizikai és kémiai sajátosságai azonosak, akkor azonos valószínűséggel kötődnek az antitesthez. Amikor a reakció egyensúly-

ban van, akkor a kötött és szabad frakcióban jelenlévő jelzett és jelzetlen antigének aránya megegyezik. A kötött és szabad frakciót szétválasztjuk, és a radioaktivitásukat megmérjük. Különböző, ismert koncentrációju jelzetlen antigénhez megmérve a frakciók aktivitását kalibrációs /vagy standard/ görbét készítünk. Mivel az összes jelzett antigénkoncentrációja valamennyi mintában azonos, így ha ezután egy tetszőleges szérum mintánál meghatározzuk a kötött vagy szabad frakció aktivitását, akkor a standard görbe alapján becsülhetjük a mintában lévő jelzetlen antigén koncentrációját.

A gyakorlatban a frakciók szétválasztása centrifugálással történik. A kötött frakció aktivitását béta vagy gamma mérővel mérjük. A mérések eredményeit beütés/perc -ben /cpm/ kapjuk, és ebből számítjuk a frakciók aktivitását.

1.2 A rendszer alapfeltételei

A radioimmun analitikai rendszert Rodbard /11/ a következő feltételekkel definiálta:

- F-1 Az antigént egyneműnek, kémiaailag egy fajtának tekintjük;
- F-2 Az antitestet egyneműnek, kémiaailag egy fajtának tekintjük;
- F-3 A reakció során egy antitest molekula egy antigén molekulával lép reakcióba;

- F-4 Az antigén-antitest reakciójának az összhangját elsősorban a tömeghatás törvénnyel, másodsorban a kémiai kinetikával magyarázzuk;
- F-5 A radioaktív jelzett és jelzetlen antigéneknek ugyanazok a fizikai és kémiai sajátosságai;
- F-6 Az antigének és az antitestek mindaddig reagálnak egymással, amíg a reakció az egyensúlyi állapotát el nem éri;
- F-7 A jelzett és jelzetlen antigének kötött és szabad frakciói szétválaszthatók az egyensúlyi állapot megzavarása nélkül;
- F-8 Az antigén kötött és szabad frakciójának az aránya, vagy a kötött frakció és az összes antigén aránya számítható.

Ezen feltételek mindegyike csak ideális körülmények között teljesül. Az F-1, F-2, F-4, F-5 feltételek teljesülése nyilvánvalóan szükséges ahhoz, hogy a radioimmun analitikai rendszert mérésre alkalmazni tudjuk. Az F-3 feltétel a gyakorlatban úgy teljesül, hogy az antitest molekulák szerepét a kötéshelyek veszik át. A módszer alkalmazhatóságánál lényeges, hogy a különböző mintákban a megkötött antigének koncentrációja valamennyi antitest kötéshely lekötése esetén azonos legyen. Az F-6, F-7, F-8 feltételek a gyakorlatban csak igen gondos, körültekintést igénylő munka esetén teljesíthetők.

Az F-6 hipotézissel, az antigén-antitest reakció időfüggésével Rodbard és mtsai /23/ foglalkoztak. Megállapították, hogy a reakcióegyensúly beálltához

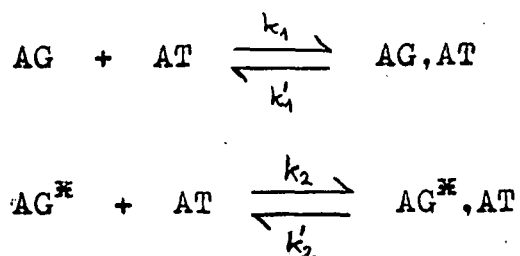
szükséges idő szempontjából lényeges az anyagok kémcsőbe való bemérésének a sorrendje. Optimálisnak a jelzett antigén, jelzetlen antigén, antitest sorrendet találták, mivel ekkor igen rövid idő alatt kialakul a reakcióegyensúly.

A kötött és szabad frakció szétválasztása /F-7/ centrifugálással történik. Ekkor az antigén-antitest kötött frakciója a kémcső alján, a szabad frakció az elegy tetején helyezkedik el. A felüluszó leöntése után a kémcsőben csak a kötött frakció marad. Ennek aktivitását mérjük. Mivel a kémcsőbe mért összes jelzett antigén aktivitását ismerjük, ezért az antigén kötött és szabad frakciójának az arányát az aktivitások ismeretében számíthatjuk /F-8/.

A minőségellenőrzés célja az lesz, hogy a kidolgozott méréstechnikai és számítási eljárás gyakorlati alkalmazhatóságát, a méréseredmények elfogadhatóságát vizsgálja.

1.3 A RIA elméleti alapjai

Az F-1 - F-8 feltételek és a tömeghatás törvénye alapján a radioimmun analitikai rendszer általánosan a következőképpen írható le:



ahol AG a jelzetlen, AG^* a jelzett antigén, AT az antitest, AG, AT , AG^*, AT a jelzetlen és a jelzett antigén és az antitest kötött frakciója, k_1 és k_2 az asszociációs állandók, k'_1 és k'_2 a disszociációs állandók. A minták jelzetlen antigén tartalmának a meghatározását azon az elven végezzük, hogy a jelzett és jelzetlen antigének azonos valószínűséggel kötődnek az antitesthez /F-1 - F-5/. Ha a rendszer egyensúlyban van, akkor a kötött és szabad frakcióban lévő antigén koncentrációk aránya /R/:

$$/1/ \quad R = \frac{[AG, AT]}{[AG]} = \frac{[AG^*, AT]}{[AG^*]}$$

ahol az $[AG]$, $[AG^*]$, $[AG, AT]$, $[AG^*, AT]$ az antigén koncentrációkat jelöli mol/l -ben. Ha az összes antitest kötéshely koncentrációja állandó, akkor az F-3 feltétel alapján:

$$/2/ \quad K = \frac{k_1}{k'_1} = \frac{[AG, AT]}{[AG] \cdot [AT]}$$

$$K^* = \frac{k_2}{k'_2} = \frac{[AG^*, AT]}{[AG^*] \cdot [AT]}$$

ahol K és K^* az affinitási állandók, $[AT]$ pedig a szabad antitest kötéshelyek koncentrációja. Reakcióegyensúly esetén a jelzett és jelzetlen antigén bármely koncentrációjánál $K = K^*$. A K affinitási állandó ezért az antitestre jellemző érték.

Az antigének kötött $\mathcal{B}$ és szabad $\mathcal{F}$ frakciójának, valamint az összes antigénnek $\mathcal{T}$ koncentrációja:

$$\begin{aligned} /3/ \quad \mathcal{B} &= [AG, AT] + [AG^*, AT] && \text{mol/l} \\ \mathcal{F} &= [AG] + [AG^*] && \text{mol/l} \end{aligned}$$

$$\mathcal{T} = \mathcal{B} + \mathcal{F} \quad \text{mol/l}$$

A rendszerben lévő összes jelzett $X^{\mathcal{K}}$ és jelzetlen X antigén koncentrációja:

$$\begin{aligned} /4/ \quad X^{\mathcal{K}} &= [\text{AG}^{\mathcal{K}}] + [\text{AG}^{\mathcal{K}}, \text{AT}] \quad \text{mol/l} \\ X &= [\text{AG}] + [\text{AG}, \text{AT}] \quad \text{mol/l} \end{aligned}$$

Az összes antitest kötőhely koncentrációja q , az antitest kötéskapacitása:

$$/5/ \quad q = [\text{AT}] + [\text{AG}, \text{AT}] + [\text{AG}^{\mathcal{K}}, \text{AT}] \quad \text{mol/l}$$

Ha q állandó, akkor az egyensúlyi állapotban az /1/ - /5/ összefüggésekből levezethető az antigén kötött frakciójának a koncentrációja $\mathcal{B}$ és a kötött és szabad frakcióaránya R közötti lineáris kapcsolat

$$/6/ \quad R = K (q - \mathcal{B})$$

Ezt az összefüggést először Scatchard /29/ ismertette a kismolekulasúlyú fehérjék vizsgálata alapján. Alkalmazása a radioimmun analitikában Berson és Yalow, valamint Ekins /2,8,33/ nevéhez fűződik. A Scatchard-függvény viselkedését Feldman és Rodbard /11,12/ elemezte az X , $X^{\mathcal{K}}$ és q különböző választása mellett.

Az R , K , q , $X^{\mathcal{K}}$ és X között levezethető egy általános összefüggés. Mivel az összes antigén koncentrációja $\mathcal{T} = X + X^{\mathcal{K}}$, ezért a kötött frakció koncentrációjára

$$\mathcal{B} = \frac{\mathcal{B}}{\mathcal{T}} (X + X^{\mathcal{K}})$$

Az /1/ -ből következik, hogy $R = \frac{\mathcal{B}}{K} \cdot \text{Igy}$



$$\frac{B}{J} = \frac{B}{B+F} = \frac{R}{R+1}$$

Behelyettesítve a /6/ Scatchard-függvénybe, és átrendezéssel kapjuk az

$$R^2 + R(1 + K \cdot X + K \cdot X^* - Kq) - Kq = 0$$

implicit összefüggést. Ez alapján elemezhető az X^* és q változtatásának hatása a rendszerre /11,12/. Azonos körülmények biztosítása esetén a választott q és X^* koncentrációk alapvetően meghatározzák a rendszert. Megfelelő választásukkal állítható be a méréstartomány, a módszer érzékenysége és a legkisebb mérhető dózis.

A szérum minták hormontartalmának meghatározására a gyakorlatban nem a Scatchard függvényt alkalmazzuk. Ennek az az oka, hogy a radioimmun analitikai rendszer rendkívül érzékeny, és a Scatchard függvény paraméterei nem stabil állandók /pl. a jelzett antigén aktivitásának változása miatt már változik a rendszer/, és ez a paraméterek változását eredményezi/. Egy további szempont, hogy az összefüggés az összes antigén koncentráció függvényében lineáris, így nem biztosít közvetlen kapcsolatot a válasz paraméter és a jelzetlen antigén koncentrációja között. Ezért történtek próbálkozások olyan összefüggések keresésére, melyek független változója a jelzetlen antigén koncentrációja, vagy ennek valamilyen transzformált értéke.

1.4 A dózis-hatás összefüggések

A radioimmun analitikai vizsgálatok kiértékelésében kulcsszerepet játszik a standard görbe.

Standard görbének nevezzük azt a függvényt, melynek független változója a jelzetlen antigén koncentrációja /dózisa/, és paramétereinek meghatározása ismert koncentrációk alapján történik.

Függő változóként /a biológiában hatás változóként/ a B/T , B/F , F/T , B/B_0 , R/R_0 /mint a különböző frakciók antigén koncentrációjának az aránya/ alkalmazása terjedt el, ahol a B_0 és R_0 a B és R értéke jelzetlen antigén hiányában / $X=0$ esetén/.

A koncentráció arányokat a frakciók radioaktivitásából számítjuk. Standard görbeként csak olyan összefüggés alkalmazható, amely kölcsönösen egyértelmű megfeleltetést hoz létre a dózis és a választott függő változó között. /A standard görbe inverz függvényéből határozzuk meg a szérum minták hormontartalmát, mint a számított függő változóhoz, hatáshoz tartozó dózisszintet./

A mintameghatározásra az irodalomban számos standard görbe típus ismert. Választásuk általában szubjektív, azonban célszerűnek látszik a kiértékelésre olyan standard görbét választani, melynek paraméterei ellenőrizhetők. Ezt az is indokolja, hogy a standard görbe meghatározását az ismert jelzetlen antigén koncentrációkhoz számított hatásokból végezzük, és az itt elkövetett hibák a mintameghatározást is befolyásolják.

Tegyük fel, hogy az antitest kötőkapacitása állandó / $q=q$ /, és a kötőhelyek telítettek / $[AT]=0$ /. Ekkor

$$/7/ \quad \frac{B}{T} = \frac{q}{X+X^*} \quad \text{vagy}$$

$$\ln B/T = \ln q - \ln(X+X^*)$$

Ha ismerjük a jelzett antigén koncentrációját, akkor a /7/ alkalmazható standard görbéként /33/. Itt a független változó az $(X+X^*)$.

Bliss /3/ a hiperbolikus transzformáció alkalmazását javasolta, amit Hales és Randle /14/ általánosított az

$\frac{1}{B/T}$, $\frac{1}{B/B_0}$, $\frac{1}{B/F}$ és a dózis változó közötti függvénykapcsolatra:

$$/a/ \quad \frac{1}{B/T} = \frac{X}{q} + \frac{X^*}{q}$$

$$/b/ \quad \frac{1}{B/B_0} = \frac{B_0/T}{B/T} = \frac{X}{X^*} + 1$$

$$/c/ \quad \frac{1}{B/F} = \frac{X+X^*}{q} - 1$$

A /c/ Ekins és mtsai /8,9,10/ munkáiban is szerepel. A hiperbolikus standard görbével előállított standard görbe alkalmazása a gyakorlatban igen elterjedt. Ennek az az oka, hogy a kiértékelésre gyakran kézi számológépet alkalmaznak, és ez a transzformáció ezeken egyszerűen hajtható végre. Hátránya viszont, hogy jól kell megválasztani a q/X^* arányt a módszer beállításánál, továbbá a méréstartomány /a megbízható mérések tartománya/ szűk. Ha a paraméterek meghatározására a súlyozott regressziót alkalmazzuk, az alacsony és a magas dózis tartományban jelentős torzítással kell számolni /17,31/. Mivel az összefüggés paraméte-

rei nem állandók, az ellenőrzésük további problémát jelent. Ezért történtek kísérletek más típusu standard görbék alkalmazására.

Jelöljük Y -al a hatásváltozót / $Y = B/T$, B/B_0 stb/, és X -el a jelzetlen antigén koncentrációját /dózisát/. Többen az Y és X polinomiális összefüggésével keresték a kapcsolatot:

$$Y = \sum_{i=0}^n c_i \cdot X^i$$

$$X = \sum_{i=0}^n c_i \cdot Y^i$$

Weaver /32/ más típusu összefüggést javasolt standard görbeként:

$$X = \frac{1}{Y} \sum_{i=0}^n c_i \cdot Y^i$$

Brown és mtsai /4/ munkáiban viszont a következő standard görbe típus szerepel:

$$X = c_0 + c_1 \cdot \lg(Y) + c_2 \cdot \lg^2(Y)$$

Rodbard és mtsai /20,21/ a logit-log transzformációt javasolják a standard görbe előállítására.

Ha $q_p = q$, és $[AT] = 0$, akkor

$$\frac{B}{T} = \frac{q}{X + X^*} \quad \text{és} \quad \frac{B_0}{T} = \frac{q}{X^*}$$

Ekkor a kettő hányadosa:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{X^*}{X + X^*}$$

A logit transzformáció definíció szerint

$$\text{logit } u = \ln \frac{u}{1-u}, \text{ ha } 0 < u < 1.$$

Mivel $0 < B/B_0 < 1$, ezért erre a hatásváltozóra alkalmazva a logit transzformációt:

$$/8/ \quad \text{logit } B/B_0 = \text{logit } \frac{X^*}{X+X^*} = \ln X^* - \ln X$$

Ha $y = \text{logit } B/B_0$ és $x = \ln X$, akkor a /8/ a következő alakban írható: $y = \ln X^* - x$. Azzal, hogy ennek a standard görbének az iránytangense elméletileg állandó -1 , a radioimmun analitikai rendszer ellenőrizhetővé válik. A gyakorlatban az empirikus adatokból megszerkesztett egyenes iránytangense mindig eltér -1 -től. Ez azt jelenti, hogy az állapotváltozások hatására az összefüggés paraméterei is megváltoznak /5,11,30/, ezért az eltérések vizsgálatát a minőség-ellenőrzés részének tekintjük.

1.5. Az aktivitás becslések hibája

A szérum minták hormontartalmát a kötött és szabad frakciókban lévő jelzett antigén koncentrációjából a mért aktivitások alapján számítjuk. A gyakorlatban a jelzett antigént tartalmazó minták béta vagy gamma sugárzását mérjük. A gamma sugárzó izotópokat NaI üreges kristályba helyezzük, amely a kibocsátott gamma sugarakat fényimpulzussá alakítja. A béta sugárzó izotópokat scintillációs folyadékba helyezzük, amely a kibocsátott béta sugarakra fényfelvillanásokkal reagál. Mindkét esetben a felvillanások száma és erős-

sége fotonsokszorozó közbeiktatásával mérhető. A mérések eredményeit közvetlenül beütés/perc-ben /cpm/ kapjuk, ebből számítjuk a minták radioaktivitását. Az egyszerűség kedvéért a gyakorlatban a számításokhoz közvetlenül a cpm-ben kapott méréseredményeket használjuk fel.

A szérum minták mérésénél elkövetett hibák igen sok összetevőből eredhetnek, melyeket az aktivitás becsléseken keresztül érzékelünk. Az egyik ilyen hibaforrás az egyes kémcsövekhez tartozó aktivitások becslése. Ennek a hibának a nagysága tetszőlegesen csökkenthető a mérés idejének a növelésével. A gyakorlatban azonban csak 1 - 3 percig mérjük a minták radioaktivitását, így a hiba vizsgálatánál célszerű kihasználni, hogy radioaktív anyag bomlását mérjük. Ha ugyanis feltesszük, hogy a kémcsőhöz tartozó aktivitás várható értéke és varianciája megegyezik /13,34/, akkor az aktivitás hiba becslésének problémája lényegesen leegyszerűsödik.

Egy szérum minta radioaktivitását több párhuzamos meghatározás /több kémcső/ méréseredményéből becsüljük. Itt az anyagok különböző kémcsövekbe történő bemérésénél elkövetett hibával kell számolnunk. Ilyen lehet a pipettázási hiba, de itt jelentkezik az eltérő inkubációs időből, elválasztási technikából adódó hiba is. /Pl. amikor a kötött frakció aktivitását kívánjuk mérni, és a centrifugálás után a kötött frakcióról leöntött szabad jelzett antigének egy része a kémcső falán megtapad./

A szérum minták aktivitásbecslésének hibái a különböző dózisszinteken eltérnek. Ennek az az oka, hogy a hibakomponensek eltérő módon befolyásolják az aktivi-

tás becslését. Arról, hogy az aktivitásbecslés hibája hogyan viselkedik az aktivitás tartományon, nincs információnk. Az irodalom ezért javasolja az empirikus átlag-szórás kapcsolat meghatározását /15,22,24,34/. Egy szérum minta radioaktivitásának meghatározásánál statisztikai értelemben véve mintának nevezzük a párhuzamos mérésekhez tartozó kémcsövek radioaktivitását. Egy kémcső aktivitását a benne lévő izotóp radioaktivitásával adjuk meg. Elvileg lehetőség van az aktivitás bármilyen hosszú ideig tartó mérésére, így a kémcső időegységre eső aktivitása a központi határeloszlás tétele /42/ alapján normális eloszlású valószínűségi változó. A szérum hormontartalmának meghatározására kivett minták párhuzamos kémcsövekben történő meghatározásánál azonos feltételeket biztosítunk, így a szérum aktivitásának meghatározásánál a szérumhoz tartozó kémcsövek időegységre eső aktivitásait tekintjük a továbbiakban statisztikai értelemben mintának. Az így nyert minta átlagát és szórását használjuk fel az aktivitásbecslés hibájának a meghatározására.

RER -nek, response-error relationship -nek
/válasz-hiba összefüggésnek/ nevezzük a szérum
minta aktivitásának empirikus átlaga és szórása
közötti függvénykapcsolatot.

Egy RIA vizsgálatban 50 - 100 szérum hormontartalmát határozzuk meg. Jelölje az egy szérumhoz tartozó kémcsövek időegységre eső aktivitásának átlagát $\bar{z}$ és szórását $s(z)$. Ha minden szérum esetén meghatározzuk $\bar{z}$ -t és $s(z)$ -t, akkor a $(\bar{z}, s(z))$ pontokra a legkisebb négyzetek módszerével illesztett függvényeket általánosan RER -nek nevezzük. Több függvénytypus alkalmazása ismert RER -ként, mint

$$/9/ \quad \Delta(z)^2 = a_0 + a_1 \cdot z + a_2 \cdot z^2 \quad \text{vagy}$$

$$\Delta(z)^2 = a \cdot z^j$$

Ezeket a függvénykapcsolatokat minden egyes vizsgálatban külön-külön meghatározzuk, ezért paramétereik a különböző vizsgálatokban eltérnek egymástól. A gyakorlatban a /9/ helyett az egyszerűbben számítható

$$/10/ \quad \Delta(z) = a \cdot z$$

összefüggést alkalmazzuk RER -ként. Ennek előnye, hogy egyetlen számmal jellemezhetjük az aktivitásbecslések megbízhatóságát. Az 1. ábrán egy konkrét vizsgálathoz megszerkesztett RER látható.

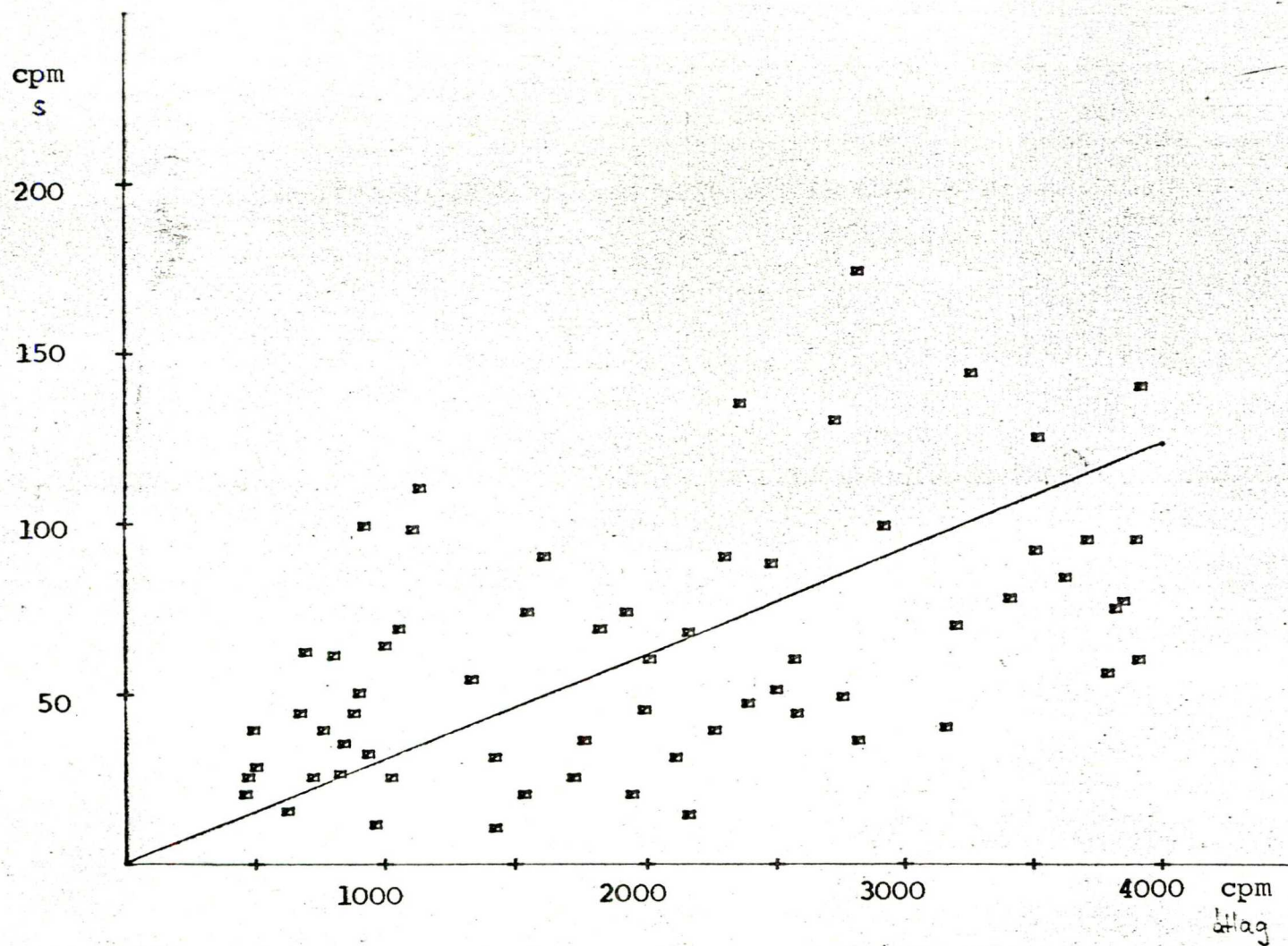
A minta kötött frakciójának aktivitása $/Z/$ az antitest $/Q/$, a jelzett antigén $/X^*$ és a jelzetlen antigén $/X/$ koncentrációjától függ:

$$/11/ \quad Z = B(Q, X^*, X)$$

A standard görbe függő változójának számításához használjuk a jelzetlen antigén hiányában mért kötött frakció aktivitását:

$$B_0 = B(Q, X^*, X=0)$$

Rendszerünkben mérjük még az összes jelzett antigén aktivitását $/T/$ és a nem specifikus kötés aktivitását $/NSB/$, melyet állandónak tekintünk. Ekkor a $B=Z-NSB$ aktivitás változóval dolgozunk. Mivel valamennyi minta mért aktivitásából levonjuk az NSB aktivitást, ezért az egyszerűség kedvéért a továbbiakban legyen $NSB = 0$.



1. ábra Egy vizsgálat aktivitásmeghatározásának RER-je

2. A STANDARD GÖRBE ILLESZTÉSE

Legyen a hatásváltozó az $y = \text{logit } B/B_0$, ahol a B/B_0 a kötött frakciók aktivitás arányát jelöli. Itt a B_0 a rendszerre jellemző állandó, a jelzetlen antigén hiányában mért mintaaktivitás. Tekintsük az $x = \ln X$ dózis változót, ahol X a szérum hormon-koncentrációját jelöli. Tegyük fel, hogy az antitest kötőkapacitása valamennyi mintánál azonos $/q=q/$, és a kötőhelyek telítettek $/[AT]=0/$, továbbá a jelzett antigén koncentrációja valamennyi mintánál azonos. Ekkor igaz a /8/ összefüggés, vagyis az x és y között lineáris összefüggés van. Legyenek az alappontok, ahol a standard görbe meghatározására méréseket végzünk $X_1, \dots, X_k$, és tegyük fel, hogy bármelyik X_i értéke pontosan beállítható. Az F-1 - F-7 alapján a /8/ bármely $X > 0$ $/q=q$, $[AT]=0$ / esetén fennáll, ennek teljesülését azonban csak az alappontokban tudjuk vizsgálni. Ezért a kapcsolat jellemzésére nem a /8/ összefüggést, hanem általánosan az

$$\text{/12/} \quad \text{logit } B/B_0 = b \cdot \ln X + c$$

$$\text{rövidebben:} \quad y = b \cdot x + c$$

függvénykapcsolatot alkalmazzuk, melyet az alappontokból határozunk meg. A továbbiakban feltesszük, hogy a /12/ függvénykapcsolat a tartomány többi pontjában is igaz.

Legyenek az X_i dózisszint aktivitásbecslései a $\zeta_{i1}, \dots, \zeta_{in_i}$ független, azonos eloszlású valószínűségi változók, és az ezekből számított hatások az

$\eta_{ij} = \text{logit } \zeta_{ij}/B_0$. A /12/ összefüggés paramétereit a legkisebb négyzetek módszerével határozzuk meg

/1,6,7,15,37,40,42/.

A paraméterek meghatározására a RIA irodalomban általánosan ismert nem súlyozott módszert alkalmazzuk, amely azon feltételezéssel él, hogy a transzformáció után nyert η_{ij} valószínűségi változók azonos normális eloszlásúak.

A paraméterek számítása a következő:

A mérések száma az i . dózisszinten : n_i .

Az összes mérések száma: $N = \sum_{i=1}^k n_i$.

A hatások átlaga az i . dózisszinten: $\bar{\eta}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \eta_{ij}$

Az összes hatás átlaga: $\bar{\eta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} \eta_{ij}$

A dózis változó átlaga: $\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k n_i \cdot x_i$

A négyzetösszegek számítása

Az i .-edik dózisszint hatásaira: $S_{\eta_i} = \sum_{j=1}^{n_i} (\eta_{ij} - \bar{\eta}_i)^2$

A hatások teljes négyzetösszege: $S_{\eta} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\eta_{ij} - \bar{\eta})^2$

A dózis változó teljes négyzetösszege: $S_x = \sum_{i=1}^k n_i (x_i - \bar{x})^2$

A szorzatok eltérése: $S_{x\eta} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_i - \bar{x})(\eta_{ij} - \bar{\eta})$

A /12/ összefüggés paramétereinek számítása:

$$b = \frac{S_{x\eta}}{S_x}$$

$$c = \bar{\eta} - b \cdot \bar{x}$$

A HP 9810/A asztali számítógépre olyan programot dolgoztunk ki, amely kiszámítja a /12/ összefüggés paramétereit, a linearitás vizsgálatához a statisztikai jellemzőket, valamint a rajzológép segítségével elkészíti a standard görbe rajzát /37,40/. A rajz tartalmazza a legfontosabb jellemzőket is.

A rajzprogram elkészítéséhez a $\text{logit } B/B_0 = b \cdot \lg X + c$ összefüggést használtuk. A standard görbét az $y = B/B_0$, $x = \lg X$ koordinátarendszerbe rajzoltuk. Az x és y értékeit a következőképpen transzformáltuk a rajzprogramhoz:

A standard görbéből $u = \exp(b \cdot \ln X + c)$,

$$\text{ekkor} \quad B/B_0 = \frac{u}{1 + u}$$

Mivel $0 < B/B_0 < 1$, ezért az y transzformált értéke: $y_p = B/B_0 \cdot 10^4$

Az x koordináták transzformációjánál figyelembe vettük, hogy a standard mintákat felező higitással készítettük. A higitások száma maximálisan 10 lehet, ezért a dózis tartomány határait a következőképpen állapítottuk meg:

Legyen a leghigabb minta X_0 . Ekkor

$$x_{\min} = \ln(X_0/2), \quad x_{\max} = 11 \cdot \ln 2 + \ln X_0.$$

Az X transzformált értéke a rajzhoz $/x_p/$:

$$x_p = \frac{\ln X - x_{\min}}{12 \cdot \ln 2} \cdot 10^4$$

A függő változó szórásai az egyes dózisszinteken eltérnek, ezért a /12/ összefüggés paramétereinek meghatározását súlyozással is végezhetjük /22/. Ennek a módszernek az alkalmazása a RIA -ban csak a lineáris esetre ismert.

A legújabb javaslatok alapján a standard görbe alkalmazhatóságának az elbírálása a következő szempontok szerint történik:

1. A dózis-hatás mérésekre végezzük el a /12/ standard görbe illesztését. Ez történhet súlyozással és súlyozás nélkül.
2. Számítsuk ki a korrelációs együtthatót $|r|$, és ha $|r| \geq 0.985$ /mint irodalmi érték/, akkor a standard görbe alapján határozzuk meg a mintákat.
3. Ha $|r| < 0.985$, akkor a standard minták mérési eredményeit logaritmus papíron ábrázolva kézzel rajzoljuk meg a standard görbét. A minták hormontartalmát leolvasással határozzuk meg.
4. A vizsgálat eredményeinek elfogadhatóságáról a vizsgálat jellemzői alapján döntünk / MD_{50} , RER, ellenőrző minták meghatározása/.

Az eljárás kétségtelen hátránya, hogy ha a görbeillesztés nem fogadható el, akkor visszatér az "ősmódszerhez", ami a standard görbe grafikus uton való előállítását jelenti. Esetenként a /12/ helyett célszerű magasabb fokszámú standard görbét illeszteni. Ilyenkor az alacsony és magas dózis tartományon az elhajlás figyelmen kívül hagyása már ok lehet a rajzolásra. A gyakorlatban az is előfordulhat, hogy egy minta mérése nem helytálló. /Pl. jóval több vagy ke-

vesebb anyag került a kémcsőbe, vagy a szennyeződés okoz nyilvánvaló hibát./ Ez esetben a vélemények a további tevékenységet illetően megoszlanak, tudni illik ilyenkor a hiba "szemmel láthatóan" nyilvánvaló. Ezek a kérdések tették indokolttá a súlyozás problémájának vizsgálatát.

2.1 A standard görbe súlyozása

Az $\eta = \logit S/B_0$ válaszparaméter szórása a különböző dózisszinteken eltér. A standard görbe paramétereinek meghatározásánál célszerű figyelembe venni ennek a hatását. Gyakran olyan hibát is elkövethetünk, ami egy-egy kémcsőhöz tartozó aktivitás méréseredményét lényegesen befolyásolja. A standard mintáknál ez nyilvánvaló mérési hibaként jelentkezik. Ilyenkor felrajzolva a görbét, a téves mérés eredménye elkülöníthető. A standard görbe súlyozással történő meghatározására olyan módszert alkalmazunk, amely figyelembe veszi a dózisszinteken a válaszparaméter becsléseinek eltérő szórását, és rajzolás nélkül kiszűri az esetleges téves mérésből eredő hiba-hatását.

A standard görbe illesztésénél a legegyszerűbb súlyozási eljárás, ha a dózisszinteket a válaszok empirikus varianciájának reciprokával súlyozzuk. Így az X_i dózisszint súlya:

$$w_i = \frac{1}{\hat{s}_i^2}$$

ahol $\hat{s}_i^2 (>0)$ az X_i dózisszinten a mérések empirikus

varianciája. Ennek a súlyozásnak az előnye, hogy csökkenti a kétségtelen hibás mérés hatását a standard görbe meghatározásánál. Hátránya, hogy a dózisszintek empirikus varianciájára épül, így nem tudja standard módon egymáshoz viszonyítani az egyes dózisszinteket.

A súlyozást az aktivitás becslések hibájára megállapított RER függvények segítségével is végezhetjük. Ennek a módszernek előnye az előzővel szemben, hogy itt az egyes szintek egymáshoz viszonyított súlyal szerepelnek. Hátránya viszont, hogy a hibás mérés hatását nem tudja csökkenteni. Számunkra további hátránya, hogy a mért aktivitásokat kétszer kell felhasználni: Először, amikor a /9,10/ RER függvényeket meghatározzuk, másodszor pedig amikor a standard görbe paramétereit határozzuk meg. Számítógépünkön az adatközlés manuálisan történik, így egy vizsgálat esetén ez jelentős idő és munka többletet jelentene.

Tekintsük az X dózisszinten a ζ aktivitás változót, mely normális eloszlású, és így véges várható értékkel és szórással rendelkezik. Ekkor az F-1 - F-7 feltételek alapján $M(\zeta) = B$. Ha a szérum aktivitásának mérésénél minden hibát figyelembe veszünk, akkor a ζ szórása: $0 < D(\zeta) = s_x < \infty$. Mivel $\eta = \text{logit } \zeta/B_0$, ezért η szórása egy tetszőleges X környezetében /13,43/:

$$D(\eta) = D\left(\frac{\zeta}{B_0}\right) \cdot \frac{B_0^2}{B(B_0 - B)}$$

Vizsgáljuk most a súlyozás problémáját úgy, hogy csak az aktivitás mérésének hibáját vegyük figyelembe. Tegyük fel, hogy ζ -t egy kémcső egy időegységre eső

aktivitása alapján adjuk meg. Mivel radioaktív anyag bomlását vizsgáljuk, ekkor a kémcső mért aktivitása Poisson-eloszlást követ. Az időegységre eső aktivitást hosszabb ideig tartó megfigyelés alapján adjuk meg, így az időegységre eső aktivitás várható értékére és szórására $M(\zeta) = D^2(\zeta)$. Az η szórásnégyzete ekkor

$$D^2(\eta) = D^2\left(\frac{\zeta}{B_0}\right) \cdot \left(\frac{B_0}{B(B_0-B)}\right)^2 = \frac{B_0^2}{B(B_0-B)^2}.$$

Ha $M(\zeta|X_i) = B_i$, akkor az X_i dózisszint sulya:

$$w_i = \frac{1}{D^2(\eta)} = \frac{B_i(B_0-B_i)^2}{B_0^2}$$

A nyilvánvaló mérési hiba felismerése céljából összehasonlítjuk a dózisszinten a mérés összes hibáját az aktivitás mérés hibájával. Legyen a minta empirikus szórása az X_i dózisszinten s_i . Az empirikus és aktivitás mérés szórások hányadosa:

$$t = \frac{s_i}{\sqrt{B_i}}$$

Válasszuk most az X_i dózisszint sulyának a

$$/13/ \quad w_i = \begin{cases} w_i & \text{ha } t \leq 1 \\ \frac{w_i}{4^{t-1}} & \text{ha } t > 1 \end{cases}$$

Ez a súlyozási eljárás csökkenti a nyilvánvaló mérési hiba hatását, viszont az egyes dózisszintek eltérő sullyal szerepelnek a standard görbe meghatározásánál.

2.2 Vizsgálatainkban alkalmazott standard görbe

Az $y = \text{logit } B/B_0$ és $x = \ln X$ változók között elméletileg lineáris összefüggés van. A gyakorlatban viszont előfordul, hogy az x és y közötti kapcsolatot nem a lineáris összefüggés írja le a legjobban. Ennek oka lehet a jelzett antigén radioaktivitásának változása, az inkubációs idő és hőmérséklet nem megfelelő választása, az anyagok szennyeződése. Ezért tapasztalati megfontolásból választottuk standard görbének az

$$\text{/14/} \quad y = b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^3 + c$$

hiányos harmadfoku kifejezést, ahol $y = \text{logit } B/B_0$ és $x = \ln X$.

Legyenek a dózisszintek, ahol a mintákat vettük:

$X_1, X_2, \dots, X_k$. Értékeit magunk írjuk elő, és tételezzük fel, hogy be is tudjuk állítani. Legyenek az X_i dózisszinten az y mérési eredményei $\eta_{i1}, \dots, \eta_{in_i}$

azonos eloszlásu független valószínűségi változók.

Mivel a dózisszinteken a szórások különböznek, legyen az X_i dózisszint súlya w_i /13/. A /14/ paramétereit a legkisebb négyzetek módszerével határozzuk meg.

Ekkor a minimalizálandó kifejezés:

$$\text{/15/} \quad K(b_1, b_2, c) = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i (\eta_{ij} - (b_1 x_i + b_2 x_i^3 + c))^2$$

A /15/ kifejezés a minimumát a

$$\frac{\partial K}{\partial b_1} = 0, \quad \frac{\partial K}{\partial b_2} = 0, \quad \frac{\partial K}{\partial c} = 0$$

esetén veszi fel. /A második deriváltak pozitív állandók./ Ekkor

$$\frac{\partial K}{\partial b_1} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} -2 x_i w_i (\eta_{ij} - y(x_i)) = 0$$

$$\frac{\partial K}{\partial b_2} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} -2 x_i^3 w_i (\eta_{ij} - y(x_i)) = 0$$

$$\frac{\partial K}{\partial c} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} -2 w_i (\eta_{ij} - y(x_i)) = 0$$

Felbontva:

$$/16.1/ \quad b_1 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^2 + b_2 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^4 + c \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i x_i \eta_{ij}$$

$$/16.2/ \quad b_1 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^4 + b_2 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^6 + c \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^3 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i x_i^3 \eta_{ij}$$

$$/16.3/ \quad b_1 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i + b_2 \sum_{i=1}^k n_i w_i x_i^3 + c \sum_{i=1}^k n_i w_i = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i \eta_{ij}$$

A /16.3/ kifejezést osszuk el $\sum_{i=1}^k n_i w_i$ -vel:

$$/17/ \quad b_1 \frac{\sum n_i w_i x_i}{\sum n_i w_i} + b_2 \frac{\sum n_i w_i x_i^3}{\sum n_i w_i} + c = \frac{\sum \sum w_i \eta_{ij}}{\sum n_i w_i}$$

Vonjuk ki a /17/ $\sum n_i w_i x_i$ szeresát a /16.1/-ből, a

/17/ $\sum n_i w_i x_i^3$ szorosát a /16.2/-ből. Ekkor a

$$/18/ \quad b_1 \cdot M_{11} + b_2 \cdot M_{12} = M_{13}$$

$$b_1 \cdot M_{12} + b_2 \cdot M_{22} = M_{23}$$

egyenletrendszerhez jutunk, ahol

$$M_{11} = \sum n_i w_i x_i^2 - \frac{(\sum n_i w_i x_i)^2}{\sum n_i w_i}$$

$$M_{12} = \sum n_i w_i x_i^4 - \frac{(\sum n_i w_i x_i)(\sum n_i w_i x_i^3)}{\sum n_i w_i}$$

$$M_{22} = \sum n_i w_i x_i^6 - \frac{(\sum n_i w_i x_i^3)^2}{\sum n_i w_i}$$

$$M_{13} = \sum \sum w_i x_i \eta_{ij} - \frac{(\sum n_i w_i x_i)(\sum \sum w_i \eta_{ij})}{\sum n_i w_i}$$

$$M_{23} = \sum \sum w_i x_i^3 \eta_{ij} - \frac{(\sum n_i w_i x_i^3)(\sum \sum w_i \eta_{ij})}{\sum n_i w_i}$$

Ennek alapján:

$$b_1 = \frac{M_{13} \cdot M_{22} - M_{23} \cdot M_{12}}{M_{11} \cdot M_{22} - M_{12}^2}$$

$$b_2 = \frac{M_{23} \cdot M_{11} - M_{13} \cdot M_{12}}{M_{11} \cdot M_{22} - M_{12}^2}$$

valamint
$$c = \frac{\sum \sum w_i \eta_{ij} - b_1 \sum n_i w_i x_i - b_2 \sum n_i w_i x_i^3}{\sum n_i w_i}$$

Az összefüggés szorosságának vizsgálatára az r korrelációs együttható nem alkalmazható, mivel az X nem valószínűségi változó. A gyakorlatban azonban az r formális számítása alapján döntenek a standard görbe alkalmazhatóságáról /27/.

Arról, hogy az $y(x)$ függvénykapcsolat valóban fennáll, a szórásanalízisben /42/ ismert egyszerű csoportosítás módszerével döntünk. Mivel az ellenőrzést csak a standard mintákra végezhetjük el, ezért fel-

tételezzük, hogy a standard és ismeretlen mintákra ugyanazok a törvényszerűségek érvényesek.

Ekkor legyen a hipotézisünk:

$$/20/ \quad H_0 : \quad M(\eta_i) = y(x_i) \quad /i=1, \dots, k/$$

Végezzük el a különbség négyzetösszegek csoportosítását

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i (\eta_{ij} - y(x_i))^2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} w_i (\eta_{ij} - \bar{\eta}_i)^2 + \sum_{i=1}^k n_i w_i (\bar{\eta}_i - y(x_i))^2$$
$$Q = Q_1 + Q_2$$

ahol Q_1 és Q_2 függetlenek, szabadságfokaik rendre $N-k$, $k-3$. / $N = \sum_{i=1}^k n_i$./

A Q_1 jelentése: Az η_{ij} -k eltérése az η_i számtani közepüktől.

A Q_2 jelentése: Az η_i -k eltérése a számított $y(x_i)$ értékektől.

Legyen most $s_1^2 = \frac{Q_1}{N-k}$, $s_2^2 = \frac{Q_2}{k-3}$.

Hányadosuk F-eloszlású:

$$F_{k-3, N-k} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

A H_0 hipotézis ellenőrzésénél azt vizsgáljuk, hogy az s_2^2 szignifikánsan nagyobb-e az s_1^2 -nél. Az s_1^2 a dózisszintek méréseredményeinek belső ingadozását jelenti. A hipotézis elfogadásáról 99%-os szinten döntünk.

Gyakorlati jelentősége is van a két hibatényező összehasonlításának. Ekkor az s_1^2 az azonos szintre

tartozó minták becslésének hibáját /aktivitásmérés, a különböző anyagok pipettázásából eredő hibák, stb./ az s_2^2 pedig az egyes dózisszintek standard mintáinak eltérő higitással való meghatározását jelenti.

2.3 A monotonitás problémája

A dózis és hatás változók között a standard görbének kölcsönösen egyértelmű megfeleltetést kellene létrehoznia /ha $X > 0$ /. Ez azt jelenti, hogy standard görbeként a kiértékelésre csak a szigorúan monoton függvények fogadhatók el. A /14/ standard görbe választása esetén elvileg előfordulhat, hogy a standard minták meghatározásánál olyan hibát követtünk el, amely egy nem szigorúan monoton függvény meghatározásához vezetett. Az alkalmazás előfeltételeként meg kell vizsgálnunk a kapott függvény monotonitását.

Legyen η mért értéke $\hat{y}$. Ekkor a /14/-et átrendezve:

$$b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^3 + c - \hat{y} = 0$$

A hozzátartozó gyököket Cardano-képlettel számítjuk. Ennek egy valós megoldása bármely $-\infty < \hat{y} < \infty$ esetén csak akkor van, ha a

$$D = \left(\frac{c - \hat{y}}{2 \cdot b_2} \right)^2 + \left(\frac{b_1}{3 \cdot b_2} \right)^3 > 0$$

Átrendezve:
$$\left(\frac{b_1}{3 \cdot b_2} \right)^3 > - \left(\frac{c - \hat{y}}{2 \cdot b_2} \right)^2$$

Az egyenlőtlenség bármely $-\infty < \hat{y} < \infty$ esetén csak akkor teljesül, ha $b_1/b_2 > 0$, tehát ekkor a /14/ szigorúan monoton függvény. Ezzel a feltételezéssel a következő fejezetben élni fogunk.



2.4 Mintameghatározás

A radioimmun analitikai vizsgálatok célja: A szérumok ismeretlen hormontartalmának a meghatározása. Legyen a minta aktivitása B . Ekkor a hozzá számított hatás: $\hat{y} = \text{logit } B/B_0$. A /14/-ből az $\hat{y}$ -hoz számított dózis:

$$\text{/21/} \quad x = \ln X = \sqrt[3]{-\frac{c-\hat{y}}{2b_2} - \sqrt{D}} + \sqrt[3]{-\frac{c-\hat{y}}{2b_2} + \sqrt{D}}$$

$$\text{ahol} \quad D = \left(\frac{c - \hat{y}}{2 \cdot b_2}\right)^2 + \left(\frac{b_1}{3 \cdot b_2}\right)^3$$

Gyakran a minták nem csak a mérendő hormont tartalmaznak, hanem más olyan anyagot is, amely reakcióba léphet az antitesttel. Ilyenkor a szérumot tisztítani kell, ami igen komoly munkával jár, és hatásfoka sem tökéletes. Ekkor ugyanis a mérés előtt olyan eljárást alkalmazunk, amely során a mérendő antigén egy részét elveszítjük. Szükség volt olyan módszer kidolgozására, amely során az antigén visszanyerésének hatásfoka megadható, és így a mért aktivitáshoz a jelzetlen antigén koncentrációja számítható /5/.

A visszanyeréssel történő mintameghatározást a következő elven végezzük: A tisztítási eljárás előtt a mérendő szérumhoz ismert d koncentrációju, R aktivitásu jelzett antigént adunk. Mivel ezt a műveletet minden meghatározandó szérummal elvégezzük, a d -t és R -t a rendszerünkben állandónak tekintjük. A tisztítási eljárás után a szérum $1/h_1$ -ed részéből

a visszanyerés hatásosságát, az $1/h_2$ -ed részéből pedig a minta hormontartalmát határozzuk meg. Legyen a visszanyerés meghatározására kivett rész aktivitása S cpm. Ekkor a visszanyerés hatásossága:

$$\text{Rec\%} = h_1 \frac{S}{R} \cdot 100$$

A mintameghatározásra kivett részhez adjuk a T aktivitású jelzett antigént. Ekkor viszont a mintában lévő összes jelzett antigén aktivitása:

$$\tau = T + \frac{h_1 \cdot S}{h_2}$$

Mivel a τ mintánként különbözik, ezért a standard görbét a T aktivitású jelzett antigén koncentrációval számítjuk. A /7/ -ből a d koncentrációju jelzett antigén többlet miatt:

$$\tau / B = \frac{X + d + X^{\#}}{q}$$

Ennek megfelelően a B/B_0 arány:

$$\hat{y} = \text{logit} \frac{B/\tau}{B_0/T} = \text{logit} \frac{X^{\#}}{X+d+X^{\#}} = \ln X^{\#} - \ln(X+d)$$

Ha tehát a standard görbe alapján határozzuk meg az $\hat{y}$ -hoz tartozó dózisszintet, akkor abban d antigén koncentráció többlettel kell számolnunk.

Legyen az $\hat{y}$ -hoz tartozó dózisszint a standard görbe alapján $\hat{X}$. A higitásokat és az antigén többletet figyelembe véve a minta tényleges hormontartalma:

$$X = \hat{X} \cdot \frac{h_2 \cdot R}{h_1 \cdot S} - d$$

2.5 Az alkalmazott eljárás

Tekintsük a B_0 /a jelzetlen antigén hiányában mért/ aktivitást adott állandónak. Meghatározását a számítási eljárás előtt végezzük el. Legyenek a dózisszintek ahol a méréseket végeztük $X_1, X_2, \dots, X_k$.

Az X_i dózisszinten az aktivitások mért értékei $Z_{i1}, Z_{i2}, \dots, Z_{in_i}$. A dózisszinten az aktivitás

átlag:
$$\bar{Z}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}$$

A mért aktivitások empirikus korrigált szórásnégyzete:

$$\sigma^{*2}(X_i) = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z}_i)^2}{n_i - 1}$$

továbbá
$$t^2 = \frac{\sigma^{*2}(X_i)}{\bar{Z}_i}$$

Az X_i dózisszinteket súlyozzuk a /13/ alapján. A /14/ standard görbe együtthatóinak meghatározását végezzük a legkisebb négyzetek módszerével. A paraméterek meghatározására általában minden számítógép rendelkezik eljárással, ezért ezeket az eljárásokat alkalmazhatjuk a súlyozás esetén is. A HP 9810/A számítógép is rendelkezik olyan mikroprogrammal, amely a súlyozás nélküli esetben kiszámítja az együtthatókat és a korrelációs együtthatót. Három változós esetben ez a

$$V_3 = b_1 \cdot V_1 + b_2 \cdot V_2 + c$$

lineáris függvénykapcsolat együtthatóinak meghatáro-

zását jelenti. A paramétereket a (v_1, v_2, v_3) becslésekből határozzuk meg, ahol

$$\begin{aligned} v_1 &= \sqrt{w_i} \cdot x_i \\ v_2 &= \sqrt{w_i} \cdot x_i^3 \\ v_3 &= \sqrt{w_i} \cdot y_{ij} \end{aligned}$$

Az összegző Σ + mikroprogram az adatregisztereket a következőképpen módosítja:

$$\begin{aligned} \text{Reg}(0) &= \text{Reg}(0) + 1 & \text{Reg}(1) &= \text{Reg}(1) + v_1 \\ \text{Reg}(2) &= \text{Reg}(2) + v_1^2 & \text{Reg}(3) &= \text{Reg}(3) + v_2 \\ \text{Reg}(4) &= \text{Reg}(4) + v_1 \cdot v_2 & \text{Reg}(5) &= \text{Reg}(5) + v_2^2 \\ \text{Reg}(6) &= \text{Reg}(6) + v_3 & \text{Reg}(7) &= \text{Reg}(7) + v_1 \cdot v_3 \\ \text{Reg}(8) &= \text{Reg}(8) + v_2 \cdot v_3 & \text{Reg}(9) &= \text{Reg}(9) + v_3^2 \end{aligned}$$

A regiszterek tartalma az eljárás végén:

$$\begin{aligned} \text{Reg}(0) &= \sum n_i & \text{Reg}(1) &= \sum n_i \sqrt{w_i} x_i \\ \text{Reg}(2) &= \sum n_i w_i x_i^2 & \text{Reg}(3) &= \sum n_i \sqrt{w_i} x_i^3 \\ \text{Reg}(4) &= \sum n_i w_i x_i^4 & \text{Reg}(5) &= \sum n_i w_i x_i^6 \\ \text{Reg}(6) &= \sum \sum \sqrt{w_i} y_{ij} & \text{Reg}(7) &= \sum \sum w_i x_i y_{ij} \\ \text{Reg}(8) &= \sum \sum w_i x_i^3 y_{ij} & \text{Reg}(9) &= \sum \sum w_i y_{ij}^2 \end{aligned}$$

Módosítsuk a $\text{Reg}(0)$, $\text{Reg}(1)$, $\text{Reg}(3)$ és $\text{Reg}(6)$ tartalmát:

$$\begin{aligned} \text{Reg}(0) &= \sum n_i w_i & \text{Reg}(1) &= \sum n_i w_i x_i \\ \text{Reg } 3 &= \sum n_i w_i x_i^3 & \text{Reg } 6 &= \sum \sum w_i y_{ij} \end{aligned}$$

A módosítás minden összegzés után elvégezhető:

$$\text{Reg}(0) = \text{Reg}(0) + w_i - 1$$

$$\text{Reg}(1) = \text{Reg}(1) - v_1 + w_i \cdot x_i$$

$$\text{Reg}(3) = \text{Reg}(3) - v_2 + w_i \cdot x_i^3$$

$$\text{Reg}(6) = \text{Reg}(6) - v_3 + w_i \cdot y_{ij}$$

A súlyozott számtani átlagok számítása:

$$\bar{v}_1 = \frac{\text{Reg}(1)}{\text{Reg}(0)} = \frac{\sum n_i w_i x_i}{\sum n_i w_i}$$

$$\bar{v}_2 = \frac{\text{Reg}(2)}{\text{Reg}(0)} = \frac{\sum n_i w_i x_i^3}{\sum n_i w_i}$$

$$\bar{v}_3 = \frac{\text{Reg}(6)}{\text{Reg}(0)} = \frac{\sum \sum w_i y_{ij}}{\sum n_i w_i}$$

A különbség négyzetösszegek:

$$\begin{aligned} M_{11} &= \sum n_i w_i (x_i - \bar{v}_1)^2 = \\ &= \sum n_i w_i x_i^2 - 2 \bar{v}_1 \sum n_i w_i x_i + \bar{v}_1^2 \sum n_i w_i = \\ &= \sum n_i w_i x_i^2 - \bar{v}_1^2 \sum n_i w_i \\ &= \text{Reg}(2) - \frac{(\text{Reg}(1))^2}{\text{Reg}(0)} \end{aligned}$$

Hasonlóan a többi tagra:

$$M_{22} = \text{Reg}(5) - \frac{(\text{Reg}(3))^2}{\text{Reg}(0)}$$

$$M_{33} = \text{Reg}(9) - \frac{(\text{Reg}(6))^2}{\text{Reg}(0)}$$

$$M_{12} = \text{Reg}(4) - \frac{\text{Reg}(1) \cdot \text{Reg}(3)}{\text{Reg}(0)}$$

$$M_{13} = \text{Reg}(7) - \frac{\text{Reg}(1) \cdot \text{Reg}(6)}{\text{Reg}(0)}$$

$$M_{23} = \text{Reg}(8) - \frac{\text{Reg}(3) \cdot \text{Reg}(6)}{\text{Reg}(0)}$$

A standard görbe együtthatói így a /18/ egyenletrendszer megoldása.

Azt, hogy a /14/ függvénykapcsolat az empirikus adatokra igaz-e, a /20/ hipotézisvizsgálattal ellenőrizzük.

A minták meghatározását a /21/ alapján végezzük.

3. MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Amikor a radioimmun analitika a klinikai gyakorlatban is rutin módszerre vált, rögtön felmerült az igény a segítségével nyert eredmények minőségellenőrzésére /Quality Control/. Kézenfekvőnek látszott, hogy a klinikai kémiában már jól bevált módszert vegyék át erre a célra. Az alkalmazás viszont számos akadályba ütközött, amik áthidalhatatlannak látszottak. Nem voltak egységesek a különböző laboratóriumokban használt módszerek, eszközök, mérőberendezések, de a minőségellenőrzésre alkalmas szérumok sem álltak rendelkezésre. Enélkül nem nyilhatott mód sem belső, sem pedig külső ellenőrzésre. Ahogy terjedtek a radioimmun analitikai módszerek, úgy vált egyre szükségesebbé a kérdés megoldása, hiszen az ezerszámra végzett RIA meghatározásoknak megbízhatóknak /reprodukálhatóknak, precizeknek, pontosaknak, torzításmenteseknek/ kell lenniük.

Reprodukálhatóságon azt értjük, hogy egy szérum minta hormontartalmát bármikor, bármely RIA vizsgálatban, vagy egy vizsgálat bármely szakaszán megmérhetjük.

Precizségen, pontosságon a párhuzamos méréseknél fellépő véletlen okozta eltéréseket értjük.

Torzításon a minták általunk mért értéke és tényleges hormontartalma közötti eltérést értjük.

Az első világméretű RIA ellenőrző kísérletet az Egészségügyi Világszervezet /WHO/ szervezte meg /1976-tól/, és minden WHO Kutató Központ - összesen 56 laboratórium - részt vett benne. Laboratóriumunkban 5 éve vé-

gezzük a RIA minőségellenőrzését. Ez idő alatt a klasszikus kémiai vizsgálati módszerek mintájára alakítottuk ki a laboratórium belső minőségellenőrzését, ami a mintameghatározások megbízhatóságának megítélése szempontjából alapvetően fontos. Csak így lehet összehasonlítani és elfogadni a különböző vizsgálatokban, különböző emberek által, különböző laboratóriumokban mért eredményeket.

A minőségellenőrzés a radioimmun analitikában a mértéket jelenti. Ennek ellenére gyakran eltekintenek tőle, mondván, hogy a standard görbe megbízhatósága elegendő a mintameghatározások megbízhatóságához. Klasszikus értelemben minőségellenőrzés az ellenőrző minták felhasználásával végzett ellenőrzés. Mi ezt általánosítottuk a radioimmun analitikai vizsgálat különböző szakaszaira. Így a minőségellenőrzést a következő fázisokban végezzük:

1. A standard görbe alkalmazhatóságának elemzése;
2. A vizsgálat belső ellenőrzése;
3. A vizsgálatok közötti ellenőrzés.

A több szinten végzett ellenőrzés megkönnyíti az esetleges hibák felderítését, elemzését. A paraméterek vizsgálatonkénti változásának figyelemmel kísérése jelzi a módszerben bekövetkezett változásokat is.

3.1 A standard görbe alkalmazhatóságának elemzése

A standard görbe megbízhatóságának megítélése szempontjából a /20/ hipotézis ellenőrzése nem nyújt elegendő információt. A RIA -ban elkövethetünk olyan hibákat is, amit ez a próba nem fed fel.

3.1.1 Az Assay-közép /MD₅₀/

A $B/B_0=0.5$ -hez tartozó dózisszintet Assay-középnek /midrange/ nevezzük. Ekkor a $\text{logit } B/B_0 = 0$, és az ehhez tartozó dózisszint : $X = \text{MD}_{50}$.

Az Assay-közép becslésének a hibája egy állandó relatív eltérést eredményez a mintameghatározásokban.

Tegyük fel ugyanis, hogy két standard görbe slope-ja /a /12/ standard görbe iránytangense/ azonos, és csak az Assay-közepük tér el. Ekkor a standard görbék:

$$\text{I.} \quad \frac{\text{logit } B/B_0}{b} = \ln X + \frac{c}{b}$$

$$\text{II.} \quad \frac{\text{logit } B/B_0}{b} = \ln X + \frac{c}{b} + \infty$$

Válasszunk egy tetszőleges $0 < B/B_0 < 1$ hatást. Az ehhez tartozó dózisok I. alapján X_1 , II. alapján X_2 . Ekkor az arányukra:

$$\frac{\text{logit } B/B_0}{b} = \ln X_1 + \frac{c}{b} = \ln X_2 + \frac{c}{b} + \alpha$$

Ebból $\frac{X_1}{X_2} = e^{\alpha}$

Tehát ekkor a minták hormonkoncentrációjának becslésénél azonos arányu hibával kell számolni. A hibát az Assay-középnek egy elméleti értéktől való relatív eltérése alapján ellenőrizzük.

3.1.2 A slope

A /12/ összefüggés iránytangensét az irodalom slope-nak nevezi. Mivel az iránytangens elméleti értéke a /8/ alapján: $b_e = -1$, ezért szükség van arra, hogy megvizsgáljuk, milyen mértékben tér el az elméleti, és az általunk empirikus adatokból számított slope. A $b = -1$ ellenőrzését csak egy konkrét vizsgálat standard görbéjénél alkalmazzuk /5/.

A gyakorlatban a slope ellenőrzésének az a jelentősége, hogy ha az alapállapotokban változás történik /pl. az inkubációs idő vagy hőmérséklet változik/, akkor ez a slope változását is maga után vonja.

Előfordulhat, hogy a $b = -1$ feltétel nem teljesül. Rodbard szerint /21/ ez a vizsgált hormonok mintegy 5 - 10 %-ában áll fenn. Ezért általában a megváltozott körülmények a felelősek. Tapasztalataink alapján ez a gyors RIA módszereknél fordul elő, ahol a reakció magasabb inkubációs hőmérsékleten, rövidebb idő alatt megy végbe. Ekkor több vizsgálat alapján becsüljük

b várható értékét, valamint a vizsgálatok közötti szórását. A slope-t minden esetben a várható értékkel hasonlítjuk össze /5/.

A /14/ típusu standard görbéhez is definiálhatunk slope-t. Erre két módszer kínálkozik.

a/ Slope a méréstartomány alapján

Legyen a $0 < Y_1, Y_2 < 1$ a $B/B_0 = 0.5$ -re szimmetrikus. Legyen a /14/ alapján a hozzájuk tartozó dózisszint X_1 és X_2 . Ekkor a méréstartomány:

$$\mathcal{X} = \{X : X_1 < X < X_2\}$$

Legyen most a slope:

$$b = \frac{\text{logit}(Y_1) - \text{logit}(Y_2)}{\ln X_1 - \ln X_2}$$

b/ Slope az MD_{50} alapján

Ekkor a slope a /14/ érintőjének az iránytangense az $X = MD_{50}$ -nél:

$$b = y'(\ln MD_{50}) = 3 \cdot b_2 \cdot \ln^2(MD_{50}) + b_1$$

3.1.3 A higitási hiba vizsgálata

A standard mintákat általában a legtöményebb minta felező higitásaival állítjuk elő. Ekkor előfordulhat, hogy a minták higitásánál követünk el valamilyen

hibát. /A leggyakoribb, ha a pipetta hegye hibás, vagy nem megfelelő./ Vizsgáljuk meg ezért a /12/ lineáris standard görbén keresztül az $y_e(X) / b = -1/$ elméleti, és $y(X) / b \neq -1/$ standard görbék mintameghatározást befolyásoló hatását. Ekkor legyen

$$\text{I.} \quad y_e(X) = A_1 - \ln X$$

$$\text{II.} \quad y(X) = A_2 + b \cdot \ln X$$

Legyen az (X_0, y_0) a két görbe közös pontja, ekkor $y_e(X_0) = y(X_0) = y_0$. Ennek általában a legtöményebb dózisszint vagy az MD_{50} és a hozzájuk tartozó logit B/B_0 választása a legcélszerűbb. Legyen az (X_1, y_1) az elméleti /I./ standard görbe pontja. Nézzük meg, hogy a II. standard görbénél y_1 -hez milyen dózisszint tartozik. Jelöljük ezt X_2 -vel, vagyis $y_e(X_1) = y(X_2) = y_1$. Mivel az (X_0, y_0) közös pont, X_2 -re a következő egyenletet kapjuk:

$$y_e(X_0) - y_e(X_1) = y(X_0) - y(X_2)$$

Az I. és II. felhasználásával:

$$\ln X_1 - \ln X_0 = b \cdot (\ln X_0 - \ln X_2)$$

$$\ln X_1 / X_0 = -b \cdot \ln X_2 / X_0$$

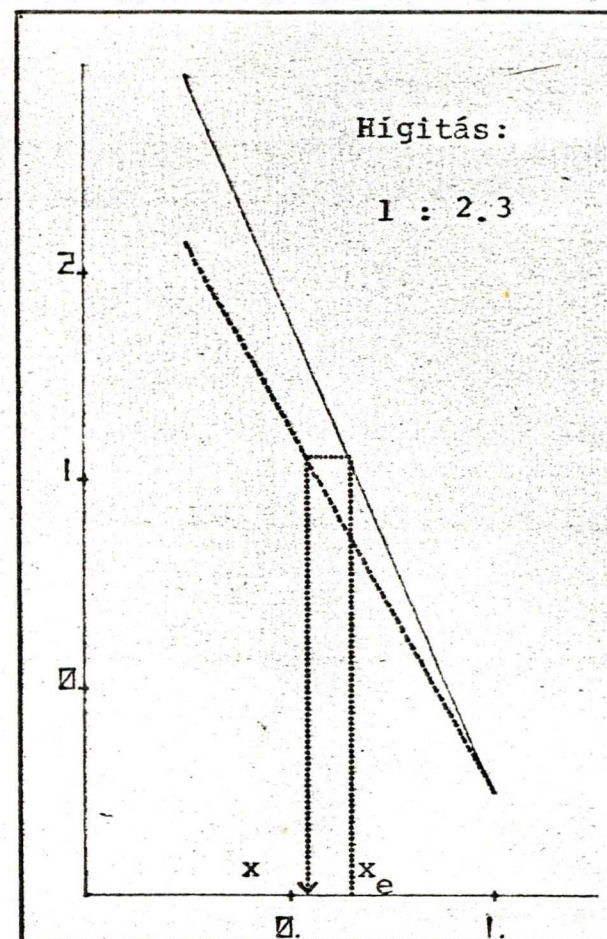
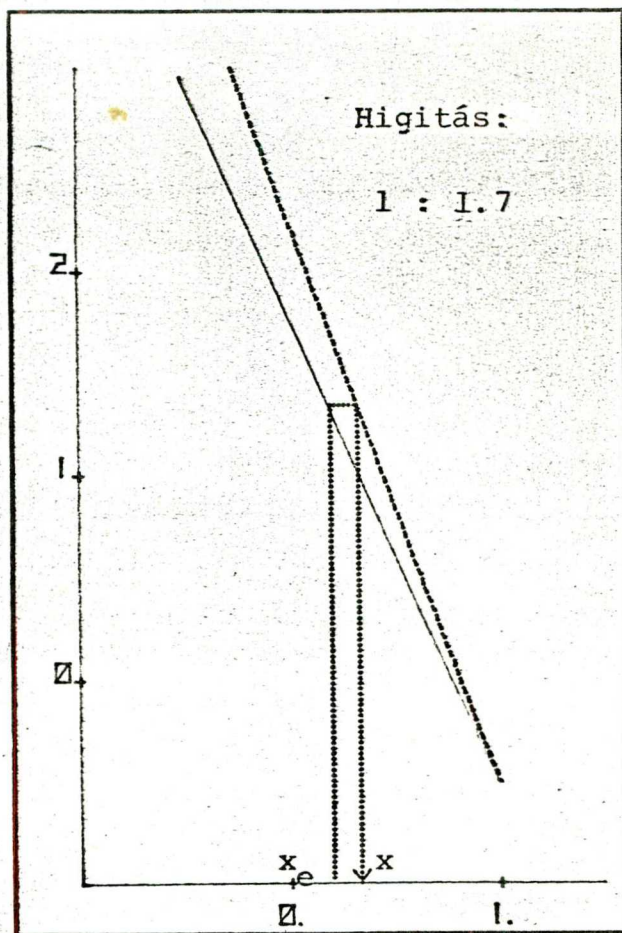
Ha a higitás $1/h$ arányban történt, de $1/2$ -es higitással számítottuk a standard görbét, akkor $b \neq -1$. Így a b ismeretében számítható a h higitás:

$$\ln 1/2 = -b \cdot \ln X_2 / X_0 = -b \cdot \ln 1/h$$

$$\ln h = - \frac{\ln 2}{b}$$

A 2.ábrán a standard minták alul és tulhigitásának hatása látható a mintameghatározásra.

logit B/B_0



log dózis

2. ábra A standard minták hígításánál elkövetett hiba hatása a minták becslésére
- x_e : a minta várható értéke az elméleti meredekség alapján;
- x : a minta számított koncentrációja.

3.1.4 A linearitás grafikus vizsgálata

Annak a hipotézisnek az eldöntésére, hogy a /12/ standard görbe az alappontokban valóban lineáris, általánosan kidolgozott módszer /42/ áll rendelkezésünkre. Ebben az esetben azzal a feltételezéssel kell élnünk, hogy az X_i dózisszinten az η_i normális eloszlású valószínűségi változó. Dózisszintenkénti két mintameghatározást véve alapul, ennek a feltételezésnek az ellenőrzésétől eltekintünk. Ekkor az X_i dózisszinten $i=1, \dots, k$ a mintákhoz tartozó értékek legyenek η_{i1} és η_{i2} , átlaguk $\bar{\eta}_i$, továbbá az X_i dózisszinthez a /12/ alapján számított érték y_i . Ebben az esetben a következő egyszerű eljárás segítségével válaszoljuk meg a hipotézist:

Ha a méréspontok közrefogják a standard görbét, akkor a linearitás hipotézisét elfogadjuk, egyébként szükséges a hipotézis számítással való ellenőrzése.

A közrefogás ebben az esetben a következőt jelenti: Minden dózisszintre $i=1, \dots, k$: $|\eta_{ij} - y_i| \leq |\eta_{i1} - \eta_{i2}|$ $j=1, 2$. Az irodalom /42/ felhasználásával az eljárás alkalmazásának helyessége számítással is ellenőrizhető:

$$F = \frac{\sum \sum (\bar{\eta}_i - y_i)^2}{k-2} \cdot \frac{k}{\sum \sum (\eta_{ij} - \bar{\eta}_i)^2} = \frac{k \cdot \sum 2(\bar{\eta}_i - y_i)^2}{(k-2) \cdot \sum \sum (\eta_{ij} - \bar{\eta}_i)^2}$$

A közrefogás miatt minden i -re:

$$2(\bar{\eta}_i - y_i)^2 = 2 \left(\frac{\eta_{i1} - y_i}{2} + \frac{\eta_{i2} - y_i}{2} \right)^2 \leq \frac{(\eta_{i1} - \eta_{i2})^2}{2}$$

mivel $(\eta_{i1} - y_i)^2$ és $(\eta_{i2} - y_i)^2 \leq (\eta_{i1} - \eta_{i2})^2$, továbbá

$$(\eta_{i1} - \bar{\eta}_i)^2 = \left(\eta_{i1} - \frac{\eta_{i1} + \eta_{i2}}{2} \right)^2 = \left(\frac{\eta_{i1} - \eta_{i2}}{2} \right)^2$$

ezért
$$F = \frac{k}{k-2} \cdot \frac{\sum 2(\bar{\eta}_i - \bar{y})^2}{\sum \frac{1}{2}(\eta_{i1} - \eta_{i2})^2} \leq \frac{k}{k-2}$$

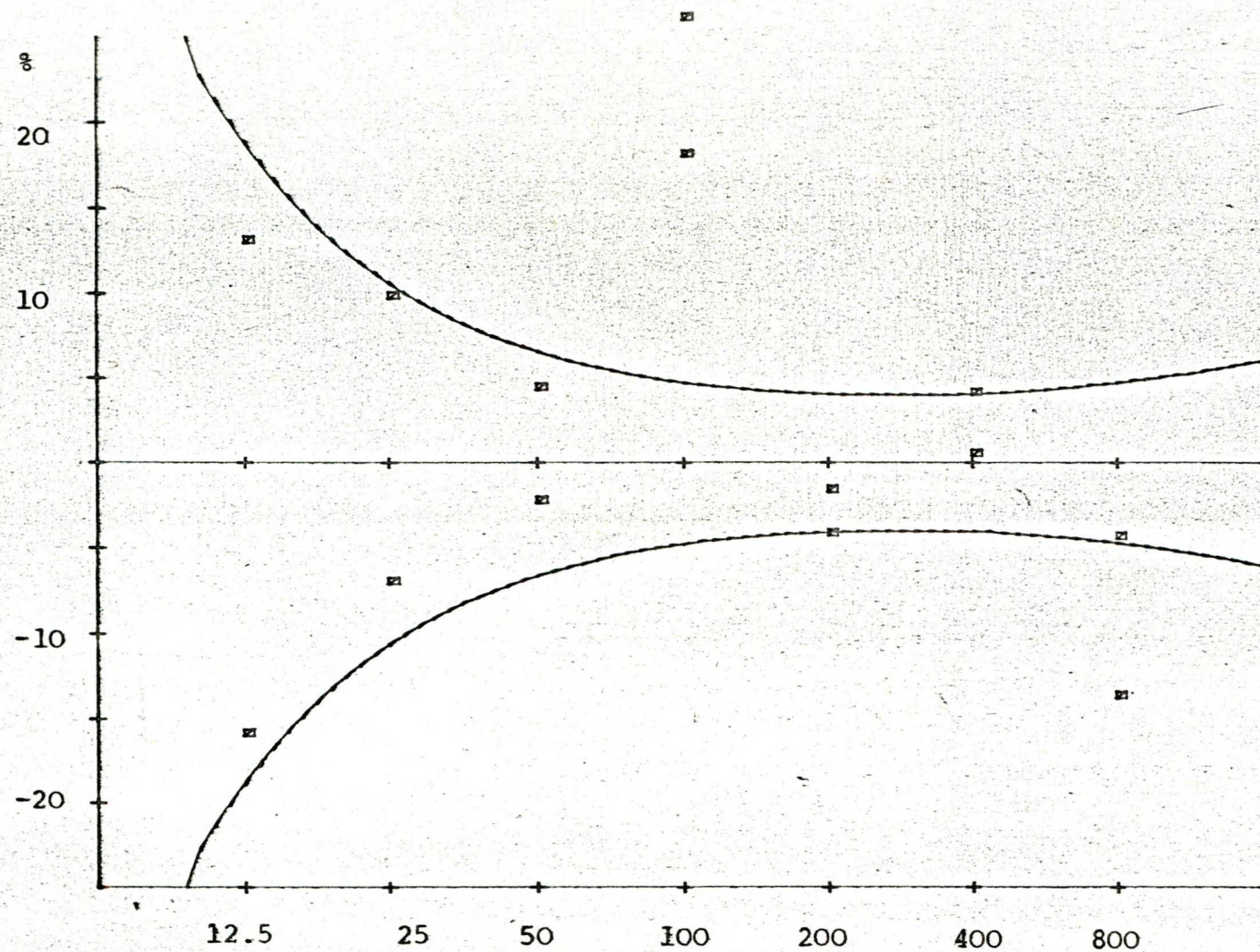
$k \geq 3$ esetén ez a hányados $(k, k-2)$ paraméterű F-eloszlást követ. A linearitás hipotézisét szignifikánsan nagy számított F esetén vetjük el. Az F-táblázattal összevetve azonban könnyű észrevenni, hogy a $k/(k-2)$ hányados bármely k esetén kisebb lesz, mint a $(k, k-2)$ szabadságfokokhoz tartozó 95%-os kritikus F érték. A hipotézis ellenőrzését így a gyakorlatban először a standard görbe és a méréspontok felrajzolásával végezzük /3.ábra/. Itt jelöltük az aktivitásbecslések relatív hibáját is.

3.1.5 A standard görbe precizitása

Az általunk alkalmazott standard görbe illesztése esetén az összefüggés szorosságának a vizsgálatára a korrelációs együttható nem alkalmazható. Szükség volt olyan paraméter bevezetésére, ami segítségével a függvénykapcsolatot jellemezni tudjuk. Erre az irodalomban ismert λ paramétert használjuk, amit a standard görbe precizitásának nevezünk /24/. Ennek számítása:

$$\lambda = \frac{1}{|b|} \cdot \frac{\sum \sum w_i (\eta_{ij} - y(x_i))^2}{\sum w_i w_i}$$

A gyakorlatban a λ -t empirikus korlátok alapján



3. ábra A linearitás grafikus vizsgálata

A standard minták relatív eltérése a standard görbétől

ítéljük meg. Ha $\lambda < 0.05$, akkor a standard görbe precizitása jó, ha $\lambda > 0.15$, akkor a standard görbét nem fogadjuk el a kiértékelésre a nagy relatív hiba miatt. A gyakorlat azt mutatja, hogy a λ és a leírt grafikus linearitásvizsgálat sokkal megbízhatóbb a standard görbe megítélése szempontjából, mint a javasolt korrelációs együttható /27/. A λ -val a méréspontok és a standard görbe relatív eltérését, a rajzzal a méréspontok és a standard görbe elhelyezkedését jellemezzük, míg az r csak az eltérésről nyújt információt.

3.2 A vizsgálat belső ellenőrzése

Az antitest kötőhelyek koncentrációja és a jelzett antigén koncentrációja alapvetően meghatározza a radioimmun analitikai rendszert. A jelzett antigén radioaktivitása az izotóp bomlása miatt változik. Ezért szükséges néhány olyan jellemzőnek a meghatározása, amely segítségével figyelemmel kísérhető a rendszer változása.

3.2.1 Az alapparaméterek

A radioimmun analitikai rendszert csak a mért aktivitások alapján tudjuk ellenőrizni. A rendszerben mérjük

az összes jelzett antigén aktivitását /T/,

a nem specifikus kötés aktivitását /NSB/,

a jelzetlen antigén hiányában mért kötött frakció aktivitását /Bo/.

Ezek várható értékeit becsléssel határozzuk meg, és egy adott vizsgálaton belül állandóknak tekintjük. Az ellenőrzésre a T aktivitást, az NSB aktivitást és a kötés-% -ot használjuk, ahol

$$\text{kötés-\%} = \frac{Bo}{T} \cdot 100$$

Az alapparaméterek közé tartozik az MD₅₀ és a mérés-tartomány is. Az MD₅₀ ebben az esetben a méréstartomány elhelyezkedéséről nyújt információt.

A mintameghatározások relatív hibája a különböző dózisszinteken eltérő. Ezért van szükség egy olyan dózis intervallum kijelölésére, melyen a mérések várható relatív hibája elfogadható, vagyis egy általunk előre megadott korlát alatt marad. A dózis intervallumot nevezzük méréstartománynak. Kijelölése általában szubjektív. A legelfogadottabb a B/Bo -ra megállapított 0.2 - 0.8 tartomány /24/.

Az alapparamétereket az egymást követő vizsgálatokban célszerű grafikonon vezetni. Ezt Progress-Chart -nak nevezzük. Alkalmazása elengedhetetlenül szükséges a paraméterek változásának követéséhez.

3.2.2 A precíziós profil

A standard görbe választása általában szubjektív. Így ha két vizsgálat kiértékelését azonos típusu /pl. hi-

perbolikus/ standard görbével végeztük, az összefüggés paraméterei alapján nehéz megmondani, hogy ugyanazon minták mérése esetén melyik vizsgálatban mért értékeket fogadjuk el. Két különböző típusu standard görbe alkalmazása esetén az összefüggés paraméterei alapján ez a kérdés szinte megválaszolhatatlan. Eldőnithető azonban az, hogy egy tetszőleges dózisszinten a becslés várható hibája melyik standard görbénél volt kisebb. Így több, akár különböző típusu standard görbével végzett mintameghatározás megbízhatósága összehasonlítható.

3.2.2.1 Az empirikus preciziós profil

A mintameghatározásoknál a precizitáson a párhuzamos meghatározások hibáját értjük, és a szórással vagy a variációs együtthatóval jellemezzük. Az aktivitások mérésénél a meghatározások precizitásának vizsgálata megszerkesztettük a /9,10/ RER függvényt. Az aktivitás tartományon értelmezett RER függvény egy megfelelője a dózistartományon értelmezett preciziós profil /PRP/.

Preciziós profilnak nevezzük a mintameghatározások dózistartományon értelmezett abszolút vagy relatív hibafüggvényét.

A preciziós profil meghatározását a minták aktivitásának méréséből vezetjük le. Ezért az értelmezése az alábbiakon alapszik:



- a/ A logit z/B_0 hatás és $x = \ln X$ dózis változók között a kapcsolatot a

$$\text{logit } z/B_0 = y(x) = y(\ln X)$$

standard görbe írja le, ahol z a minta mért aktivitása. Az összefüggést az aktivitás változója zóra rendezve:

$$z = z(X) = \frac{B_0 \cdot e^{y(x)}}{1 + e^{y(x)}}$$

Mivel a standard görbe szigorúan monoton, folytonos a $0 < z < B_0$ intervallumon, ezért a $z(X)$ függvénynek létezik inverze, ezt jelöljük $\varphi(z)$ -vel. A szérumban mért z aktivitása alapján határozzuk meg a minta $X = \varphi(z)$ hormonkoncentrációját.

- b/ Legyen egy szérumban mért aktivitás időegységre eső aktivitásának mért értéke a ζ valószínűségi változó, amely normális eloszlást követ /a központi határeloszlás tétele alapján /42//. Legyen a ζ várható értéke az X dózisszinten $M(\zeta|X) = z$, szórása $D(\zeta|X) > 0$.

- c/ Tekintsük a $\xi = \varphi(\zeta)$ transzformációt. Ekkor a ζ valószínűségi változó minden egyes értékéhez a ξ valószínűségi változónak pontosan egy érték tartozik. Mivel ismerjük a ζ eloszlását, ez egyértelműen meghatározza ξ eloszlását.

- d/ Legyen ζ eloszlásfüggvénye az $F(z)$, a ξ eloszlásfüggvénye a $G(X)$. A φ függvény alapján meghatározható a két eloszlásfüggvény kapcsolata:

$$G(X) = P(\xi < X) = P(\varphi(\zeta) < X) = P(\zeta < \varphi^{-1}(X)) = F(\varphi^{-1}(X))$$

Ha a ζ eloszlásfüggvénye folytonosan differenciálható, φ bármely $z \in (0, B_0)$ pontban differenciálható és $\varphi'(z) \neq 0$, akkor a ζ és ξ sűrűségfüggvényei közötti kapcsolat:

$$g(X) = \frac{\partial G(X)}{\partial X} = \frac{\partial F(\varphi^{-1}(X))}{\partial X} = f(\varphi^{-1}(X)) \cdot \left| \frac{\varphi^{-1}(X)}{\partial X} \right|$$

Tehát tetszőlegesen rögzített $\hat{X} > 0$ dózisszinten, ahol $M(\zeta|\hat{X}) = B$ $\hat{X} = \varphi(B)/:$

$$g(\hat{X}) = f(B) \cdot \left| \frac{dz}{dX} \right|_{z=B}$$

e/ Ha a ζ valószínűségi változó folytonos, és az értelmezési tartomány bármely $z \in (0, B_0)$ pontjában véges várható értékkel és szórással rendelkezik, továbbá φ az értelmezési tartomány bármely pontjában differenciálható és $\varphi'(z) \neq 0$, akkor a ζ és ξ szórásai közötti kapcsolat az $\hat{X}$ dózisszinten /41,43/:

$$D(\zeta|\hat{X}) = D(\xi|\hat{X}) \left| \frac{d\varphi^{-1}(X)}{dX} \right|_{X=\hat{X}}$$

A ζ aktivitás és ξ dózis változókra az a/-e/ feltételek teljesülnek, így vizsgálhatjuk az aktivitás változó képének viselkedését a dózis tartományon.

Legyen a tetszőleges $\lambda(z)$ RER függvény szigorúan monoton, folytonos a $(0, B_0)$ intervallumon, továbbá a dózis és aktivitás változók közötti függvénykapcsolatot írja le az $X = \varphi(z)$ standard görbe. Legyen

$$X_- = \begin{cases} 0 & , \text{ ha } z + \lambda(z) \geq B_0 \\ \varphi(z + \lambda(z)) & , \text{ ha } B_0 > z + \lambda(z) > 0 \\ \varphi(z) & \text{ egyébként} \end{cases}$$

Tekintsük az aktivitás tartomány és a dózis tartomány pontjai között a következő megfeleltetést:

$$\psi(\lambda(z)) = \varphi(z) - \varphi(z + \lambda(z)) = X - X_-$$

Ez a megfeleltetés a dózis tartomány bármely $X = \varphi(z) > 0$ pontjára értelmezett. Ekkor legyen

$$/23/ \quad X - X_- = \psi(\lambda(z)) = \psi(\lambda(\varphi^{-1}(X))) = h(X)$$

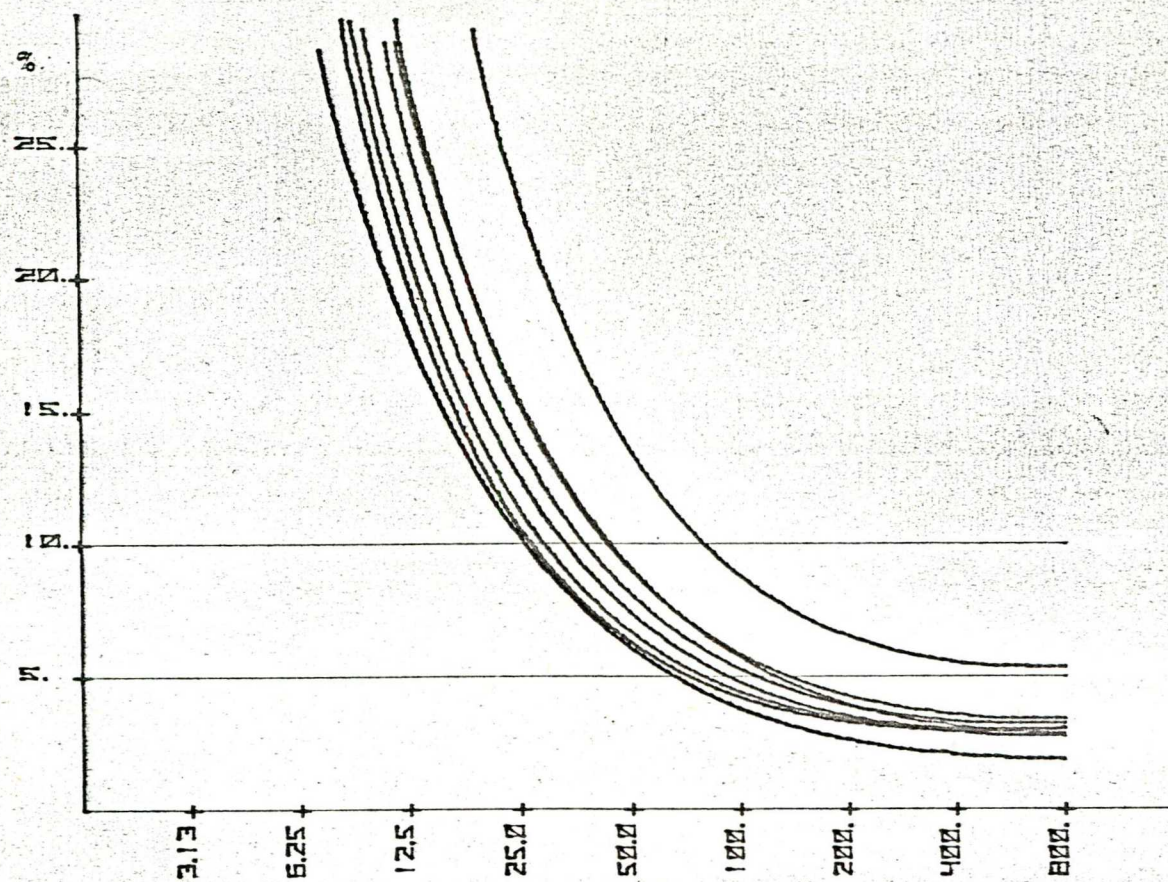
Az aktivitás tartományon értelmezett RER függvény ismeretében a dózistartomány pontjaira meghatározott $h(X)$ függvényt nevezzük az empirikus precíziós profilnak.

Mivel az $\lambda(z)$ RER függvények vizsgálatonként különböznek, ezért a precíziós profilok is különbözők lesznek. A 4. ábrán együtt látható néhány vizsgálat precíziós profilja. A precíziós profilnak ezt a tulajdonságát használjuk ki a vizsgálatok megbízhatóság szerinti rangsorolására.

Legyen $\mathcal{V}_1$ és $\mathcal{V}_2$ két vizsgálat. A hozzájuk tartozó precíziós profilok: $h_1(X)$ és $h_2(X)$.

A dózistartomány (a, b) intervallumán a $\mathcal{V}_1$ vizsgálat jobb, megbízhatóbb, mint a $\mathcal{V}_2$ vizsgálat, ha

$$(\forall x \in (a, b)) (h_1(x) < h_2(x))$$



4. ábra Több vizsgálat $y = \frac{h(x)}{x}$ preciziós profilja

Ily módon a vizsgálatok rangsorolhatók. Az eljárás előnye, hogy a standard görbe típusától függetlenül alkalmazható az egyes radioimmun analitikai vizsgálatok összehasonlítására.

3.2.2.2 Az elméleti precíziós profil

Az egyes vizsgálatokhoz tartozó $\lambda(z)$ RER függvények vizsgálatonként különböznek, mivel itt a szérum minták mérésénél elkövetett valamennyi hiba hatását figyelembe vesszük. Ha a minták meghatározásának a hibája csak az aktivitás méréséből származik, akkor a hiba vizsgálata az egyes dózisszinteken lényegesen leegyszerűsödik. Mivel azonban az így nyert aktivitás-hibafüggvény a vizsgálatoktól független, ezért ennek egy megfelelően transzformált alakját elméleti precíziós profilnak nevezzük. Ezt elsősorban a mintameghatározások megbízhatóságának megítélésénél alkalmazzuk, de ennek alapján határozzuk meg a méréstartományt is.

Tekintsük a /12/ standard görbét:

$$\text{logit } z/B_0 = b \cdot \ln X + c$$

ahol z a mért aktivitás. Az itt szereplő c -t MD_{50} -el kifejezve:

$$b \cdot \ln MD_{50} + c = 0 \quad \text{ebből}$$

$$c = -b \cdot \ln MD_{50}$$

Ennek felhasználásával a standard görbe:

$$\logit z/Bo = b \cdot \ln(X/MD_{50})$$

Rendezzük ezt az aktivitás változóra:

$$/24/ \quad z = \frac{Bo}{1 + (X/MD_{50})^{-b}}$$

A ζ aktivitás és ξ dózis változókra az előző fejezet a/-e/ feltételei teljesülnek. A /24/-ből

$$\frac{dz}{dX} = \frac{b \cdot Bo \cdot (X/MD)^{-b}}{X \cdot (1 + (X/MD)^{-b})^2}$$

Mivel $(X/MD_{50})^{-b} = \frac{Bo - z}{z}$, ezért a ζ akti-

vitás és a $\xi = \varphi(\zeta)$ dózis változó szórásaira egy tetszőleges $X = \varphi(z)$ dózisszinten:

$$\frac{D(\zeta|X)}{D(\xi|X)} = \frac{|b| \cdot z \cdot (Bo - z)}{X \cdot Bo}$$

Használjuk ki, hogy radioaktív anyag bomlása esetén egy kémcső egy időegység alatt mért aktivitása Poisson-eloszlást követ. Így a központi határeloszlás tétel alapján az időegységre eső aktivitás szórásnégyzete:

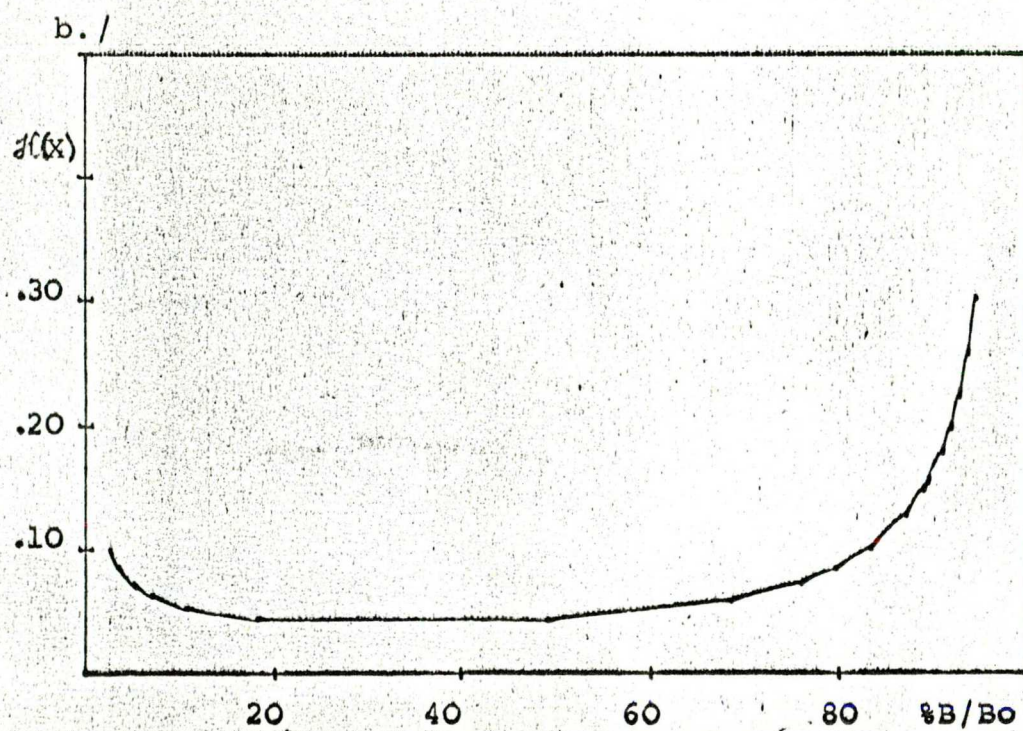
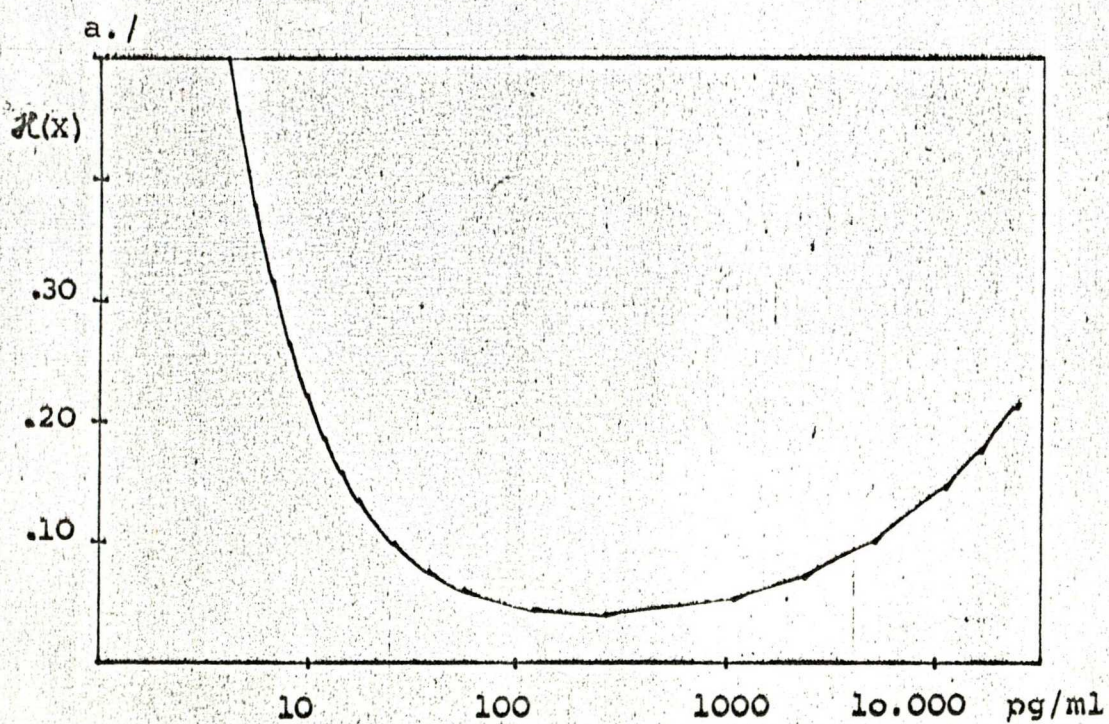
$$D^2(\zeta|X) = M(\zeta|X) = z$$

Ennek alapján a ξ szórása az $X = \varphi(z)$ dózisszinten:

$$D(\xi|X) = h(X) = \frac{X \cdot Bo}{|b| \cdot \sqrt{z} \cdot (Bo - z)} = h(\varphi(z))$$

Gyakran szükség van a várható relatív hiba ismeretére. Ez az elméleti precíziós profil ismeretében egyszerűen

5. ábra A $\mathcal{H}(x)$ és a log dózis /a./ valamint a $\mathcal{H}(x)$ és a B/B_0 kötés-% /b./ közötti összefüggés



megadható:

$$/25/ \quad \mathcal{H}(x) = \frac{h(x)}{x} = \mathcal{H}(\varphi(z)) = \frac{Bo}{|b| \cdot \sqrt{z} \cdot (Bo-z)}$$

3.2.3 A méréstartomány meghatározása

A B/Bo -ra megállapított $(0.2, 0.8)$ méréstartomány a meghatározások megbízhatóságáról nem nyújt elegendő információt. Előfordulhat, hogy egy meghatározás várható hibája - annak ellenére, hogy a minta az így megállapított méréstartományba esik - jóval nagyobb egy előre megadott szintnél. Ezért célszerű a méréstartományt a precíziós profil alapján megadni. Mi erre a célra a $/25/ \mathcal{H}(x)$ precíziós profilt alkalmazzuk. Ekkor

$$\mathcal{H}(x) = \mathcal{H}(\varphi(z)) = \frac{Bo}{|b| \cdot \sqrt{z} \cdot (Bo-z)}$$

A $\mathcal{H}(x) = \mathcal{H}(\varphi(z))$ függvény folytonos bármely $z \in (0, Bo)$ pontban, továbbá

$$\lim_{z \rightarrow Bo} \mathcal{H}(\varphi(z)) = \infty \qquad \lim_{z \rightarrow 0} \mathcal{H}(\varphi(z)) = \infty$$

A $\mathcal{H}(\varphi(z))$ függvény a minimumát a

$$\frac{d\mathcal{H}}{dz} = - \frac{Bo(Bo - 3 \cdot z)}{2 \cdot |b| \cdot z^{3/2} (Bo-z)^2} = 0$$

teljesülése esetén a $z = \frac{Bo}{3}$ pontban veszi

fel. Az ehhez tartozó X_M dózisszint:

$$\text{logit } \frac{Bo}{3 \cdot Bo} = \ln 1/2 = b \cdot \ln(X_M / MD_{50})$$

$$\text{Ebből } X_M = 2^{-\frac{1}{b}} \cdot MD_{50}$$

Ideális esetben, ha $b = -1$:

$$X_M = 2 \cdot MD_{50}$$

A $\mathcal{H}(X) = \mathcal{H}(\varphi(z))$ függvény értéke a $z = \frac{Bo}{3}$ helyen:

$$\sigma_M = \mathcal{H}\left(\varphi\left(\frac{Bo}{3}\right)\right) = \frac{Bo}{|b| \cdot \sqrt{Bo} \cdot \frac{2}{3}Bo} = \frac{3}{2 \cdot |b| \cdot \sqrt{Bo}}$$

A méréstartomány meghatározását egy előre megadott $\sigma > 0$ hibakorlát alapján végezzük. Ekkor σ csak úgy választható, hogy $\sigma > \sigma_M$.

A σ -hoz tartozó z_1 és z_2 értéket a

$$\sigma = \frac{Bo}{|b| \cdot \sqrt{z} \cdot (Bo - z)}$$

egyenletből numerikus módszerrel határozzuk meg /43/.

A z_1 -hez és a z_2 -höz tartozó $X_1 = \varphi(z_1)$ és $X_2 = \varphi(z_2)$ dózisszintek lesznek a méréstartomány határai.

3.2.4 A legkisebb mérhető dózis /MMD/

A radioimmun analitikai módszer szempontjából fontos tudnunk, hogy mi az a legkisebb hormonkoncentráció, amit még biztonsággal meg tudunk határozni. Ezt minimális mérhető dózissnak /MMD/, vagy a kimutathatóság határának nevezzük. Az MMD mérésére és számítására több módszer is ismeretes./25,26,27/.

I. A vizérték meghatározása

Az MMD empirikus úton történő meghatározását vizmintha mérésével végezzük. Ekkor szérum helyett vizet teszünk a rendszerbe, és meghatározzuk a hozzátartozó dózisszintet. Ezt vizértéknek nevezzük, és ezt tekintjük a módszer empirikusan meghatározott legkisebb mérhető dózisának.

II. Az MMD meghatározása becsléssel

Tekintsük a ζ normális eloszlású valószínűségi változót, amely most jelölje egy tetszőleges szérum minta mért aktivitását. Legyen a B_0 a rendszerre jellemző állandó, a zero dózis aktivitása. Egy n elemű független minta alapján ellenőrizzük a

$$H_0 : M(\zeta) = B_0$$

hipotézist az $M(\zeta) < B_0$ ellenhipotézis mellett. Tegyük fel, hogy ζ szórása ismert: $D(\zeta) = \sigma^2$. Ekkor a hipotézis ellenőrzését az

$$u = \frac{B_0 - \bar{\zeta}}{\sigma} \cdot \sqrt{n}$$

statisztika alapján végezzük. Vegyük a táblázatból azt az u_p értéket, melyre a H_0 -t 95%-os szinten elutasítjuk. A megadott statisztika alapján vegyük azt a B értéket, melyre

$$B = B_0 - u_p \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Legyen most a standard görbe alapján a minimális mérhető dózis: $MMD = \varphi(B)$.

A gyakorlatban a B_0 értékét is becsléssel határozzuk meg. Legyen ekkor ζ_0 a zéró dózishoz tartozó aktivitás becslése, mint valószínűségi változó, melyre tekintsünk egy m elemű mintát. Tegyük fel, hogy $D(\zeta_0) = D(\zeta) = \sigma^2$ ismert. Ellenőrizzük most a

$$H_0 : M(\zeta) = M(\zeta_0)$$

hipotézist az $M(\zeta) < M(\zeta_0)$ ellenhipotézis mellett. Ekkor a hozzátartozó statisztika:

$$u = \frac{\bar{\zeta}_0 - \bar{\zeta}}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

Vegyük most a táblázatból azt az u_p értéket, melyre a hipotézist 95%-os szinten elutasítjuk. Mivel a B_0 -t a $\bar{\zeta}_0$ -al becsljük, így ennek ismeretében tekintsük azt a B értéket, melyre

$$B = \bar{\zeta}_0 - u_p \cdot \sigma \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}$$

A minimális mérhető dózis: $MMD = \varphi(B)$.



3.3 A vizsgálatok közötti ellenőrzés

A radioimmun analitikai vizsgálatokban a vizsgálatok közötti ellenőrzést az analitikai kémiai vizsgálatok minőségellenőrzésének mintájára végezzük /5,34,36,38/. A vizsgálatok közötti ellenőrzés adja az alapot a különböző vizsgálatokban mért értékek összehasonlítására. Minél több mérést végzünk egy minta hormontartalmának meghatározására, annál megbízhatóbb a várható értékére tett becslésünk. Egy vizsgálatban csak korlátozott számú mintameghatározást végezhetünk, a különböző vizsgálatokban viszont a körülmények eltérnek /pl. a jelzett antigén koncentrációja, specifikus aktivitása, vagy az antitest koncentrációja, esetleg a vizsgált térfogat változhat mintánként/.

Az ismeretlen minták hormonkoncentrációjára tett becslésünk megbízhatóságáról csak úgy nyerhetünk információt, ha olyan mintákat is meghatározunk, amelyek hormontartalmát ismerjük. Ezeket ellenőrző vagy kontroll /QC/ mintáknak nevezzük. Meghatározásukat valamennyi vizsgálatban elvégezzük.

Ha feltesszük, hogy az ismeretlen minták és az ellenőrző minták hormontartalmának becslése ugyanazt a törvényszerűséget követi, akkor elegendő az ellenőrző minták meghatározásának elemzése a vizsgálatok összehasonlításához. A meghatározások megbízhatóságát a precizitással és a torzitással jellemezzük. Mivel ugyanannak a mintának a becslése egy vizsgálaton belül és a különböző vizsgálatokban eltérő lehet, ezért

beszélhetünk vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti precizitásról. Egy minta meghatározásának vizsgálatok közötti precizitásán a hormontartalomra tett becslések vizsgálatonkénti relatív eltérését értjük.

Egy mintameghatározás torzításán a hormontartalomra tett becslés és a minta valódi hormontartalmának relatív vagy abszolút eltérését értjük. Ennek vizsgálata a radioimmun analitikában nem terjedt el, aminek talán az az oka, hogy gyakran nincs megbízható információnk az ellenőrző minta valódi hormontartalmáról. Kísérletképpen a standard mintákból ismert higitással ellenőrző mintákat állítottunk elő. Így ismerve a valódi hormontartalmukat, megvizsgáltuk a klasszikus kémiai vizsgálatokban alkalmazott minőségi indexek alkalmazhatóságát a radioimmun analitikai vizsgálatok minőségellenőrzésében.

3.3.1 A precizitás vizsgálata

A radioimmun analitikában általánosan alkalmazott minőségellenőrző eljárás az ellenőrző minták egymást követő vizsgálatokban mért értékeinek összehasonlításán alapszik. Ekkor általában az utolsó $(N+1)$ -edik vizsgálatban mért értékek elfogadásáról vagy elvetéséről kell döntené az ellenőrző minták első N vizsgálatban mért értéke alapján.

Legyen az ellenőrző minta hormontartalmának a mérése a ξ valószínűségi változó, mely normális eloszlású. Tekintsük erre nézve a ξ_{ij} $(i=1, \dots, N+1; j=1, \dots, n_i)$ független mintavételt, ahol ξ_{ij} az

ellenőrző minta i -edik vizsgálatban mért j -edik értékét jelöli, továbbá $\bar{\xi}_i$ az i -edik, $\bar{\xi}$ pedig az első N vizsgálatban mért értékek átlaga:

$$\bar{\xi}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \xi_{ij}, \quad \bar{\xi} = \frac{1}{\sum_{i=1}^N n_i} \sum_{i=1}^N n_i \bar{\xi}_i$$

A különbség négyzetösszeg az i -edik vizsgálatban:

$$\sum_{j=1}^{n_i} (\xi_{ij} - \bar{\xi})^2 = \sum_{j=1}^{n_i} (\xi_{ij} - \bar{\xi}_i)^2 + n_i (\bar{\xi}_i - \bar{\xi})^2$$

$$Q_i = QB_i + n_i \cdot QK_i$$

ahol QB_i az i -edik vizsgálat belső eltérése, QK_i pedig az i -edik vizsgálat vizsgálatok közötti eltérése. A gyakorlatban az $N+1$ -edik vizsgálat elfogadhatóságát az első N vizsgálat alapján ítéljük meg. Ekkor feltesszük, hogy az ellenőrző minta belső és vizsgálatok közötti eltérése az első N vizsgálatban nem tér el lényegesen. Legyen σ_1^2 az $N+1$ -edik vizsgálat vizsgálaton belüli varianciája, σ_2^2 pedig az első N vizsgálat közös vizsgálaton belüli varianciája. A hipotézisünk:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2, \quad H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$$

A hozzátartozó statisztika:

$$F_{\nu_1, \nu_2} = \frac{QB_{N+1}}{n_{N+1}-1} \cdot \frac{\sum_{i=1}^N (n_i-1)}{\sum_{i=1}^N QB_i}$$

ahol $\nu_1 = n_{N+1}-1$, $\nu_2 = \sum_{i=1}^N (n_i-1)$. A hipotézis elfogadásáról 99%-os szinten döntünk.

Legyen σ_3^2 az $N+1$ -edik vizsgálatához tartozó vizsgálatok közötti variancia, σ_4^2 pedig az első N

vizsgálat vizsgálatok közötti varianciája. Vizsgáljuk most a

$$H_0 : \sigma_3^2 = \sigma_4^2, \quad H_1 : \sigma_3^2 > \sigma_4^2$$

hipotézis teljesülését. A hozzátartozó statisztika:

$$F_{\nu_1, \nu_2} = \frac{QK_{N+1}}{\sum_{i=1}^N QK_i} \cdot \frac{N-1}{\sum_{i=1}^N QK_i} \quad \begin{matrix} \nu_1 = 1 \\ \nu_2 = N-1 \end{matrix}$$

A vizsgálatok precizitását a relatív szórásokkal jellemezzük. Így a belső precizitás az N vizsgálat alapján:

$$CV_B = \frac{100}{\sum} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N QB_i}{\sum_{i=1}^N (n_i - 1)}} \quad \text{%%}$$

A vizsgálatok közötti precizitás az N vizsgálat alapján:

$$CV_K = \frac{100}{\sum} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N QK_i}{N - 1}} \quad \text{%%}$$

3.3.2 Ellenőrzés minőségi indexekkel

Az ellenőrző minta m hormontartalmának és σ' mérési hibájának ismeretében jellemezhetjük a vizsgálat torzítását. Erre a klasszikus kémiai vizsgálatokban használt minőségi indexek alkalmazása adja az alapot. /36,39/.

I. A változás vizsgálata optimális és rutin körülmények között

A vizsgálatok optimális körülmények közötti változása /Optimal Conditions Variance, OCV/ az ellenőrző minta hormontartalmára tett becslések vizsgálatonkénti változását jelenti. Legyen $\bar{x}_i$ az i -edik vizsgálatban az ellenőrző minta hormontartalmára tett becslésünk. Ekkor célszerű a $\bar{x}_i$ -ket a vizsgálatok sorrendjében ugynevezett Progress Charte-on ábrázolni. Jelöljük ki az ellenőrző minta m hormontartalma körül egy $m \pm 2.\sigma'$ és $m \pm 3.\sigma'$ sávot. A $\bar{x}_i$ becslések sávon belüli elhelyezkedése szemléletesen jellemzi az adott meghatározás torzítását. Ezt a módszert az egyszerűsége miatt alkalmazzák szívesen az ellenőrzésre.

A vizsgálatok rutin körülmények közötti változását /Rutin Conditions Variance, RCV/ az OCV mintájára vizsgáljuk. Ekkor az összes vizsgálatból valamilyen szempont szerint csoportokat képezünk, és ezekre a csoportokra szerkesztjük meg az OCV-t. Ezt tekintjük az adott szempont RCV -jének.

Laboratóriumunkban RCV-t szoktunk készíteni a hét

különböző napjain végzett meghatározások ellenőrzésére, továbbá a különböző célra történő hormonmeghatározásokra.

II. Az összegzett eltérés

Az összegzett eltérés /Cummulative Sum Technique, CUSUM/ számítása az ellenőrző minta vizsgálatonkénti becsléseinek a minta várható hormontartalmától való eltérésére épül. Ha a különbségeket vizsgálatonként összegezzük, akkor fényt deríthetünk a rendszerben lévő szisztematikus hibák jelenlétére /16/.

Legyen $\bar{\xi}_i$ az i-edik vizsgálatban a minta hormontartalmára tett becslésünk. Az összegzett eltérést a következőképpen számíthatjuk:

Legyen

$$C_1 = \bar{\xi}_1 - m$$

az eltérés az első vizsgálatban. Rekurzív definícióval az összegzett eltérés az i-edik vizsgálatban:

$$C_i = C_{i-1} + \bar{\xi}_i - m$$

A C_i a vizsgálatok sorrendjében szintén ábrázolható Progress Charte-on.

Ez a módszer a radioimmun analitikai vizsgálat beállításánál elkövetett hibákra figyelmeztet, továbbá jelzi a rendszerben beállt változásokat is.

III. A variancia index

Az OCV, RCV, CUSUM eljárásokat általában a vizsgálatok torzításának szemléltetésére használjuk. A vizsgálatok torzítását azonban számszerűen is jellemezhetjük.

Az i -edik vizsgálat relatív eltérés mutatóját a minta hormontartalmára tett becslés alapján számítjuk:

$$V_i = \frac{\bar{S}_i - m}{m} \cdot 100$$

A V_i az eltérés irányát és relatív nagyságát is megadja.

A CUSUM technikához hasonlóan N vizsgálatra meghatározhatjuk az összegzett relatív eltérés mutatót:

$$\text{SUMV}_N = \sum_{i=1}^N V_i$$

A variancia indexet a relatív eltérés mutató adott CCV kritikus értékének felhasználásával számítjuk.

Az i -edik vizsgálat variancia indexe $/VI_i/$:

$$VI_i = \frac{\text{ABS}(V_i)}{\text{CCV}} \cdot 100$$

Hasznos információt nyújt a meghatározásokra vonatkozó átlagos variancia index /Overall Mean Running Variance Index Score, OMRVIS/, melyet $N > 20$ vizsgálat alapján adunk meg:

$$\text{OMRVIS} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N VI_i$$

A megbízhatóság szempontjából ezzel jellemezzük a különböző anyagokat /pl. a különböző típusú antiszérumokat/, de ezzel jellemezhetjük azokat a személyeket is, akik a meghatározásokat végzik.

3.3.3 Az etinilösztadiol EE_2 RIA meghatározása

Az etinilösztadiol EE_2 meghatározására a SzOTE Női Klinika laboratóriuma gyors RIA módszert dolgozott ki. Ez az eljárás a rutin klinikai vizsgálatokban csak akkor alkalmazható, ha a radioimmun analitikai vizsgálatokkal szemben támasztott követelményeknek megfelel. Ezért a radioimmun analitikai vizsgálatok kiértékelését az EE_2 példáján mutatjuk be/38/.

A standard görbe kiértékelésére az 1979.05.25 -én lefutott első radioimmun analitikai meghatározást választottuk. A 6.ábrán a logit-log típusu standard görbe rajza a B/B_0 -ra rendezett alakban látható. Ekkor a standard görbe szigmoid jellegű.

Minőségellenőrzést nyolc egymást követő vizsgálatban végeztünk. A vizsgálatokat jellemző paraméterek vizsgálatonkénti változása a 7.ábrán látható.

Minden vizsgálatban három ellenőrző mintát határoztunk meg a torzítás ellenőrzésére. Ezek minőségi indexeit az 1.táblázat tartalmazza.

Az ellenőrző minták vizsgálatonkénti becslései a 8.ábrán láthatók. Itt jelöltük az $m \pm 2.0$ és $m \pm 3.0$ sávot.

A 9. ábrán az összegzett eltérés látható a $\pm 2.\sigma$ és $\pm 3.\sigma$ sávokkal. Itt látható, hogy a 2. és 3. minta becslésénél szisztematikus hibát követtünk el. Ez a vizsgálat alapfeltételeinek ellenőrzését teszi szükségessé.

A 10. ábrán a torzítás jellemzésére a három minta minőségi indexeinek változását szemléltetjük a vizsgálatok sorrendjében.

Az elemzett nyolc vizsgálat alapján megállapíthatjuk, hogy az etinilösztadiol EE_2 gyors radioimmun analitikai meghatározásra kidolgozott módszer a minőségi elvárásoknak megfelel. A becslések precizitása 10% , torzítása 15% alatt van.

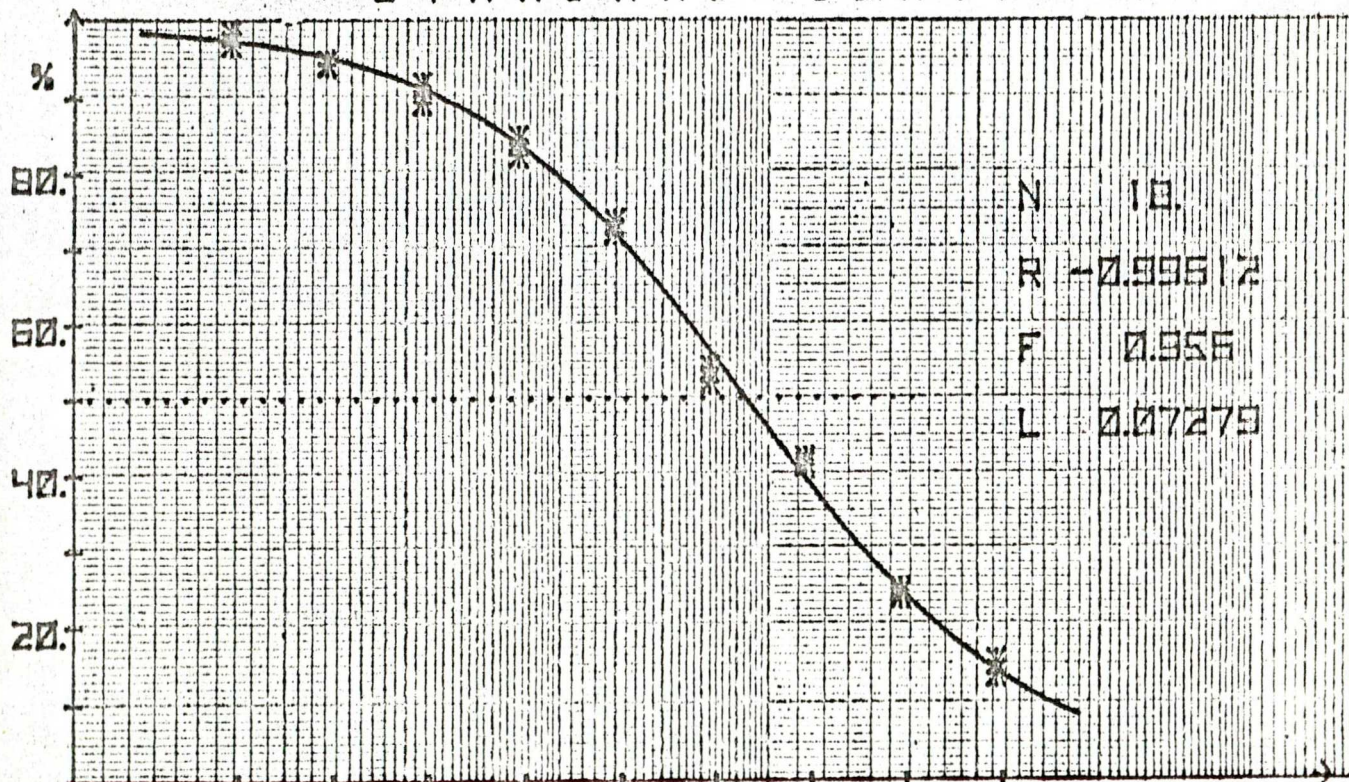
6.ábra A számítógéppel készített standard
görbe rajz és kiértékelés

ETINIL ESTRADIOL

RADIOIMMUNOASSAY

1979. 5. 25.

STANDARD CURVE

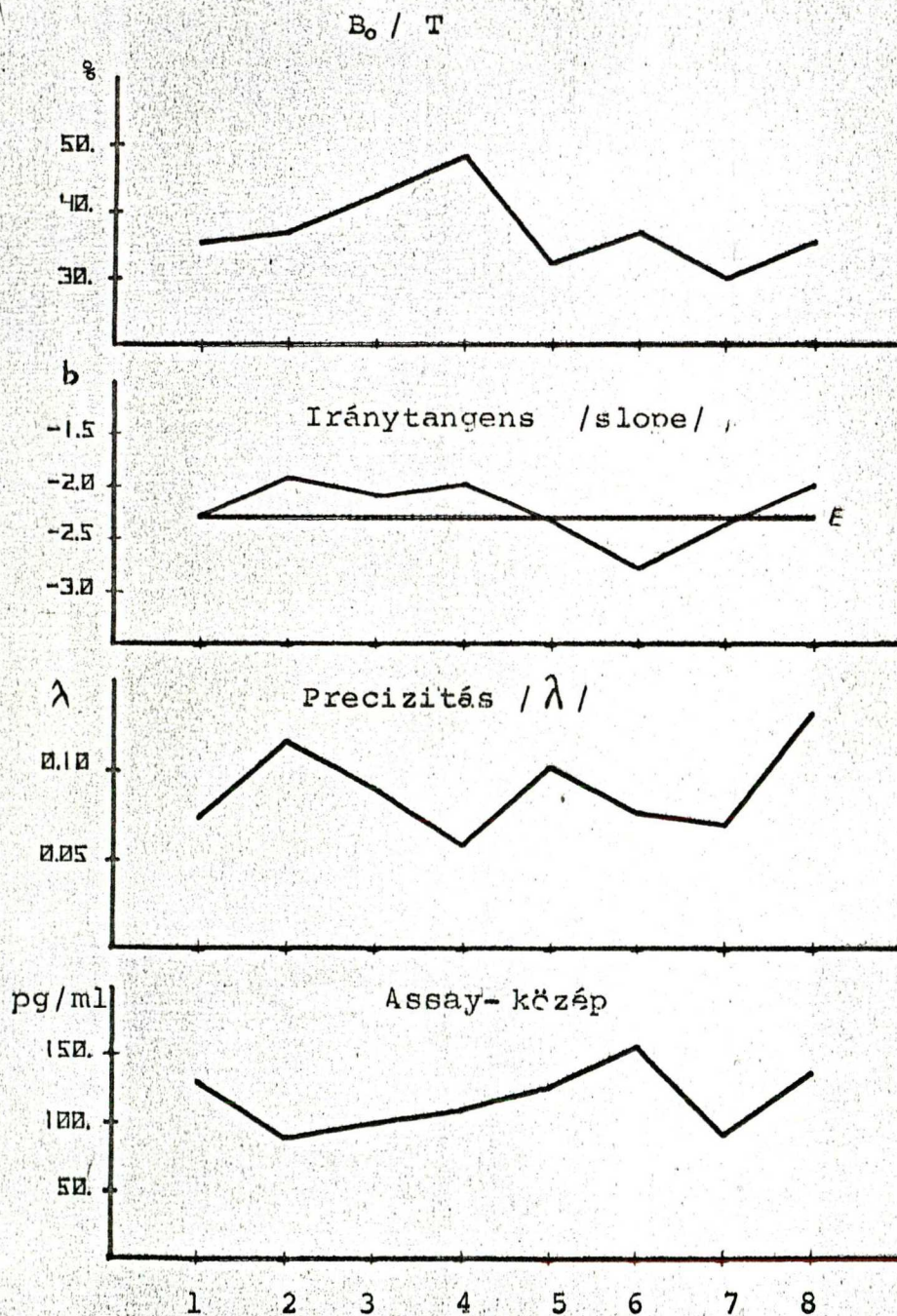


N 10.
R -0.99612
F 0.956
L 0.07279

3.1	6.3	12.5	25.0	50.0	100.	200.	400.	800.	
2.7	7.4	13.3	25.3	47.7	113.	181.	404.	778.	PG/ML
97.9	94.4	90.4	83.3	72.7	53.1	41.4	24.1	14.3	
97.6	95.2	91.0	83.5	71.7	56.1	39.0	24.3	13.9	%-B/B ₀

B	-2.28736	TOTAL	12223. CPM	ACCEPTABLE RANGE
CONST	4.81796	B ₀	4441. CPM	MIN 23.2
S _{BX}	0.05049	NSB	175. CPM	50% 127.7
S _{YX}	0.16649	BOUND	35.4%	MAX 702.9

7. ábra A standard görbe jellemzőinek változása az egymást követő vizsgálatokban



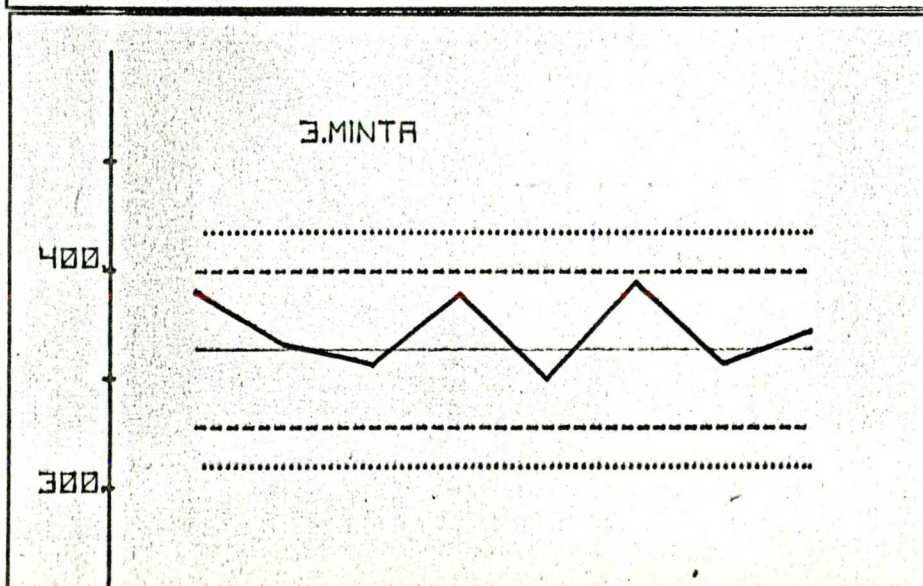
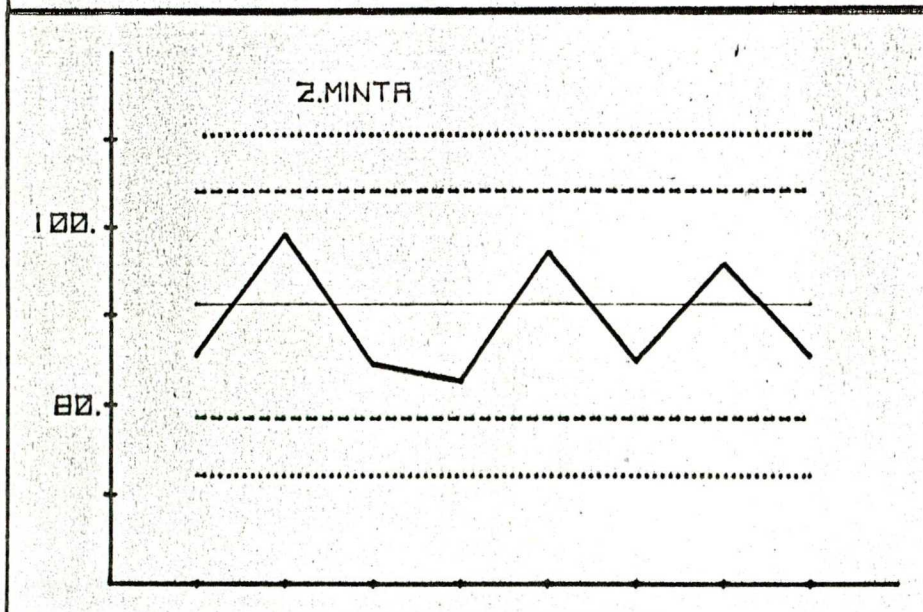
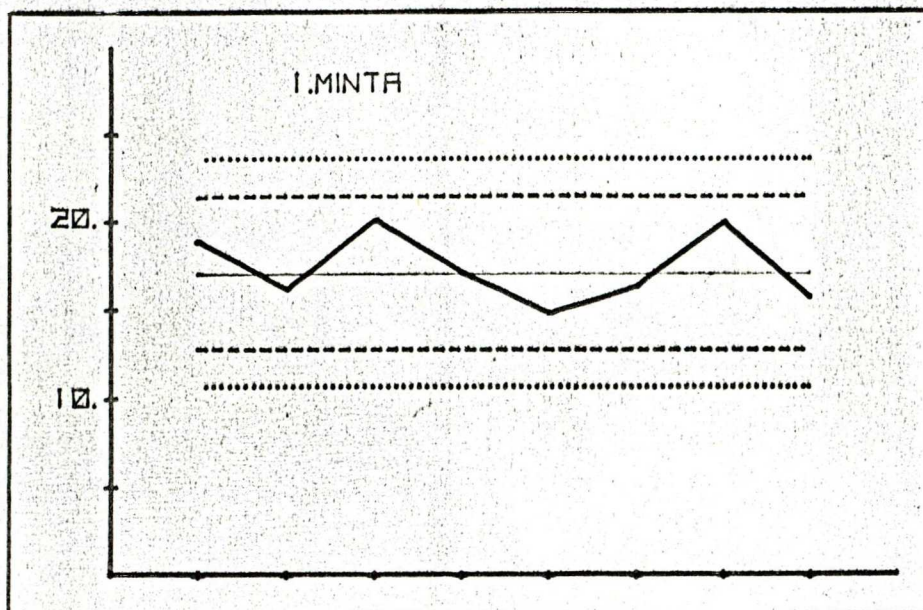
I . Táblázat Az ellenőrző minták minőségi indexei

	A minta vár- ható értéke / m /	A becslés hibája / CV /
1.minta	17.20	12.62
2.minta	91.50	7.02
3.minta	365.0	4.98

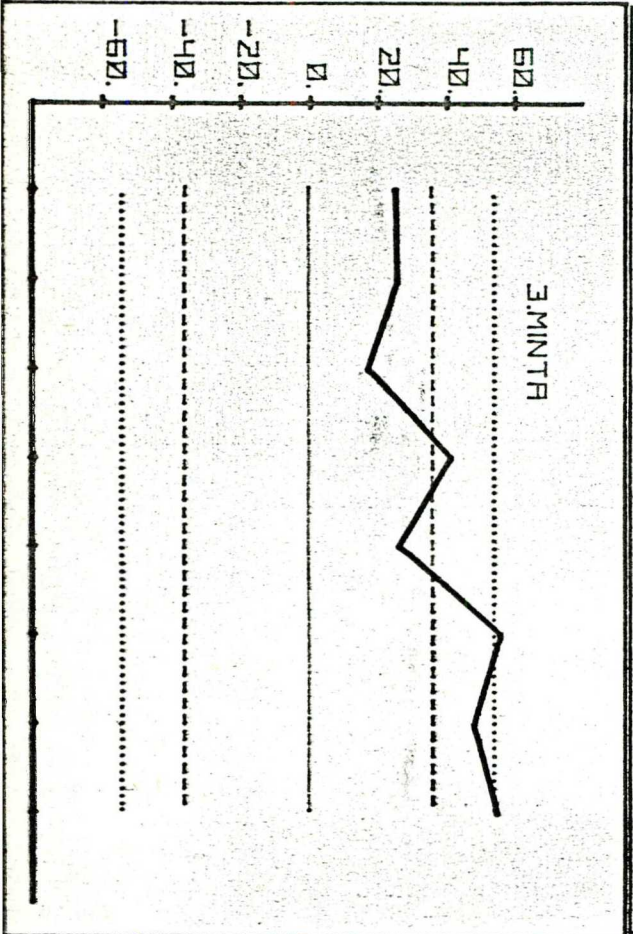
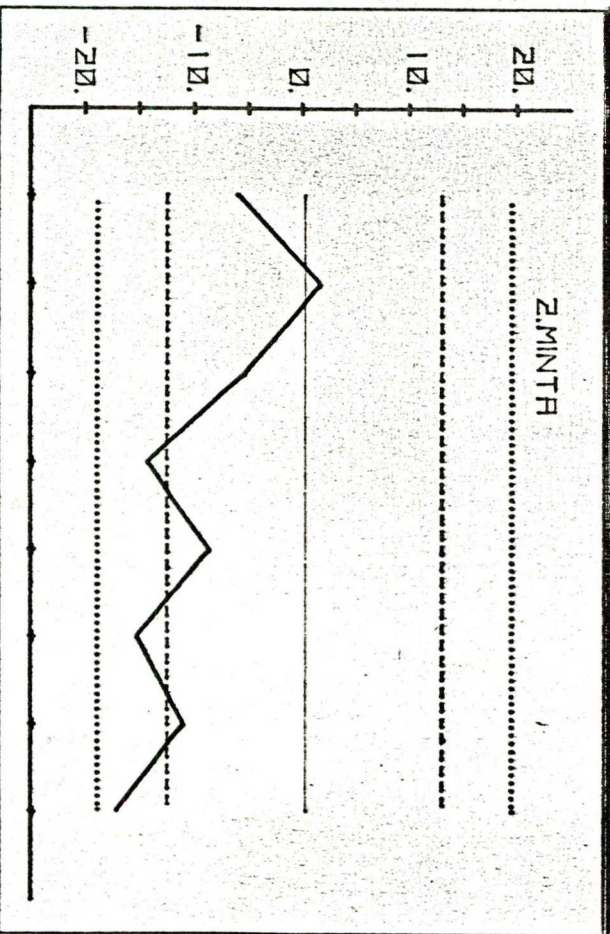
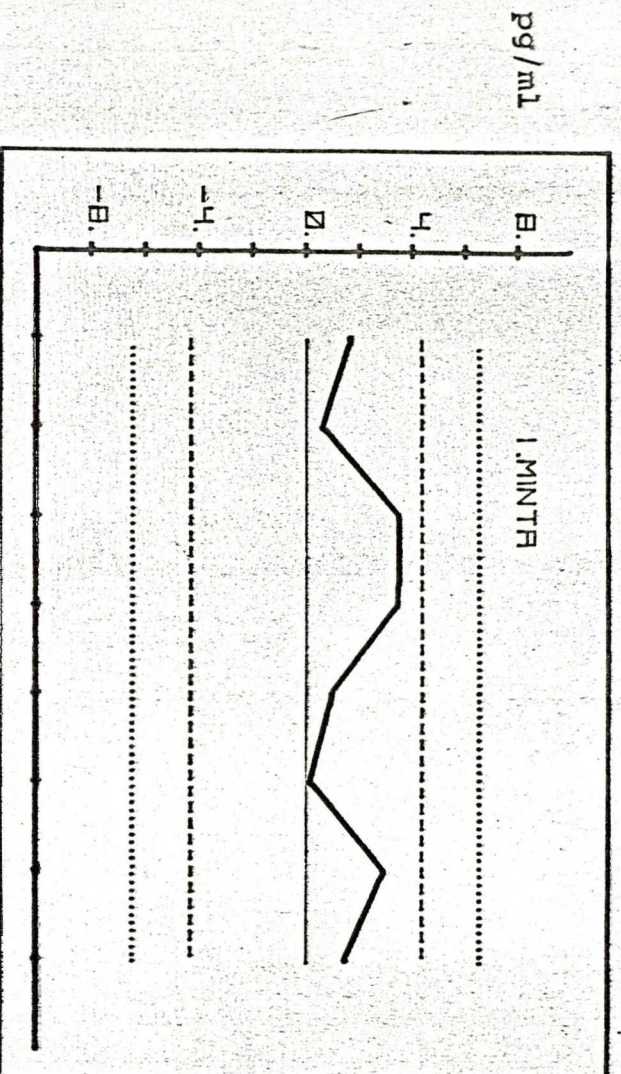
Vizsgálat	1. minta			2. minta			3. minta		
	C _i	V	VI	C _i	V	VI	C _i	V	VI
1	1.71	9.94	79	-5.97	-6.52	93	25.0	6.85	138
2	0.64	-6.22	49	1.74	8.43	120	25.7	0.19	4
3	3.55	16.92	134	-5.37	-7.77	111	17.1	-2.36	48
4	3.44	-0.64	5	-14.32	-9.78	139	41.3	6.63	134
5	1.01	-14.13	112	-8.59	6.26	89	26.2	-4.14	83
6	0.19	-4.77	38	-15.30	-7.33	105	55.9	8.14	164
7	2.95	16.05	127	-10.99	4.71	67	47.9	-2.19	44
8	1.47	-8.60	68	-17.19	-6.78	97	55.0	1.95	39

8. ábra Az ellenőrző minták becslései az egymást követő vizsgálatokban

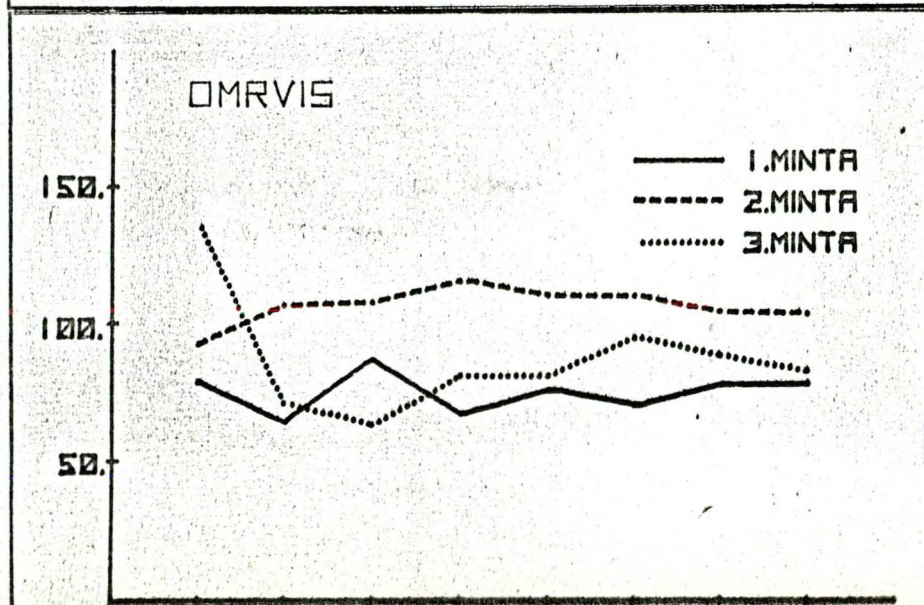
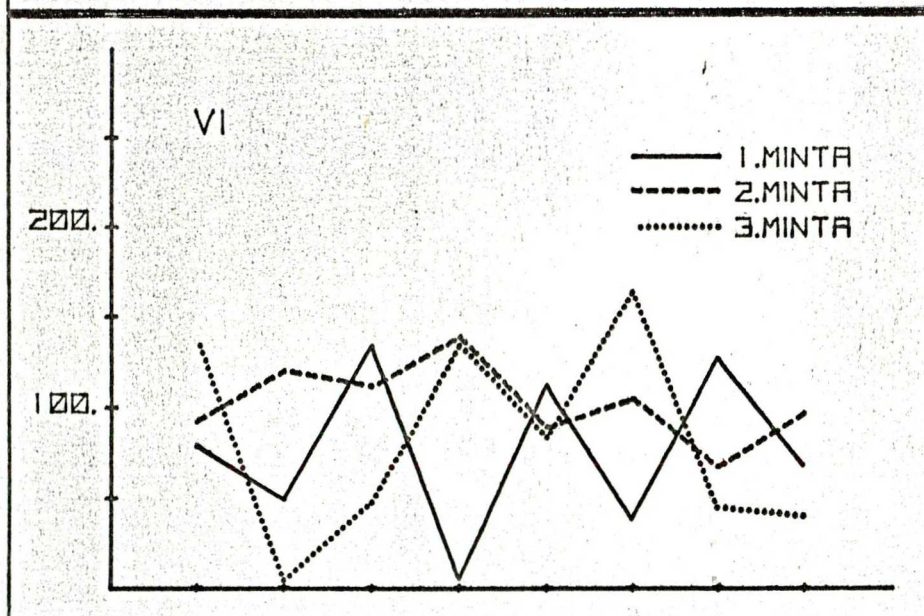
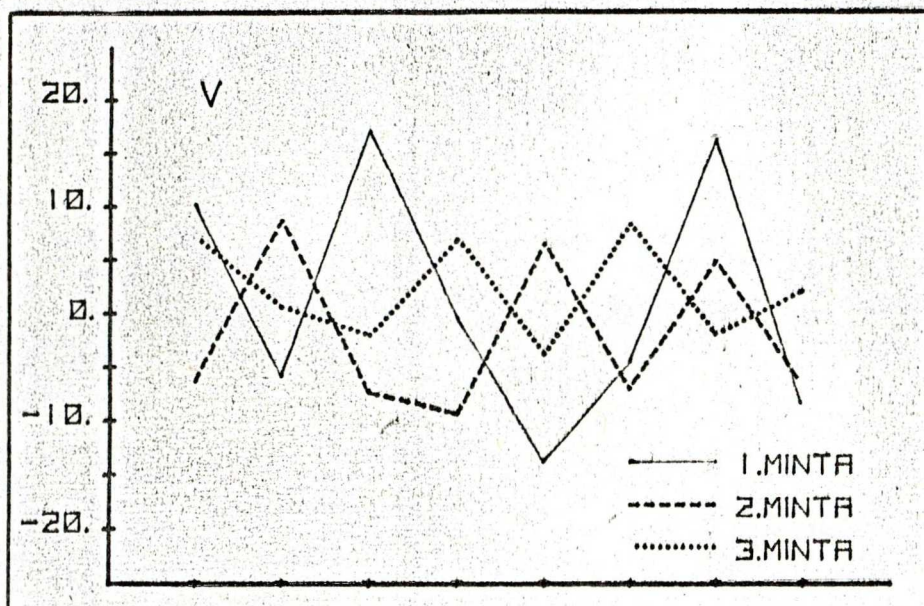
pg/ml



9. ábra Az összegzett eltérés / C_1 / az egymást követő vizsgálatokban



10. ábra A minőségi indexek az egymást követő vizsgálatokban



M E G B E S Z É L É S

Az élő szervezetben igen kis koncentrációban előforduló hormonok vizsgálata a Szegedi Orvostudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján az emberi szaporodás /családtervezés, szüléset/ területén kapott fontos szerepet. Laboratóriumunkban 18 hormon radioimmun analitikai meghatározását végezzük. A nagy számú rutin meghatározás szükségessé tette a laboratórium belső minőségellenőrző rendszerének kidolgozását.

A radioimmun analitikai vizsgálat a hormonmeghatározások jelenlegi legmodernebb módszere. Hasznosítja az antigén-antitest reakció nagy specifikusságát és az izotóp technika érzékenységét.

A radioimmun analitikai rendszer alapfeltételeinek vizsgálatával csak részben foglalkoztunk. Mivel az általunk alkalmazott RIA módszereknel elegendő idő áll rendelkezésre a reakcióegyensúly beállítására, ezért ezt a kérdést itt nem tekintettük alapvetőnek. A minőségellenőrző rendszer kidolgozásánál a fő hangsúlyt a kötött és szabad frakció elválasztására és az aktivitás mérésére tettük. A jelzett antigén koncentrációja és aktivitása között lineáris kapcsolat van, ezért a frakciókban lévő jelzett antigén koncentrációkat a mért aktivitások alapján számítjuk. Ha a rendszer alapfeltételei teljesülnek, akkor a jelzetlen antigén koncentrációja is számítható a frakciók aktivitásának az ismeretében. A rendszerünkben állandónak vesszük a jelzett antigén és az antitest koncentrációját. Így a kötött és a szabad frakció

aktivitásának az aránya és a jelzetlen antigén koncentrációja közötti összefüggést felhasználhatjuk a szérumok hormontartalmának meghatározására.

Ha a reakció egyensúlyban van, akkor levezethető a tömeghatás törvénye alapján a kötött és szabad frakció aránya és az összes antigén koncentrációja közötti lineáris kapcsolat, amit Scatchard függvénynek nevezünk. Ez azonban a mintameghatározásra nem alkalmazható, mivel paraméterei vizsgálatról vizsgálatra változnak.

A radioimmun analitikai vizsgálatok kiértékelésében kulcsszerepet játszik a standard görbe, amelyből az ismeretlen hormonkoncentrációk meghatározása történik. Számos próbálkozás ismert az irodalomban a legalkalmasabb standard görbe típus megválasztására. Mi a Rodbard és mtsai /20,21/ által javasolt logit-log transzformációs összefüggést választottuk standard görbének. Választásunkat az indokolta, hogy a linearizált összefüggés iránytangense elméletileg állandó, és ez lehetőséget ad a minőségellenőrzésben való felhasználására.

A frakciókban lévő jelzett antigén koncentrációját a frakciók radioaktivitásából számítjuk. Az aktivitásmérés hibája befolyásolja a minták hormontartalmára tett becslésünket, ezért vizsgáltuk az aktivitás becslésére vett minta átlagának és szórásának a kapcsolatát. Erre meghatároztuk az irodalomban ismert RER /response-error relationship/ függvényt, ami egy adott vizsgálat aktivitásbecsléseinek megbízhatóságát jellemzi.

A Rodbard által javasolt linearizált standard görbe csak a dózistartomány kis részén nyújt megbízható becslést. Az irodalom célszerűnek tartja a magasabb foku standard görbe alkalmazását a kiértékelésre. A javasolt másodfokú standard görbe csak az 50% alatti vagy fölötti kötés-% tartományon nyújt hatásos becslést. A standard görbe a gyakorlatban szigmoid jellegű, ezért tartottam célszerűnek a hiányos harmadfokú standard görbe választását, mely a gyakorlatban hatásosabb becslést nyújt, mint a lineáris vagy másodfokú standard görbe.

A függő változó becslésének szórása az egyes dózisszinteken eltér. Az irodalomban a standard görbe paramétereinek meghatározására kétféle súlyozási eljárás ismert. Az egyik a függő változó empirikus varianciájának a reciproka az adott dózisszinten, a másik pedig az aktivitásbecslés várható hibájának a reciproka az adott dózisszinten. Az általunk alkalmazott súlyozási eljárás mind a két módszer előnyeit tartalmazza.

A függvénykapcsolat szorosságának vizsgálatára az irodalom a korrelációs együttható formális számítását javasolja. A hipotézisvizsgálatot ehelyett a különbség négyzetösszegek felbontására építettem. Ez a gyakorlatban a pipettázási hiba és a standard minták dózisszintjeinek beállításánál elkövetett hiba összehasonlítását jelenti.

A gyakorlatban előfordul, hogy a tisztítási eljárás miatt a mérendő hormon kinyerése nem 100%-os. Ebben az esetben a visszanyeréssel történő mintameghatározást végezzük, melynek gyakorlati kivitelezését Čekan közölte.

A minőségellenőrzés minden klinikai kémiai vizsgálat fontos része. A radioimmun analitikai vizsgálatok minőségellenőrzésére olyan rendszert dolgoztunk ki, amely a standard görbe ellenőrzéséből, a vizsgálat belső ellenőrzéséből, és a vizsgálatok közötti ellenőrzésből áll.

A standard görbe ellenőrzésére azért van szükség, mert a mintameghatározásoknál előforduló hibákat a standard minták viselkedése alapján tanulmányozhatjuk. A standard görbét az Assay-közép /MD₅₀, az 50%-os kötéshez tartozó dózisszint/ és a slope /az iránytangens/ jellemzi.

A standard minták beállításánál elkövetett hiba befolyásolja a slope-ot. A $b = -1$ hipotézis ellenőrzése helyett megadtam a higitási hiba számításának a módját, melynek alkalmazása a gyakorlatban hasznosnak bizonyult.

A gyakorlatban a legelterjedtebb a standard görbe paramétereinek dózisszintenkénti két mintából történő meghatározása. Ezért a linearitás alappontokban történő teljesülésének ellenőrzésére a gyakorlatban igen jól alkalmazható grafikus linearitás vizsgálatot dolgoztam ki.

A standard görbe újszerű minőségellenőrzése hasznosan segíti a laboratóriumi szakembert. A slope és a linearitás vizsgálata új szemléletet adott a standard görbe elfogadhatóságának megítélésére. Ezek a gyakorlatban sokkal megbízhatóbbak, mint az irodalomban javasolt korrelációs együttható vizsgálata.

A vizsgálat belső ellenőrzése az alapfeltételek teljesülésének ellenőrzését jelenti. A rendszert az összes jelzett antigén, az antitest, valamint a kötött frakcióban jelezetlen antigén hiányában mért jelzett

antigén koncentráció alapvetően meghatározza. A koncentrációkat csak az aktivitások mérése alapján tudjuk becsülni, ezért a rendszert az összes jelzett antigén /Total/, a nem specifikus kötés /NSB/, valamint a jelzetlen antigén hiányában mért kötött frakció /Bo/ aktivitása alapján jellemezzük. Ezek vizsgálatonkénti ellenőrzése a rendszer ellenőrzését is jelenti. Hasonló szerepe a méréstartománynak és az Assay-középnek. Ezekkel a módszer beállítása ellenőrizhető.

A standard görbe választása a kiértékelésre szubjektív. Ha két különböző típusu standard görbével végeztük a minták meghatározását, az összefüggés paraméterei alapján nehéz megmondani, hogy melyik vizsgálat eredményei megbízhatóbbak. A RER függvényt minden vizsgálathoz meghatározzuk. Az aktivitástartományon értelmezett RER alkalmas megfeleltetéssel leképezhető a dózis tartományra. A RER alapján meghatározott dózis és dózis-hiba összefüggés lesz a vizsgálat empirikus precíziós profilja. Ez lehetővé teszi a különböző standard görbékkel végzett mintameghatározások összehasonlítását, valamint a vizsgálatok rangsorolását a megbízhatóság szempontjából.

A vizsgálatban a méréstartomány meghatározása a mintameghatározások elfogadhatóságának megítélése szempontjából lényeges. A B/Bo -ra elfogadott határok a becslések várható hibájáról nem adnak információt. Ezért célszerű a méréstartományt a precíziós profil segítségével meghatározni. Ekkor kiköthető, hogy a mintameghatározásokat csak egy várható hibára rögzített hibakorlát alatt fogadjuk el.

A legkisebb mérhető dózisszint szintén fontos

jellemzője a radioimmun analitikai módszernek. Meghatározható empirikusan / a vízértékből/, valamint számításokkal. Mi a legkisebb mérhető dózishoz a precíziós profil függvény $X = 0$ dózishoz vett helyettesítési értékének kétszeresét vesszük.

Klasszikus értelemben minőségellenőrzésnek a különböző vizsgálatok mintameghatározásainak ellenőrzését nevezzük. Erre a célra olyan szérumokat választunk, amelyek hormontartalmát minden vizsgálatban meghatározzuk. A meghatározások összehasonlítása adja az alapot a vizsgálatok összehasonlítására. A gyakorlatban az utolsó vizsgálatot hasonlítjuk a megelőző vizsgálatokhoz. Döntünk a meghatározások vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti eltéréseinek elfogadhatóságáról. A precizitásokat a relatív szórásokkal jelemezzük.

A radioimmun analitikai vizsgálatok kiértékelésének gyakorlatában nincs elterjedve a minőségi indexek alkalmazása. Szemléltetésre használjuk az optimális és rutin körülmények közötti eltérést. Számítjuk az összegzett eltérést és a relatív eltérés mutatót. Megadjuk az összes vizsgálatra a relatív eltérés mutatót, amivel a szisztematikus hibák jelenlétét vizsgáljuk. A relatív eltérés mutatót egy adott kritikus értékkel is ellenőrizzük. Erre számítjuk a variancia indexet, valamint a vizsgálatok jellemzésére az átlagos variancia indexet.

A gyakorlatban célszerű a vizsgálatok paramétereit Progress Charte-on szemléltetni. Erre a célra használjuk ki a számítógép és a rajzológép által adott lehetőséget.

A radioimmun analitikai vizsgálat kiértékelését az etinilösztadiol EE_2 gyors RIA meghatározásra végeztük el. Ennek az általunk kidolgozott új módszernek a rutin klinikai alkalmazhatóságát a RIA minőségellenőrzése igazolta.

A laboratóriumokban a bonyolultabb számítási eljárások elvégzésére egyre inkább elterjedőben van a számítógépek alkalmazása. Komoly teljesítményű számítógéppel azonban csak kevés laboratórium rendelkezik, így az asztali számítógépek és kalkulátorok alkalmazhatók hatékonyan. Mivel ezek kis teljesítményű és kapacitású gépek, ezért rajtuk a bonyolultabb problémák csak több fázisban oldhatók meg.

A radioimmun analitikai vizsgálat kiértékelése a HP 9810/A asztali számítógépen két fázisban történik. Az egyik a standard görbével kapcsolatos számításokat tartalmazza, a másik a minőségellenőrzéssel kapcsolatos számítási és rajzolási eljárásokból áll. A standard görbével kapcsolatos számításokra két eljárás áll rendelkezésünkre. Az egyik a linearizált standard görbe illesztését és a rajzolást tartalmazza, a másik a harmadfoku standard görbével kapcsolatos számításokból áll. Mind a két program rutinszerűen futtatható, ami azt jelenti, hogy a programrészek módosítása nélkül több egymást követő vizsgálat kiértékelhető.

A program részei:

Az alappontok becslése

Ide a Total, NSB, Bo aktivitások becslései tartoznak, melyeket több kémcső mért aktivitása alapján számítunk.

A standard görbe paramétereinek számítása

Itt történik az ismert dózisszintekhez mért aktivitások alapján a standard görbe paramétereinek meghatározása. Ide tartozik a függő változó transzformációja és a súlyozás is. A lineáris standard görbénél itt történik a rajzolás és a paraméterek listázása.

A standard görbe kiértékelése

Ez a programrész az összefüggés szorosságát jellemző statisztikai paraméterek számítását, a precizitás, az Assay-közép és a slope számítását, valamint a mérés-tartomány meghatározását tartalmazza.

A szérum minták meghatározása

Az ismeretlen minták hormontartalmának meghatározását a mért aktivitások alapján a standard görbéből végezzük. Az aktivitásbecslések ellenőrzésére kiszámítjuk a variációs együtthatót, az egyedi aktivitásbecslések dózisszintjeit. Számítjuk a becslésekhez a variancia indexet, ami a mintameghatározáshoz számított variációs együttható és az elméleti precíziós profil alapján a dózisszinthez tartozó érték hányadosa.

RER , PRP , MPV és MMD számítása

Az aktivitásbecslések és empirikus szórásaik alapján a program kiszámítja az aktivitásbecslés hibafüggvényének /RER/ paramétereit. Kiszámítja a precíziós profil standard dózisszinteken vett helyettesítési értékeit, valamint megadja a legkisebb mérhető dózist. A mintameghatározások alapján számítja az összes meghatározás átlagértékét /MPV/.

A standard görbe adatbankjára épülő programok

1. A grafikus linearitásvizsgálat

A program a rajzológép segítségével a standard minták és a standard görbe helyzetét szemlélteti. Az aktivitásbecslésekhez tartozó dózisszinteket a standard görbétől való relatív eltérés alapján ábrázoljuk. A rajz az elméleti precíziós profilt is tartalmazza.

2. A precíziós profil listázó programja

Ez az eljárás a standard görbe paramétereivel kiszámítja a standard minták becsléseihez tartozó dózisszinteket, a B/B_0 értékeket, valamint a dózisszint és az aktivitásbecsléssel számított dózisszint relatív eltérését. A dózisszint több aktivitásbecslése esetén megadja az aktivitásbecslések átlagát, a hozzátartozó B/B_0 értéket, valamint számítja a dózisszint valamint az aktivitásbecslések átlagához tartozó dózis relatív eltérését. Megadja az elméleti precíziós profil alapján a mintameghatározások varható relatív hibáját is.

3. A precíziós profil rajza

Ez a program végzi az egymást követő vizsgálatok empirikus precíziós profiljának a rajzolását. Az egymásra rajzolt precíziós profilokból ítélhető meg a meghatározások megbízhatóságá.

4. Progress Charte rajz

Ez a program végzi a vizsgálat legfontosabb paramétereinek szemléltetését a vizsgálatok sorrendjében. A

λ , a slope, az MD_{50} és a B/T vizsgálatban

számított értékeit pontok formájában helyezi el.

A minőségellenőrzésre használt programok

1. Quality Controll program

Ez a program végzi az ellenőrző minták alapján a vizsgálatok összehasonlítását. A mintameghatározásokból számítja a vizsgálat belső és vizsgálatok közötti variációs együtthatóját, valamint elvégzi a varianciák összehasonlítását. Külön program készült az eredmények listázására, melyet a rajzológép végez.

2. A minőségellenőrzéshez kapcsolódó programok

Ebbe a programcsomagba olyan programok tartoznak, amelyek a mintameghatározások további ellenőrzését segítik elő. Az összehasonlításokat a statisztikai programcsomag programjaival végezzük. A minőséget jellemző paraméterek szemléltetését a számítógépes rajzprogramok segítségével végezzük.

A kidolgozott kiértékelő eljárás a laboratórium hormonmeghatározásainak alapvető része. Igazolta azt, hogy asztali számítógépre is tervezhető olyan rendszer, amellyel a radioimmun analitikai vizsgálatok mélyreható minőségellenőrzése elvégezhető. Ma már a rendszer alkalmazása adja az alapot a vizsgálati eredmények orvosi diagnosztikai és tudományos célra történő felhasználására.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A radioimmun analitika bevezetése alig 20 év alatt az endokrinológia robbanásszerű fejlődéséhez vezetett. Az élő szervezetben rendkívül kis koncentrációban előforduló hormonok vizsgálata klinikánkon elsősorban az emberi szaporodás /human reproduction/ szempontjából nélkülözhetetlen. Ma már a hormonmeghatározások az orvosi diagnosztika szerves részét képezik.

A radioimmun analitikai vizsgálatban a hormonkoncentrációk meghatározása közvetett uton történik, ami igen sok hibaforrást eredményez. /Pl. higitási, pipettázási hibát, aktivitás-mérési hibát; de a mérést befolyásolja az antiszérum specifikussága, a hőmérséklet, az elválasztási technika, a radioaktív anyag bomlása is./ Mivel a hibák igen eltérő természetűek, így elengedhetetlen a vizsgálatok mélyreható elemzése. Így tárhatjuk fel a hibákat, és adhatunk módot azok kiküszöbölésére. Mivel a HP 9810/A asztali számítógépre ilyen rendszer nem állt rendelkezésre, így erre a gépre megterveztem és kidolgoztam a radioimmun analitikai vizsgálatok minőségellenőrző rendszerét.

Az antigén-antitest reakciót az antigének vetélkedése jellemzi az antitest szabad kötőhelyeiért. Ha a rendszer alapfeltételei teljesülnek, akkor a kötött és szabad frakcióban lévő radioaktív jelzett és jelzetlen antigének aránya megegyezik. Ezt használjuk fel, amikor az ismert koncentrációjú jelzetlen anti-



génhez mérjük a frakciók aktivitását, és a számított hatás és a jelzetlen antigén koncentráció kapcsolatát vizsgáljuk.

A megbízható vizsgálat alapja a megbízható standard görbe. Választása szubjektív, ezért megvizsgáltam, hogy az irodalomban javasolt dózis-hatás összefüggések közül melyiket célszerű alkalmazni standard görbeként. A minőségellenőrzés céljainak a Rodbard által javasolt logit-log transzformációs standard görbe felel meg a legjobban, mivel az összefüggés iránytangense állandó.

Rendszerünkben a függő változót a minták aktivitásából számítjuk. Az aktivitások mérésének az ideje korlátozott, ezért vizsgáltam az aktivitás becsléséből eredő hiba és a várható aktivitás kapcsolatát. A mintameghatározások átlagaira és szórásaira illesztett RER függvényekkel jellemezhetjük az aktivitásbecslések hibáját. Mivel a RER vizsgálatonként különbözik, így alkalmazható minőségellenőrzésre is.

Két standard görbe típusra készült program. A Rodbard által javasolt logit-log transzformációs standard görbét lineárisnak véve az irodalomban általánosan alkalmazott eljárást használtam fel az egyik programhoz. Mivel a számítógépünkhöz egy rajzológép is tartozik, ezért elkészítettem a standard görbe rajzoló programját is.

A függő változó szórása a különböző dózisszinteken eltér. Ezért célszerűnek látszott a standard görbe paramétereit súlyozással meghatározni. Az irodalom két eljárást javasol a súlyozásra. A kétségtelen hibás mérés hatásának csökkentése céljából a két eljárás

rást összevontam. Figyelembe véve, hogy a függő változót a mért aktivitásokból számítjuk, a dózisszintek súlyozását az aktivitásmérés várható hibájának számításával végeztük. Az így nyert súlyozási eljárás egy gyakorlati probléma megoldása.

Azt, hogy a függvénykapcsolat az alappontokban teljesül-e, a különbség négyzetösszeg felbontásával ellenőrizzük. Ez a gyakorlatban a pipettázási hiba és a dózisszintek beállításánál elkövetett hiba összehasonlítását jelenti.

A szérum minták hormontartalmának meghatározását a standard görbe alapján végezzük. Előfordul azonban, hogy az elválasztási technika tökéletlensége miatt kevesebb jelzetlen antigén kerül a rendszerbe, mint amennyit a szérum valójában tartalmaz. Ebben az esetben a Čekan által kidolgozott visszanyeréssel történő mintameghatározást végezzük.

A minőségellenőrzés a radioimmun analitikai vizsgálatok alapvetően fontos része. A standard görbe ellenőrzését az előforduló mintameghatározást befolyásoló hibák teszik indokolttá. A linearitás vizsgálata nem elegendő ezek felderítésére. Az Assay-közép becslésének hibája állandó relatív eltérést eredményez a mintameghatározásoknál. A slope ellenőrzésére a higitási hiba vizsgálata alkalmazható.

Az általunk alkalmazott grafikus linearitás vizsgálat a gyakorlatban jól bevált, szemléletes módszer. A standard görbe illesztésének relatív hibáját a precizitás paraméterével $1/\lambda$ jellemezzük.

A vizsgálat belső ellenőrzése a vizsgálatban beállt változások ellenőrzését jelenti. Ezt az összes jelzett antigén /T/, a nem specifikus kötés /NSB/ és a jelzetlen antigén nélküli kötött frakció /Bo/ aktivitásaival ellenőrizzük. A méréstartomány és az Assay-közép szintén fontos paramétere a belső ellenőrzésnek.

A standard görbe típusának választása a kiértékelésre szubjektív. A különböző típusú standard görbék összehasonlítása a paramétereik alapján nem végezhető el. A RER alapján meghatározott precíziós profil függvények vizsgálatonként különböznek. Ez módot ad arra, hogy a vizsgálatokat megbízhatóság szerint rangsoroljuk. A mintameghatározások precízitásának ellenőrzésére célszerű az elméleti precíziós profilt alkalmazni. A precíziós profil alapján meghatározott méréstartomány a várható hiba miatt korrekt.

A legkisebb mérhető dózis szintén a vizsgálat alapvető jellemzője. Meghatározását empirikus úton és számítással is elvégezhetjük.

A vizsgálatok közötti ellenőrzést ellenőrző minták meghatározásával végezzük. Egy vizsgálat belső eltérésének elfogadásáról, és a vizsgálatok közötti eltérésének elfogadásáról az ellenőrző minta becslései alapján döntünk.

A radioimmun analitikai vizsgálatok torzítását a klinikai kémiai eljárásokban alkalmazott minőségi indexek felhasználásával vizsgáljuk. Az optimális és rutin körülmények közötti eltérést /OCV, RCV/ rajzon szemléltetjük, számítjuk az összegzett eltérést /CUSUM/ és a variancia indexet /VI/. Ezek mutatják az ellenőrző minta becsléseinek vizsgálá-

tonkénti változását. Hasznos paraméter az összes meghatározás átlaga, ami a minták mérésstartományon belüli elhelyezkedéséről nyújt információt.

Laboratóriumunk az etinilösztadiol EE_2 meghatározására gyors radioimmun analitikai módszert dolgozott ki. A vizsgálatok kiértékelését és minőségellenőrzését ezen mutattam be.

A kidolgozott minőségellenőrző rendszer az alapja a radioimmun analitikai vizsgálatok megbízható kiértékelésének. A paraméterek nem csak a hibák okának felderítésében nyújtanak segítséget, hanem alapot adnak a méréseredmények diagnosztikai és tudományos célra történő felhasználására.

I R O D A L O M

1. Cornish-Bowden A., Koshland D.
Molekular Biol. 95. 201. /1975/
2. Berson S., Yalow R.
J. Clin. Invest. 38. 1996. /1959/
3. Bliss C. McGraw-Hill , New York /1967/
4. Brown G., Boshans R., Schalch D.
Comput. Biomed. Research
3, 212. /1970/
5. Čekan Z. J. Steroid Bioch. 6. 271. /1975/
6. McDonagh B., Munson P., Rodbard D.
Comput. Programs Biomed.
7. 179. /1977/
7. Duddleson W., Midgley A., Niswender G.
Comput. Biomed. Research
5. 205. /1972/
8. Ekins R. Clin. Chim. Acta 5. 453. /1960/
9. Ekins R., Newmann G.
Acta Endocrinology 64. 11. /1970/
10. Ekins R. Brit. Med. Bull. 30. 3. /1974/
11. Feldman H., Rodbard D.
Mathematical Theory of Radioimmunoassay, Lippincott, Philadelphia
158. /1971/
12. Feldman H., Rodbard D., Levine D.
Anal. Biochem. 45. 530. /1972/
13. Finney D. Biometrics 32. 721. /1976/



14. Hales H., Randle P.
J. Biochem. 88. 137. /1963/
15. Healy M. J. Biochem. 130. 207. /1972/
16. Kemp K., Nix A., Wilson D., Griffiths K.
J. Endokr. 76. 203. /1978/
17. Leclercq R., Taljedal I., Wold S.,
Clin. Chem. Acta 36. 257. /1972/
18. Lefkowitz R., Roth J., Pastan I.
Science 170. 663. /1970/
19. Meinert C., McHugh R.
Math. Bioscience 2. 319. /1968/
20. Rodbard D., Rayford P., Cooper J., Ross G.
J. Clin. Endocr. Met. 28. 1412. /1968/
21. Rodbard D., Bridson W., Rayford P.
J. Lab. Clin. 74. 770. /1969/
22. Rodbard D., Lewal J.
Acta Endocr. 64. 79. /1970/
23. Rodbard D., Ruder H., Vaitukaitis J., Jacob H.
J. Clin. End. Metab. 33. 343. /1971/
24. Rodbard D. Statistical Aspects of Radioimmuno-
assay, Lippincott, Philadelphia,
204. /1971/
25. Rodbard D., Lenox R., Wray H., Ramseth D.
Clin. Chemistry 22. 350. /1976/
26. Rodbard D., Anal. Biochem. 90. 1. /1978/
27. Rodbard D., Tacey R.
Anal. Biochem. 90. 13. /1978/

28. Sayers G., Giordano N., Ma R.
Program of the Endocrine Society
St. Louis, 1970. pp. 140.
29. Scatchard G. Ann. New York Acad. Science
51. 660. /1949/
30. Shaw W., Smith J., Spietro F., Agnesse S.
Clin. Chem. Acta 76. 15. /1977/
31. Valleron A., Rosselin G.,
Ann.Biol.Clin., /Paris/
29. 145. /1971/
32. Weaver C., Cargille C.
J.Lab.Clin.Med. 77. 661. /1971/
33. Yalow R., Berson S.
J. Clin. Invest. 39. 1157. /1960/
34. "Radioimmunoassay and Related Procedures in
Medicine 1977"
International Atomic Energy
Agency, Vienna, 1978.
35. Scientific Tables X.th. ed. Diem, K. and C.
Lettner, eds. Ciba-Geigy, Ltd. Basle 1973.
36. Whitehead T. Quality Control in Clinical
Chemistry
John Wiley and Sons, New York
1977.
37. Gyöngyösi J., Morvay J., Sas M.
A standard görbe alkalmazhatóságá-
nak elemzése az etinilösztadiol
gyors radioimmun analitikai /RIA/
meghatározásokban
Acta Pharmaceutica Hungarica
51. 3. /1981/

38. Morvay J., Gyöngyösi J., Falkay Gy.
Az etinilöszttradiol EE_2 gyors radio-
immun analitikai /RIA/ meghatározá-
sok minőségi ellenőrzése
Acta Pharmaceutica Hungarica
50. 217. /1980/
39. Morvay J., Gyöngyösi J.
Az etinilöszttradiol antiszérum
specifikusságának vizsgálata radio-
immun analitikai meghatározás céljára
Acta Pharmaceutica Hungarica
50. 197. /1980/
40. Gyöngyösi J.
Program for calculation of RIA
results on HP 9810/A desktop
computer and HP 9862/A plotter
Under Publication in WHO
Series Special Programme
of Research
Development and Research Training in
Human Reproduction, Geneva, 1980.
41. Prékopa A. Valószínűségelmélet
Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1974.
42. Vincze I. Matematikai statisztika ipari
alkalmazásokkal
Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1968.
43. Korn G., Korn T.
Matematikai kézikönyv műszakiaknak
Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1975.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton fejezem ki őszinte köszönetemet Dr. Csirik János tudományos főmunkatársnak, a matematikai tudományok kandidátusának mindazért a sok segítségért, hasznos tanácsért, utmutatásért, melyet a téma matematikai megfogalmazása és kidolgozása során tőle kaptam.

Köszönettel tartozom Dr. Sas Mihály egyetemi tanár urnak, az orvostudományok doktorának, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Női Klinikája igazgatójának azért a segítségért, támogatásért, amellyel klinikáján lehetővé tette a disszertációm elkészítését.

Köszönettel tartozom Dr. Morvay József egyetemi docens urnak, a kémiai tudományok kandidátusának, a Női Klinika Laboratóriuma vezetőjének, és Dr. Falkay György tudományos főmunkatársnak, az orvostudományok kandidátusának az értékes témáért, és azért, hogy a vizsgálatok kiértékelésében, a probléma megfogalmazásában és gyakorlati alkalmazásában a segítségemre voltak.