

15
AD CITTÀ

||
Consiglio Nazionale delle Ricerche

||
**ISTITUTO DI ELABORAZIONE
DELLA INFORMAZIONE**

PISA
||

GESTIONE E ANALISI DEI DATI DI COLTURE MISTE
DI LINFOCITI

M. Mennucci

Nota interna B81-17

Dicembre 1981

Introduzione

In questa nota vengono descritti alcuni programmi per la gestione e l'analisi dei dati prodotti in esperimenti di Colture Miste di Linfociti.

Questo lavoro è stato svolto nell'ambito dell'accordo di collaborazione tra l'Istituto di Elaborazione dell'Informazione e il Centro di Immunoematologia dell'Ospedale di Massa. Tutti i programmi sono stati realizzati per essere utilizzati su "macchine virtuali" sotto il sistema operativo IBM VM/370-CMS e, attualmente, sono operanti sui sistemi del Centro di Calcolo dell'Istituto CNUCE del CNR.

Per avere maggiori indicazioni sul sistema HLA e una trattazione completa sul Sistema di Programmi per l'Elaborazione di Dati Immunologici, cui si fa riferimento nell'ultimo paragrafo di questa nota, si rimanda alla Nota Interna: GADI/HLA-"Sistema di Gestione e Analisi di Dati Immunologici".

Colture Miste di Linfociti

Nel sistema HLA si considera incluso un locus (locus D) i cui geni sono i principali, se non gli unici, responsabili della capacità proliferativa dei linfociti in presenza di cellule allogeniche.

In altre parole, i linfociti di due individui, se messi insieme in coltura, normalmente non proliferano solo nel caso che condividano gli stessi geni HLA-D.

Su questo fenomeno si basa la tecnica di tipizzazione per il locus HLA-D che consiste nel mettere in coltura i linfociti di individui di riferimento con quelli degli individui da tipizzare. Tale tecnica viene indicata col nome di Tecnica delle Colture Miste o MLC (Mixed Lymphocyte Culture) .

Allo scopo di poter ricavare il massimo possibile di informazione dagli esperimenti di Colture Miste, e' necessario:

1) che l' individuo di riferimento (detto donatore o stimulator) sia omozigote per l' HLA (per questo si ricercano donatori tra i figli di coppie formate da primi cugini) . In tal modo, infatti, poiche' il donatore possiede lo stesso gene su ambedue i cromosomi (paterno e materno) omologhi, risultera' univoca l' interpretazione di una mancata stimolazione nei confronti dei linfociti dell' individuo da tipizzare (responder) .

In altre parole, se i linfociti del responder non vengono stimolati a proliferare dai linfociti del donatore, questo significa che il responder possiede almeno uno dei due geni HLA-D (ambedue se e' anch' esso omozigote) uguale al gene

HLA-D del donatore.

2) che i linfociti del donatore siano inattivati, cioè che siano impediti di proliferare pur mantenendo la proprietà di stimolare la proliferazione dei linfociti del responder. Il che si può ottenere per irradiazione o con mezzi chimici. Senza questo accorgimento, i linfociti del donatore prolifererebbero inevitabilmente in tutti i casi (che sono la stragrande maggioranza) in cui il responder è eterozigote per l' HLA-D, indipendentemente dal fatto che il responder abbia o meno uno dei due geni uguale a quello del donatore.

Il rilevamento quantitativo della proliferazione viene effettuato incorporando dei precursori radioattivi del DNA (cioè il materiale con cui viene "costruito" il DNA delle cellule) nelle cellule del responder e analizzando la coltura tramite un contatore di eventi radioattivi.

In un singolo esperimento MLC vengono normalmente preparate numerose colture destinate ad analizzare la risposta di un certo numero di responders (in genere da 10 a 20) contro un analogo numero di stimulators.

Il motivo principale per cui vengono svolti esperimenti in cui si confrontano contemporaneamente più responders con più donatori risiede nel fatto che i risultati di questi esperimenti presentano una notevole variabilità che deve essere attribuita, oltre che alle differenze immunogenetiche tra donatore e responder, anche a una diversa capacità di risposta dei vari responders, e a una diversa capacità di stimolazione dei vari

stimulators.

Analizzando tutti i risultati che uno stesso stimulator dà con diversi responders e, viceversa, i risultati di uno stesso responder con diversi stimulators, si può valutare e neutralizzare la variabilità dovuta alle caratteristiche individuali sopra menzionate.

Modalità di acquisizione e formato dei dati

Come si è detto nel paragrafo precedente un esperimento di MLC consiste nell'analisi, attraverso un contatore di eventi radioattivi, di tutte le colture prodotte attraverso tutti i possibili accoppiamenti tra un certo numero di cellule di omozigoti (stimulator) e di cellule di individui da tipizzare (responder). Ognuna di queste colture è inoltre ripetuta più volte, normalmente tre, allo scopo di rendere più affidabile l'analisi.

Per motivi di controllo vengono analizzate, nell'esperimento, anche le colture (anch'esse in più repliche) delle cellule di ciascun responder con se stesse (autologo). L'autologo costituisce un importante riferimento relativo al comportamento della cellula in coltura in totale assenza di stimolazione allogenica.

Le varie colture vengono analizzate sequenzialmente e automaticamente dal contatore che, per ciascuna di esse, fornisce in output, su una telescrivente, il numero degli eventi

radioattivi rivelati per minuto (count per minute - CPM) . Il valore CPM sara' elevato se c' e' stata una proliferazione sensibile, basso in caso contrario.

I risultati prodotti dal contatore vengono quindi trasferiti al calcolatore per l' elaborazione. Il trasferimento puo' avvenire in due modi:

- 1) immettendo i risultati manualmente da un terminale
- 2) facendo produrre alla telescrivente anche un output su nastro perforato. In questo modo pero', non esistendo la possibilita' di leggere bande di nastro perforato presso il centro di calcolo del CNUCE, si deve provvedere alla lettura del nastro e alla sua trascrizione su bobina di nastro magnetico tramite un calcolatore HP dello IRI.

Di norma, in un esperimento, fissato l' insieme dei responders e quello degli stimulators e stabilito su di essi un qualunque ordinamento, si sottopongono all' analizzatore le tre (o piu') repliche delle colture del primo responder con ognuno degli stimulators (presi nell' ordine fissato) e con se stesso (autologo) e si procede cosi' in sequenza per tutti i successivi responders.

Il rispetto rigoroso di un preciso ordinamento e' indispensabile perche' e' l' unico criterio di associazione tra i valori in uscita dal contatore e le varie colture.

Poiche' l' output del contatore andra' a costituire piu' o meno direttamente il file di input del programma di elaborazione, vale la pena fornire fin dall' inizio tutte le informazioni necessarie all' interpretazione dei dati nel formato previsto dal programma. A questo scopo, prima di far partire il contatore, vengono battute manualmente sulla telescrivente:

- una riga contenente la sigla di identificazione dell'esperimento (da 1 a 20 caratteri)

- una o piu' righe contenenti l'elenco delle sigle dei responders che partecipano all'esperimento (ovviamente nell'ordine convenuto).

Ciascuna sigla e' costituita da una parte numerica (da 1 a 5 cifre) e una parte letterale (da 0 a 2 caratteri). Non c' e' nessun vincolo sul formato ne' sul numero delle sigle da inserire in ogni riga. Unica condizione e' che ogni sigla sia separata dalla successiva tramite il carattere virgola (,).

- una riga contenete un carattere asterisco (*) a colonna 1 per indicare la fine dell'elenco

- una o piu' righe contenenti l'elenco delle sigle degli stimulators; in questo caso le sigle sono costituite dalla sola parte numerica (max 5 cifre). Per il resto valgono le stesse condizioni precedentemente indicate.

- una riga contenente un carattere asterisco a colonna 1

Seguiranno i risultati dell'esperimento, uno per riga. Per convenzione i dati mancanti (in genere colture non riuscite) devono essere indicati con il valore -1.

Quello descritto e' esattamente il formato che dovranno avere i dati (comunque siano stati trasferiti) nel file di Input del programma.

Al file di Input potra' essere attribuito qualunque nome, mentre il tipo dovra' essere obbligatoriamente RAW. In un singolo file di Input possono essere messi, uno di seguito all'altro senza nessun particolare record di separazione, i dati relativi a piu' esperimenti.

Normalizzazione dei dati

Un primo passo da compiere nell'elaborazione dei dati di un esperimento è quello di scegliere un unico valore da sostituire agli NR valori corrispondenti alle repliche di una stessa coltura. Il criterio, ormai universalmente accettato in questo tipo di esperimenti, è quello di scegliere la mediana degli NR valori. Ricordiamo che la mediana di un insieme di N valori si ottiene disponendo in ordine gli N valori e scegliendo il valore centrale se N è dispari o la media dei due valori centrali se N è pari.

Per poter rendere i dati tra loro confrontabili si deve eliminare la variabilità dovuta sia alla capacità di risposta proliferativa delle varie cellule, diversa da un responder all'altro, sia alla diversa capacità di stimolazione antigenica dei singoli stimulators. Per questo scopo si procede alla "doppia normalizzazione" dei dati nel modo seguente:

- normalizzazione dei responders

Per un generico responder R_i ($i=1, n$) si considerano tutti i risultati $C(R_i, S_j)$ delle colture tra il responder R_i e ognuno degli stimulators S_j ($j=1, m$), si calcola il 75-mo percentile di questo insieme di valori e si esprimono i vari risultati in termini di percentuale del 75-mo percentile.

Indicando con RN i valori dei dati così normalizzati si ha:

$$RN(R_i, S_j) = \frac{C(R_i, S_j)}{75\text{mo perc } R_i} \times 100$$

dove con "75mo perc R_i " si intende il 75-mo percentile dell'insieme dei valori $C(R_i, S_1), C(R_i, S_2) \dots C(R_i, S_m)$.

- normalizzazione degli stimulators

Sui nuovi valori ottenuti, si procede alla normalizzazione degli stimulators esprimendo i risultati che il generico stimulator S_j ha prodotto con ognuno dei responders R_i ($i=1,n$), come percentuale del valore del 75-mo percentile dell'insieme dei risultati stessi. Indicando con DN i valori doppiamente normalizzati si ha:

$$DN(R_i, S_j) = \frac{RN(R_i, S_j)}{75\text{mo perc } S_j} \times 100$$

dove con "75mo perc S_j " si intende il 75-mo percentile dell'insieme dei valori $RN(R_1, S_j), RN(R_2, S_j) \dots RN(R_n, S_j)$

Ricordiamo qui la seguente definizione del 75mo percentile di un insieme di valori:

Sia n il numero di osservazioni. Si ordinino i valori dal piu' piccolo al piu' grande e si indichi con $X(1)$ il piu' piccolo di tali valori, con $X(2)$ il secondo piu' piccolo...e con $X(n)$ il piu' grande. Allora il 75-mo percentile e' :

a) $X(m)$ se $m = \frac{3}{4}n + \frac{1}{2}$ e' un numero intero

b) $\frac{X(K) + X(K+1)}{2}$ se m non e' un numero intero (con $K =$ parte intera di m)

Come base per la normalizzazione dei dati e' stato scelto il 75-mo percentile anziche' la media o la mediana perche' queste ultime risentono troppo l'influenza dei valori bassi corrispondenti alla assenza di proliferazione.

Descrizione dei programmi

Il sistema che descriveremo e' costituito da un insieme di programmi, Fortran e Assembler, destinati a lavorare sotto il sistema operativo CMS. Allo scopo di semplificare il piu' possibile l'uso di tali programmi, e' stata predisposta una serie di comandi di tipo EXEC mediante i quali si provvede alla definizione dei files, al controllo e al passaggio dei parametri, nonche' al caricamento e all'esecuzione dei programmi.

La descrizione del sistema, che daremo nel seguito, si basera' principalmente sulla descrizione dei comandi piuttosto che su quella dei singoli programmi, sara' cioe' una descrizione piu' orientata verso l'uso del sistema che non verso l'analisi della struttura interna.

Programma per la lettura e il controllo formale dei dati

Allo scopo di permettere un controllo preventivo dei dati di input prima dell'elaborazione, e' stato predisposto un programma che provvede a leggere i dati relativi ai vari esperimenti contenuti nel file di input e, per ciascuno esperimento, controlla che siano presenti tutte le informazioni generali previste, che siano nella forma corretta e, infine, che il numero dei valori CPM sia congruente con tali informazioni.

L'errore che si rileva piu' frequentemente nei dati di input e' l'omissione di uno o piu' risultati; normalmente questo si

verifica durante la trascrizione manuale, ma non e' infrequente la perdita di qualche risultato, dovuta a errori di lettura, anche nel caso di trasferimento tramite nastro perforato.

Il programma provvede alla segnalazione, attraverso appropriati messaggi sul terminale, di tutti gli errori riscontrati sul file di input e fornisce all'utente tutte le informazioni possibili per facilitare la successiva correzione.

Il programma, inoltre, trascrive tutti i dati del file di input in un nuovo file che ha lo stesso nome del file di input ma ha il tipo DATI. Questo nuovo file e' in tutto uguale al file originario, tranne per il fatto che i valori CPM sono raggruppati a 13 per record anziche' uno per record. Il file di tipo DATI risulta quindi molto meno ingombrante del file di tipo RAW, il cui formato e' pero' molto piu' adatto per l'input manuale e per l'effettuazione delle eventuali correzioni.

Una volta che siano state effettuate tutte le correzioni sui dati, il file di tipo RAW puo' essere distrutto, e mantenuto il solo file di tipo DATI.

Il comando con cui si attiva il programma menzionato e' COMP il cui formato e' il seguente:

```
-----  
COMP nonfile <nr>  
-----
```

nonfile

e' il nome del file, di tipo RAW, in cui sono contenuti i dati di uno o piu' esperimenti nel formato descritto precedentemente.

nr

e' il numero delle repliche di ogni singola coltura, (se gli esperimenti sono piu' di uno, devono avere tutti lo stesso numero di repliche) .
Se il parametro e' omissso viene assunto nr=1

Per ogni esperimento il programma legge dal file "nonfile RAW" :

- il codice dell' esperimento
- l' elenco dei responders
- l' elenco degli stimulators
- $n*(m+1)*nr$ valori CPM, avendo indicato con n il numero dei responders e con m quello degli stimulators.

Se non vengono rilevati errori, il programma riscrive i dati letti sul file "nonfile DATI". A titolo di esempio, nella fig. 1 e' riportata la porzione iniziale di un file prodotto dal comando COMP.

GBP 177 060777

290,71,99,821,492,263,557,336,346,226,573,91,662,610,215,

* 501,503,504,505,507,513,514,517,522,523,533,535,536,541,542,546, 547,552,553,557,562,565,566,

Table with 13 columns of numerical data for GBP 177 060777. Values range from 15 to 1979.

GBP 178 070777

417,467,584,688,665,65,484,614,810,296,673,566,600,710,578,

* 501,513,504,505,507,513,517,522,523,533,535,536,541,542,546,547,552, 553,557,562,565,566,

Table with 13 columns of numerical data for GBP 178 070777. Values range from 16 to 2637.

GBP 179 120777

99,673,263,71,226,557,215,573,662,346,336,91,492,291,

* 518,519,520,532,534,540,544,545,548,549,550,554,555,561,563,564,567,22,

Table with 13 columns of numerical data for GBP 179 120777. Values range from 16 to 12701.

GBP 180 130777

417,584,600,688,810,710,65,467,506,614,296,484,673,665,578,

Programma per la doppia normalizzazione dei dati

Il file prodotto dal comando COMP costituisce l° input per il programma di normalizzazione il quale, per ogni esperimento incontrato, svolge le seguenti operazioni:

1) legge i dati dell° esperimento e sostituisce il valore della mediana alle NR repliche di ciascuna misura;

2) svolge sui dati così ridotti una serie di controlli che possono comportare l° eliminazione di uno o più° stimulators, di uno o più° responder o anche l° eliminazione dell° intero esperimento;

3) provvede alla "doppia normalizzazione" dei dati rimasti stampando i risultati sia in forma di tabella che di istogrammi;

4) produce e/o aggiorna una serie di files destinati a permettere l° archiviazione dei dati e il loro eventuale successivo uso.

Mentre il punto 1 non necessita di alcun ulteriore chiarimento, i punti 2, 3, 4 richiedono di essere illustrati più° dettagliatamente.

Il primo controllo che si effettua sui dati consiste nel verificare se, nell° insieme dei valori dell° autologo dei vari responders, la cui distribuzione è° considerata normale, esistano degli "outliers". A questo scopo si fa uso della Statistica di Kurtosis, che illustriamo brevemente.

Supponiamo di avere n dati i cui valori siano X_1, X_2, \dots, X_n e si voglia determinare se qualcuno di tali valori è° un outlier. A tal fine si calcola l° indice statistico di Kurtosis (b_2) così°

definito:

$$b_2 = \frac{n * \left(\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^4 \right)}{\left(\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right)^2} \quad \text{dove } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Si controlla se il valore di b_2 e' significativamente elevato, al livello di probabilita' del 5 per cento, usando la Tavola dei Valori Critici per b_2 di seguito riportata:

Tavola dei Valori Critici di b_2 ($P < 0.05$)

dimensione del campione	valore critico per b_2
7	3.55
8	3.70
9	3.86
10	3.95
11	4.00
12	4.05
15	4.13
20	4.17

Se b_2 eccede il valore critico si puo' concludere (con una probabilita' contraria del 5 per cento) che c' e' un outlier nei dati. L' outlier e' il dato il cui valore e' piu' distante dalla media. Dopo aver scartato l' outlier, il test deve essere ripetuto sui rimanenti $n-1$ valori, e cosi' di seguito finche' non ci siano piu' outliers.

Dopo aver eliminato tutti i responders il cui autologo si sia rilevato un outlier (1) si procede a svolgere ulteriori controlli la cui giustificazione si basa piu' sull' esperienza pratica che su argomentazioni di carattere teorico.

In particolare vengono eliminati tutti i responders per i quali il valore del 75-no percentile non superi di almeno tre

(1) L' eliminazione e' giustificata dal fatto che un autologo, il cui valore sia "eccessivamente anomalo", indica chiaramente che il comportamento delle cellule del responder in coltura non garantisce l' affidabilita' dei risultati.

volte quello dell' autologo. In questo caso infatti e' praticamente certo che le cellule del responder non sono in grado di proliferare in presenza di stimolazione allogenica.

L' ultimo controllo e' destinato alla eliminazione degli stimulators che, con oltre la meta' dei responders, hanno prodotto dei valori che non superano di almeno 3 volte quello del rispettivo autologo. Si eliminano cioe' gli stimulators che si presume abbiano una capacita' di stimolazione eccessivamente ridotta.

Questo controllo non sempre e' appropriato, come, ad esempio, nel caso di un test mirato in cui i responders siano stati scelti in maniera da possedere tutti la stessa specificita' HLA-D dello stimolatore. Per questo motivo il controllo puo' essere escluso tramite un' opzione del programma.

Se, a seguito delle eliminazioni operate, non rimangono almeno 4 responders e 4 stimulators l' intero esperimento viene eliminato. Per gli esperimenti che non vengono eliminati il programma procede alla doppia normalizzazione con le modalita' esposte in precedenza e fornisce la stampa dei dati originali e dei dati normalizzati sotto forma di tabella nonche' una serie di istogrammi in cui sono riportati i risultati normalizzati che i vari responders hanno dato con ciascun stimulator in modo da evidenziare, ove cio' e' possibile, la bimodalita' della distribuzione dei risultati (assenza/presenza di stimolazione) .

Un esempio, parziale, di queste stampe e' fornito nelle figg. 2 e 3, che si riferiscono alla normalizzazione dei dati contenuti nel file della fig. 1.

Nella fig. 4 e' presentato un caso in cui il programma elimina un responder (perche' il suo autologo e' un outlier) e

due stimulators. In casi come questo il programma stampa due volte i dati originali, prima e dopo l'effettuazione delle eliminazioni. Analogamente a quanto previsto per i dati mancanti nell'input, nelle stampe i risultati eliminati sono forzati al valore -1.

Il programma di normalizzazione crea i due files:

nomef INTER
nomef TABCEL

e aggiorna (o crea se non esistono) i files:

EXP FERRARA
ALL TABCEL

dove nomef e' il nome del file di input (di tipo DATI) .

Il file di tipo INTER contiene, per ogni esperimento : l'elenco dei responders, l'elenco degli stimulators, i dati normalizzati e un indice che permette di ricollegare i vari dati all'esperimento appropriato.

Questo file e' un "file intermedio" in cui vengono posti i dati normalizzati prima della loro definitiva archiviazione che avverra' , per mezzo di un apposito programma, solo quando l'utente li avra' giudicati soddisfacenti.

Il file nomef TABCEL contiene le sigle (numeriche) di tutti gli stimulators incontrati nei vari esperimenti presenti nel file di input. La sigla di ciascun stimulator e' riportata nel file una volta sola anche se, come generalmente avviene, lo stimulator e' presente in piu' di uno degli esperimenti.

Il file EXP FERRARA contiene le sigle di tutti gli esperimenti sottoposti al programma di normalizzazione. Ad ogni esecuzione

vengono aggiunte le sigle dei nuovi esperimenti in coda alle precedenti.

Il file ALL TABCEL contiene le sigle di tutti gli stimulators (ciascuna riportata una sola volta) presenti in tutti gli esperimenti sottoposti al programma di normalizzazione. Ad ogni esecuzione vengono aggiunte al file solo le sigle degli stimulators incontrati per la prima volta.

L'uso di questi files verra' chiarito nel corso della descrizione dei programmi che verranno illustrati nel seguito.

Il programma di normalizzazione viene attivato tramite il comando NORM il cui formato e' il seguente:

```
-----  
NORM nomef <OPZIONI>  
-----
```

```
nomef  
nome del file di input di tipo DATI
```

le opzioni possibili sono:

```
CONTROL ON  
(default) viene effettuato il controllo sugli  
stimulators
```

```
CONTROL OFF  
nessun controllo sugli stimulators
```

```
REPL N  
nei dati di input sono previsti N (N intero>0)  
replicati (default N=1)
```

```
TERM  
le stampe vengono presentate sul terminale (sono  
omessi gli istogrammi)
```

```
NOTERM  
(default) le stampe sono inviate alla stampante  
off-line.
```

Se si da' il comando:

WORM ?

viene stampato sul terminale il formato del comando
insieme alle indicazioni sull'uso e il significato dei
parametri.

EXPERIMENT GBF 177 660777
ORIGINAL DATA

SPIM	RSP	290	71	99	821	492	263	557	336	346	226	573	91	662	610	215
501	972	1186	689	496	178	1152	1965	991	478	991	675	1547	460	149	284	489
503	315	83	286	1077	678	249	1147	880	1092	675	1547	87	480	965	53	
504	399	21	1077	1489	1383	1150	1883	1153	1873	12662	01799	249	1282	1658	47	
505	478	151	159	1653	780	1086	1660	2031	671	975	1947	457	143	1187	485	
507	3670	1491	1495	1893	1078	2250	2678	3555	2754	2280	2572	1254	2152	2394	1855	
513	376	29	74	33	77	759	344	557	1451	364	1256	70	554	587	62	
514	445	71	40	88	63	34	61	62	1158	64	47	69	49	50	30	
517	5750	946	163	155	82	154	1677	465	1888	1267	1893	681	1594	1852	653	
522	444	48	46	140	87	63	22	21	284	484	145	45	58	77	30	
523	3471	376	31	255	572	1266	543	49	1188	1968	1677	29	765	1058	151	
533	787	176	684	1166	32	20	1263	1893	786	1855	1804	383	945	1675	1446	
535	3912	1083	779	448	578	32	1888	1588	2057	1575	246	253	1468	1866	446	
536	1176	188	52	56	63	68	161	48	1670	255	246	22	580	283	44	
541	3184	287	675	77	276	377	1459	1549	291	772	158	252	184	549	259	
542	2696	51	155	650	49	37	1245	467	444	143	1371	385	956	186	267	
546	2150	61	244	369	49	1950	562	1544	877	1174	954	80	583	860	265	
547	2869	867	769	1152	1058	792	1758	2434	1752	885	2228	376	1757	1271	977	
552	1272	878	488	1978	1162	43	1352	2182	2556	243	2415	871	960	1875	1944	
553	6794	2292	478	3780	2157	2965	2776	868	3372	2934	3722	460	2565	3467	2348	
557	1679	1675	452	1793	168	16	676	1775	1669	57	1453	1281	1169	1758	793	
562	656	154	73	79	63	21	188	63	1466	254	845	20	249	566	360	
565	953	159	67	443	57	254	483	891	269	663	1582	249	173	1074	77	
566	3735	1257	61	251	480	75	1493	1401	345	850	1389	350	944	1348	669	
0	268	39	21	49	18	15	34	20	64	27	55	20	28	31	21	

NORMALIZED DATA

SPIM	RSP	290	71	99	821	492	263	557	336	346	226	573	91	662	610	215
501	29	116	101	36	24	106	113	58	26	81	3	99	12	16	66	
503	15	13	66	128	146	37	105	82	95	87	117	30	62	89	11	
504	11	2	143	151	171	97	99	62	93	94	8717	49	94	87	6	
505	14	15	23	124	107	101	96	120	37	80	93	99	12	69	66	
507	52	76	164	68	70	100	74	160	72	89	59	130	83	66	121	
513	28	7	27	6	27	178	45	83	202	75	122	38	114	86	21	
514	186	90	75	85	110	40	50	47	816	67	29	192	51	37	52	
517	163	88	23	11	11	14	92	26	98	98	86	140	123	102	84	
522	119	42	60	94	106	52	11	11	139	353	62	87	42	40	37	
523	131	47	6	24	99	149	40	4	83	203	101	8	79	78	26	
533	25	18	107	94	5	2	78	120	46	75	96	48	82	104	211	
535	103	94	101	30	70	3	94	83	99	113	99	48	105	95	53	
536	179	94	39	44	44	32	47	14	466	106	60	24	240	83	30	
541	146	43	152	9	58	54	103	141	25	97	12	84	23	49	54	
542	117	7	33	71	8	5	105	40	35	17	95	122	113	16	53	
546	113	11	63	48	137	172	57	56	84	168	80	30	83	87	63	
547	69	69	93	69	116	59	82	116	77	58	85	66	115	59	107	
552	28	64	53	110	118	3	58	96	104	15	85	140	58	81	95	
553	80	89	28	112	116	109	64	20	73	91	70	39	82	79	126	
557	48	100	63	127	22	1	37	100	87	4	66	264	90	97	102	
562	73	57	40	32	32	7	36	14	301	77	150	16	76	123	183	
565	53	31	18	62	15	44	52	99	28	101	141	101	26	117	20	
566	432	145	44	32	77	4	102	98	22	82	77	90	90	92	108	

Fig. 2

EXPERIMENT PDA 12 90879

ORIGINAL DATA

STIM	RESP	1037F	1038F	1039F	1041F	1043F	247F	248F	999F	1001F	998F	1002F	1000F	557F
8104	15144	2015	17350	6268	10209	14579	18054	48216	35486	23860	12105	6832	37847	
8103	25657	7161	23545	20308	14710	30400	27789	18908	14291	46645	39428	6736	33929	
8108	76828	42367	92404	47032	66851	84803	127669	38064	46255	57644	13988	36366	101378	
8112	59692	9455	27992	33376	61256	50421	47743	71719	86705	44576	168008	38454	99579	
8113	5296	852	496	1520	1074	4988	4590	1345	1268	1248	5835	9462	15576	
8117	20317	600	474	2424	3394	8094	9300	11353	4482	6055	6872	9833	13808	
8120	21332	9762	50444	21575	12911	39082	29944	33647	22868	9942	18745	12545	36770	
8122	28014	6374	23032	17256	15764	28439	22735	15554	17709	50842	48512	12913	30134	
8124	18988	6195	34323	5684	9188	2597	19143	47802	16893	22826	15152	16447	47827	
8126	39119	16335	20419	11090	8214	2679	38293	15590	23997	6174	7204	52135	42030	
8130	21417	4955	5467	3567	7978	2425	31423	5028	9995	1560	2304	16101	21816	
8135	21178	9911	18245	15631	31086	2044	16206	2311	13213	1330	3729	29608	49249	
8139	26876	29302	21856	12908	18042	26577	60182	34343	32990	48155	78525	21667	25324	
8140	6992	9100	12394	1641	9169	18185	31669	15568	4151	13687	5290	8362	19290	
8143	4832	15329	10831	3813	5862	27876	54306	9141	17770	17790	16460	12855	25930	
8148	32770	29927	20044	17199	13152	13964	15742	24400	29467	26725	34921	19618	102462	
8150	24976	3936	38395	7271	28489	42961	19255	24393	16062	30695	37321	28831	61566	
8152	17973	5154	18888	3556	9092	14429	21924	8840	13145	19245	13964	8434	20608	
8154	32109	6298	3856	4452	9456	24242	38581	15594	19833	19924	22491	8644	25583	
8157	42407	8351	53671	22252	102114	46684	35732	38947	42642	59351	45786	19038	61995	
8159	35073	6514	23715	7424	11139	29161	20645	17772	17516	23850	21272	13393	22972	
0	3171	1029	2266	6395	1852	1187	783	2136	3120	824	874	1495	3054	

EXPERIMENT PDA 12 90879

ORIGINAL DATA

STIM	RESP	1037F	1038F	1039F	1041F	1043F	247F	248F	999F	1001F	998F	1002F	1000F	557F
8104	15144	2015	17350	-1	10209	14579	18054	48216	35486	23860	12105	6832	37847	
8103	25657	7161	23545	-1	14710	30400	27789	18908	14291	46645	39428	6736	33929	
8108	76828	42367	92404	-1	66851	84803	127669	38064	46255	57644	13988	36366	101378	
8112	59692	9455	27992	-1	61256	50421	47743	71719	86705	44576	168008	38454	99579	
8113	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
8117	20317	600	474	-1	3394	8094	9300	11353	4482	6055	6872	9833	13808	
8120	21332	9762	50444	-1	12911	39082	29944	33647	22868	9942	18745	12545	36770	
8122	28014	6374	23032	-1	15764	28439	22735	15554	17709	50842	48512	12913	30134	
8124	18988	6195	34323	-1	9188	2597	19143	47802	16893	22826	15152	16447	47827	
8126	39119	16335	20419	-1	8214	2679	38293	15590	23997	6174	7204	52135	42030	
8130	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
8135	21178	9911	18245	-1	31086	2044	16206	2311	13213	1330	3729	29608	49249	
8139	26876	29302	21856	-1	18042	26577	60182	34343	32990	48155	78525	21667	25324	
8140	6992	9100	12394	-1	9169	18185	31669	15568	4151	13687	5290	8362	19290	
8143	4832	15329	10831	-1	5862	27876	54306	9141	17770	17790	16460	12855	25930	
8148	32770	29927	20044	-1	13152	13964	15742	24400	29467	26725	34921	19618	102462	
8150	24976	3936	38395	-1	28489	42961	19255	24393	16062	30695	37321	28831	61566	
8152	17973	5154	18888	-1	9092	14429	21924	8840	13145	19245	13964	8434	20608	
8154	32109	6298	3856	-1	9456	24242	38581	15594	19833	19924	22491	8644	25583	
8157	42407	8351	53671	-1	102114	46684	35732	38947	42642	59351	45786	19038	61995	
8159	35073	6514	23715	-1	11139	29161	20645	17772	17516	23850	21272	13393	22972	
0	3171	1029	2266	-1	1852	1187	783	2136	3120	824	874	1495	3054	

NORMALIZED DATA

STIM	RESP	1037F	1038F	1039F	1043F	247F	248F	999F	1001F	998F	1002F	1000F	557F
8104	72	26	90	71	68	76	253	183	84	51	44	110	
8103	93	70	93	78	107	99	60	56	125	126	33	75	
8108	78	115	102	98	94	114	34	51	43	12	49	63	
8112	78	33	40	117	54	55	83	123	43	194	68	80	
8117	220	17	6	54	85	99	109	53	49	66	143	91	
8120	70	87	181	62	126	87	113	82	24	55	56	74	
8122	100	61	90	82	100	72	49	69	136	154	62	66	
8124	74	65	145	52	10	56	165	71	66	52	66	114	
8126	107	120	61	33	7	93	38	71	13	17	192	71	
8135	75	94	70	160	7	50	7	51	3	12	140	106	
8139	60	177	54	59	58	119	68	81	81	156	65	35	
8140	44	155	86	85	113	177	87	29	65	30	71	75	
8143	21	177	51	37	117	206	35	83	57	63	74	68	
8148	101	248	67	59	42	43	67	99	61	95	61	194	
8150	62	26	104	103	105	42	54	43	57	82	97	94	
8152	111	86	127	82	87	120	48	88	89	76	70	78	
8154	142	75	19	61	105	151	61	95	66	88	51	69	
8157	92	49	127	324	99	69	75	101	96	88	56	83	
8159	156	78	115	72	127	81	70	85	79	84	80	63	

fig. 4

Archiviazione dei dati

L'uso che viene fatto più comunemente dei dati dell'MLC richiede di accedere contemporaneamente ai risultati che i vari responders hanno dato con uno stesso stimulator. Per questo motivo si è scelto di creare un file per ciascuno stimulator e di cumulare, in ognuno di tali files, tutti i risultati che il relativo stimulator dà con i diversi responders con cui è messo in coltura nei vari esperimenti.

I nomi che vengono attribuiti a questi files sono composti dalla lettera C seguita dalla sigla dello stimulator, il tipo, unico per tutti i files, e FERRARA. Ad esempio, il file "C100 FERRARA" conterrà tutti i risultati dello stimulator 100 con tutti i responders con cui è stato messo a confronto.

Tutti i programmi che usano i dati MLC definiscono, durante l'esecuzione, i files a cui devono accedere a partire dalla sigla dei vari stimulators.

Il programma di archiviazione dei dati provvede alla creazione o all'aggiornamento di questi file a partire dal file di tipo INTER; per ciascun stimulator, ni, che incontra nel file di input, accede al file Cni FERRARA (creandolo se già non esiste) per aggiungervi i nuovi risultati. L'aggiunta dei nuovi dati è effettuata attraverso una procedura di "merging" in quanto i risultati vengono mantenuti ordinati per valore crescente all'interno dei files.

Nei files di archiviazione vengono associati ad ogni dato sia la sigla del responder che il numero dell'esperimento in cui il risultato è stato ottenuto. (Attraverso il numero dello esperimento si risale alla sigla completa tramite i dati

contenuti nel file EXP FERRARA).

Il programma di archiviazione viene attivato dal comando:

```
-----  
MER nomef  
-----
```

nomef

nome del file di input di tipo INTER

Presentazione dei dati

Allo scopo di presentare i dati relativi ai vari stimulators sotto forma di stampe variamente organizzate e' stato realizzato un programma che, partendo dai dati contenuti in un generico file Cni FERRARA, stampa:

1) l' istogramma di tutti i risultati, sia utilizzando asterischi, per una maggiore evidenza grafica, sia utilizzando le sigle dei vari responders per rendere possibile un' analisi piu' dettagliata; (figg. 5-6)

2) la lista delle "occorrenze multiple" cioe' la lista di tutti i responders che sono stati messi in coltura con lo stimulator piu' di una volta. Per ciascuna occorrenza viene indicato, sia il valore del risultato che l' esperimento in cui esso e' stato ottenuto; (fig. 7)

3) una lista in cui compaiono tutti i responders, ciascuno con il relativo risultato e l' indicazione dell' esperimento, ordinata secondo le sigle dei responders ed una seconda lista, uguale alla precedente, ma ordinata secondo i valori crescenti dei risultati. (fig 8,9)

La presentazione dei dati sotto forma di istogramma e' molto utile quando si debba operare una scelta "manuale" dell' elemento di separazione delle due classi di risultati (positivi/negativi), mentre evidenziare i risultati multipli e' utile al fine di ottenere una indicazione della qualita' degli esperimenti (test di riproducibilita').

Il programma e' organizzato in maniera da presentare le stampe relative a tutti gli stimulators contenuti nel file di tipo TABCEL fornitogli come input e viene attivato dal comando HIST il cui formato e':

HIST nomef

nomef

e' il nome di un file di tipo TABCEL, prodotto dal comando NORM

Quindi il comando

HIST ALL

produce le stampe relative a tutti gli stimulators, mentre il comando

HIST nomef

produce le stampe relative ai soli stimulators presenti negli esperimenti contenuti nel file nomef DATI e che non sono stati eliminati durante la normalizzazione.

Questa seconda forma permette cioe' di farsi presentare solo gli stimulators per i quali sono stati acquisiti nuovi dati.

STIMULATOR 501

FREQUENCY	9	10	8	4	6	2	6	5	6	4	8	17	11	9	17	13	12	18	15	27	14	12	6	4	3	5	2	1	2	0	4	0	0	1	1	3	0	0	1
27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
26	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PERCENTAGE	5	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	9	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	

Fig 5

PERC	RESPONDERS																			
5	613	205	69	394	573	289	284	419	688											
10	610	247	394	209	242	568	628	370S	1018	73										
15	67	662	386	59	69	484	757	613												
20	610	209	506	492																
25	92	59	1014	710	484	346														
30	290	688																		
35	821	710	21	572	437	614														
40	309	160	568	160	60															
45	170	248	59	209	1013	69														
50	600	263	628	485																
55	91	77	434	470	1028	467	336	583												
60	215	578	470	205	434	290	175	550	1004	417										
65	773	346	99	506	551	175	1PD	625	436	843	583									
70	114	584	99	71	114	361	5NA	52	132											
75	337	377	445	1022	1021	1027	1029	2M	338	147	309	263	472	319	1020	311	65			
80	547	596	3PD	226	197	370	2NA	2PD	175	949	5PD	65	175							
85	113	248	864	320	160	132	3NA	912	41A	175	200	547								
90	547	114	320	120	960	4NA	341	77	175	618	175	339	243	58	340	470	175	320		
95	1002	175	1030	618	113	64	277	1016	1003	351	574	445	869	615	65					
100	1019 436	461 377	21 73	578 73	630 638	548 220	651 485	538P	52	673	147	175	263	1006	596	625	407	821	99	91
105	1011	574	810	646	147	483	263	58	1M	615	318	64	120	175						
110	1015	599	377	485	168	309	1024	557	550	4ED	71	296								
115	254	1026	813	1023	113	538M														
120	52	613	175	31																
125	1	638	77																	
130	5NA	1	65	1012	866															
135	865	150																		
140	810																			
145	472	31																		
155	91	646	1005	150																
170	215																			
175	834																			
180	665	113	296																	
200	467																			

fig 6

MULTIPLE OCCURRENCIES

SP

VALUE/EXPERIMENT

3	2/GRF 172	15/GBP 131	116/GBP 134						
5	2/GBP 172	59/GRF 186							
9	2/GRF 169	12/GBP 112	44/GRF 137						
4	2/GBP 169	6/GBP 122							
	5/GRF 186	28/GBP 178							
	6/GRF 186	16/GRF 177							
	8/GRF 172	16/GBP 121	42/GBP 134						
	8/GRF 127	40/GRF 135							
	9/GRF 169	50/GRF 172							
	10/GRF 169	100/GRF 135	100/GBP 112						
	12/GBP 172	23/GRF 127	42/GBP 134						
	15/GRF 178	25/GRF 186							
	19/GRF 186	52/GRF 178							
	24/GRF 186	32/GRF 178							
	25/GRF 177	61/GRF 186							
	27/GBP 177	59/GRF 122							
	31/GRF 177	100/GRF 166							
	33/GRF 114	96/GRF 166							
	38/GRF 159	73/GRF 186	107/GBP 121						
	40/GRF 168	40/GRF 135							
	42/GRF 169	81/PDA 2 2							
	48/GRF 132	73/GRF 122	98/GRF 120	103/GRF 177					
	50/GRF 169	100/GRF 127	106/GRF 135						
	51/GRF 172	100/GRF 177	151/PDA 1 2						
	51/GRF 132	88/GRF 172	125/GRF 120						
	52/GRF 120	59/GRF 168							
	53/GRF 132	58/GRF 120	90/GRF 168						
	54/GRF 186	259/GRF 178							
	55/GRF 120	65/GRF 132							
	56/GRF 177	166/GRF 186							
	57/GRF 178	96/GRF 122							
	59/GRF 131	62/GRF 112	79/GRF 121	80/GRF 123	84/GRF 120	88/GRF 168	88/GRF 126	90/GRF 122	
	92/GRF 134	68/GRF 114	105/GRF 132	118/GRF 135					
	59/GRF 132	109/GRF 131							
	61/GRF 122	69/GRF 168	100/GRF 177						
	64/GRF 135	99/GRF 127							
	64/GRF 134	100/GRF 169							
	66/PDA 4 1	69/GRF 126	86/GRF 168						
	69/GRF 131	110/GRF 177							
	70/GRF 112	97/GRF 134	116/GRF 169						
	73/GRF 134	32/GRF 123							
	71/GRF 135	100/GRF 169	106/GRF 172						
	71/GRF 135	94/GRF 131							
	72/GRF 168	98/GRF 137	102/GRF 114						
	73/GRF 112	142/GRF 169							
	75/GRF 178	80/GRF 168	95/GRF 114	128/GRF 132					
	76/GRF 112	85/GRF 137	86/GRF 168						
	76/GRF 132	99/GRF 131							
	81/PDA 4 1	93/GRF 137	115/GRF 126	177/GRF 168					
	81/GRF 172	86/GRF 134	90/GRF 131						
	81/GRF 134	107/GRF 172							
	86/GRF 120	104/GRF 132							
	88/GRF 135	93/GRF 121							
	89/GRF 132	103/GRF 123							
	93/GRF 123	104/GRF 137							
	94/GRF 135	111/GRF 131							
	95/GRF 114	104/GRF 168							
	100/GRF 112	125/GRF 168							
	102/GRF 178	138/GRF 186							
	102/GRF 137	152/GRF 127							
	110/GRF 122	179/GRF 178							
	120/GRF 134	144/GRF 112							
	121/GRF 114	126/GRF 168							
	134/GRF 134	154/GRF 172							

fig 7

STIMULATOR 501

VAL	RESP	EXP	VAL	RESP	EXP	VAL	RESP	EXP	VAL	RESP	EXP
2	613	GBF 172	54	467	GBF 186	81	864	PDA 1 2	100	73	GBF 135
2	205	GBF 172	54	336	GBF 177	91	320	GBF 172	100	73	GBF 112
2	69	GBF 169	55	583	GBF 120	81	168	GBF 134	100	638	GBF 112
2	394	GBF 169	56	215	GBF 177	82	132	GBF 123	100	220	GBF 134
3	573	GBF 177	57	578	GBF 178	83	3NA	PDA 3 3	100	485	GBF 127
3	289	GBF 169	58	470	GBF 120	83	902	PDA 1 2	101	1011	PDA 2 2
4	284	GBF 123	59	205	GBF 186	84	91A	GBF 126	101	574	GBF 131
5	419	PDA 3 3	59	434	GBF 168	84	175	GBF 120	102	810	GBF 178
5	688	GBF 186	59	290	GBF 122	85	200	GBF 121	102	646	GBF 137
6	610	GBF 186	59	175	GBF 131	85	547	GBF 137	102	147	GBF 114
6	247	GBF 169	59	550	GBF 132	86	547	GBF 168	102	483	GBF 120
6	394	GBF 122	60	1004	PDA 2 2	86	114	GBF 168	103	263	GBF 177
8	209	GBF 172	60	417	GBF 178	86	320	GBF 134	103	58	GBF 123
8	242	GBF 168	61	773	GBF 186	86	120	GBF 120	104	1M	PDA 4 1
8	568	GBF 127	61	346	GBF 186	88	960	PDA 4 1	104	615	GBF 168
9	628	GBF 169	61	99	GBF 122	88	4NA	PDA 3 3	104	318	GBF 122
9	370S	GBF 123	62	506	GBF 178	88	341	PDA 1 2	104	64	GBF 137
10	1018	PDA 3 3	62	551	GBF 126	88	77	GBF 172	104	120	GBF 132
10	73	GBF 169	62	175	GBF 112	88	175	GBF 168	105	175	GBF 132
11	67	GBF 186	54	1PD	PDA 1 2	88	618	GBF 135	106	1015	PDA 3 3
11	662	GBF 177	64	625	GBF 135	88	175	GBF 126	106	599	GBF 186
12	386	GBF 186	64	436	GBF 134	89	339	PDA 1 2	106	377	GBF 172
12	59	GBF 172	65	843	GBF 172	89	243	GBF 126	106	485	GBF 135
12	69	GBF 112	65	583	GBF 132	89	58	GBF 132	107	168	GBF 172
15	484	GBF 178	66	114	PDA 4 1	90	340	PDA 1 2	107	309	GBF 121
15	757	GBF 122	66	584	GBF 178	90	470	GBF 168	108	1024	PDA 4 1
15	613	GBF 131	69	99	GBF 168	90	175	GBF 122	109	557	GBF 177
16	610	GBF 177	69	71	GBF 131	90	320	GBF 131	109	550	GBF 131
16	209	GBF 121	69	114	GBF 126	91	1002	PDA 2 2	110	4PD	PDA 1 2
19	506	GBF 186	69	361	GBF 114	92	175	GBF 134	110	71	GBF 177
19	492	GBF 177	70	6NA	PDA 3 3	93	1030	PDA 4 1	110	296	GBF 122
21	92	PDA 1 2	70	52	GBF 112	93	618	GBF 121	111	254	GBF 126
23	59	GBF 127	70	132	GBF 134	93	113	GBF 137	112	1026	PDA 4 1
24	1014	PDA 3 3	71	337	PDA 1 2	93	64	GBF 123	113	813	GBF 186
24	710	GBF 186	71	377	GBF 135	93	277	GBF 127	114	1023	PDA 4 1
25	484	GBF 186	71	445	GBF 135	94	1016	PDA 3 3	115	113	GBF 126
25	346	GBF 177	72	1022	PDA 4 1	94	1003	PDA 2 2	115	538M	GBF 123
27	290	GBF 177	72	1021	PDA 4 1	94	351	GBF 172	116	52	GBF 169
28	688	GBF 178	72	1027	PDA 4 1	94	574	GBF 135	116	613	GBF 134
31	821	GBF 177	72	1029	PDA 4 1	94	445	GBF 131	118	175	GBF 135
32	710	GBF 178	72	2M	PDA 4 1	95	869	GBF 186	120	31	GBF 134
33	21	GBF 114	72	338	PDA 1 2	95	615	GBF 114	121	1	GBF 114
34	572	GBF 131	72	147	GBF 168	95	65	GBF 114	125	638	GBF 168
34	437	GBF 120	73	309	GBF 186	96	1019	PDA 4 1	125	77	GBF 120
35	614	GBF 178	73	263	GBF 122	96	461	GBF 186	126	5WA	PDA 3 3
38	309	GBF 169	73	472	GBF 112	96	21	GBF 168	126	1	GBF 168
40	160	GBF 168	73	319	GBF 114	96	578	GBF 122	128	65	GBF 132
40	568	GBF 135	74	1020	PDA 4 1	96	630	GBF 137	130	1012	PDA 3 3
40	160	GBF 135	74	311	GBF 134	96	538	GBF 132	130	866	PDA 1 2
40	60	GBF 134	75	65	GBF 178	97	651	GBF 186	132	865	PDA 1 2
41	170	PDA 1 2	76	547	GBF 112	97	538P	GBF 123	134	150	GBF 134
42	248	GBF 169	76	596	GBF 132	97	52	GBF 134	138	810	GBF 186
42	59	GBF 134	78	3PD	PDA 1 2	98	673	GBF 178	142	472	GBF 169
42	209	GBF 134	78	226	GBF 177	98	147	GBF 137	144	31	GBF 112
44	1013	PDA 3 3	78	197	GBF 123	98	175	GBF 114	151	91	PDA 1 2
44	69	GBF 137	78	370	GBF 114	98	263	GBF 120	152	646	GBF 127
47	600	GBF 178	79	2NA	PDA 3 3	99	1006	PDA 2 2	154	1005	PDA 2 2
48	263	GBF 132	79	2PD	PDA 1 2	99	596	GBF 131	154	150	GBF 172
50	628	GBF 172	79	175	GBF 121	99	625	GBF 127	166	215	GBF 186
50	485	GBF 169	80	949	PDA 4 1	100	407	GBF 186	171	834	GBF 186
51	91	GBF 172	80	5PD	PDA 1 2	100	821	GBF 186	176	665	GBF 178
51	77	GBF 132	80	65	GBF 168	100	99	GBF 177	177	113	GBF 168
52	434	GBF 120	80	175	GBF 123	100	91	GBF 177	179	296	GBF 178
53	470	GBF 132	81	113	PDA 4 1	100	436	GBF 169	259	467	GBF 178
54	1028	PDA 4 1	81	248	PDA 2 2	100	377	GBF 169			

Fig 8

STIMULATOR 501

RESP	VAL	EXP	RESP	VAL	EXP	RESP	VAL	EXP	RESP	VAL	EXP
1H	104	PDA 4 1	147	98	GBP 137	346	61	GBP 186	613	2	GBP 172
1PD	64	PDA 1 2	147	102	GBP 114	351	94	GBP 172	613	15	GBP 131
1	121	GBP 114	150	134	GBP 134	361	69	GBP 114	613	116	GBP 134
1	126	GBP 168	150	154	GBP 172	370S	9	GBP 123	614	35	GBP 178
2H	72	PDA 4 1	160	40	GBP 168	370	78	GBP 114	615	95	GBP 114
2NA	79	PDA 3 3	160	40	GBP 135	377	71	GBP 135	615	104	GBP 168
2PD	79	PDA 1 2	168	81	GBP 134	377	100	GBP 169	618	88	GBP 135
3NA	83	PDA 3 3	168	107	GBP 172	377	106	GBP 172	618	93	GBP 121
3PD	78	PDA 1 2	170	41	PDA 1 2	386	12	GBP 186	625	64	GBP 135
4NA	88	PDA 3 3	175	59	GBP 131	394	2	GBP 169	625	99	GBP 127
4PD	110	PDA 1 2	175	62	GBP 112	394	6	GBP 122	628	9	GBP 169
5NA	126	PDA 3 3	175	79	GBP 121	407	100	GBP 186	628	50	GBP 172
5PD	80	PDA 1 2	175	80	GBP 123	417	60	GBP 178	630	96	GBP 137
6NA	70	PDA 3 3	175	84	GBP 120	419	5	PDA 3 3	638	100	GBP 112
21	33	GBP 114	175	88	GBP 168	434	52	GBP 120	638	125	GBP 168
21	96	GBP 168	175	88	GBP 126	434	59	GBP 168	646	102	GBP 137
31	120	GBP 134	175	90	GBP 122	436	64	GBP 134	646	152	GBP 127
31	144	GBP 112	175	92	GBP 134	436	100	GBP 169	651	97	GBP 186
52	70	GBP 112	175	98	GBP 114	437	34	GBP 120	662	11	GBP 177
52	97	GBP 134	175	105	GBP 132	445	71	GBP 135	665	176	GBP 178
52	116	GBP 169	175	118	GBP 135	445	94	GBP 131	673	98	GBP 178
58	89	GBP 132	197	78	GBP 123	461	96	GBP 186	688	5	GBP 186
58	103	GBP 123	200	85	GBP 121	467	54	GBP 186	688	28	GBP 178
59	12	GBP 172	205	2	GBP 172	467	259	GBP 178	710	24	GBP 186
59	23	GBP 127	205	59	GBP 186	470	53	GBP 132	710	32	GBP 178
59	42	GBP 134	209	8	GBP 172	470	58	GBP 120	757	15	GBP 122
60	40	GBP 134	209	16	GBP 121	470	90	GBP 168	773	61	GBP 186
64	93	GBP 123	209	42	GBP 134	472	73	GBP 112	810	102	GBP 178
64	104	GBP 137	215	56	GBP 177	472	142	GBP 169	810	138	GBP 186
65	75	GBP 178	215	166	GBP 186	483	102	GBP 120	813	113	GBP 186
65	80	GBP 168	220	100	GBP 134	484	15	GBP 178	821	31	GBP 177
65	95	GBP 114	226	78	GBP 177	484	25	GBP 186	821	100	GBP 186
65	128	GBP 132	242	8	GBP 168	485	50	GBP 169	834	171	GBP 186
67	11	GBP 186	243	89	GBP 126	485	100	GBP 127	843	65	GBP 172
69	2	GBP 169	247	6	GBP 169	485	106	GBP 135	864	81	PDA 1 2
69	12	GBP 112	248	42	GBP 169	492	19	GBP 177	865	132	PDA 1 2
69	44	GBP 137	248	81	PDA 2 2	506	19	GBP 186	866	130	PDA 1 2
71	69	GBP 131	254	111	GBP 126	506	62	GBP 178	869	95	GBP 186
71	110	GBP 177	263	48	GBP 132	538M	115	GBP 123	902	83	PDA 1 2
73	10	GBP 169	263	73	GBP 122	538P	97	GBP 123	949	80	PDA 4 1
73	100	GBP 135	263	98	GBP 120	538	96	GBP 132	960	88	PDA 4 1
73	100	GBP 112	263	103	GBP 177	547	76	GBP 112	1002	91	PDA 2 2
77	51	GBP 132	277	93	GBP 127	547	85	GBP 137	1003	94	PDA 2 2
77	88	GBP 172	284	4	GBP 123	547	86	GBP 168	1004	60	PDA 2 2
77	125	GBP 120	289	3	GBP 169	550	59	GBP 132	1005	154	PDA 2 2
91A	84	GBP 126	290	27	GBP 177	550	109	GBP 131	1006	99	PDA 2 2
91	51	GBP 172	290	59	GBP 122	551	62	GBP 126	1011	101	PDA 2 2
91	100	GBP 177	296	110	GBP 122	557	109	GBP 177	1012	130	PDA 3 3
91	151	PDA 1 2	296	179	GBP 178	568	8	GBP 127	1013	44	PDA 3 3
92	21	PDA 1 2	309	38	GBP 169	568	40	GBP 135	1014	24	PDA 3 3
99	61	GBP 122	309	73	GBP 186	572	34	GBP 131	1015	106	PDA 3 3
99	69	GBP 168	309	107	GBP 121	573	3	GBP 177	1016	94	PDA 3 3
99	100	GBP 177	311	74	GBP 134	574	94	GBP 135	1018	10	PDA 3 3
113	81	PDA 4 1	318	104	GBP 122	574	101	GBP 131	1019	96	PDA 4 1
113	93	GBP 137	319	73	GBP 114	578	57	GBP 178	1020	74	PDA 4 1
113	115	GBP 126	320	81	GBP 172	578	96	GBP 122	1021	72	PDA 4 1
113	177	GBP 168	320	86	GBP 134	583	55	GBP 120	1022	72	PDA 4 1
114	66	PDA 4 1	320	90	GBP 131	583	65	GBP 132	1023	114	PDA 4 1
114	69	GBP 126	336	54	GBP 177	584	66	GBP 178	1024	108	PDA 4 1
114	86	GBP 168	337	71	PDA 1 2	596	76	GBP 132	1026	112	PDA 4 1
120	86	GBP 120	338	72	PDA 1 2	596	99	GBP 131	1027	72	PDA 4 1
120	104	GBP 132	339	89	PDA 1 2	599	106	GBP 186	1028	54	PDA 4 1
132	70	GBP 134	340	90	PDA 1 2	600	47	GBP 178	1029	72	PDA 4 1
132	82	GBP 123	341	88	PDA 1 2	610	6	GBP 186	1030	93	PDA 4 1
147	72	GBP 168	346	25	GBP 177	610	16	GBP 177			

fig 9

Conversione del formato dei dati

L'analisi dei risultati che i vari responders hanno dato con uno stimulator permette, normalmente, di individuare due classi di responders:

i) la classe dei responders che hanno dato luogo a una scarsa proliferazione, per i quali si deve presumere che condividano la stessa specificità HLA-D dello stimulator (2)

ii) la classe dei responders che hanno dato luogo a una marcata proliferazione, per i quali si presume che possiedano specificità diverse da quella dello stimulator.

Il problema consiste, essenzialmente, nell'individuare un valore di "soglia" che permetta di discriminare gli elementi delle due classi. Un criterio oggettivo per la scelta dei valori di soglia che sia pienamente soddisfacente non è stato ancora definito nonostante siano state proposte svariate metodologie (analisi dei cluster, analisi della varianza ecc...). Anche nel corso di questo lavoro sono stati realizzati alcuni programmi per sperimentare diversi approcci alla soluzione del problema (fitting di curve normali, analisi dei cluster, tripla normalizzazione).

Questi programmi, pur fornendo delle indicazioni molto utili

(2) Una "assoluta" assenza di proliferazione (valori CPM dello stesso ordine di quelli dell'autologo) è molto difficilmente riscontrabile. Questo è probabilmente dovuto, oltre che a cause sperimentali, anche a cause biologiche, come una non completa identità tra il determinante HLA-D del responder e del donatore e un'influenza, se pur ridotta, di determinanti non HLA-D nelle reazioni MLC.

nella scelta delle soglie, allo stato attuale non garantiscono risultati sempre e comunque affidabili. Per questo motivo non sono stati inseriti fra i programmi, di uso routinario, descritti in questa nota.

Normalmente la procedura di classificazione dei risultati relativi a ogni stimulator, sia essa svolta con l'aiuto degli appositi programmi o in modo esclusivamente manuale, porta alla scelta di una coppia di valori S_1 e S_2 ($S_1 \leq S_2$) che ci permettono di ripartire i risultati nelle tre classi distinte:

1	classe dei risultati negativi	se $V \leq S_1$
2	= = =	dubbi se $S_1 < V \leq S_2$
3	= = =	positivi se $V > S_2$

avendo indicato con V il valore di un generico risultato.

La scelta delle soglie, anche se non viene basata su metodi rigorosi, risulta ampiamente accettabile al fine pratico per la possibilità di definire un intervallo di incertezza (classe di risultati dubbi) anche relativamente ampio.

Una volta effettuata la ripartizione dei dati in tre classi distinte, diviene possibile assimilare i dati MLC ai dati ottenuti dagli esperimenti serologici in modo da potersi avvalere, anche per essi, dei vari programmi di analisi realizzati per questi ultimi (analisi dei pattern di reazioni, analisi delle correlazioni, ecc...).

A questo scopo basta produrre due files, uno contenente la lista delle sigle degli stimulators e uno contenente, per ciascun responder, la relativa sigla e i risultati, espressi con i punteggi standard 0,1,4,8, che il responder ha dato con tutti gli stimulators della lista. Questi due files costituiranno l'input per il sistema GADI-HLA. Essi sono del tutto equivalenti, per formato e contenuto, ai file contenenti la lista degli antisieri.

e i risultati degli esperimenti serologici.

Illustriamo adesso il metodo usato per la sostituzione dei dati MLC con i punteggi standard.

Sia S un generico stimulator per cui sono stati scelti i valori di soglia S1 e S2 (S1 ≤ S2) , R un qualunque responder e V(S,R) il valore CPM doppiamente normalizzato associato alla coltura di S con R (V(S,R)=0 se S e R non sono stati mai messi insieme in coltura) , il punteggio P(S,R) si attribuisce secondo il seguente criterio:

se	V(S,R)=0	allora	P(S,R)=0
	V(S,R) ≤ S1		P(S,R)=8
	S1 < V(S,R) ≤ S2		P(S,R)=4
	V(S,R) > S2		P(S,R)=1

Se S e R sono stati messi insieme in coltura n volte, si calcola un unico valore V(S,R) a partire dagli n valori V_i(S,R) ottenuti nelle varie prove, nel modo seguente:

se $V_i(S,R) \leq S_2 \quad \forall i$ oppure $V_i(S,R) > S_1 \quad \forall i$ allora

$$V(S,R) = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n}$$

altrimenti

$$V(S,R) = 0$$

Il programma di conversione dei dati richiede, in input, due files:

- un file, di tipo TABCEL, contenente la lista degli stimulator da considerare
- un file, di tipo SOGLIE, contenente, per ogni stimulator considerato, una coppia i valori interi da assumere come soglie

Talvolta avviene che la sigla usata per un individuo che partecipa come responder in esperimenti MLC sia diversa dalla sigla usata, per lo stesso individuo, negli esperimenti

serologoci. In tal caso il programma puo' sostituire, nel file di output di tipo DATICEL, quest' ultima alla sigla MLC. Questo se si vuole ottenere la possibilita' di associare , nelle analisi, i dati MLC ai dati serologici.

In un caso del genere basta provvedere alla creazione del file SIGLE RESPN in cui si fornisce l' elenco delle sigle MLC che si intende sostituire, ciascuna seguita immediatamente dalla corrispondente sigla sostitutiva.

Se esiste il file SIGLE RESPN, il programma provvede automaticamente a svolgere le sostituzioni in esso indicate. I dati contenuti nel file di tipo SOGLIE e nel file SIGLE RESPN non sono sottoposti ad alcun vincolo di formato, a parte la condizione di essere separati, tra loro, da almeno un carattere spazio.

Il comando che attiva il programma di conversione e' FORM il cui formato e' il seguente:

```
-----  
FORM nomes <nomef>  
-----
```

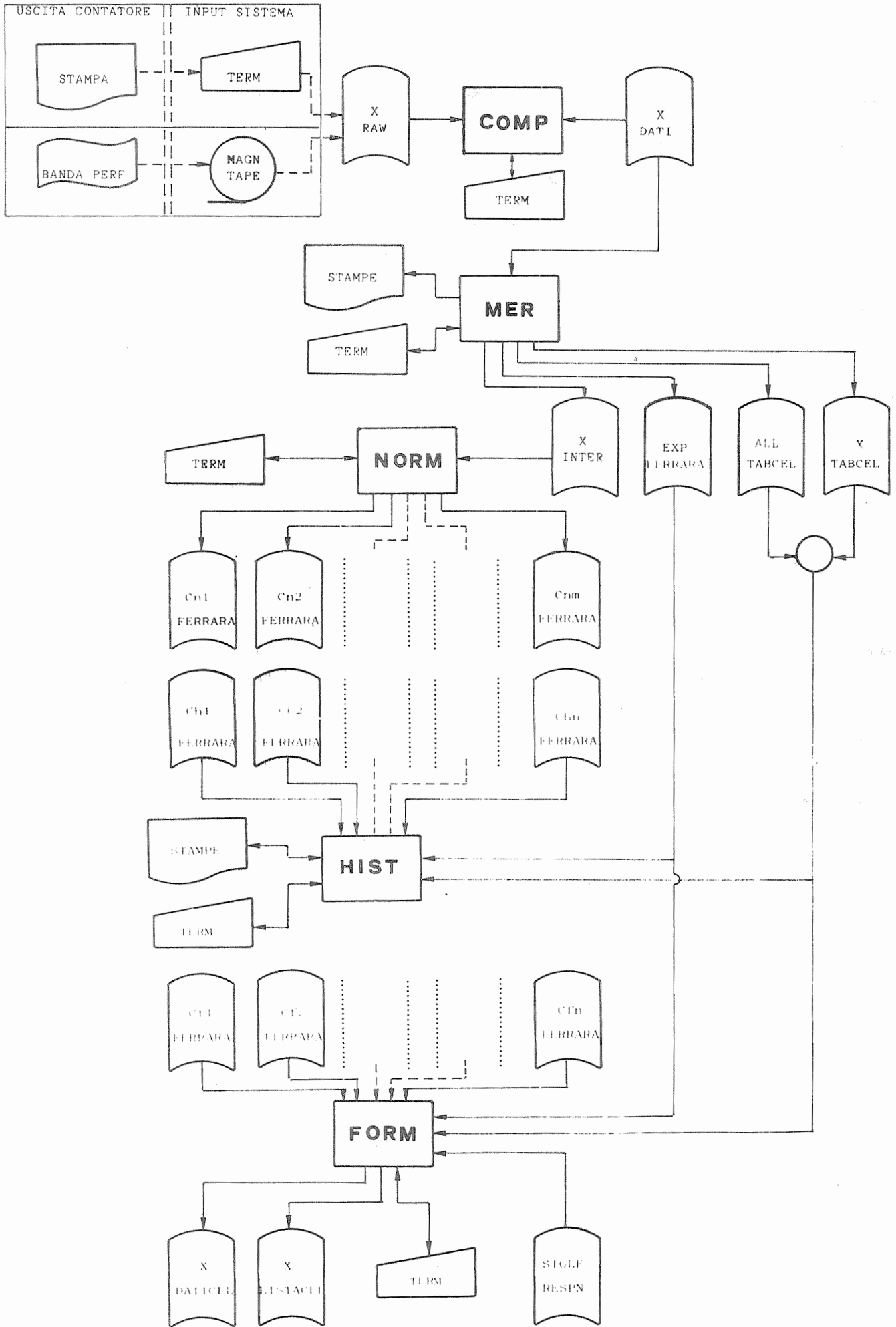
nomes

e' il nome attribuito ad ambedue i file di output di tipo DATICEL e LISTACEL

nomef

e' il nome di ambedue i file di input di tipo TABCEL e SOGLIE. Se omissso viene assunto nomef=ALL

Nella tavola I e' riportato un diagramma che illustra il flusso dei dati in connessione ai vari comandi.



TAV. 1

B I B L I O G R A P H I A

Bach P.H., van Rood J.J., "The Major Histocompatibility Complex - Genetics and Biology". The New England Journal of Medicine, Oct. 7, 1976: pp. 806-812 (First Part)

Bach P.H., van Rood J.J., "The Major Histocompatibility Complex - Genetics and Biology". The New England Journal of Medicine, Oct. 14, 1976: pp. 872-878 (Second Part)

Bach P.H., van Rood J.J., "The Major Histocompatibility Complex - Genetics and Biology". The New England Journal of Medicine, Vol. 295 No. 17: pp. 927-936 (Third Part)

Jensen E.B., Kristensen T., Jorgensen P., Lamb L.U., "HLA-D Typing by Homozygous Typing Cells". Tissue Antigens (1977), 10, 83-98

Piazza A., Mattiuz P.L., Richiardi P., "A Computer Program Library for a Tissue Typing Laboratory". Tissue Antigens (1972), 2, 156-162

Steen G.J., D'Amaro J., "Computer Selection of Donor-Recipient Pairs" Tissue Antigens (1972), 2, 189-195

Ruppelt W., Grosse-Wilde H., Netzel B., "Computer Program for the Evaluation and Interpretation of HLC Data". Seventh Annual Meeting of the German Tissue

Selwood N.H., "Detailed Numerical Analysis of Serological Data from the Fifth International Histocompatibility Workshop". *Tissue Antigens* (1975), 5, 367-385

Hendell N.R., Lee K.L., Reinsmoen N., Yunis E., Amos D.B., Enne L., "Statistical Methods for Evaluating Responses in HLA-D Typing". *Transplantation Proceedings*, Vol. IX, No. 1, Supplement 1 (March), 1977 pp. 99-106

Albert E., Mickey M.R., Terasaki P.I., "The Use of Computer Programs for Tissue Typing and Immunogenetic Research". *Tissue Antigens* (1972), 2, 173-181

Rubinstein P., Falk C., Martin M., Suciú-Poca N., "Complete HLA and Bf Typing in Families. I. Analysis of MLC Responses and LD Typing". *Transplantation Proceedings*, Vol. IX, No. 1, Supplement 1 (March), 1977 pp. 77-81

Van Rood J.J., D'Amato J., Doetjes R.S., Steen G., "The Role of the Computer in a Histocompatibility Laboratory". *Tissue Antigens* (1972), 2, 196-201 Typing Laboratories; 293-297