Inchiesta nazionale sull'impiego di metodi commerciali basati sul principio analitico raccomandato dall'IFCC per la determinazione dell'attività catalitica degli enzimi nel siero*

Giampaolo Cattozzo[1], Maurizio Borsotti[2], Anna Carobene[3], Loredana Incorvaia[4], Sandra Secchiero[5], Carlo Franzini[6] per il Gruppo di Studio SIBioC Enzimi

[1]Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese
[2]Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze
[3]Laboratorio di Standardizzazione, Diagnostica e Ricerca San Raffaele SpA, Milano
[4]Azienda Ospedaliera Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna
[5]Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)
[6]Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

National survey on the use of commercial assays employing method principles in agreement with IFCC reference methods for the measurement of catalytic activity of serum enzymes. Method-dependent variability of enzyme catalytic activities jeopardizes the use of uniform clinical decision limits and confuses the understanding of results observed in patient sera and in control materials as well. Results by different methods may be harmonized making the results they produce traceable to a selected higher metrological level: however, it may be easier to achieve result traceability by widespread use of one selected analytical principle comparable with a reference, i.e. the IFCC, reference procedure. The aim of this work was to check the spread in Italian laboratories of assays based on IFCC reference method principles for measurement of alanine transaminase (ALT), α-amylase (AMY), aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK), γ-glutamiltransferase (GGT), and lactate dehydrogenase (LDH) activities. By distributing a questionnaire to organizers of five national EQAS, we collected information about the enzyme analytical methodologies selected in about 1400 laboratories. We found that 86%, 44%, 15% and 10% of laboratories adopted the relevant IFCC principle for CK, AMY, LDH and AST/ALT measurements, respectively. For GGT we observed that the IFCC principle was adopted by 56% of laboratories participating in the two EQAS distinguishing a specific group for the IFCC method. However, 83% of the laboratories participating in EQAS used L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide as substrate.

INTRODUZIONE

I valori forniti dai metodi per la misura della concentrazione di attività catalitica degli enzimi del siero dipendono, oltre che dalla concentrazione dell'enzima, anche dalle condizioni sperimentali previste dal metodo analitico: se queste variano, varia anche il risultato della misurazione (1). La metodo-dipendenza dei valori misurabili di concentrazione di attività catalitica impedisce la definizione di livelli decisionali condivisi e complica l'interpretazione dei risultati misurati per i pazienti e dei risultati ottenuti nei programmi di VEQ a cui aderiscano laboratori che impiegano metodi differenti. Il largo impiego della determinazione degli enzimi del siero a scopo diagnostico indica la necessità di adottare un sistema di standardizzazione delle misurazioni; a tale scopo è stata proposta l'implementazione di un sistema metrologico di riferimento completo che prevede il trasferimento dell'esattezza analitica del metodo di rango metrologico superiore, assunto come riferimento, ai metodi di uguale o simile specificità analitica impiegati ordinariamente (2). Sebbene l'applicazione di principi di riferibilità consenta di ottenere risultati accettabilmente sovrapponibili anche utilizzando metodi differenti (3), l'utilizzazione allargata del medesimo metodo, con caratteristiche di specificità analitica corrispondenti al procedimento analitico di riferimento, consente un più sicuro conseguimento dell'armonizzazione dei risultati (4). La disponibilità di procedimenti analitici di riferimento IFCC per la misurazione dell'attività catalitica degli enzimi del siero è quindi un importante riferimento per l'armonizzazione dei risultati (5-10).

Scopo di questa inchiesta è stata la verifica della diffusione presso i laboratori clinici italiani di metodi basati sulla standardizzazione IFCC per la determinazione degli enzimi di maggiore interesse medico [alanina amminotransferasi (ALT), α-amilasi (AMY), aspartato amminotransferasi (AST), creatina chinasi (CK), γ-glutammiltransferasi (GGT) e lattato deidrogenasi (LDH)].

**Questo lavoro è stato in parte presentato al 40° Congresso Nazionale SIBioC, 28-31 ottobre 2008, Rimini, sotto forma di poster (Biochim Clin 2008;32:473).*

MATERIALI E METODI

Per verificare la diffusione dei metodi basati sul principio analitico raccomandato dall'IFCC in confronto con quella di metodi alternativi, si è fatto riferimento a programmi di VEQ rispettivamente organizzati da Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia (Milano) (VEQ A), Diagnostica e Ricerca S. Raffaele (Milano) (VEQ B), Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (Firenze) (VEQ C), Centro di Ricerca Biomedica (Castelfranco Veneto) (VEQ D) e Azienda Ospedaliera Policlinico S. Orsola-Malpighi (Bologna) (VEQ E).

Per ciascun programma si sono considerati i dati relativi al penultimo esercizio di VEQ dell'anno 2007. Ai fini dell'elaborazione statistica, i metodi sono stati classificati in gruppi omogenei per principio analitico; per 4 programmi di VEQ la classificazione dei metodi proposta dai partecipanti era stata sottoposta a revisione a cura dell'ente organizzatore. Per ciascun metodo di determinazione dei 6 enzimi considerati (ALT, AMY, AST, CK, GGT e LDH) si è calcolata la frequenza cumulativa di adozione da parte di tutti i laboratori partecipanti ai programmi di VEQ. Inoltre, si è calcolata la frequenza dell'adozione da parte dei laboratori partecipanti a ciascun programma di VEQ. I dati relativi ai laboratori partecipanti ai programmi di Castelfranco Veneto e Bologna sono stati elaborati cumulativamente.

RISULTATI

Sono stati raccolti 1406 dati di laboratori partecipanti a programmi di VEQ per l'ALT, 1245 dati per l'AMY, 1409 per l'AST, 1434 per la CK, 1444 per la GGT e 1425 per la LDH. Il 37% dei laboratori risultava situato nelle regioni settentrionali, il 25% nelle regioni centrali ed il 38% nelle regioni meridionali e nelle isole.

Le Figure 1 e 2 illustrano, per ciascuno degli enzimi considerati in questa inchiesta, la frequenza di adozione dei diversi metodi di misura. Tra i metodi basati sulla standardizzazione IFCC, quello per la determinazione della CK è adottato dal 86% dei laboratori partecipanti ai programmi di VEQ coinvolti in questo studio; la frequenza di adozione da parte dei laboratori aderenti ai differenti programmi di VEQ risulta omogenea, essendo compresa tra 82% e 89% (Figura 1A). Il principio metodologico IFCC per la determinazione dell'AMY è utilizzato dal 44% dei laboratori (da 40% a 48%, nei diversi programmi di VEQ) (Figura 1B). Il principio metodologico IFCC per la determinazione della LDH è impiegato dal 15% dei laboratori (la frequenza di adozione nei differenti programmi di VEQ è compresa tra 9% e 20%) (Figura 1C). I principi metodologici IFCC per la determinazione di AST ed ALT sono usati dal 10% dei laboratori (la frequenza di adozione più elevata è pari a 24%, mentre nel caso di un programma di VEQ nessuno dei laboratori partecipanti adotta metodi basati sulla standardizzazione IFCC per la determinazione di questi enzimi) (Figura 1D). Per la GGT non era possibile fare valutazioni valevoli per l'intero campione, perché alcuni programmi di VEQ (i programmi A, D ed E), ai fini della valutazione statistica, cumulano in un unico gruppo metodologico i risultati ottenuti con tutti i metodi che impiegano substrato carbossilato, utilizzati comunque dalla maggioranza dei laboratori (83%) (Figura 2A). Per il principio metodologico IFCC, la frequenza di adozione da parte dei laboratori varia da 33% (VEQ B) a 79% (VEQ C) (Figura 2B).

DISCUSSIONE

L'armonizzazione dei risultati ottenuti con metodi dotati di uguali caratteristiche di specificità analitica permette l'adozione di intervalli di riferimento e livelli decisionali comuni, rendendo più agevole e sicura l'interpretazione dei risultati misurati per i pazienti. Ciò rappresenta un importante contributo alla pratica della medicina basata sulle prove di efficacia (11).

Per quanto riguarda la diffusione dei metodi basati sulla standardizzazione IFCC per la determinazione degli enzimi di più frequente utilizzo in ambito medico, la situazione risulta piuttosto variegata. La grande maggioranza dei laboratori clinici partecipanti ai programmi di VEQ coinvolti in questo studio utilizza metodi per la determinazione della CK basati sul principio metodologico IFCC. Anche i laboratori (7%) che impiegano sistemi analitici in chimica secca, forniti da un unico produttore, utilizzano un metodo basato sul medesimo principio. Circa la metà dei laboratori usa metodi per la misurazione dell'AMY conformi al metodo di riferimento. Questi metodi permettono di ottenere una stechiometria della reazione pari a 1, impiegando un substrato cromogenico di struttura definita (5-etilidene-4-nitrofenil-maltoeptaoside) ed un enzima ausiliario capace di catalizzare l'idrolisi di tutti i legami glicosidici presenti nei prodotti della reazione primaria catalizzata dall'AMY (l'α-glucosidasi) (12-14). I valori forniti da questi metodi possono essere più facilmente confrontati con i valori di concentrazione di attività catalitica dell'isoenzima pancreatico dell'AMY misurati con metodi che presentino analoga stechiometria della reazione. Metodi differenti per la determinazione dell'AMY potrebbero presentare differenti caratteristiche di specificità analitica, con riferimento alla composizione isoenzimatica dei campioni da pazienti (2).

Soltanto nel 15% dei laboratori coinvolti in questo studio la determinazione della LDH viene eseguita utilizzando metodi basati sul monitoraggio della reazione di ossidazione del lattato a piruvato, come nel caso del procedimento analitico di riferimento IFCC. I metodi conformi a questo procedimento sono caratterizzati da migliori caratteristiche di linearità della reazione e presentano condizioni di reazione ottimali per la valutazione dell'attività catalitica dell'isoenzima LDH-1 (più specifico per il tessuto miocardico), pur risultando idonei anche per la misurazione degli altri isoenzimi della LDH (15). Inoltre, solo una piccola minoranza (10%) dei laboratori adotta metodi basati sulla standardizzazione IFCC per la determinazione di AST e ALT. In questo caso, soltanto i metodi che, analogamente al procedimento analitico di riferimento IFCC, prevedono l'aggiunta di piridossal-5'-fosfato (P5P) esogeno alla miscela di reazione garantiscono la disponibilità di quantità di coenzima adeguate all'e-

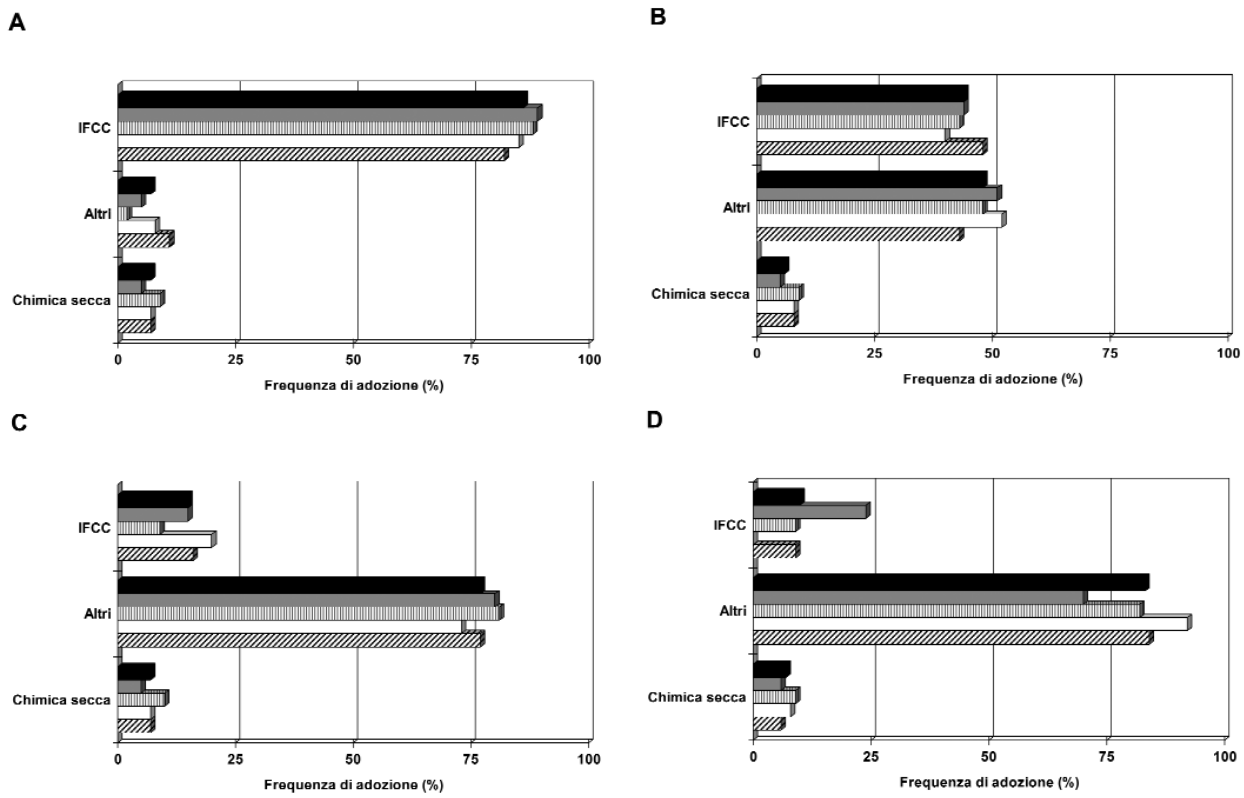


Figura 1

Frequenza dell'adozione dei differenti metodi di determinazione presso i laboratori coinvolti nell'inchiesta. A) creatina chinasi; B) α-amilasi; C) lattato deidrogenasi; D) aspartato amminotransferasi ed alanina amminotransferasi. Dati relativi a tutti i laboratori (barra di colore nero), laboratori partecipanti alla VEQ A (grigio), alla VEQ B (tratto verticale), alla VEQ C (bianco), alle VEQ D ed E (diagonale).

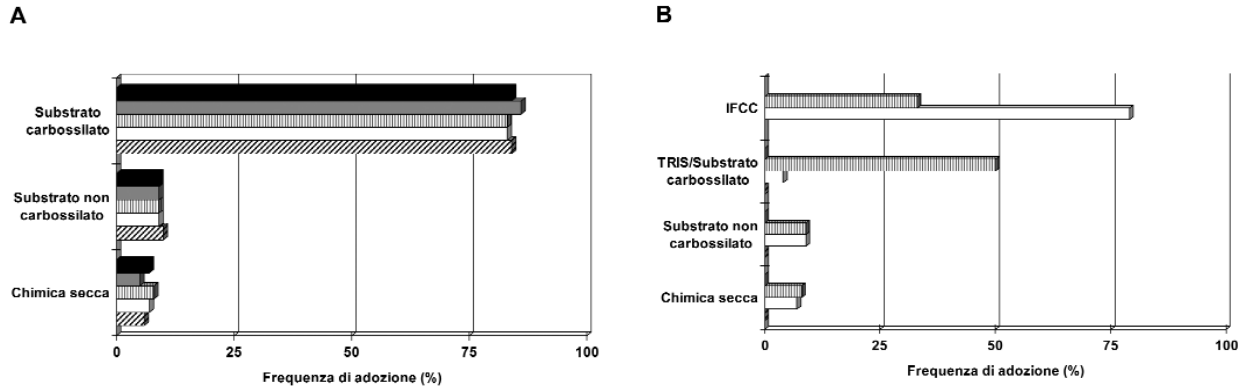


Figura 2

Frequenza dell'adozione dei differenti metodi di determinazione della γ-glutammiltransferasi. A) dati relativi a tutti i programmi di VEQ considerati in questa inchiesta: tutti i laboratori che adottano metodi con substrato carbossilato vengono classificati in un unico gruppo metodologico; B) dati relativi ai programmi di VEQ B e C: i laboratori che adottano il principio metodologico raccomandato dall'IFCC vengono classificati separatamente dai laboratori che adottano altri metodi con substrato carbossilato. Dati relativi a tutti i laboratori (barra di colore nero), laboratori partecipanti alla VEQ A (grigio), alla VEQ B (tratto verticale), alla VEQ C (bianco), alle VEQ D ed E (diagonale).

spletamento dell'attività catalitica di tutte le molecole enzimatiche, anche in caso di dismissione acuta di grandi quantità di apoenzima da parte dei tessuti sede di lesione e di carenza relativa di P5P endogeno (la forma biologicamente attiva della vitamina B6) (16-19). L'errore (sottostima) del valore di concentrazione di attività catalitica conseguente ad insufficiente disponibilità di P5P è imprevedibile e di entità variabile, poiché dipende dal rapporto tra le concentrazioni delle molecole enzimatiche e del P5P endogeno in ciascun siero da paziente; ne consegue che non è costante la relazione matematica tra i valori di concentrazione di attività catalitica di AST

ed ALT forniti dai metodi basati sul procedimento analitico di riferimento IFCC ed i valori misurabili con i metodi che non contemplano l'aggiunta di P5P in adeguata quantità (20) e, quindi, non è teoricamente possibile calibrare i metodi che non prevedono l'aggiunta di P5P assumendo come riferimento metodi che, al contrario, la prevedono, come il procedimento analitico di riferimento IFCC (2). Per quanto riguarda la frequenza di adozione dei metodi per la determinazione di AST ed ALT basati sul principio metodologico IFCC, si osserva ampia differenza tra i diversi programmi di VEQ: questi metodi risultano essere più frequentemente adottati dai laboratori che partecipano al programma di VEQ A (24%), mentre nessun laboratorio partecipante al programma di VEQ C utilizza tali metodi. È possibile che tale differenza derivi, oltre che dalla diversa frequenza di adozione, anche dal fatto alcuni laboratori siano fuorviati dalla denominazione "metodo IFCC senza piridossalfosfato" (o simile) impropriamente utilizzata da alcune aziende del settore diagnostico per designare metodi che non prevedono l'aggiunta di P5P esogeno alla miscela di reazione, pur presentando altre caratteristiche comuni con i metodi basati sulla standardizzazione IFCC (per es., tipo e concentrazione della soluzione tampone, tipo e concentrazione del substrato, temperatura di esecuzione dell'analisi, lunghezza d'onda della lettura spettrofotometrica, ecc.) (21): in realtà questi metodi non possono essere considerati "metodi IFCC simili" e i valori da essi forniti non possono essere confrontati con i valori misurati utilizzando metodi basati sulla standardizzazione IFCC, a causa della differente specificità analitica.

Per quanto riguarda i metodi per la determinazione della GGT, quelli che impiegano substrato carbossilato vengono utilizzati dalla maggior parte dei laboratori coinvolti in questo studio. Tra questi metodi, quelli basati sulla standardizzazione IFCC prevedono l'impiego del tampone glicilglicina (che nella reazione enzimatica funge anche da accettore del gruppo glutammico) anziché del tampone tris(idrossimetil)amminometano, perché quest'ultimo ha attività inibente nei confronti della GGT stessa (22).

In conclusione, i nostri risultati confermano la ben nota difficoltà intrinseca nel tentativo di diffondere un unico metodo di misurazione delle attività enzimatiche nella pratica quotidiana (2). Come più ampiamente discusso in un altro articolo pubblicato in questo fascicolo (23), l'approccio relativo alla implementazione della riferibilità metrologica tenta, almeno in parte, di supplire a questo problema. Ciò non toglie che metodi commerciali che utilizzino principi metodologici con differente specificità analitica debbano essere abbandonati nel momento in cui i risultati della VEQ ne dimostrino l'inaffidabilità in ambito clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Bais R, Panteghini M. Principles of clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2006:191-218.
2. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. Biochim Clin 2000;24:499-508.
3. Cattozzo G, Guerra E, Ceriotti F, et al. Commutable calibrator with value assigned by the IFCC reference procedure to harmonize serum lactate dehydrogenase activity results measured by two different methods. Clin Chem 2008;54:1349-55.
4. Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. Clin Biochem Rev 2007;28:155-61.
5. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. Clin Chem Lab Med 2002;40:635-42.
6. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. Clin Chem Lab Med 2002;40:643-8.
7. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:718-24.
8. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:725-33.
9. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:734-8.
10. Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α-amylase. Clin Chem Lab Med 2006;44:1146-55.
11. Muller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. Clin Chem 2000;46:1907–9.
12. Lorentz K. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 9. IFCC method for α-amylase. Clin Chem Lab Med 1998;36:185-203.
13. Ceriotti F. Amilasi: quale metodo di determinazione? Biochim Clin 1997;21:553-6.
14. Panteghini M. Laboratory evaluation of pancreatic diseases. Biochim Clin 2010;34:19-25.
15. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994;32:639-55.
16. Rosalki SB, Bayoumi RA. Activation by pyridoxal 5-phosphate of aspartate transaminase in serum of patients with heart and liver disease. Clin Chim Acta 1975;59:357-60.
17. Lustig V. Activation of alanine aminotransferase in serum by pyridoxal phosphate. Clin Chem 1977;23:175-7.
18. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1986;24:481-95.
19. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic

concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1986;24:497-510.
20. Bergmeyer HU, Schelbe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 1978;24:58-73.
21. Camerotto A, Natali GF, Carmignoto F. Aspartato e alanina transaminasi: alcune considerazioni su due esami della metà del XX secolo: la fisiopatologia, il metodo ed il razionale della richiesta. Biochim Clin 2006;30:224-32.
22. Shaw LM, Stromme JH, London JL, et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ-glutamyltransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:633-46.
23. Infusino I, Ceriotti F, Panteghini M. Standardizzazione in enzimologia clinica: una sfida per la teoria della riferibilità metrologica. Biochim Clin 2010;34:96-102.