

## Valutazione comparativa di differenti metodi per la misura della concentrazione di attività catalitica della colinesterasi del siero

Mauro Panteghini<sup>1</sup>, Roberto Bonora<sup>1</sup>, Carlo Alberto Ferrero<sup>2</sup>, Paola Luraschi<sup>3</sup>, Andrea Mosca<sup>4</sup>, Martina Zaninotto<sup>5</sup>, Carlo Franzini<sup>3</sup>  
per la Commissione Enzimi della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

<sup>2</sup>Laboratorio Centrale, Ospedale San Raffaele, Milano

<sup>3</sup>Università degli Studi di Milano, Istituto di Scienze Biomediche - Ospedale L. Sacco

<sup>4</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

<sup>5</sup>Laboratorio Centrale, Azienda Ospedaliera, Padova

### ABSTRACT

#### Comparative assessment of different methods for the measurement of the catalytic activity concentration of cholinesterase in human serum

Seven methods for the measurement of the catalytic activity of cholinesterase in serum, using different substrates, have been comparatively evaluated. 152 native sera, covering the interval of (normal and pathological) values observed in the clinical laboratory have been used for such an evaluation. With rare exceptions, the analytical imprecision was within the limits predicted on the basis of biological variability. The relative accuracy of the methods was evaluated by comparing each of them, in turn, with the butyrylthiocholine-based method, and analyzing the results by means of regression/correlation studies. In spite of different numerical values, satisfactory correlations were shown, pointing out to substantially similar ability of the methods to separate low from normal values. These results are considered an important premise to a study in progress, aiming at evaluating the ability of the different methods to recognise the carriers of genetic enzyme defects, by means of simple measurement of total (uninhibited) serum cholinesterase activity.

### RIASSUNTO

Sono stati valutati comparativamente 7 metodi per la determinazione della attività della colinesterasi del siero, basati sull'uso di substrati differenti. Per la valutazione si sono utilizzati 152 sieri nativi, coprenti l'intervallo dei valori (normali e patologici) riscontrati nel laboratorio clinico, indipendentemente dalle condizioni di salute/malattia dei pazienti. La imprecisione analitica è risultata compresa, salvo rare eccezioni, nei limiti calcolati sulla base della variabilità biologica dell'analita. L'accuratezza relativa è stata valutata per confronto con il metodo basato sul substrato butiriltiocolina. Pur in presenza di valori numerici differenti, le correlazioni sono risultate soddisfacenti, evidenziando per i differenti metodi una capacità sostanzialmente equivalente a discriminare tra valori normali e bassi. I risultati del presente lavoro sono considerati un importante presupposto per una ricerca in corso volta a verificare la capacità dei differenti metodi ad evidenziare mediante determinazione della attività enzimatica totale (non-inibita) la presenza di difetti enzimatici genetici.

### INTRODUZIONE

Nell'ambito delle attività della Commissione Enzimi della SIBioC si è deciso di riconsiderare criticamente l'interesse medico della determinazione della attività della colinesterasi (acilcolina acilidrolasi, EC 3.1.1.8) del siero. Per la definizione del tipo di enzima considerato, e per la sua corretta denominazione, si rimanda alla rassegna sull'argomento, predisposta anch'essa nell'ambito della attività su menzionata (1).

In vista della possibilità che la rilevanza clinica della informazione fornita dalla misura di questa attività enzimatica del siero potesse essere anche solo parzialmente dipendente dal metodo impiegato, anche considerando il fatto che i diversi metodi utilizzano substrati spesso tra loro differenti e presumibilmente differenti dal bersaglio fisiologico dell'enzima, la Commissione ha ritenuto utile compie-

re una verifica sperimentale comparativa di metodi differenti, su un numero discretamente ampio di sieri umani nativi. In questo lavoro sono riportati i risultati di tale comparazione.

### MATERIALI E METODI

Si sono utilizzati 152 sieri freschi, ottenuti da soggetti consenzienti, indipendentemente dalla situazione di salute/malattia, ma selezionati in modo da coprire l'intervallo dei valori abitualmente misurati ("normali", alti e bassi) nel laboratorio clinico. Dopo il prelievo, i sieri venivano immediatamente aliquotati e congelati a -20°C, e quindi distribuiti in forma congelata ai 4 laboratori partecipanti per la misura della attività catalitica con 7 differenti metodi (2-8). Ciascun laboratorio eseguiva le misure in duplicato su tutti

i sieri (con la eccezione di una parte delle analisi con metodo manuale, comprensibilmente indaginoso) utilizzando il metodo disponibile in routine oppure un metodo appositamente predisposto, e preventivamente verificato, anche in termini di familiarizzazione. Per tutti i metodi, escluso uno, si utilizzavano reattivi "pronti" forniti dall'industria, adattati ad analizzatori automatici: le caratteristiche principali dei metodi utilizzati sono riassunte nella tabella 1. I reattivi per il metodo G erano preparati in laboratorio, secondo indicazioni della letteratura (8). I valori di riferimento, riportati nella tabella 1, relativi al metodo A sono quelli forniti dalla Ditta produttrice dei reattivi (temperatura di 37°C), mentre i valori di riferimento per gli altri metodi erano calcolati sulla base dei valori del metodo A, applicando l'equazione della relativa retta di regressione lineare (vedi sotto). In linea di massima, i valori così calcolati corrispondevano accettabilmente bene a quelli riportati per il corrispondente metodo, quando disponibili.

La imprecisione analitica entro-la-serie dei differenti

metodi (espressa come deviazione standard e come coefficiente di variazione) era calcolata dalle coppie di valori forniti dall'analisi in duplicato, quando disponibili, a tre livelli di concentrazione comprendenti rispettivamente i valori inferiori, all'interno e superiori al corrispondente intervallo di riferimento. Per il confronto tra coppie di metodi venivano allestiti diagrammi di dispersione  $y/x$ , ponendo sull'asse delle  $y$ , di volta in volta, i valori dei metodi da B a G, e sull'asse delle  $x$  i valori del metodo A, per tutti i confronti. Analogamente venivano calcolate le equazioni delle rette di regressione (lineare), secondo il modello standard, nonché i coefficienti di correlazione ( $R^2$ ) per i 6 confronti di coppie di risultati. Utilizzando le rispettive equazioni di regressione lineare, per ogni valore di  $x$  veniva calcolato un valore di  $y'$ , e quindi il relativo residuo ( $y-y'$ ) rappresentativo della distanza del singolo punto sperimentale dalla retta di regressione, misurata sull'asse delle  $y$  ed espresso nella unità del corrispondente metodo. Veniva quindi calcolata la deviazione standard dei residui

**Tabella 1**

Principali caratteristiche dei metodi impiegati e della relativa strumentazione

Metodo	Substrato	Reazione Accoppiata	Fonte dei Reattivi	Analizzatore	Laboratorio	Intervallo di riferimento*	T (°C)
A	Butiriltiocolina	Ditiobis-nitrobenzoato	Roche	Hitachi 917	Milano/Sacco	5,3+12,9 kU/L	37
B	Butiriltiocolina	Esacianoferrato III	Olympus	Hitachi 917	Milano/Sacco	5,4+13,1 kU/L	37
C	Propioniltiocolina	Ditiobis-nitrobenzoato	Sigma	Hitachi 717	Milano S. Raffaele	3,5+9,5 kU/L	37
D	Succinilditiocolina	Ditiobis-nitrobenzoato	Sclavo	Mega	Brescia	24+77 U/L	37
E	Benzoilcolina	ColinaOX/POD	Verbena	Mega	Brescia	1,98+4,82 kU/L	37
F	POHbenzoilcolina	OH-benzoato idrossilasi	Menarini	Cobas Fara II	Padova	150+401 U/L	37
G	Benzoilcolina	Nessuna	Laboratorio	Manuale (spettrofot. Perkin Elmer)	Brescia	367+804 U/L	25

\*vedi testo

**Tabella 2**

Imprecisione analitica entro-la-serie dei sette metodi valutati, a tre diversi livelli di concentrazione di attività catalitica

Statistica	Metodo A	Metodo B	Metodo C	Metodo D	Metodo E	Metodo F	Metodo G
Media	3,93 kU/L	4,03 kU/L	2,45 kU/L	14,1 U/L	1,48 kU/L	106 U/L	306 U/L
DS	0,07 kU/L	0,04 kU/L	0,022 kU/L	0,33 U/L	0,44 kU/L	4,65 U/L	7,66 U/L
CV	1,73%	1,07%	0,91%	2,34%	2,98%	4,39%	2,50%
N	45	42	48	53	41	45	40
Media	7,46 kU/L	7,48 kU/L	5,30 kU/L	42,2 U/L	2,69 kU/L	219 U/L	*
DS	0,18 kU/L	0,13 kU/L	0,046 kU/L	0,41 U/L	0,09 kU/L	3,44 U/L	*
CV	2,41%	1,74%	0,62%	0,97%	1,99%	1,57%	*
N	85	88	82	77	87	84	*
Media	14,4 kU/L	14,8 kU/L	10,7 kU/L	86,9 U/L	5,56 kU/L	459 U/L	*
DS	0,47 kU/L	0,27 kU/L	0,076 kU/L	0,21 U/L	0,06 kU/L	4,48 U/L	*
CV	3,26%	1,82%	0,81%	0,24%	1,01%	0,98%	*
N	21	22	22	22	22	22	*

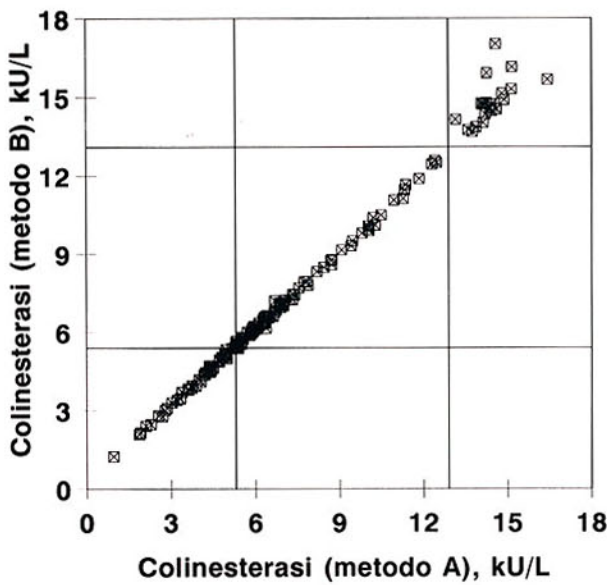
\*dati non disponibili

come misura della dispersione dei punti sperimentali attorno alla retta di regressione. Tutti i calcoli erano effettuati con le opzioni del programma Microsoft Excel.

**RISULTATI**

I valori di imprecisione analitica entro-la-serie sono riassunti nella tabella 2.

I diagrammi di dispersione dei valori ottenuti con le 6 coppie di metodi sono riportati nelle figure I-VI, nelle quali sono anche riportate le linee che delimitano i rispettivi intervalli di riferimento. I parametri della correlazione/regressione per coppie di metodi sono riassunti nella tabella

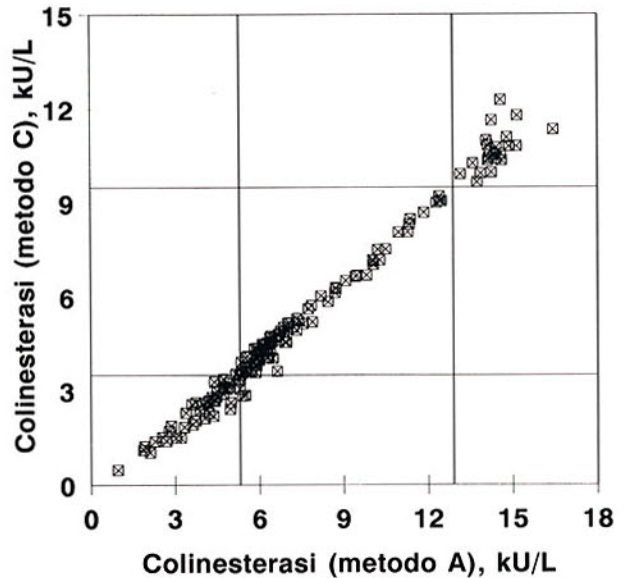


**Figura I**  
 Diagramma di dispersione dei risultati ottenuti con il metodo B (asse delle y) e con il metodo A (asse delle x). Le linee orizzontali e verticali corrispondono ai limiti inferiore e superiore del corrispondente intervallo di riferimento (vedi testo)

3: i valori di deviazione standard dei residui sono riportati in tale tabella sia come valori assoluti sia come valori percentuali rispetto al valore y medio, per una rappresentazione meglio comparabile della dispersione attorno alla retta di regressione.

**DISCUSSIONE**

Dando per scontata la linearità tra concentrazione di enzima e attività misurata e la linearità della cinetica nella finestra di analisi utilizzata, peraltro qui verificate in fase preliminare durante l'applicazione strumentale dei metodi utilizzati, la valutazione delle caratteristiche analitiche di metodi per la misura di attività enzimatiche comprende essenzialmente la valutazione della imprecisione e la

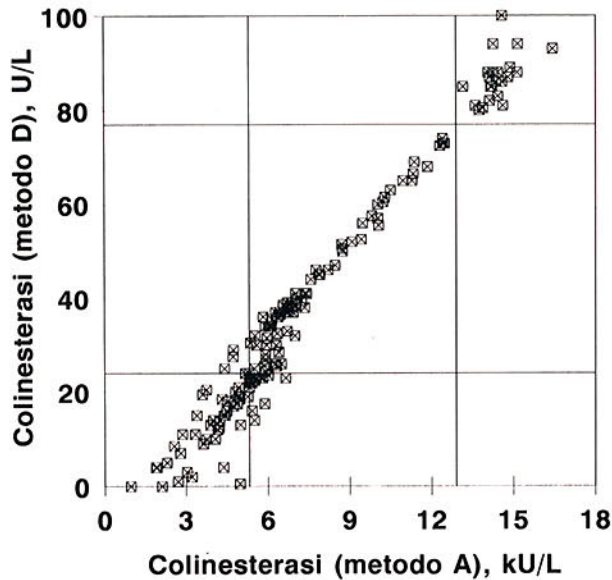


**Figura II**  
 Come figura I, relativa al confronto metodo C/metodo A

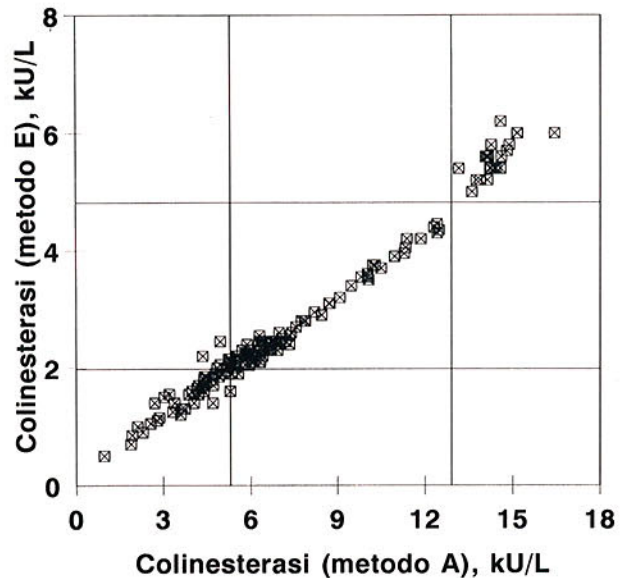
**Tabella 3**

Parametri statistici del confronto tra metodi. I risultati con i metodi da B a G sono stati confrontati, a turno, con quelli del metodo A come base comune di raffronto

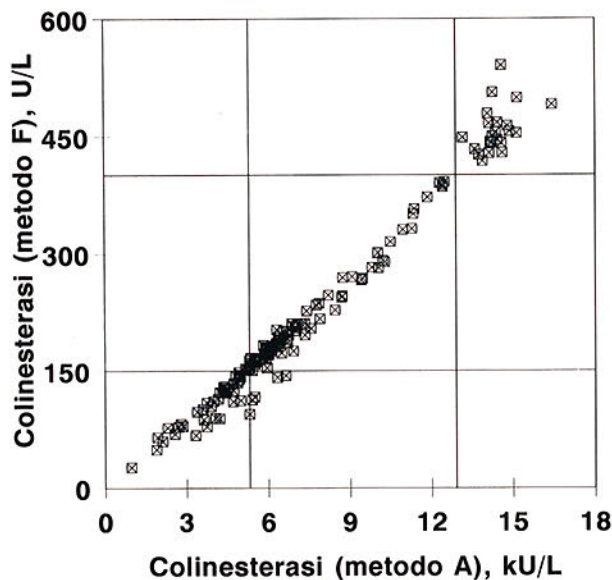
Statistica	Metodo confrontato con il metodo A					
	Metodo B	Metodo C	Metodo D	Metodo E	Metodo F	Metodo G
N	152	152	152	152	152	152
y media	7,59 kU/L	5,18 kU/L	39,8 U/L	2,77 kU/L	220 U/L	491 U/L
Regressione lineare:						
Intercetta	0,10 kU/L	-0,64 kU/L	-12,9 U/L	0,00	-25,8 U/L	63,0 U/L
Pendenza	1,010	0,785	6,98	0,373	33,1	57,4
DS dei residui						
Assoluta	0,29 kU/L	0,32 kU/L	4,72 U/L	0,20 kU/L	17,3 U/L	37,2 U/L
Relativa	3,82%	6,18%	11,9%	7,22%	7,86%	7,58%
R <sup>2</sup>	0,9940	0,9877	0,9672	0,9802	0,9799	0,9696



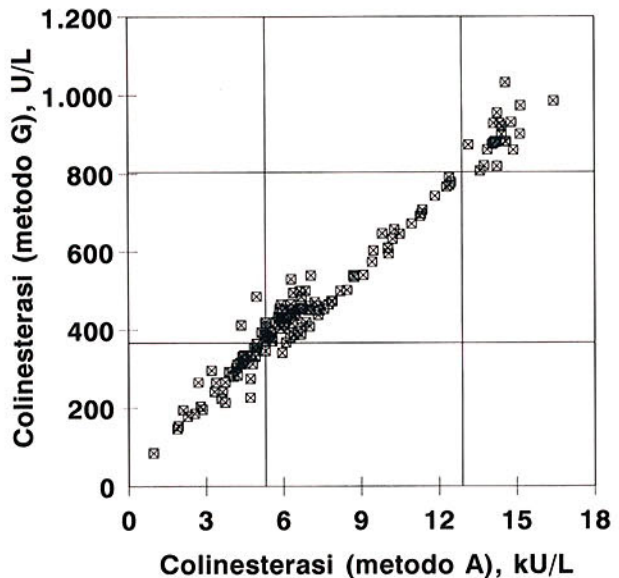
**Figura III**  
Come figura I, relativa al confronto metodo D/metodo A



**Figura IV**  
Come figura I, relativa al confronto metodo E/metodo A



**Figura V**  
Come figura I, relativa al confronto metodo F/metodo A



**Figura VI**  
Come figura I, relativa al confronto metodo G/metodo A

valutazione comparativa verso un metodo di confronto per una stima della accuratezza relativa.

I valori di imprecisione risultano, con rare eccezioni, significativamente più bassi delle specificazioni di qualità desiderabile per la imprecisione (CV compreso da 2,7% e 3,5%) riportate nella più recente rassegna sulla variabilità biologica (9), e permettono quindi di concludere, con qualche eccezione (metodo F, concentrazioni basse), per una accettabile precisione (entro-la-serie) di tutti i metodi studiati. Va sottolineato che i valori di imprecisione rilevati sono il risultato dell'interazione metodo/reagente/stru-

mento, e quindi potrebbero anche variare se lo stesso principio analitico venisse applicato a differenti strumenti con reagenti di altra origine. In linea di principio è possibile comunque confermare che la attività della colinesterasi del siero può essere misurata, in condizioni ordinarie, con precisione sufficiente ai fini clinici.

La valutazione comparativa di numerosi metodi che forniscono valori numericamente differenti pur misurando (in teoria) la medesima grandezza (concentrazione di attività catalitica della colinesterasi del siero) presenta qualche elemento di complessità. Per una valutazione

caratterizzata da maggiore intuitività, si è scelto di effettuare la valutazione per coppie, confrontando a turno i singoli metodi con uno di essi, scelto come confronto per tutti. La scelta è caduta sul metodo A perché quello maggiormente diffuso nei laboratori diagnostici. Anche l'approccio su menzionato per la definizione degli intervalli di riferimento, esclusivamente ai fini della presente valutazione, è stato orientato ad ottenere una valutazione più intuitiva, evitando che incorrette definizioni degli intervalli di riferimento, indipendenti dalle caratteristiche analitiche del metodo, influissero sulle valutazioni di comparabilità.

I diagrammi di dispersione mostrano già visivamente l'esistenza di un accordo spesso soddisfacente, pur nella diversità dei valori numerici. In particolare, la massima parte dei punti sperimentali ricade nelle aree della concordanza di classificazione: a conferma di questa osservazione, il numero di valori compresi nell'intervallo di riferimento è risultato abbastanza costante per i differenti metodi (da 82 a 88) con la maggiore eccezione del metodo D, nel quale sono risultati 77, e per il quale i valori inferiori al medesimo intervallo sono risultati 53, contro i 40-48 degli altri metodi. Peraltro, i singoli punti che ricadono nelle aree di differente classificazione (a livello della classificazione normale/basso, clinicamente più importante) non si discostano molto dal corrispondente limite inferiore dell'intervallo di riferimento. Inoltre, essendo il metodo D quello utilizzando il substrato più simile al farmaco succinilcolina, nei confronti del quale si esplicita l'eventuale alterazione qualitativa dell'enzima, il diverso comportamento sulle basse concentrazioni di questo metodo è in parte spiegabile con la possibile diversa origine (genetica o da fattori esogeni) della diminuzione delle concentrazioni di colinesterasi nei sieri selezionati, che questo metodo sembra meglio evidenziare (10).

Le medie dei residui (non riportate in tabella) sono risultate costantemente  $\leq 0,01$  nei 6 confronti, a riprova della bontà dell'adattamento della regressione ai punti sperimentali. Come già menzionato, la deviazione standard dei residui fornisce una indicazione della dispersione dei punti attorno alla retta. Espressa come percentuale del valore medio di  $y$ , tale statistica assume il valore più basso (3,82%) nel confronto tra i metodi A e B, corrispondente ad un intervallo di confidenza (95%) pari a 7,6% nella trasformazione dei valori ottenuti con il metodo B nei rispettivi valori ottenibili con il metodo A. Ciò trova giustificazione nel fatto che il metodo B differisce dal metodo A "solamente" per una variazione della concentrazione del substrato (che è il medesimo per tutti e due) e per la scelta di una differente reazione accoppiata (2,3). Nel caso degli altri confronti i valori della deviazione standard dei residui, come percentuale del valore medio di  $y$ , oscillano tra 6,18% e 11,9%, con corrispondenti intervalli di confidenza compresi tra 12,2% e 23,8%. Poiché l'imprecisione con cui vengono misurati i valori di  $y$  non sembra giustificare tale variabilità attorno alla regressione, sembrerebbe lecito concludere che in presenza di differenti substrati e/o condizioni analitiche, la colinesterasi presente nei differenti sieri presenta una reattività alquanto differente. L'utilizzo del parametro  $R^2$  per descrivere la dispersione dei punti

sperimentali attorno alla retta di regressione è stato fortemente criticato (11). Va comunque rilevato che, in accordo con il discreto adattamento dei punti alla retta evidenziato graficamente (figure 1-6), i valori di  $R^2$  sono sempre risultati elevati (tabella 3). Si è evidenziata inoltre una discreta correlazione negativa tra valori di  $R^2$  e valori di deviazione standard relativa.

Nel complesso, sembra lecito concludere che nella misura della attività della colinesterasi del siero si possono ottenere risultati clinicamente validi, ossia in grado di differenziare i valori superiori e, soprattutto, inferiori all'intervallo di riferimento, utilizzando metodi tra loro differenti. Ciò almeno riguardo ai difetti quantitativi dell'enzima (1). Rimane tuttavia completamente aperto il problema della capacità di tali metodi di discriminare, con la determinazione della sola attività totale dell'enzima (quindi senza l'impiego di particolari inibitori, come la dibucaina o il fluoruro), i soggetti eterozigoti ed omozigoti per il difetto enzimatico qualitativo (12). Ciò peraltro rappresenta il principale obiettivo dello studio attualmente in corso a cura della Commissione Enzimi, del quale questi dati rappresentano uno dei presupposti (13).

## RINGRAZIAMENTI

La Commissione Enzimi ringrazia il Dottor Franco Azzario (Servizio di Immunoematologia Trasfusionale, AVIS, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano) per aver caratterizzato e fornito parte dei campioni utilizzati nel presente lavoro. Si ringraziano inoltre le ditte Menarini, Olympus, Roche Diagnostics, Sclavo e Sigma per il gentile omaggio dei reattivi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Franzini C. Colinesterasi del siero: laboratorio e clinica. *Biochim Clin* 1997;21:242-51.
2. Whittaker M, Britten JJ, Dawson PJG. Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants. *Clin Chem* 1983;29:1746-51.
3. DGKC Working Group on Enzymes. Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. II. Cholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1992;30:163-70.
4. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid) procedure. *Clin Chem* 1973;19:1309-13.
5. Hersh LB, Raj PP, Ohlweiler D. Kinetics of succinylthiocholine hydrolysis by serum cholinesterase: comparison to dibucaine and succinylcholine numbers. *J Pharmacol Exp Therap* 1974;189:544-9.
6. Okabe H, Sagesaka K, Nakajima N, Noma A. New enzymatic assay of cholinesterase activity. *Clin Chim Acta* 1977;80:87-94.
7. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Evaluation of a new method for cholinesterase determination. *Clin Biochem* 1986;19:161-6.
8. Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of

- dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* 1957;35:339-46.
9. Ricòs C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, Minchinela J, Perich C, Simón M. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
  10. Panteghini M. Methods for serum cholinesterase assay and classification of genetic variants. *Clin Chim Acta* 1989;183:87-90.
  11. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
  12. Mosca A, Lando G, Patrosso C, Bonora R, Ceriotti F, Franzini C, Zaninotto M, Panteghini M. Genetic defects of serum cholinesterase: comparison between activity and genotype. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(suppl):S473.
  13. Mosca A. Genetic defects of serum cholinesterase: a protocol for method evaluation. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:A59.