

## L'impiego della succinilditiocolina come substrato rappresenta il metodo d'elezione per la misura dell'attività catalitica della colinesterasi nel siero nella diagnosi della sensibilità alla succinildicolina\*

Andrea Mosca<sup>1</sup>, Roberto Bonora<sup>2</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>3</sup>, Carlo Franzini<sup>4</sup>, Giuliana Lando<sup>5</sup>, Renata Paleari<sup>1</sup>, Maria Cristina Patrosso<sup>5</sup>, Martina Zaninotto<sup>6</sup>, Mauro Panteghini<sup>2\*\*</sup> per il Gruppo di Studio 'Enzimi' della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Segrate, Milano

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia

<sup>3</sup>Laboratorio Standardizzazione, Istituto Scientifico H. San Raffaele, Milano

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche Luigi Sacco, Università degli Studi, Milano

<sup>5</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche Patologia Clinica, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

<sup>6</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università - Ospedale, Padova

\*Questo articolo è basato su uno studio in precedenza riportato in *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* (Clin Chem Lab Med 2003;41:317-22), anche se in forma e contenuti parzialmente diversi.

Il presente lavoro è stato in parte presentato durante il 32° Congresso Nazionale SIBioC, 12-15 settembre 2000, Rimini (Biochim Clin 2000;24:303), e il 34° Congresso Nazionale SIBioC, 17-20 settembre 2002, Rimini (Biochim Clin 2002;26:297).

\*\* Coordinatore del Gruppo di Studio, a cui inviare la corrispondenza (e-mail: panteghi@bshosp.osp.unibs.it)

### ABSTRACT

#### Assay using succinylthiocholine as substrate: the method of choice for the measurement of cholinesterase catalytic activity in serum to diagnose succinylthiocholine sensitivity

No comparative information is available concerning the ability of various cholinesterase (ChE) methods to identify succinylthiocholine-sensitive patients, purely based on the enzyme activity recorded in serum. Here, we evaluated six different methods for the measurement of ChE activity; 131 subjects were subdivided according to ChE phenotype and, therefore, to succinylthiocholine sensitivity. ChE phenotype was determined by measuring dibucaine and fluoride numbers. DNA analysis was performed to confirm correlation between the phenotype classification used in the study and the ChE genotype. The tested methods were significantly different in their ability to discriminate between the subjects with and without succinylthiocholine-sensitive phenotypes. The succinylthiocholine/5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoate) (DTNB) method showed the highest accuracy [area under the receiver operating characteristic (ROC) curve 0.97] followed by the propionylthiocholine/DTNB method (area under the ROC curve 0.94). On the other hand, the two methods using butyrylthiocholine as substrate and that employing benzoylcholine showed limited clinical utility in discriminating subjects at risk of prolonged apnea (area under the ROC curve  $\leq 0.9$ ). Using the succinylthiocholine method, a value  $\leq 23$  U/L was approximately five times as likely to occur in a sensitive individual as in a normal one.

### RIASSUNTO

Non essendo disponibili informazioni comparative riguardo alla capacità dei diversi metodi di misura della colinesterasi (ChE) di identificare i pazienti sensibili alla succinildicolina, unicamente sulla base dell'attività enzimatica misurata nel siero, abbiamo valutato a tal fine sei metodi disponibili commercialmente. 131 soggetti sono stati classificati in base alla sensibilità alla succinildicolina secondo il fenotipo/genotipo della ChE, definito mediante la misura dei numeri di dibucaina e fluoruro e confermato dall'analisi del DNA. Il metodo che utilizza la succinilditiocolina e il 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (DTNB) era il più accurato nell'evidenziare soggetti sensibili (area sottesa alla curva ROC, 0,97), seguito dal metodo basato sull'uso della propioniltiocolina e DTNB (area sotto la curva ROC, 0,94). I metodi che utilizzano come substrato la butiriltiocolina e la benzoilcolina si sono rivelati di minore utilità clinica nel discriminare i soggetti a rischio di sviluppare apnea prolungata (area sotto la curva ROC  $\leq 0,9$ ). Utilizzando il metodo succinilditiocolina/DTNB, esiste una probabilità 5 volte superiore che un valore  $\leq 23$  U/L venga riscontrato in un soggetto sensibile alla succinildicolina che in uno normale.

## INTRODUZIONE

Numerose varianti genetiche della colinesterasi umana del siero (EC 3.1.1.8; ChE) sono state descritte in letteratura (1). Alcune di esse, ad esempio la variante atipica (A) e la fluoruro-resistente (F), sono ben note in quanto i loro portatori possono frequentemente manifestare apnea prolungata dopo somministrazione di succinildicolina, un farmaco miorelaxante abitualmente impiegato in anestesia (2). In questi casi, la caratterizzazione del genotipo è molto importante al fine di prevenire questi episodi e le tecniche di fenotipizzazione basate sull'inibizione dell'attività enzimatica con dibucaina e fluoruro di sodio sono utili per distinguere queste varianti dall'enzima normale (U) (3,4).

Il riconoscimento delle varianti della ChE può, tuttavia, essere difficile per i seguenti motivi: *a*) il numero delle varianti note è in costante rapido aumento (ne sono state finora identificate circa 40) (5), *b*) per misurare l'attività catalitica della ChE sono disponibili numerosi metodi commerciali basati su almeno sei diversi principi analitici (6), *c*) non sono disponibili raccomandazioni internazionali per la misura dell'attività della ChE, *d*) non sono reperibili informazioni definitive riguardo alla capacità dei diversi metodi commerciali di identificare i pazienti sensibili alla succinildicolina, unicamente sulla base dell'attività enzimatica misurata nel siero, *e*) la relazione tra il tipo di mutazione e l'attività della ChE non è stata finora studiata approfonditamente.

Come primo passo verso la standardizzazione della misura della ChE, il Gruppo di Studio 'Enzimi' della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) ha portato a termine il presente studio per valutare se la misura della sola attività ChE, vale a dire senza la determinazione della sensibilità agli inibitori, possa fornire un'accettabile accuratezza diagnostica per predire la sensibilità alla succinildicolina. A questo scopo, sono stati confrontati sei diversi metodi per la misura dell'attività catalitica della ChE utilizzando campioni di siero raccolti da donatori di sangue e da soggetti portatori di genotipo sensibile alla succinildicolina.

## MATERIALI E METODI

### Soggetti

2609 donatori di sangue erano inizialmente analizzati presso il Centro di Immunoematologia dell'Ospedale Niguarda Cà Granda di Milano. L'attività della ChE era misurata utilizzando il metodo butirrilticolina/5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (DTNB) su analizzatore Synchron CX (Beckman Coulter, Brea, USA). Tutti i soggetti ( $n=58$ , pari al 2,2 %) che presentavano un'attività di ChE inferiore al limite inferiore di riferimento in precedenza stabilito (7,0 kU/L) erano identificati ed arruolati nello studio insieme ad un più piccolo gruppo di soggetti di controllo ( $n=32$ ), selezionati a caso tra quelli che avevano l'attività della ChE entro l'intervallo di riferimento. Ad ognuno di questi soggetti, dopo l'ottenimento del consenso informato, era effet-

tuato un prelievo di sangue in EDTA dal quale era isolato il *buffy coat* per l'analisi del DNA. Da altro sangue raccolto senza anticoagulante era separato il siero che era suddiviso in aliquote e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi nei laboratori partecipanti allo studio. È stato dimostrato che in queste condizioni di conservazione l'attività della ChE rimane costante per diversi anni (7).

Al fine di aumentare la prevalenza delle varianti della ChE nella popolazione studiata, erano anche impiegati campioni di siero ottenuti da 41 soggetti portatori di varianti della ChE. Tali campioni erano conservati come sopra descritto. Su questi soggetti non era effettuata l'analisi del DNA.

I 131 soggetti selezionati erano suddivisi in base al fenotipo della ChE e, di conseguenza, sulla base della sensibilità alla succinildicolina. In accordo con classificazioni in precedenza pubblicate (8,9), i fenotipi AA, FF e AF erano considerati sensibili alla succinildicolina, mentre i fenotipi UU, UA e UF come non sensibili.

## MISURA DELL'ATTIVITÀ CATALITICA DELLA ChE

I sei metodi per la misura della ChE, oggetto della presente valutazione, erano implementati in quattro diversi laboratori ed i medesimi campioni di siero erano analizzati in tutti i centri. In particolare, erano seguite le istruzioni delle ditte produttrici sull'impiego dei metodi e per la loro implementazione sugli analizzatori automatici, riguardo ai volumi di campione e reagente, lunghezza d'onda, tempi d'incubazione, tempo di latenza, intervallo di misura dell'attività catalitica e numero di letture. L'attività della ChE era misurata a  $37^{\circ}\text{C}$  in duplicato ed il valore medio espresso in U/L (metodi D e F) o in kU/L (metodo A, B, C ed E). Di seguito, sono riportate le caratteristiche dei metodi.

*Metodo A: butirrilticolina/DTNB (10)*. Eseguito nel laboratorio #1, impiegando l'analizzatore Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) con reagenti Roche (cat. No. 1972090). L'imprecisione media del metodo, espressa come CV, era  $<3,3\%$  (6).

*Metodo B: butirrilticolina/esacianoferrato(III) (11)*. Eseguito nello stesso laboratorio, utilizzando reagenti Olympus (Segrate MI, cat. No. OSR 6114) su analizzatore Hitachi 917. Il CV era  $<1,8\%$  (6).

*Metodo C: propionilticolina/DTNB (12)*. Eseguito nel laboratorio #2 su analizzatore Roche Hitachi 717, utilizzando reagenti Sigma Diagnostics (St. Louis, USA, cat. No. 422-10). Il CV era  $<0,9\%$  (6).

*Metodo D: succinilditiocolina/DTNB (13)*. Eseguito nel laboratorio #3 utilizzando reagenti Sclavo Diagnostici (Siena, cat. No. 81238) su analizzatore Mega (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Il CV era  $<2,3\%$  (6).

*Metodo E: benzoilcolina/colina ossidasi-perossidasi (14)*. Eseguito nello stesso laboratorio del metodo precedente, sullo stesso strumento, utilizzando reagenti Amplimedical (Assago MI, cat. No. CC1111). Il CV del metodo era  $<3,0\%$  (6).

*Metodo F: p-idrossibenzoilcolina/NADP-idrossilasi (15)*. Eseguito nel laboratorio #4, utilizzando l'analizzato-

re Cobas Fara-II (Roche Diagnostics) con reagenti della Menarini Diagnostici (Firenze, cat. No. B 8250). Il CV era <4,4 % (6).

### Inibizione da dibucaina e fluoruro

La caratterizzazione biochimica del fenotipo della ChE era effettuata con la determinazione del numero di dibucaina (percentuale d'inibizione dell'enzima da parte della dibucaina, DN) e del numero di fluoruro (percentuale d'inibizione dell'enzima causata dal fluoruro di sodio, FN) mediante i metodi di Kalow e Genesi (DN) e Harris e Whittaker (FN) (3,4). Le misure erano effettuate manualmente con spettrofotometro Lambda 2 (Perkin-Elmer, Uberlingen, Germania). Il metodo mostrava tipicamente un CV <2,5 %. Nella Tabella 1 è riportata la classificazione fenotipica basata su DN e FN utilizzata per caratterizzare i soggetti (16,17).

**Tabella 1**

*Classificazione fenotipica della colinesterasi basata sulla determinazione dei numeri di dibucaina (DN) e di fluoruro (FN)*

Fenotipo	DN intervallo	FN intervallo
UU	≥77	≥ 55
UF	72-76	≥53
UA	48-72	≥44
AF	45-59	<44
FF	64-69	<44
AA	<35	— <sup>a</sup>

<sup>a</sup>superfluo per l'attribuzione del fenotipo AA.

### Studi sul DNA

Al fine di confermare la correttezza della classificazione fenotipica utilizzata nello studio in rapporto al genotipo della ChE, su tutti i campioni provenienti dai donatori di sangue (n=90) era effettuata l'analisi del DNA, secondo quanto descritto in un precedente lavoro (18).

### Analisi statistica

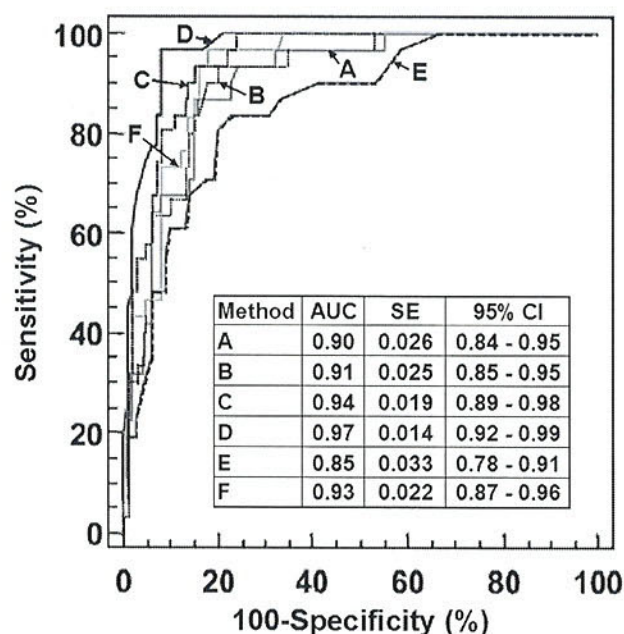
Le relazioni tra le attività della ChE ottenute con i diversi metodi e la sensibilità alla succinildicolina erano analizzate con l'impiego delle curve ROC. I soggetti studiati erano suddivisi in due gruppi, quelli con fenotipi AA, FF ed AF, corrispondenti ai soggetti sensibili alla succinildicolina, e quelli con fenotipo UU, UA ed UF, corrispondenti ai soggetti non sensibili. La capacità di classificare in modo corretto i soggetti nei due gruppi mediante la misura dell'attività della ChE era valutata calcolando l'area sottesa alla curva ROC. Secondo lo schema proposto da Sweets per l'interpretazione dell'area sottesa alla curva ROC (19), i valori compresi tra 0,5 e 0,7 sono considerati indicativi di bassa accuratezza diagnostica, i valori tra 0,7 e 0,9 di limitata accuratezza diagnostica ed i valori mag-

giori di 0,9 di accuratezza diagnostica elevata. Erano anche calcolati la specificità e il rapporto di probabilità ('likelihood ratio') per un test positivo ad un valore di ChE con sensibilità pari al 100 %.

### RISULTATI

Sulla base dei valori di DN e FN, erano individuati 31 soggetti sensibili alla succinildicolina. Questo gruppo comprendeva 6 soggetti con fenotipo AA, 20 soggetti con fenotipo AF e 5 con fenotipo FF. Nel gruppo di controllo erano inclusi i rimanenti 100 soggetti, che presentavano fenotipo UU (n=62), UA (n=35) e UF (n=3). La Figura 1 mostra le curve ROC per i sei metodi valutati ed i corrispondenti valori delle aree sottese alle curve. I metodi differivano significativamente in rapporto alla capacità di discriminare tra i due gruppi di soggetti. Il metodo D (succinilditiocolina/DTNB) mostrava la miglior accuratezza ( $p \leq 0,004$  vs tutti gli altri metodi) nell'identificare i soggetti sensibili alla succinildicolina, seguito dal metodo C (propioniltiocolina/DTNB) ( $p \leq 0,05$  vs metodi A, B, E e F). Al contrario, i due metodi che utilizzano come substrato la butiriltiocolina (A e B) e quello che utilizza la benzoilcolina (E) si dimostravano di limitata utilità nell'individuare i soggetti a rischio di sviluppare apnea prolungata (area sotto la curva ROC  $\leq 0,9$ ).

Dal momento che la sensibilità dei metodi per la



**Figura 1**  
Curve ROC riguardanti i metodi per la misura dell'attività catalitica della ChE, valutati come test diagnostico della sensibilità alla succinildicolina. AUC, area sottesa alla curva ROC; SE, errore standard; CI, intervalli di confidenza.

misura della ChE nell'evidenziare il rischio d'apnea in seguito alla somministrazione del farmaco miorelaxante rappresenta il requisito più importante al fine del loro utilizzo clinico da parte degli anestesisti, che sono principalmente interessati a non perdere i soggetti effettivamente sensibili alla succinildicolina, erano calcolati, per ogni metodo, al valore di ChE corrispondente al 100 % di sensibilità, la corrispondente specificità e il rapporto di probabilità di un test positivo (Tabella 2). Con l'impiego del metodo D, un valore di ChE  $\leq 23$  U/L aveva una probabilità circa 5 volte superiore di essere presente in un soggetto sensibile alla succinildicolina che in uno normale.

A supporto della caratterizzazione del fenotipo, basata su DN e FN, era anche eseguita l'analisi delle mutazioni puntiformi della ChE su un sottogruppo di 90 soggetti. Nella Tabella 3 sono riportati i risultati di questo studio, limitatamente ai soggetti portatori di un genotipo anormale (n=28). Come si vede, un ottimo accordo era riscontrato tra il genotipo e il fenotipo biochimico, se si eccettua un unico campione (soggetto No. 41), omozigote F di tipo 2, che era stato classificato in maniera errata come UA, a causa del valore relativamente alto di FN (= 49). La percentuale stimata di misclassificazione dei soggetti utilizzando il fenotipo biochimico era quindi del 1,1%, dimostrando l'ampia accettabilità dello standard diagnostico utilizzato.

## DISCUSSIONE

Per la misura della ChE non è stato ancora proposto un metodo di riferimento e neppure è disponibile una procedura di consenso raccomandata a livello internazionale. Trenta anni fa il metodo che utilizza la propioniltiocolina come substrato fu adottato come 'selected method' dalla American Association for Clinical Chemistry (AACC) (12), mentre più recentemente è stata sviluppata in Germania una procedura di riferimento che impiegava come substrato la butiriltiocolina (11). In Italia, il metodo che utilizza la butiriltiocolina come substrato e il DTNB come cromogeno è il più frequentemente impiegato, più per la sua maggiore disponibilità commerciale e facilità d'automazione che per la sua validità clinica. Uno studio comparativo del valore clinico dei vari metodi di misura della ChE

non è mai stato comunque effettuato in maniera completa e solo dati parziali sono reperibili in letteratura (9,12,20).

Nel presente studio, come primo passo verso la definizione di un metodo di riferimento accettato a livello internazionale, sono stati confrontati tutti i metodi commercialmente disponibili per la misura dell'attività della ChE allo scopo di valutare la loro capacità di predire la sensibilità alla succinildicolina di soggetti portatori di varianti enzimatiche, senza far uso di inibitori. Per questa valutazione non è stato possibile utilizzare campioni di siero direttamente ottenuti da pazienti che avevano già sviluppato apnea prolungata in seguito al trattamento con succinildicolina a scopo chirurgico, ma, al fine di raccogliere un numero sufficientemente ampio di soggetti ed in accordo con studi in precedenza pubblicati (8,9), abbiamo assunto che i soggetti portatori di fenotipo AA, FF e AF erano potenzialmente sensibili al farmaco. Per la validazione dell'approccio diagnostico basato sulla caratterizzazione del fenotipo biochimico, è stato eseguito il confronto del fenotipo con il genotipo della ChE, effettuato mediante l'analisi del DNA, ottenendo concordanza nel 99% dei casi analizzati, e confermando che la predizione del genotipo basata su DN e FN possiede un'elevata efficienza.

L'utilizzo del metodo succinildicolina/DTNB ha mostrato un rilevante vantaggio quando la misura della sola attività della ChE era impiegata come procedura per l'identificazione dei fenotipi (e genotipi) sensibili alla succinildicolina. Per massimizzare la sensibilità clinica nell'individuazione dei soggetti sensibili, è stato fissato un valore soglia di 23 U/L. Questo dato si avvicina molto a quello in precedenza riportato in uno studio che utilizzava la stessa metodica analitica ma un diverso approccio per definire il valore discriminante (13). E' da notare che, dal punto di vista analitico, la riproducibilità del metodo è anche soddisfacente: il CV (<2,5%), ottenuto in precedenti valutazioni (6,13), dimostra la capacità del metodo di soddisfare il traguardo d'imprecisione desiderabile derivato dai dati di variabilità biologica dell'attività enzimatica della ChE, corrispondente ad un CV  $\leq 3,1\%$  (21).

Il metodo che utilizza la propioniltiocolina come substrato ha mostrato di possedere una lieve ma significativamente minore efficienza. In accordo con i risultati in precedenza pubblicati (9,10), abbiamo anche confermato

**Tabella 2**

*Specificità e rapporto di probabilità di un test positivo a valori di colinesterasi corrispondenti al 100% di sensibilità per ogni metodo valutato nella diagnosi della sensibilità alla succinildicolina*

Metodo	Valore con 100% di sensibilità	Specificità (intervallo di confidenza al 95%)	Rapporto di probabilità per un test positivo <sup>a</sup>
A	6.64 kU/L	45.0% (35.0-55.3)	1.8
B	6.61 kU/L	47.0% (36.9-57.2)	1.9
C	3.63 kU/L	76.0% (66.4-84.0)	4.2
D	23 U/L	79.0% (69.7-86.5)	4.8
E	2.45 kU/L	33.3% (24.2-43.5)	1.5
F	170U/L	66.0% (55.8-75.2)	2.9

<sup>a</sup> test positivo significa un'attività ChE inferiore o uguale al valore soglia corrispondente al 100% di sensibilità (vedi seconda colonna).

**Tabella 3**

Confronto tra l'analisi del DNA e il fenotipo biochimico della colinesterasi

Genotipo della ChE (analisi DNA)	Soggetto No.	Variante della ChE (sostituzione amminoacidica)			Fenotipo biochimico della ChE <sup>a</sup>
		Asp70Gly (Atipica)	Thr243Met (Fluoro-1)	Gly390Val (Fluoro-2)	
Atipica, eterozigote	1	+/-	-/-	-/-	UA
	3	+/-	-/-	-/-	UA
	5	+/-	-/-	-/-	UA
	7	+/-	-/-	-/-	UA
	8	+/-	-/-	-/-	UA
	13	+/-	-/-	-/-	UA
	17	+/-	-/-	-/-	UA
	20	+/-	-/-	-/-	UA
	29	+/-	-/-	-/-	UA
	32	+/-	-/-	-/-	UA
	36	+/-	-/-	-/-	UA
	38	+/-	-/-	-/-	UA
	39	+/-	-/-	-/-	UA
	40	+/-	-/-	-/-	UA
	44	+/-	-/-	-/-	UA
	50	+/-	-/-	-/-	UA
	52	+/-	-/-	-/-	UA
	54	+/-	-/-	-/-	UA
	55	+/-	-/-	-/-	UA
56	+/-	-/-	-/-	UA	
57	+/-	-/-	-/-	UA	
Atipica, omozigote	10	+/+	-/-	-/-	AA
	27	+/+	-/-	-/-	AA
Fluoruro-resistente, eterozigote	4	-/-	+/-	-/-	UF
	21	-/-	-/-	+/-	UF
	42	-/-	-/-	+/-	UF
Fluoruro-resistente, omozigote	41	-/-	-/-	+/+	UA
Atipica/Fluoruro, eterozigote	30	+/-	-/-	+/-	UF

<sup>a</sup> basato sui numeri di dibucaina e fluoruro

che il metodo butiriltiocolina/DTNB e quello che impiega la benzoilcolina come substrato non sono efficienti nella differenziazione delle varianti della ChE sulla base della misura della sola attività enzimatica.

In Germania e in Giappone, la determinazione della ChE è raramente utilizzata come metodo di screening in anestesia ma è usata di preferenza come marcatore di ridotta biosintesi proteica nel fegato o come indice di avvelenamento da esteri organofosforici usati come insetticidi (22). Precedenti lavori hanno tuttavia dimostrato che il metodo che impiega la succinilditiocolina come substrato è

adatto anche per queste altre applicazioni (13,23).

In conclusione, i nostri dati indicano che il metodo succinilditiocolina/DTNB è il migliore per evidenziare i soggetti a rischio di sviluppare apnea in seguito al trattamento con succinilditiocolina sulla base della determinazione della sola attività ChE. Poiché l'uso di questo metodo non riduce l'efficienza della determinazione della ChE per le altre applicazioni cliniche (intossicazione da organofosforici e diminuita sintesi proteica epatica), questo approccio analitico può essere proposto come la base per una procedura di riferimento per la standardizzazione della misura della ChE (24).

## RINGRAZIAMENTI

Il Gruppo di Studio "Enzimi" ringrazia Franco Azzario (Ospedale Ca' Granda Niguarda, Milano) e Monica Morandi (Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia) per il prezioso aiuto nella raccolta dei campioni di sangue. Si ringraziano inoltre Graziella Bonetti (Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia) per le analisi statistiche e Carlo Ferrero per la collaborazione tecnica. Un ringraziamento a Menarini Diagnostici, Olympus, Roche Diagnostici, Sclavo Diagnostici e Sigma Diagnostici per aver fornito parte dei reagenti utilizzati nello studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, et al. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 1990;29:124-31.
2. Viby Mogensen J. Cholinesterase and succinylcholine. *Dan Med Bull* 1983;30:129-50.
3. Kalow W, Genesi 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.
4. Harris H, Whittaker M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature* 1961;191:496-8.
5. Boeck AT, Fry DL, Sastre A, Lockridge O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. *Ann Clin Biochem* 2002;39:154-6.
6. Panteghini M, Bonora R, Ferrero CA, Luraschi P, et al. Comparative assessment of different methods for the measurement of the catalytic activity concentration of cholinesterase in human serum. *Biochim Clin* 2000;24:415-20.
7. Balland M, Vincent-Viry M, Henny J. Effect of long-term storage on human plasma cholinesterase activity. *Clin Chim Acta* 1992;211:129-31.
8. Whittaker M, ed. *Cholinesterase*. New York: Karger, 1986.
9. Evans RT, Wroe J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* 1978;24:1762-6.
10. 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.
11. 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 acetylhydrolase, EC 3.1.1.8). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:163-70.
12. 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.
13. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. An alternative approach to the prevention of succinylcholine-induced apnoea. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:85-90.
14. Panteghini M, Bonora R. Evaluation of a new continuous colorimetric method for determination of serum pseudochoolinesterase catalytic and its application to a centrifugal fast analyzer. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:671-6.
15. Panteghini M, Bonora R, Pagani F. Evaluation of a new method for cholinesterase determination. *Clin Biochem* 1986;19:161-6.
16. Panteghini M. Methods for serum cholinesterase assay and classification of genetic variants. *Clin Chim Acta* 1989;183:87-90.
17. Jensen FS, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J. Identification of human plasma cholinesterase variants in 6,688 individuals using biochemical analysis. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;39:157-62.
18. Lando G, Mosca A, Bonora R, Azzario F, et al. Frequency of butyrylcholinesterase gene mutations in individuals with abnormal inhibition numbers: an Italian-population study. *Pharmacogenetics* 2003;13:265-70.
19. Sweets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988;240:1285-93.
20. Faye S, Evans RT. Is succinylcholine the substrate of choice for the measurement of cholinesterase activity? *Clin Chem* 1986;32:1477-80.
21. Moses GC, Tuckerman JF, Henderson AR. Biological variance of cholinesterase and 5'-nucleotidase in serum of healthy persons. *Clin Chem* 1986;32:175-7.
22. Franzini C. Cholinesterasi nel siero: laboratorio e clinica. *Biochim Clin* 1997;21:242-51.
23. Faye S, Bannister P, Evans RT. Cholinesterase measurement in liver disease. A succinylcholine assay is more clinically useful. *Ann Clin Biochem* 1988;25(suppl):79S-80S.
24. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24:499-508.