

## Determinazione dell'attività della colinesterasi nel siero e suo utilizzo clinico: risultati di una indagine conoscitiva

**Andrea Mosca<sup>1</sup>, Ferruccio Ceriotti<sup>2</sup>, Carlo Franzini<sup>3</sup>, Mauro Panteghini<sup>3</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 di Milano

<sup>2</sup>Laboratorio Standardizzazione, Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano

Per la determinazione dell'attività catalitica della colinesterasi (CHE) nel siero sono attualmente disponibili numerosi metodi basati sull'uso di differenti substrati (1). Il Gruppo di Studio "Enzimi" della SIBioC ha recentemente dimostrato che il metodo che utilizza come substrato la succinilditiocolina rappresenta il metodo di elezione per l'identificazione dei pazienti sensibili alla somministrazione dell'anestetico succinildicolina, sulla base della misura della sola attività enzimatica nel siero (2). Al fine di valutare l'opportunità di utilizzare questo approccio analitico come base per lo sviluppo di una procedura di riferimento finalizzata alla standardizzazione della misura della CHE, il Gruppo di Studio "Enzimi" ha ritenuto importante raccogliere informazioni aggiornate riguardo la determinazione e l'utilizzo clinico di questo enzima. A tale scopo è stata condotta un'inchiesta conoscitiva tra i laboratori nazionali, basata sui risultati della compilazione di un questionario (Tabella 1), distribuito ai laboratori insieme ai risultati di alcuni programmi di Verifica Esterna della Qualità (VEQ) e disponibile, inoltre, sul sito web della SIBioC.

Sono complessivamente pervenute 112 risposte (via fax). Tale numero corrisponde a circa il 10% del totale dei laboratori ospedalieri italiani. Il 47% dichiarava di eseguire più di 200 determinazioni di CHE al mese, il 32% meno di 50, il 19% tra 50 e 200, mentre il 2% non ha risposto. La misura della CHE era principalmente impiegata per rivelare un'aumentata sensibilità al miorellassante succinilcolina (suxametonio) (59% dei laboratori) e per valutare la funzione epatica (43%). Solo in 2 laboratori la determinazione della CHE era utilizzata per confermare il sospetto di esposizione a composti organofosforici utilizzati comunemente come pesticidi e per monitorare l'eventuale intossicazione. Questi risultati sono in sostanziale accordo con quanto emerso da un'indagine svolta qualche anno fa in Gran Bretagna, mentre differiscono significativamente da quanto rilevato in altri paesi europei (Francia e Austria), nei quali l'interesse clinico per la CHE è principalmente associato al suo utilizzo come indice di esposizione ai pesticidi organofosforici (3, 4).

Per quanto riguarda il tipo di substrato e metodo utilizzati per il saggio enzimatico, la maggior parte dei laboratori (91%) ha dichiarato di utilizzare la butiriltiocolina come substrato, per lo più in associazione con 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (DNTB), mentre solo in una minoranza di casi erano utilizzati benzoilcolina, acetiltiocolina o succinilditiocolina. In accordo con il fatto che l'esame è principalmente utilizzato nella valutazione del rischio di sviluppare apnea da succinilcolina, circa la metà (47%) dei partecipanti determinava, oltre all'attività enzimatica totale, anche il numero di dibucaina, al fine di valutare il fenotipo biochimico della CHE (5). Solo un laboratorio misurava anche il numero di fluoruro.

E' importante notare che, nonostante la ricordata superiorità in termini di accuratezza diagnostica, il metodo basato sull'impiego del substrato succiniltiocolina era utilizzato in

**Tabella 1**

Questionario sull'impiego della colinesterasi sierica (CHE) distribuito ai laboratori.

- 1 Quante richieste al mese il tuo Laboratorio riceve per la misura dell'attività della CHE?
- 2 Qual'è la principale indicazione clinica per la richiesta di CHE al vostro Laboratorio?
  - a) Rivelazione di una possibile aumentata sensibilità alla succinilcolina (suxametonio)
  - b) Valutazione della funzionalità epatica
  - c) Conferma di intossicazione da insetticidi organofosforici
- 3 Indica orientativamente da quale tipo di reparto provengono le richieste:
 

Medicina Interna	0-20 %()	20-40 %()	40-60 %()	60-80 %()	80-100 %()
Chirurgia	0-20 %()	20-40 %()	40-60 %()	60-80 %()	80-100 %()
DEA-Anestesiologia	0-20 %()	20-40 %()	40-60 %()	60-80 %()	80-100 %()
Altro .....	0-20 %()	20-40 %()	40-60 %()	60-80 %()	80-100 %()
- 4 Quale metodica e reagente utilizzate?
 

nome kit \_\_\_\_\_

ditta produttrice \_\_\_\_\_

substrato \_\_\_\_\_

strumento sul quale è implementata la metodica \_\_\_\_\_

ditta produttrice \_\_\_\_\_

temperatura di esecuzione \_\_\_\_ °C
- 5 Quale intervallo di riferimento utilizzate?
 

intervallo \_\_\_\_\_ unità di misura \_\_\_\_\_
- 6 Avete intervalli di riferimento separati per:
 

sesso	SI' ( )	NO ( )
età	SI' ( )	NO ( )
gravidanza	SI' ( )	NO ( )
- 7 Effettuate la misura del numero di dibucaina?
 

se si' indicate il valore decisionale scelto: \_\_\_\_\_
- 8 Effettuate la misura del numero di fluoruro?
 

se si' indicate il valore decisionale scelto: \_\_\_\_\_

un solo laboratorio. Fattori, quali la facilità di automazione dell'analisi o la più ampia disponibilità commerciale di alcuni metodi rispetto ad altri, possono spiegare questa situazione ed aver assunto, almeno in parte, un ruolo importante nel determinare la scelta del metodo da parte dei laboratori.

Nonostante la relativa omogeneità metodologica, i limiti di riferimento adottati nei diversi laboratori sono risultati scarsamente comparabili. Anche nel caso in cui era utilizzata la stessa metodica analitica (metodo con butirilticolina a 37 °C), il limite inferiore di riferimento variava da 3,0 kU/L a 7,0 kU/L ed il limite superiore di riferimento tra 9,0 kU/L e 20,0 kU/L. Solo una minoranza di laboratori utilizza inoltre limiti di riferimento differenziati per sesso ed età (28% e 11%, rispettivamente), mentre il 13% dei laboratori adotta anche limiti di riferimento specifici per le donne in gravidanza.

Impiegando il metodo con substrato butirilticolina a 37 °C, è stato precedentemente calcolato che il livello decisionale della determinazione della CHE che consente di ottenere una sensibilità diagnostica pari al 100% nell'identificazione dei soggetti sensibili alla succinilcolina corrisponde a 6,6 kU/L (6). Al di sotto di questo valore, la probabilità di individuare un soggetto sensibile raddoppia. Comparando questo limite "evidence-based" con quelli sopra riportati come limiti inferiori di riferimento, si può notare che molti dei laboratori che impiegano butirilticolina probabilmente impiegano limiti troppo bassi rispetto all'ottimale, con un conseguente elevato rischio di non diagnosticare la presenza di una sensibilità all'anestetico quando il valore venga erroneamente ritenuto "normale".

I risultati emersi da questa indagine indicano che in Italia la maggior parte delle richieste che pervengono ai laboratori per la determinazione della CHE sono in relazione

alla possibile identificazione di soggetti portatori di aumentata sensibilità alla succinilcolina, impiegata come farmaco miorelaxante in corso di procedure anestesiolgiche. Appare evidente che, in generale, la richiesta di determinazione di questo enzima è relativamente scarsa e che i fattori che indirizzano i laboratori nella scelta del metodo analitico sono probabilmente vari ma, per lo più, indipendenti dalle prestazioni cliniche del metodo stesso. E' chiaro che esiste una notevole eterogeneità da parte dei medici anestesisti relativamente all'approccio utilizzato per l'identificazione dei soggetti portatori delle varianti genetiche della CHE, incapaci di metabolizzare parzialmente o totalmente il farmaco miorelaxante. In parecchi casi, sembra infatti preferito un approccio di semplice "attenzione" clinica rispetto alla più oggettiva misura dell'attività della CHE e alla valutazione del fenotipo enzimatico.

A rendere ancora più complessa la situazione contribuisce la mancanza di standardizzazione dei metodi di misura, come chiaramente dimostrato dai risultati ottenuti nei programmi di VEQ (7). Inoltre, le notevoli differenze nei valori dei limiti di riferimento utilizzati non solo per differenti sistemi analitici ma anche all'interno di gruppi di laboratori che impiegano lo stesso principio di misura possono indurre ad una differente classificazione clinica dello stesso campione ("normale" per alcuni, con possibile deficit enzimatico per altri). Lo sviluppo di un sistema di riferimento per la standardizzazione della misura dell'attività della CHE nel siero potrebbe contribuire a risolvere molti di questi problemi (8). Tuttavia, in assenza di chiare evidenze circa la definitiva rilevanza clinica fornita dalla misura di questo enzima, una decisione riguardo alla possibile implementazione di un programma di standardizzazione della determinazione della CHE può essere presa solamente a livello internazionale nell'ambito della Federazione Internazionale di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio (IFCC).

## RINGRAZIAMENTI

Il Gruppo di Studio "Enzimi" esprime un particolare ringraziamento alla dott.ssa Renata Paleari (Università degli Studi di Milano) che ha curato la preparazione del presente rapporto. Ringrazia inoltre i seguenti colleghi che hanno risposto all'indagine, rendendo possibile con la loro collaborazione questo lavoro:

Laura **Arcangeli**, Osp. Caduti Bollatesi, Bollate (MI); Carlo **Arfini**, ASO SS. Antonio e Biagio, Alessandria; Laura **Auriemma**, Osp. Bolognini, Seriate (BG); Fiamma **Balboni**, IFCA, Casa di Cura Ulivella e Glicini, Firenze; Roberto **Balducci**, Osp. Infermi, Rimini; Angelo **Barbieri**, P. Ospedaliero, Sesto S. Giovanni (MI); Giandomenico **Basile**, Casa di Cura Rizzola, San Donà di Piave (VE); Michele **Bellenzier**, Osp. Civile, Pieve di Cadore (BL); Giorgio **Brocco**, Policlinico Verona, Verona; Aldo **Burighel**, Osp. Civile, Dolo (VE); Eugenio **Burti**, Osp. Orlandi, Bussolengo (VR); Roberta **Busson**, Emolab, Conselve (PD); Sergio **Buzzati**, Osp. Civile, Belluno; Gianfranco **Caenaro**, Osp. Generale Regionale, Treviso; Giuseppe **Calanna**, Osp. S. Bambino, Catania; Lorella **Campostrin**, Fondazione Salvatore Maugeri, Castel Goffredo (MN); Gilda **Capuano**, Mebios, Pozzuoli (NA); Paolo **Carraro**, Az. Ospedaliera, Padova; Renato **Carraro**, Osp. S. Camillo, Roma; Mario **Casarotto**, Datamedica, Chioggia (VE); Giampaolo **Cattozzo**, Osp. Del Ponte, Varese; Angelo **Cavaricci**, Osp. Nuovo Regina Margherita, Roma; Mario **Cazzavillan**, Casa di Cura Villa Berica, Vicenza; Giovanni **Cigliana**, Ist. Fisioterapici Ospedalieri, Roma; Paolo **Ciola**, Osp. Civile, Ostuni (BR); Giovanni **Cocco**, Osp. Civile USL 12, Mestre, (VE); Paolo **Colloca**, Laboratorio Tortoriello, Napoli; Mario **Conte**, Centro Diagnostico P. Conte, Scafati (SA); Rossella **Corradini**, Osp. Civile, Vignola (MO); Gianfranco **Cortelli**, Osp. Maggiore, Trieste; Elena **Costa**, Policlinico S. Donato Milanese (MI); Luigi D'Agostino, Laboratorio Mida, Casandrino (NA); A. **De Arcangelis**, Laboratorio Analisi Cliniche e Ricerche Diagnostiche, Roma; Stefania **De Toni**, Osp. S. Luca Trecenta, (RO); Rosanna **Del Carro**, Casa di Cura S. Giovanni, Milano; Ernesto **Delprete**, Osp. S. Croce, Fano (PS); Francesca **Di Serio**, Policlinico, Bari; Rosolen **Di Teresa**, Osp. De Gironcoli, Conegliano Veneto (TV); Roberto **Diodati**, Osp. della Versilia, Lido di Camaiore (LU); Francesco **Donnini**, USL 8, Arezzo; Giovanni **Faraone**, Laboratorio Analisi Privato Del Piano, Ancona; Renzo **Fenoil**, Osp. Martini ASL 2, Torino; Maria Teresa **Fiorb**, Osp. S. Marco Argentario (CS); Valerio **Formentini**, Osp. Civile, Latisana

(UD); Massimo **Gaio**, Laboratorio Bios, Treviso; Arturo **Gheller**, Casa di Cura Eretenia, Vicenza; Susanna **Ghirelli** Osp. Dossetti, Bazzano, (BO); Silvia **Giannelli**, Studio Diagnostico Pantheon, Roma; Franca **Giuliano**, Fondazione Salvatore Maugeri, Telesse Terme (BN); Maria Luisa **Gozzo**, Policlinico Gemelli, Roma; **Grilli Tena**, Studio associato Analisi, Acquaviva Delle Fonti (BA); Emma **Guagnellini**, Osp. S. Paolo, Milano; Romeo **Igea**, Osp. Civile, Valdagno (VI); Giovanni **Introcaso**, Centro Cardiologico Monzino, Milano; Celio **Lazzarini**, Osp. Portogruaro (VE); Tommaso **Lipartiti**, Analisi Cliniche Mater Dei, Pagani (SA); Massimo **Locatelli**, IRCCS S. Raffaele, Milano; Evi **Lochmann**, Osp. Civile, Vipiteno (BZ); Fiorenzo **Lovison**, Osp. Thiene (VI); Paola **Luraschi**, Osp. Sacco, Milano; Pierangelo **Magatelli**, Osp. Civile, Iseo (BS); Paolo **Manara**, Casa di Cura S. Francesco, Verona; C. **Margarini**, Osp. S. Giuseppe Ist. Auxologico Italiano, Intra (VB); Vincenzo **Mari**, INRCA, Cosenza; Saulle **Mazzolini**, Osp. S.M. Misericordia, Udine; Gian Paolo **Mastelli**, Casa di Cura Chierengo Perbellini, Verona; Agnes **Mayr**, Osp. Brunico (BZ); Luigi **Melica**, Analisi Igea; Vincenzo **Memoli**, Analisi Chimico-Cliniche ME.Cl., S. Antonio Abate (NA); Cesaro **Milano**, IRCAS, Roma; Claudio **Moretto**, Osp. S. Maria della Misericordia, Rovigo; Enzo **Moscarella**, Az. Ospedaliera Salvini, Garbagnate (MI); Antonio **Napolitano**, Landa, Modica (RG); Lorella **Ostinelli**, Az. Ospedaliera S. Anna, Como; Michele **Paolino**, Casa di Cura Villa Azzurra, Siracusa; Franca **Pagani**, Az. Ospedaliera Spedali Civili, Brescia; Nicoletta **Pane**, Laboratorio Analisi Cliniche D. Pane, Napoli; Giorgio **Paride**, Osp. Civile, Villafranca (VR); Antonella **Parisoli**, Az. Ospedaliera, Reggio Emilia; Marcella **Pasti**, Analisi Cliniche Gallieno, Verona; Giovanna **Patrucco**, P. Ospedaliero S. Andrea ASL 11, Vercelli; Gabriele **Pegoretti**, Osp. S. Chiara, Trento; Gianpaolo **Piaserico**, Osp. Monte Belluna (TV); Mario Andrea **Piazzon**, Analisi Chimico-Cliniche M.A. Piazzon, Thiene (VI); Francesco **Pisanti**, ASL NA 4, Ottaviano (NA); Laura **Pitton**, Laboratorio Druso, Trento; Marco **Pradella**, USL N.8 Castelfranco Veneto (TV); M.G. **Prudenzioli**, Laboratorio Fleming, Verona; Giuseppe **Racugno**, Laboratorio Medico Analisi S. Luca, Taranto; Luigi **Romano**, Az. Ospedaliera Monaldi, Salerno; Attilio **Rosolia**, Laboratorio Mater Dei, Pagani (SA); Roberto **Santoni**, Osp. Nuovo S. Giovanni di Dio, Firenze; Daniela **Signori**, Osp. S. Maria del Prato, Feltre (BL); Mario **Snidero**, Az. Ospedaliera S. Maria della Misericordia, Cividale del Friuli, (UD); Mariapaola **Spadolini**, Osp. S. Maria Nuova, Firenze; Mariapia **Stella**, Osp. S. Antonio, Padova; Giovanni **Stinco**, Centro Diagnostico S. Paolo; Simona **Storti**, Osp. G. Pasquinucci, Massa Carrara; Maurizio **Toffoluti**, Osp. Civile, Pordenone; Luigi **Tomelleri**, Laboratorio S. Martino, S. Martino Buon Albergo (VR); Cristina **Troi**, Ospedale Bressanone (BZ); Sara **Valverde**, Osp. Civile Chioggia (VE); Maurizio **Vana**, Osp. Oftalmico, Torino; Barbara **Vezzaro**, CEMAR, Trissino (VI); **Alessandro Vicentini**, Centro Diagnostico Veneto, Caldogno (VI); Elide **Vidano**, Osp. Civile, Ivrea (TO); Martina **Zaninotto**, Az. Ospedaliera Padova.

## BIBLIOGRAFIA

1. Panteghini M, Bonora R, Ferrero CA, Luraschi P, Mosca A, Zaninotto M, Franzini C. Valutazione comparativa di differenti metodi per la misura della concentrazione di attività catalitica della colinesterasi nel siero. *Biochim Clin* 2000;24:415-20.
2. Mosca A, Bonora R, Ceriotti F, Franzini C, Lando G, Paleari R, et al. L'impiego della succinilcolina come substrato rappresenta il metodo d'elezione per la misura dell'attività catalitica della colinesterasi nel siero nella diagnosi della sensibilità alla succinilcolina. *Biochim Clin* 2003;27:326-31.
3. Goodall R. Cholinesterase: phenotyping and genotyping. *Ann Clin Biochem* 2004;41:98-110.
4. Franzini C. Colinesterasi del siero: laboratorio e clinica. *Biochim Clin* 1997;21:242-51.
5. 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.
6. Mosca A, Bonora R, Ceriotti F, Franzini C, Lando G, Patrosso MC, et al. M. Assay using succinylidithiocholine as substrate: the method of choice for the measurement of cholinesterase catalytic activity in serum to diagnose succinylidicholine sensitivity. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:317-23.
7. Goodall R, Bullock DG, French J, Goldie DJ. Proficiency testing (PT) underpinned by molecular genotyping - The UK NEQAS for cholinesterase phenotyping. *Clin Chem* 2001;47(suppl):A220.
8. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24:499-508.