

## STUDIO COMPARATIVO DELLE METODICHE DI DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ AMINO LEVULINICO DEIDRATASI ERITROCITARIA

A. Trevisan, A. Buzzo e F.M. Scarpa

« Comparative Study of Methods for Measurements of Erythrocyte Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity ». - Comparison of the method of Bonsignore et al. and the European Standardized Method for erythrocyte ALAD determination. With the European Standardized Method values 2.5 times higher were obtained with both results expressed in mU/ml. A conversion factor is recommended to convert U (Bonsignore) to mU/ml (European) in order to compare the results obtained with the two methods. Other methodological variables are also discussed.

### INTRODUZIONE

La prima metodica di determinazione dell'attività aminolevulinica deidratasi eritrocitaria (ALA D, E.C. 4.2.1.24) fu approntata da Gibson e coll. (4) e prevedeva l'aggiunta del glutatione ridotto (GSH) nel mezzo di incubazione e la colorazione del porfobilinogeno (PBG) formato col reattivo di Ehrlich.

L'aggiunta del GSH al mezzo di incubazione ha condotto a non pochi equivoci nella valutazione dei risultati fino al 1965 ottenuti su esposti a piombo: secondo alcuni Autori (5, 7, 11) vi erano infatti una riduzione dell'attività ALA D; secondo altri (8) tale attività non variava.

Gli stessi scopritori (4) non ottennero in vitro significative riduzioni dell'attività enzimatica dopo aggiunta di piombo.

Nel 1965, Bonsignore, Calissano e Cartasegna (3) misero a punto un metodo sem-

plice e rapido per la determinazione di tale attività enzimatica che non prevedeva la presenza di GSH nel mezzo di incubazione; con tale metodica venivano ottenuti valori sempre riproducibili e con attività enzimatica relativamente costante.

Recentemente (2) il metodo di Bonsignore e coll. (3) è stato modificato e standardizzato a livello europeo, basandosi principalmente sulle osservazioni di Nikkanen e coll. (9) che dimostravano un optimum di pH a 6,4 dell'attività enzimatica nel soggetto normale con un "shift" a pH 5,8 in presenza di piombo in vivo. Quando il piombo era aggiunto in vitro l'optimum di pH rimaneva a 6,4. A tale pH era inoltre presente una migliore correlazione con la piombemia.

Nel presente lavoro abbiamo confrontato i valori di attività enzimatica ottenuti con le due metodiche citate, indicando l'uso di un fattore di conversione per trasformare i valori ottenuti col metodo di Bonsignore e coll. (3) in mU/ml.

Altre variabili metodologiche sono discusse nel testo.

## MATERIALI E METODI

La metodica di Bonsignore e coll. (3) e quella standardizzata a livello europeo (2) sono state usate.

La prima è stata da noi parzialmente modificata con diluizioni finali del campione diverse (1:50 col metodo originale, 1:35 con le nostre modifiche). Il calcolo era identico a quello indicato da Bonsignore e coll. (3), ma poiché non teneva conto delle diluizioni successive, forniva valori superiori a quelli classificati come normali.

È stata quindi calcolata l'influenza dei bianchi dei campioni, il coefficiente di variazione (C.V.) dei metodi, la stabilità del PBG colorata col reattivo di Ehrlich, la stabilità dei campioni dopo 24 ore a  $t^{\circ}$  ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) e a  $+4^{\circ}$ . Inoltre abbiamo calcolato il fattore di conversione dalle U Bonsignore alle mU/ml (espressione delle nanomoli di ALA trasformate in PBG per minuto per ml di G.R.). Infine sono stati confrontati col metodo standardizzato europeo (2) tre substrati forniti da tre ditte diverse (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; Merck, Darmstadt, RFT; Baker, Deventer, Holland).

Per tutte le determinazioni è stato usato uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 550.

## RISULTATI

Applicando la formula che tiene conto di tutte le diluizioni del campione nei successivi passaggi, è possibile ottenere dei risultati confrontabili tra i due metodi [le variazioni volumetriche da noi apportate al metodo di Bonsignore e coll. (3) non influenzano il calcolo finale, si ottengono cioè risultati sempre eguali se si esprimono in mU/ml].

Dalla figura 1 è possibile osservare come i risultati ottenuti coi due metodi mostrino una differenza praticamente costante, tale che la correlazione è molto vicina all'unità ( $r = 0,9507$ ).

È facile inoltre individuare un fattore di conversione dalle U Bonsignore (U arbitrarie) alle mU/ml e questo fattore è 3,88 se si applica fedelmente la metodica di Bonsignore e coll. (3); di 5,55 applicando le nostre modificazioni.

Come già osservato da Nikkanen e coll. (9), la correlazione con la piombemia è migliore ( $r = -0,863$ ) per i campioni determinati col metodo standardizzato europeo

(fig. 2) che per quelli determinati col metodo di Bonsignore e coll. (3) ( $r = -0,794$ ; fig. 3).

In accordo con Herber e Sallé (6) l'assorbanza del campione al tempo zero è trascurabile (incide sul valore finale per meno del 1 %).

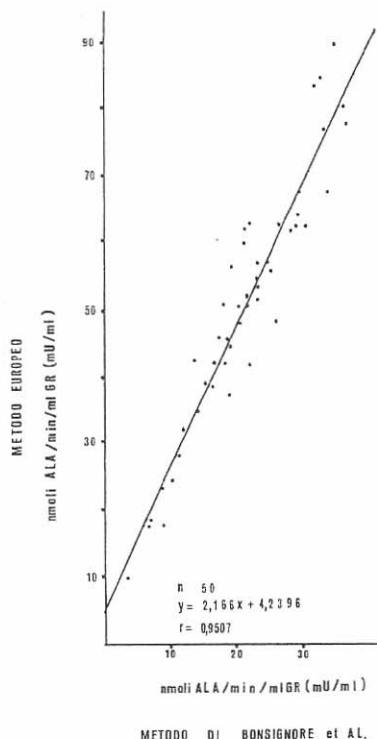


Fig. 1 - Correlazione tra attività ALA D determinata col metodo di Bonsignore e coll. (3) e col metodo standardizzato europeo (2).

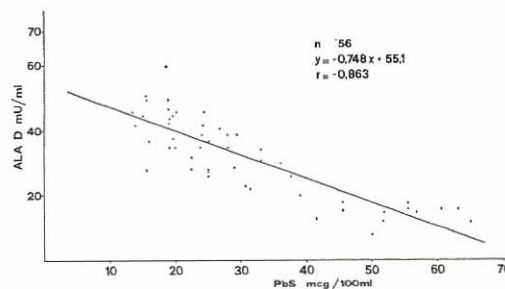


Fig. 2 - Correlazione tra la piombemia e l'attività dell'ALA D determinata col metodo standardizzato europeo (2).

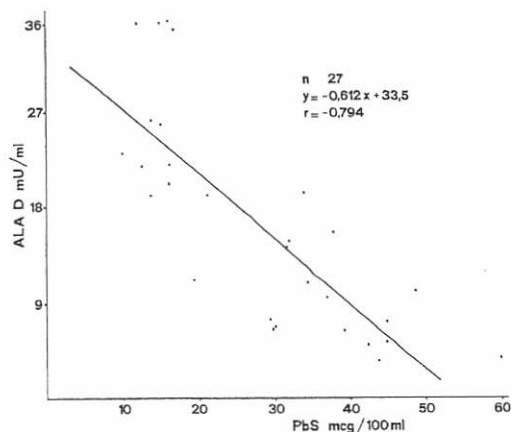


Fig. 3 - Correlazione tra la piombemia e l'attività dell'ALA D determinata col metodo di Bonsignore e coll. (3).

Determinazioni ripetute sullo stesso campione non mostravano un C.V. superiore al 5 % per entrambi i metodi.

La tabella 1 dimostra come i risultati ottenuti usando substrati forniti dalla ditta Merck e dalla ditta Sigma sono sovrapponibili, mentre il substrato fornito dalla ditta Baker dà valori mediamente superiori del 5 %.

TABELLA 1 - Uso di substrati (ALA HCl) forniti da tre diverse ditte

Campioni	Substrati		
	Sigma	Merck mU/ml	Baker
1	62,0	61,9	65,0
2	50,6	49,8	52,7
3	30,3	32,3	32,1
4	40,4	38,4	42,1
5	73,6	75,4	77,7
Media	51,4	51,6	53,9

La stabilità del PBG colorato col reattivo di Ehrlich è mostrata in figura 4: il massimo si ottiene dopo 4 e ½ minuti; dopo 10 minuti si assiste ad una caduta dell'1,1 %;

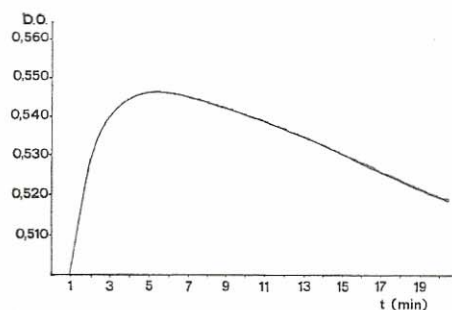


Fig. 4 - Stabilità del PBG colorato col reattivo di Ehrlich nel tempo; dopo 5 minuti dal completo sviluppo del colore si assiste ad una caduta di attività dell'1,1 %, dopo 15 minuti del 3 % e dopo 20 minuti del 5,1 %.

dopo 15 minuti del 3 %; dopo 20 minuti del 5,1 %.

La tabella 2 riporta i valori ottenuti dopo 24 ore dallo stesso campione conservato a  $t^{\circ}$  ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) e a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

I valori normali ottenuti nel nostro laboratorio col metodo standardizzato europeo su 50 casi (maschi e femmine) sono  $48 \pm 10$  mU/ml (range: 25-70 mU/ml).

TABELLA 2 - Prove di conservazione del campione per 24 ore a  $+4^{\circ}\text{C}$  e a  $t^{\circ}$  ambiente ( $+25^{\circ}\text{C}$ ).

Campioni	Attività di base	Dopo 24 ore	
		$+4^{\circ}\text{C}$ mU/ml	$+25^{\circ}\text{C}$
1	61,9	56,1	46,7
2	49,5	42,9	36,8
3	32,9	27,9	21,2
4	38,4	27,1	28,9
5	76,3	68,9	59,2
6	60,2	55,6	46,1
7	42,2	40,8	35,1
8	62,6	61,3	44,1
9	44,8	41,0	30,9
10	24,9	20,0	16,8
Media	49,4	44,2	36,6
Variazione %		-10,5	-26,0



## DISCUSSIONE

Sulla utilità della determinazione dell'attività ALA D negli esposti a piombo, gioca un ruolo determinante la concentrazione ematica del metallo poiché, essendo un indice precocissimo di effetto, ha il sostanziale difetto di non predire piombemie superiori a 60 mcg/100 ml. Questo è il grado di predizione che si può ottenere col metodo di determinazione messo a punto da Bonsignore e coll. (3), il quale prevede un pH di 7,0 nel mezzo di incubazione.

Seguendo le indicazioni di Nikkanen e coll. (9) è stato possibile ampliare il campo di predizione di tale parametro sino a piombemie vicine a 100 mcg/100 ml. Tali nuove indicazioni, fatte proprie dalla standardizzazione del metodo a livello europeo (2), prevedono un pH di incubazione di 6,4; a tale pH si ha una riduzione della sensibilità al piombo dell'attività enzimatica e, in termini pratici, una migliore correlazione con la piombemia.

Nel presente lavoro è stata quindi ripresa la questione metodologica la quale, oltre a confermare i risultati di Nikkanen e coll. (9), ha dimostrato: 1 - col metodo europeo si ottengono valori mediamente superiori 2,5 volte a quelli trovati col metodo di Bonsignore e coll. (3); evidentemente per il confronto le U Bonsignore debbono essere trasformate in mU/ml, cosa assai semplice se si tiene conto del fattore di diluizione, del fattore di conversione PBG-ALA, del coefficiente di estinzione molare e della K dello strumento. A chiara dimostrazione della costante differenza tra i due metodi sta la correlazione statistica ( $r = 0,9507$ ); 2 - l'assorbimento dei campioni al tempo zero, e qui confermiamo quanto precedentemente indicato (6), è trascurabile (inferiore all'1 % del valore, ampiamente nell'errore del metodo); 3 - l'uso di substrati di ditte fornitrici diverse non è da sottovalutare, poiché abbiamo

dimostrato che quello fornito dalla Baker dà risultati mediamente più elevati del 5 % rispetto a quelli forniti dalla Merck o dalla Sigma; tale differenza non è significativa, ma risulta ai limiti della precisione del metodo; 4 - la relativa instabilità del PBG colorato col reattivo di Ehrlich obbliga ad una rapida (oppure frazionata) lettura dei campioni: entro i primi 5 minuti dal completo sviluppo del colore (è possibile leggere circa 20 campioni) la stabilità è praticamente costante; 5 - sulla conservazione dei campioni si trovano in letteratura pareri discordi: alcuni (1) ritengono che non avvenga alcuna variazione dell'attività enzimatica dopo conservazione per 24 ore a +4°C; altri (10) trovano una caduta del 9 % dopo 24 ore a +4°C e del 13 % a t° ambiente. Nella nostra ricerca, conservando il sangue in toto al riparo dalla luce, dopo 24 ore a +4°C la riduzione di attività è del 10 %, mentre a t° ambiente è del 26 %. Riteniamo quindi che sia opportuno dosare l'attività enzimatica immediatamente o breve tempo dopo la raccolta del campione; 6 - è stato possibile eseguire il calcolo del fattore di conversione delle U Bonsignore alle mU/ml e ne consigliamo l'applicazione per poter confrontare i risultati ottenuti coi due metodi.

Il nostro lavoro non ha voluto mettere in risalto i pregi di un metodo rispetto a quelli dell'altro, che ormai sono noti a tutti e da tutti accettati; ha invece avuto l'intenzione di facilitare l'interpretazione dei risultati trovati col metodo di Bonsignore e coll. (3) rendendo possibile il confronto coi risultati ottenuti col metodo europeo (2).

Ci siamo prefissi inoltre l'intento di dare delle indicazioni di ordine tecnico e metodologico, in particolare sulla stabilità del colore e sull'uso di substrati forniti da ditte diverse.

Riteniamo di aver soddisfatto ad alcune domande, mai sufficientemente puntualizzate.

## RIASSUNTO

Sono stati confrontati il metodo di Bon-signore et al. e il metodo standardizzato europeo per la determinazione dell'attività ALA D eritrocitaria. Col metodo europeo si ottengono valori mediamente più elevati di 2,5 volte quando entrambi i risultati siano espressi in mU/ml. L'uso di un fattore di conversione dalle U Bonsignore alle mU/ml è stato raccomandato al fine di poter comparare i risultati ottenuti con le due meto-diche. Altre variabili metodologiche sono di-scusse nel testo.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALESSIO L., BERTAZZI P.A., CORTONA G.: Mo-nitoraggio biologico di lavoratori esposti a piombo. Utilità e limiti degli indicatori di dose interna e di effetto biologico precoce. Atti del Convegno: « Aggiornamento sul monitoraggio biologico di soggetti professionalmente esposti a piombo ». Milano, 30.6.1977. *Med. Lavoro*, 69, 6 (1978).
2. BERLIN A., SCHALLER K.H.: European stan-dardized method for the determination of delta aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 12, 389 (1974).
3. BONSIGNORE D., CALISSANO P., CARTASEGNA C.: Un semplice metodo per la determinazione della delta aminolevulinico deidratasi nel sangue. Comportamento dell'enzima nell'intossicazione saturnina. *Med. Lavoro*, 56, 199 (1965).
4. GIBSON K.D., NEUBERGER A., SCOTT J.J.: The purification and properties of delta aminolevu-linic acid dehydratase. *Biochem. J.*, 61, 618 (1955).
5. HEIMEYER L.: Neue Ergebnisse der Porphyrinsoffwechsel Forschung. *Mediz. Wochenschrift*, 105, 277 (1963).
6. HERBER R.F.M., SALLÉ H.J.A.: On the value of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity as predictor for lead in blood. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 41, 147 (1978).
7. LICHTMAN H.C., FELDMAN F.: In vitro pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency. *J. Clin. Invest.*, 42, 830 (1963).
8. MOLÈ R., PESARESI C.: Il comportamento del- l'ALA deidrasi nel saturnismo umano e sperimen-tale. *Folia Med.*, 47, 73 (1964).
9. NIKKANEN J., HERNBERG S., TOLA S.: Modifi-cations of the delta aminolevulinic acid dehy-dratase test and their significance for assessing different intensities of lead exposure. *Work Environ. Health*, 9, 46 (1972).
10. PRPIC-MAJIC D., MUELLER P.K., LEW V.C., TWISS S.: Delta aminolevulinic acid dehydra-tase (ALAD) stability in human blood. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 34, 315 (1973).
11. RUBINO G.F.: The role of lead in porphyrin metabolism. *Panminerva Med.*, 4, 340 (1962).