

ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA EN MUESTRAS DE SANGRE ENTERA DE DISTINTAS ESPECIES ANIMALES SOMETIDAS A DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Cholinesterase stability of whole blood samples from diverse animal species under different storage conditions

Tecles F., Gutiérrez C., Cerón J.J.

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 30100 Espinardo, Murcia. ESPAÑA.

Autor de referencia: José Joaquín Cerón

Teléfono: 968 364722

E-mail: jjceron@um.es

RESUMEN

En el presente trabajo se pretende estudiar la estabilidad de la actividad colinesterasa en muestras de sangre entera de diferentes especies animales, y determinar aquellas condiciones de almacenamiento que permitan conservar la actividad de la enzima durante el mayor tiempo posible. Muestras de sangre entera de las especies canina, equina y ovina fueron almacenadas, sin diluir o diluidas al 1:50 en agua destilada, a tres temperaturas diferentes: 25°, 4° y -20° C. La actividad colinesterasa se determinó el día de obtención de las muestras y después de 1 día, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses y 6 meses de almacenamiento, utilizando una adaptación del método de Ellman para el espectrofotómetro automático Coulter Profile Analyzer. Simultáneamente, muestras de sangre entera canina fueron congeladas y descongeladas una vez al día durante cinco días seguidos, con el fin de evaluar su efecto sobre la colinesterasa. La máxima estabilidad de la colinesterasa se observó al conservar la sangre a -20° C en el caso de las especies canina y ovina, y a 4° C en la especie equina. La dilución de las muestras provocó una rápida pérdida de actividad si el almacenamiento se producía a 25° ó 4° C; a -20° C la dilución de la sangre proporcionó mayor estabilidad en la especie ovina, menor en la equina, y similar a la sangre no diluida en la especie canina. Las sucesivas congelaciones y descongelaciones de las muestras de sangre no afectaron de forma significativa a la actividad de la enzima.

Key Words: estabilidad, colinesterasa, sangre, almacenamiento

ABSTRACT

In this work, study of cholinesterase stability in whole blood samples from different animal species and determination of storage conditions that allow maximum enzyme conservation is pretended. Canine, equine and ovine whole blood samples were stored at 25°, 4° and -20° C with and without previous dilution in distilled water at 1:50 dilution degree. Cholinesterase activity was monitored at the same day of samples collection and 1 day, 3 days, 1 week, 2 weeks, 1 month, 3 months and 6 months of storage, using the adapted Ellman method for an automated spectrophotometer (Coulter Profile Analyzer). Simultaneously, canine whole blood samples were frozen and thawed once a day during five consecutive days, in order to evaluate the effect on cholinesterase activity. Maximum cholinesterase stability was observed when whole blood was stored at -20° C in canine and ovine samples, and at 4° C in equine samples. Rapid lose of cholinesterase activity was observed at 25° and 4° C in diluted blood; whereas dilution yielded higher stability in ovine, lesser in equine, and similar to non-diluted samples in canine blood. Successive whole blood freezing and thawing did not significantly affect enzyme activity.

Key words: stability, cholinesterase, blood, storage

INTRODUCCIÓN

Las colinesterasas son enzimas que se engloban dentro de la subclase B de las esterasas, y que se encargan de catalizar la hidrólisis de los ésteres de la colina (Silver 1974). En los mamíferos, existen fundamentalmente dos enzimas con actividad colinesterasa: (a) acetilcolinesterasa o colinesterasa verdadera (AChE, EC 3.1.1.7), presente en el tejido nervioso y en la membrana eritrocitaria, que tiene por función hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas, una vez se ha transmitido el impulso nervioso; (b) butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8), que se encuentra en el plasma y en una gran variedad de tejidos, y cuya función orgánica es desconocida (Wills 1972).

Aunque la colinesterasa puede ser analizada en un gran número de tejidos orgánicos, su determinación en sangre entera ha demostrado presentar una serie de ventajas, como son la facilidad en obtención y manejo de las muestras, la posibilidad de analizar AChE y BChE en la misma muestra sin necesidad de separar plasma y eritrocitos, la utilización de un volumen reducido de muestra, y la falta de interferencia de la hemólisis en los análisis espectrofotométricos (Tecles *et al.* 2000).

La principal utilidad clínica de la determinación de colinesterasa consiste en detectar la exposición de los animales a insecticidas organofosforados y carbamatos. Estos insecticidas se utilizan de manera rutinaria en agricultura para el control de plagas, o sobre los animales domésticos para la eliminación de ectoparásitos. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de inhibir a la colinesterasa, uniéndose al centro activo de la enzima de forma reversible (carbamatos) o irreversible (organofosforados) (Silver 1974). De este modo, la detección de valores disminuidos de la colinesterasa es un biomarcador básico y fiable para llegar al diagnóstico de exposición a organofosforados y carbamatos (Harlin y Ross 1990).

La estabilidad de la actividad colinesterasa en muestras de sangre es un aspecto preanalítico muy importante, ya que desde que las muestras son obtenidas hasta que llegan al laboratorio para su análisis puede transcurrir un periodo de tiempo de duración variable. Este retraso entre la recogida de la muestra y su procesamiento resulta problemático, sobre todo si la muestra es recogida a nivel de campo (Jones 1985). Por lo tanto, la temperatura y condiciones de almacenamiento de la sangre son aspectos fundamentales que se deben tener en cuenta. La refrigeración o congelación de las muestras pueden mi-

nimizar el proceso de pérdida de actividad, pero no previenen cambios en la actividad de la enzima tras largos periodos de almacenamiento (Fairbrother *et al.* 1991). Por estos motivos, el propósito de este trabajo consiste en estudiar diferentes condiciones de almacenamiento de las muestras de sangre, con el fin de determinar aquellas que permitan mantener la actividad colinesterasa durante el mayor tiempo posible. Con este fin, se comprobará la estabilidad de la colinesterasa en sangre de tres especies (canina, equina y ovina) a tres temperaturas diferentes (25°, 4° y -20° C), el efecto de la dilución de la sangre previa a su almacenamiento, y las posibles alteraciones de la actividad enzimática después de realizar varias congelaciones y descongelaciones de forma sucesiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos. El cromóforo empleado fue el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma Chemical Co, St Louis, USA) a una concentración final de $0,08 \times 10^{-3}$ M. La disolución tampón-cromóforo se preparó utilizando tampón fosfato 0,1 M y pH 7,5 como diluyente.

Los sustratos empleados fueron: acetiltiocolina iodada (ATCI, Sigma Chemical Co, St Louis, USA), butiriltiocolina iodada (BTCI, Sigma Chemical Co, St Louis, USA) y propioniltiocolina iodada (PTCI, Sigma Chemical Co, St Louis, USA). La concentración final de cada sustrato en el medio de reacción fue de 1×10^{-3} M. Las disoluciones de los diferentes sustratos se prepararon utilizando agua destilada como diluyente.

Obtención y preparación de las muestras. La sangre se obtuvo a partir de 10 animales adultos de tres especies: canina (raza Braco alemán), equina (mestizos de raza Española) y ovina (raza Segureña). Los animales estaban sanos y libres de exposición a compuestos organofosforados o carbamatos. La toma de muestras se realizó por punción de la vena cefálica en los individuos de la especie canina, y en la yugular

en las especies equina y ovina, empleándose heparina como anticoagulante. La sangre de los diferentes individuos de cada especie fue mezclada, de modo que se obtuvieron mezclas homogeneizadas de sangre entera, una para cada especie. Estos homogeneizados de sangre fueron separados en alícuotas de 1 ml, con las que se formaron tres grupos, de modo que cada grupo fue almacenado a una temperatura diferente: 25°, 4° y -20° C.

Simultáneamente, a partir de cada mezcla de sangre se preparó una dilución al 1:50, utilizando agua destilada como diluyente. Las diluciones de sangre obtenidas fueron almacenadas en tres grupos compuestos por alícuotas de 1 ml, utilizando una temperatura diferente para cada grupo: 25°, 4° y -20° C.

La actividad colinesterasa se determinó en cada mezcla de sangre entera el mismo día de su obtención (día 0). Los análisis se repitieron en las muestras conservadas después de 1 día, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses y 6 meses de almacenamiento, utilizando en cada ocasión 5 alícuotas nuevas de cada grupo almacenadas desde el día cero. Antes de su análisis, las muestras de sangre que no habían sido previamente diluidas se diluyeron con agua destilada, utilizando un grado de dilución 1:50, siguiendo las recomendaciones de Cerón *et al.* (1999).

Efecto de congelación y descongelación sucesiva de las muestras de sangre. A partir de la mezcla de sangre de perro heparinizada, se prepararon tres grupos compuestos por cinco alícuotas de sangre entera diluidas en agua destilada al 1:50, y otros tres grupos de cinco alícuotas de sangre entera sin diluir. La actividad colinesterasa se determinó en cada uno de los grupos. Posteriormente, las alícuotas fueron congeladas a una temperatura de -20° C. Una vez al día, durante cinco días seguidos, las muestras fueron descongeladas utilizando tres temperaturas de descongelación diferentes: 60°, 25° y 4° C (por cada temperatura se descongelaron un grupo de sangre entera diluida y otro grupo sin

diluir). La actividad colinesterasa fue determinada después de cada descongelación.

Determinación de colinesterasa. Los análisis se realizaron mediante una adaptación del método de Ellman (Ellman *et al.* 1961) descrita por Cerón *et al.* (1996) para el espectrofotómetro automático Coulter Profile Analyzer (Coulter Scientific, Margency, Francia).

Siguiendo las recomendaciones de Tecles y Cerón (2001), como sustratos de la enzima se utilizaron ATCI y BTCl en las muestras de la especie canina; ATCI, BTCl y PTCl en las muestras de la especie equina; y ATCI para los análisis realizados en sangre de oveja.

La actividad colinesterasa se expresó como los micromoles de sustrato hidrolizados/ml de sangre/min, y fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Actividad final} = \Delta_{405}/\text{min} \times 0,808 \times \text{dilución inicial}$$

Donde:

- Δ_{405}/min es el incremento de absorbancia a 405 nm de longitud de onda por minuto.
- El factor de conversión 0,808 es igual a $(1000/13600 \times 1) \times (275/25)$, donde: 1000 es un factor de conversión de $\mu\text{mol/ml}$ a mol/ml , 13600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (producto de reacción entre el DTNB y los ésteres de la colina) a 405 nm de longitud de onda, 1 es la longitud de la cubeta de reacción en cm, y 275/25 es la dilución en la cubeta.

Se calcularon dos blancos: el primero constituido por sustrato y cromóforo, con el fin de monitorizar la hidrólisis no enzimática del sustrato, y el segundo por cromóforo y muestra, para evaluar la reacción entre el cromóforo y el glutatión (actividad no enzimática). La actividad colinesterasa fue corregida tras la sustracción de ambos blancos.

Estudio estadístico. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Los valores

medios obtenidos se compararon mediante un análisis de rango múltiple. El nivel de significación empleado fue de 0,05. Todos los cálculos se realizaron con el programa informático Statgraphics (Statistical Graphics Corp, Rockville, MD, USA).

RESULTADOS

Estabilidad de la actividad colinesterasa en sangre conservada a diferentes temperaturas

Estabilidad de la colinesterasa en sangre de perro. Los resultados obtenidos durante el ensayo con sangre de perro aparecen en la Figura 1. Las muestras de sangre diluidas, cuando se conservaron a 25° C permanecieron 3 días sin cambios estadísticamente significativos al ser analizadas con BTCl, mientras que con ATCI se observaron cambios significativos a las 24 horas de almacenamiento. A 4° C, no aparecieron oscilaciones significativas de actividad durante 2 semanas con BTCl, mientras que con ATCI se observaron a las 24 horas. La actividad colinesterasa de las muestras conservadas a -20° C no presentó cambios significativos durante un mes.

En las muestras de sangre no diluidas, la actividad colinesterasa se mantuvo sin oscilaciones estadísticamente significativas durante dos semanas a 25° C; después de un mes a esta temperatura, las muestras no pudieron volver a ser analizadas debido a que coagularon. A 4° C, la actividad colinesterasa permaneció sin cambios significativos durante 2 semanas, y las muestras coagularon a los tres meses de su almacenamiento. En las muestras conservadas a -20° C, la actividad colinesterasa no presentó cambios significativos después de un mes al analizarse con ATCI, y 3 meses al utilizar BTCl como sustrato.

Estabilidad de la colinesterasa en sangre de caballo. Los resultados obtenidos durante el ensayo con sangre de caballo aparecen en la Figura 2. La actividad colinesterasa de las mues-

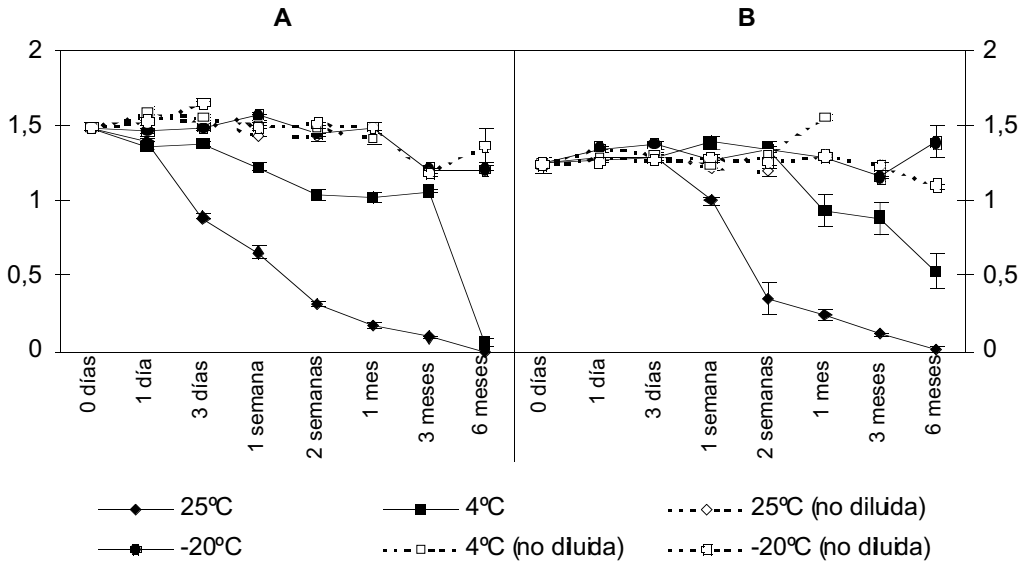


FIGURA 1. Estabilidad de la actividad colinesterasa (en $\mu\text{mol/ml/min}$) en sangre entera de la especie canina bajo diferentes condiciones de almacenamiento: A) actividad colinesterasa con el sustrato acetiltiocolina iodada; B) actividad colinesterasa con el sustrato butiriltiocolina iodada.

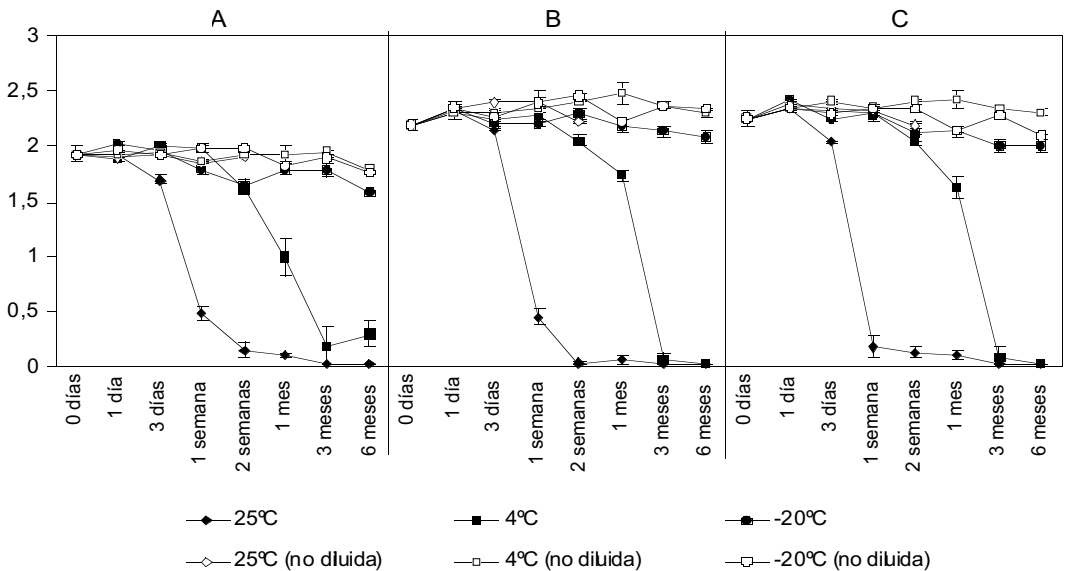


FIGURA 2. Estabilidad de la actividad colinesterasa (en $\mu\text{mol/ml/min}$) en sangre entera de la especie equina bajo diferentes condiciones de almacenamiento: A) actividad colinesterasa con el sustrato acetiltiocolina iodada; B) actividad colinesterasa con el sustrato butiriltiocolina iodada; C) actividad colinesterasa con el sustrato propioniltiocolina iodada.

tras de sangre diluidas presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) después de 24 horas de almacenamiento a 25° C. En las muestras conservadas a 4° C no aparecieron oscilaciones significativas durante una semana. En las muestras congeladas, no se observaron diferencias significativas durante 1 semana al utilizar ATCI como sustrato, 1 mes con BTCl y 2 semanas con PTCl.

La actividad colinesterasa de las muestras no diluidas permaneció sin cambios estadísticamente significativos durante 2 semanas de almacenamiento a 25° C. Después de un mes, las muestras coagularon y no pudieron volver a ser analizadas. A 4° C, las muestras fueron analizadas durante 6 meses sin que se observasen cambios significativos en la actividad de la enzima. A -20° C, la colinesterasa no mostró oscilaciones significativas durante 2 semanas al utilizar los sustratos ATCI y PTCl, mientras que sí aparecieron a las 24 horas con BTCl.

Estabilidad de la colinesterasa en sangre de oveja. Los resultados obtenidos durante el ensayo con sangre de oveja aparecen en la Figura 3. Las muestras diluidas mantuvieron su actividad colinesterasa sin cambios estadísticamente significativos durante 1 semana a 4° C y 6 meses a -20° C, y las muestras no diluidas durante 3 días a 25° C, 1 semana a 4° C y 2 semanas a -20° C.

Efecto de sucesivas congelaciones y descongelaciones de muestras de sangre entera

Los resultados de este ensayo aparecen reflejados en la Figura 4. No se apreciaron cambios estadísticamente significativos en la actividad colinesterasa después de 5 congelaciones y descongelaciones sucesivas de muestras de sangre entera de perro diluidas y sin diluir, aunque la descongelación se realizase a 60°, 25° o 4° C.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este ensayo pusieron de manifiesto diferencias en la capacidad

de conservación de la colinesterasa en sangre entera dependiendo de las condiciones de almacenamiento empleadas.

A temperatura ambiente (25° C), la actividad colinesterasa permaneció estable durante 2 semanas en la sangre de perro y de caballo, y sólo 3 días en la sangre ovina. Así, estas condiciones podrían utilizarse para un almacenamiento a corto plazo de la sangre canina y equina. No obstante, el riesgo de coagulación de la sangre es muy elevado, por lo que no se recomienda la conservación de la sangre a temperatura ambiente durante periodos muy prolongados.

En refrigeración (4° C), la estabilidad de la colinesterasa canina no sobrepasó las dos semanas de almacenamiento. La colinesterasa de la especie equina permaneció estable durante un mínimo de 6 meses, presentando una oscilación máxima de un 11,2% durante el periodo de duración del ensayo. Estos resultados contradicen estudios anteriores, que describieron un rápido descenso de la actividad colinesterasa en muestras de sangre equina sometidas a similares condiciones (Plumlee *et al.* 1994). En la especie ovina, la colinesterasa únicamente permaneció estable durante una semana. En base a estos datos, la refrigeración de sangre entera sería un buen método de conservación a largo plazo en el caso de la especie equina. Sin embargo, en las especies canina y ovina la refrigeración podría ser adecuada para un almacenamiento a corto plazo, como en el transporte de las muestras al laboratorio, de acuerdo con los resultados descritos por Witter *et al.* (1963).

En congelación (-20° C), la colinesterasa canina permaneció estable durante un mes con una oscilación de un 9,1%, alcanzando hasta un 28% a los seis meses. En la especie equina, aunque el estudio estadístico reveló cambios significativos, la variación máxima detectada fue de un 10,6% en los seis meses de duración de este trabajo, similar a la observada en refrigeración. Y en la especie ovina, las muestras congeladas presentaron una variación máxima de un 14,1% en los seis meses de duración del estu-

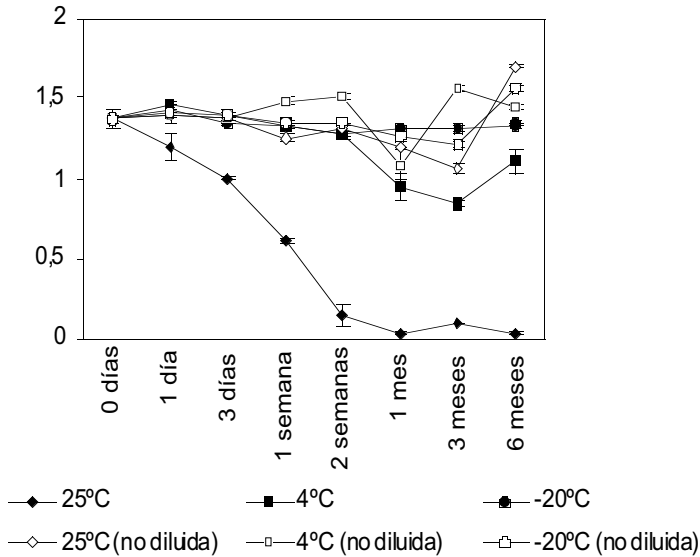


FIGURA 3. Estabilidad de la actividad colinesterasa (en $\mu\text{mol/ml/min}$) en sangre entera de la especie ovina bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Se utilizó el sustrato acetiltiocolina iodada.

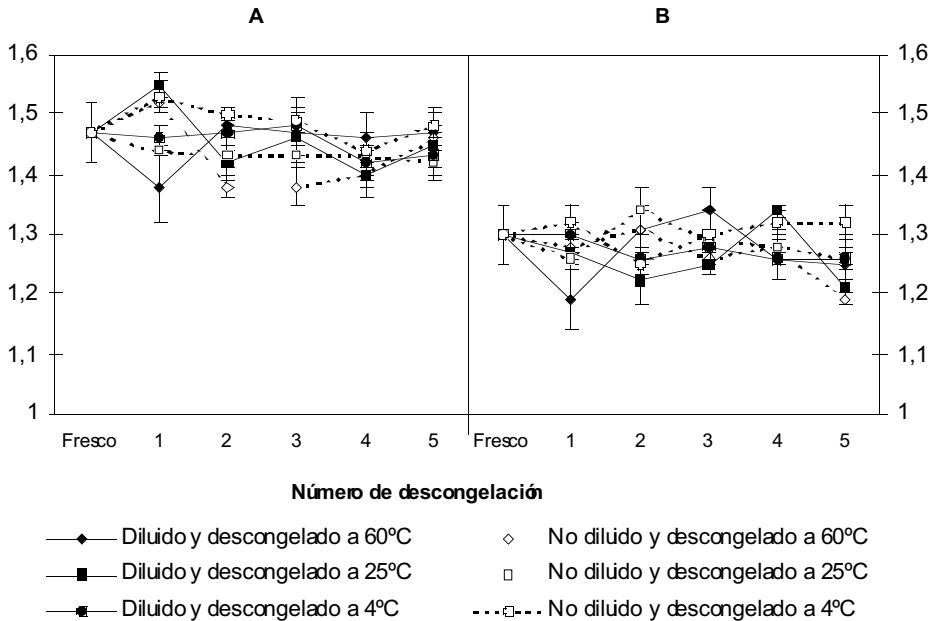


FIGURA 4. Estabilidad de la actividad colinesterasa (en $\mu\text{mol/ml/min}$) en sangre entera de la especie canina, diluida y no diluida, después de cinco congelaciones y descongelaciones (a 60°, 25° y 4° C) sucesivas: A) actividad colinesterasa con el sustrato acetiltiocolina iodada; B) actividad colinesterasa con el sustrato butiriltiocolina iodada.

dio, resultando una mayor estabilidad que la indicada por Jones (1985). Dado lo anteriormente expuesto, la congelación resultaría como un método de conservación de la colinesterasa en sangre entera más adecuado a largo plazo que la refrigeración en la especie ovina, mientras que en la especie canina sólo permitiría una estabilidad de un mes, y en la especie equina proporcionaría similar estabilidad que la refrigeración. En un estudio realizado por Halbrook *et al.* (1992) con sangre bovina, se encontró mayor estabilidad si el almacenamiento tenía lugar a 4° C que a -20° C. Estos autores llegaron a la conclusión de que los cambios observados en la colinesterasa de la sangre congelada se debían a oscilaciones de la temperatura que se producen en los aparatos congeladores. De este modo, sería recomendable realizar estudios más exhaustivos para determinar el posible efecto que la congelación puede provocar sobre la integridad de las proteínas.

La dilución de la sangre provocó una rápida pérdida de actividad en las muestras de todas las especies conservadas a 4° o 25° C. Este fenómeno no se observó de forma clara cuando el almacenamiento tuvo lugar a -20° C, encontrándose diferencias entre especies a esta temperatura: a) en la especie canina las muestras diluidas permanecieron sin cambios significativos durante un mes con una variación de un 9,4%, alcanzando un 23% a los seis meses, por lo que su estabilidad resultó similar a la de la sangre no diluida; b) en la especie equina los resultados de estabilidad de la colinesterasa fueron más variables (se observaron cambios significativos después de dos semanas al analizar las muestras con ATCI y PTCI, y a las 24 horas con BTCI), y la oscilación máxima encontrada durante los seis meses de duración del ensayo fue de un 21,7% (aproximadamente el doble que para la sangre no diluida); c) en la sangre ovina no se detectaron cambios significativos durante seis meses, apareciendo una oscilación máxima de un 10,5% durante ese tiempo, por lo que se obtuvo mayor estabilidad

que con sangre no diluida. En un estudio realizado por Meuling *et al.* (1992) se apreció una mayor estabilidad de la colinesterasa en sangre entera de la especie humana si las muestras eran diluidas antes de su congelación, hecho que en nuestro estudio únicamente se ha observado en la sangre ovina.

Las cinco congelaciones y descongelaciones sucesivas de las muestras de sangre canina, diluidas o no diluidas, no afectaron significativamente a la actividad colinesterasa. En las muestras diluidas se apreció una oscilación máxima de un 11,1%, siendo de un 5,9% en las muestras no diluidas. Aunque no se han hallado estudios similares realizados en sangre entera, Turner *et al.* (1984) no encontraron cambios significativos después de cinco congelaciones y descongelaciones sucesivas de muestras de plasma humano.

Los datos aportados en este trabajo indican que la congelación, y en el caso de la especie equina la refrigeración, de sangre entera no diluida son los métodos de conservación que permiten mantener la actividad colinesterasa durante periodos de tiempo más prolongados. Finalmente, se ha demostrado que pueden realizarse sucesivas congelaciones y descongelaciones de las muestras de sangre, dado que la actividad de la enzima no se ve significativamente afectada por estos procesos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren mostrar su agradecimiento a José Zilberchstein y a María Dolores Parra por la ayuda prestada en la obtención de las muestras de sangre.

BIBLIOGRAFÍA

Cerón J.J., Fernández M.J., Bernal L., Gutiérrez C. 1996. Automathed spectrophotometric method using 2,2'-Dithiodipyridine acid for determination of ChE in whole blood. *J. AOAC. Int.* 79: 757-763.

- Cerón J.J., Tecles F., Espín J.C. 1999. Comparison of different diluents and chromophores for spectrophotometric determination of livestock blood cholinesterase activity. *Res. Vet. Sci.* 67: 261-266.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Fairbrother A., Marden B.T., Bennett J.K., Hooper M.J. 1991. Methods used in determination of cholinesterase activity. En: *Cholinesterase-inhibiting Insecticides. Their impact on Wild Life and the Environment*, pp. 35-71. Eds. Mineau P. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam. Holanda. 348 pp.
- Halbrook R.S., Shugart L.R., Watson A.P., Munro N.C., Linnabary R.D. 1992. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure. *J. Vet. Med. Assoc.* 202: 714-725.
- Harlin K.S., Ross P.F. 1990. Enzymatic-Spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *J. AOAC. Int.* 73: 616-619.
- Jones D.G. 1985. Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood. *Res. Vet. Sci.* 38: 301-306.
- Meuling W.J.A., Jongen M.J.M., Van Hemmen J.J. 1992. An automated method for the determination of acetyl and pseudo cholinesterase in hemolized whole blood. *Am. J. Ind. Med.* 22: 231-241.
- Plumlee K.H., Richardson E.R., Gardner I.A., Galey F.D. 1994. Effect of time and storage temperature on cholinesterase activity in blood from normal and organophosphorus insecticide treated horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 247-249.
- Silver A. 1974. *Frontiers of Biology*. Vol 36, American Elsevier Publishing CO. Inc. New York. USA. 596 pp.
- Tecles F., Martínez Subiela S., Bernal L.J., Cerón J.J. 2000. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *Vet. J.* 160: 242-249.
- Tecles F., Cerón J.J. 2001. Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. *Res. Vet. Sci.* 70: 233-238.
- Turner J.M., Hall R.A., Whittaker M., Kricka L.J. 1984. Effects of storage and repeated freezing and thawing on plasma cholinesterase activity. *Ann. Clin. Biochem.* 21: 363-365.
- Wills J.H. 1972. The measurement and significance of changes in the cholinesterase activities on erythrocytes and plasma in man and animals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* March: 153-201.
- Witter R.F. 1963. Measurement of blood cholinesterase. *Arch. Environ. Health.* 6: 537-563.