Un caso di macrolattatodeidrogenasemia

Maddalena Marini, Maria Gabriella Anselmi, Maria Stella Graziani
Laboratorio Analisi, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

ABSTRACT

A case of macrolactatedehydrogenasemia. We present here the detection of a lactate dehydrogenase (LDH) macroenzyme in the blood of an apparently healthy female. The finding of an increased LDH activity during routine biochemical investigations led to a number of further laboratory and imaging examinations. When the diagnostic problem was finally posed to the laboratory consultant, a serum treatment with polyethylene glycol and an isoenzyme electrophoretic separation allowed to demonstrate the presence of a circulating macroenzyme. Macroenzymes have been described from almost 50 years, but despite many efforts it was difficult to recognize a pathogenetic role. Their recognition is, however, important in order to avoid expensive and cumbersome procedures to explain elevated enzyme values.

INTRODUZIONE

L'interessante recente editoriale di Plebani e Wu sui macroenzimi (1) ci ha richiamato alla memoria un caso di macrolattatodeidrogenasemia (macroLDH) occorso alla nostra attenzione qualche tempo fa, che ha richiesto adeguati e specifici accertamenti per essere riconosciuto. I macroenzimi sono enzimi con un PM più elevato rispetto all'enzima che si trova fisiologicamente in circolo, dovuti ad autopolimerizzazione oppure ad associazione con altre componenti plasmatiche, più comunemente immunoglobuline (1, 2). I meccanismi ipotizzati per spiegare l'esistenza dei macroenzimi dovuti a legame con le immunoglobuline, che sono classificati tra gli autoanticorpi, sono essenzialmente l'"antigen driven theory" e la "dysregulation of immune tolerance theory" (1). Nel primo caso, una modifica di un antigene "self" lo rende riconoscibile da un anticorpo inizialmente formatosi contro un antigene estraneo; questo modello è stato utilizzato per spiegare la formazione di macrocomplessi con enzimi derivati da tessuti danneggiati, come ad esempio creatinchinasi (CK) o LDH. L'altra ipotesi è stata formulata per spiegare la coincidenza dei macroenzimi con malattie autoimmuni. Spesso il legame con le immunoglobuline porta a una concentrazione plasmatica elevata dell'attività enzimatica per meccanismi che possono essere ricondotti a rallentata "clearance" e/o ridotta inattivazione dell'attività enzimatica (1-3).

Macrocomplessi sono stati nel tempo descritti praticamente per tutti gli enzimi comunemente misurati nel laboratorio clinico: amilasi, CK, fosfatasi alcalina, aspartato amminotransferasi e LDH, ma esiste in letteratura scarsa o nulla evidenza che i macroenzimi siano legati a situazioni patologiche (1-5). In particolare, non è mai stato chiarito se la loro presenza sia causa di malattia o se possano semplicemente essere marcatori di qualche condizione patologica. Tuttavia, dato che la misura della loro attività non li distingue dagli enzimi non complessati, evidenziare la loro presenza può essere utile nei casi di attività enzimatiche inaspettatamente elevate per indirizzare correttamente la diagnosi ed evitare ulteriori fastidiosi, costosi e inutili accertamenti diagnostici.

LDH è un enzima tetramerico che catalizza la reazione reversibile di piruvato a lattato nella fase finale della glicolisi; è composto da 4 catene peptidiche di due diverse subunità (H e M), la cui sintesi è sotto il controllo di due diversi geni. L'attività enzimatica totale misurabile nel siero raggruppa l'attività di 5 isoenzimi, da LDH1 a LDH5, che sono differenziabili sulla base della loro composizione in subunità. LDH è un enzima citoplasmatico che è presente in molti tessuti; elevati livelli plasmatici si ritrovano perciò a seguito di danni a numerosi organi. L'aumento dell'attività di LDH è tuttavia di limitato aiuto nella diagnostica differenziale a causa della sua mancata specificità d'organo (6). In passato, si era cercato di aumentare la specificità diagnostica di LDH utilizzando la separazione isoenzimatica; nemmeno questo ha tuttavia portato a risultati significativi e al momento le indicazioni per la misura dell'enzima sono poco chiare e limitate al sospetto di anemia emolitica, al monitoraggio delle malattie neoplastiche e dei trapianti d'organo (6).

Corrispondenza a: Maddalena Marini, Laboratorio Analisi Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Piazzale Stefani 1, 37126 Verona. Tel. 0458122155, Fax 0458123562, E-mail maddalena.marini@ospedaleuniverona.it

Ricevuto: 15.07.2011 Revisionato: 01.09.2011 Accettato: 05.09.2011

CASO CLINICO

Il soggetto considerato era una donna di 46 anni inviata dal medico di Medicina Generale all'ambulatorio del nostro ospedale per accertamenti legati al monitoraggio biochimico di una terapia antiipertensiva. Gli esami richiesti includevano i più comuni analiti di chimica clinica ed ematologia, con risultati tutti all'interno dei rispettivi intervalli di riferimento, ad eccezione della LDH che risultava 395 U/L (intervallo di riferimento: 100-210 U/L). La misura dell'attività catalitica di LDH era eseguita su plasma eparinato e la possibile contaminazione da LDH piastrinica evitata mediante centrifugazione in linea su Workcell StreamLab (Siemens Diagnostics). L'attività enzimatica totale era determinata su Dimension RxL (Siemens Diagnostics) secondo le indicazioni del produttore (7); al tempo in cui i campioni sono stati analizzati (2008), il metodo adottato in laboratorio non era standardizzato al sistema di riferimento IFCC (8).

Dopo il primo riscontro, la signora era inviata ancora dal suo medico curante presso il nostro laboratorio per successivi ulteriori controlli ad intervalli di qualche mese, nei quali i valori di LDH si confermavano sempre intorno a 400 U/L (Figura 1), mentre gli altri esami ematochimici risultavano sempre nei limiti di riferimento. Nella ricerca delle cause degli elevati livelli di LDH, la paziente è stata sottoposta in successione a ecografia addominale, gastroscopia, visita cardiologia ed ecocardiogramma, tutti con esito negativo. Solo in seguito a questi accertamenti negativi, il medico curante si è rivolto al laboratorio per una consulenza, che ha posto il sospetto di macroLDH.

Gli isoenzimi LDH sono stati frazionati mediante elettroforesi su gel di agarosio in tampone alcalino (pH 8,4), utilizzando come substrato NAD^+ e come cromogeno nitro blu di tetrazolio (NTB) e metasolfato di fenazina, secondo le indicazioni del produttore (Sebia Italia). Per l'identificazione del macroenzima è stata utilizzata anche una tecnica di precipitazione con polietilenglicole (PEG) 6000 (9), ben illustrata in una recente rassegna pubblicata su questa rivista (10). Una miscela di 200 µL di campione e 200 µL di PEG (250 g/L) (LDH-PEG) è incubata, dopo adeguato mescolamento, a temperatura ambiente per ~10 min. Analogo trattamento è applicato a una miscela vol:vol di campione e soluzione fisiologica (LDH-FISIO). Dopo centrifugazione (5000 r.p.m. per 6 min) è misurata l'attività enzimatica nel sovranatante. La percentuale di attività enzimatica precipitabile con PEG (%PPA) è calcolata secondo la seguente formula: %PPA = 100 [(LDH-FISIO – LDH-PEG)/LDH-FISIO]. La stessa procedura era applicata ad altri 4 campioni con attività LDH compresa fra 220 U/L e 1750 U/L, scelti fra i campioni pervenuti in laboratorio per la misura di LDH e preventivamente sottoposti a frazionamento isoenzimatico per escludere la presenza di frazioni anomale. Le immunoglobuline IgA, IgG e IgM sono state misurate in nefelometria su Immage 800 (Beckman Coulter) sui sovranatanti al fine di verificare l'efficacia della rimozione delle immunoglobuline da parte del trattamento precipitante.

L'elettroforesi degli isoenzimi LDH della paziente mostrava un quadro inusuale in cui tutte le 5 frazioni erano poco nette con bande diffuse e di alterata mobilità (Figura 2). La misura dell'attività enzimatica sul sovranatante dopo trattamento con PEG era marcatamente diminuita rispetto al sovranatante della miscela con fisiologica: il calcolo con la formula sopra riportata dimostrava che il 98% di LDH era precipitato dopo trattamento con PEG. Nei 4 campioni di controllo, la diminuzione percentuale era molto inferiore (fra 6% e 30%), in sostanziale accordo con i limiti di riferimento recentemente pubblicati per il recupero dell'attività LDH dopo precipitazione con PEG 6000 (9, 11). Nel campione della paziente la precipitazione con PEG 6000 riduceva notevolmente anche la concentrazione delle immunoglobuline nel sovranatante: IgA –45%, IgG –89% e IgM –93%, rispettivamente.

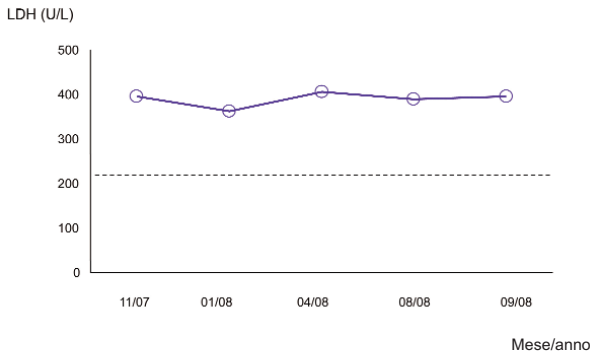


Figura 1
Attività catalitica della lattatodeidrogenasi (LDH) del soggetto studiato durante il periodo di osservazione: si evidenzia la sostanziale stabilità della concentrazione enzimatica.
Il limite superiore di riferimento è evidenziato dalla linea tratteggiata.

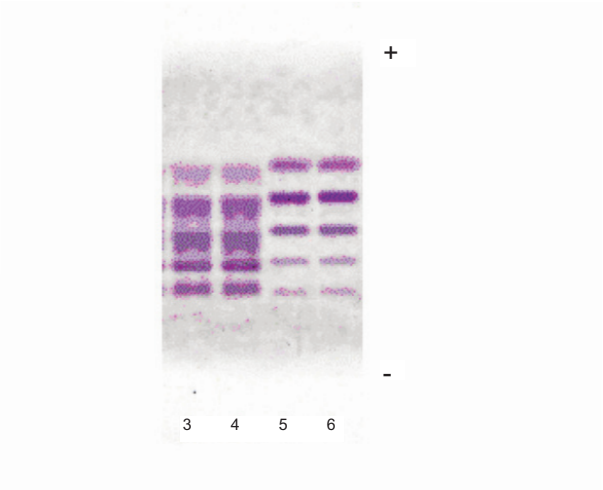


Figura 2
Frazionamento isoenzimatico della lattatodeidrogenasi: corsie 3 e 4, siero della paziente; corsie 5 e 6, campioni di controllo.

DISCUSSIONE

Macroenzimi sono stati descritti per tutti gli enzimi che si misurano comunemente nel laboratorio clinico. Sebbene non sia mai stata identificata una loro definitiva associazione con condizioni cliniche specifiche e non siano mai stati riconosciuti come marcatori di malattia, essi possono interferire con l'interpretazione della misura degli enzimi plasmatici e, se non riconosciuti, condurre a errori diagnostici oppure indurre accertamenti indaginosi, costosi e ansiogeni per il paziente (1-5). Il caso qui presentato illustra bene questo problema: infatti, in seguito all'evidenziazione di un'elevata attività di LDH, la paziente è stata sottoposta a numerosi accertamenti diagnostici prima che il laboratorio fosse interpellato.

Il percorso diagnostico seguito, che ha portato all'identificazione della macroLDH, è iniziato dalla separazione elettroforetica degli isoenzimi, il cui quadro simile a quello segnalato da altri Autori (2, 9) ci ha indotto a verificare la presenza del macrocomplesso con la precipitazione con PEG. La macroLDH può infatti presentarsi al tracciato elettroforetico in forme diverse: un anormale numero di bande, una modifica della posizione elettroforetica dei diversi isoenzimi oppure un allargamento di una o più delle normali frazioni isoenzimatiche. La precipitazione con PEG, alle concentrazioni utilizzate, è relativamente specifica per la frazione globulinica del siero e quindi virtualmente tutte le immunoglobuline vengono rimosse (9); la riduzione dell'attività enzimatica nel sovranatante in seguito alla precipitazione delle immunoglobuline ha confermato la presenza del macrocomplesso enzima-immunoglobulina.

Una semplice precipitazione con PEG può quindi far sospettare la presenza di un macroenzima, anche se è sempre consigliabile, all'interno di questo percorso diagnostico, utilizzare più tecniche e far seguire alla precipitazione con PEG il frazionamento isoenzimatico elettroforetico. Quest'ultimo metodo è spesso non disponibile in laboratorio e quindi la precipitazione con PEG, anche se con alcuni limiti (9, 11-13), può senza dubbio essere utile come approccio orientativo. Un ulteriore elemento che può far propendere per la presenza di un macroenzima è la costanza della concentrazione della attività enzimatica nel tempo, come è stato riscontrato nel caso in questione.

Il caso qui descritto non presenta caratteri di peculiarità rispetto ad altri precedentemente pubblicati; tuttavia, la sua segnalazione ci è sembrata utile perché consente, ancora una volta, di evidenziare il ruolo del laboratorio nel percorso diagnostico di questa condizione che, sebbene non sia provato che costituisca un problema per la salute del paziente, è spesso fonte, quando non riconosciuta, di accertamenti diagnostici non necessari che possono comportare disagi per il paziente e sprechi di risorse per la comunità.

Una considerazione finale va riservata al problema della appropriatezza delle richieste. Esami richiesti in maniera poco appropriata, senza fondata motivazione clinica, possono facilmente generare risultati "inaspettati", che sono fonte di problemi interpretativi per la soluzione dei quali vengono spesi, poco proficuamente, tempo e risorse. Questo è quanto accaduto nel caso specifico: la richiesta di LDH non trovava fondamento nella condizione clinica della paziente (ipertensione) e ha generato un risultato inatteso che ha provocato poi una serie importante di indagini non necessarie e costose.

BIBLIOGRAFIA

1. Plebani M, Wu AH. Circulating macrocomplexes: old wine in new bottles? Clin Chem Lab Med 2011;49:759-60.
2. Remaley A, Wilding P. Macroenymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. Clin Chem 1989;35:2261-70.
3. Galasso PJ, Litin SC, O'Brien JF. The macroenzymes: a clinical review. Mayo Clin Proc 1993;68:349-54.
4. Briani C, Zaninotto M, Forni M, et al. Macroenzymes: too often overlooked. J Hepatol 2003;38:119.
5. Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. Bratisl Lek Listy 2004;105:260-3.
6. Lothar T. Lactate dehydrogenase (LD). In: Lothar T, ed. Clinical laboratory diagnostics. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl-Ges, 1998:89-94.
7. Gay RJ, McComb RB, Bowers GN. Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. Clin Chem 1968;14:740-53.
8 Infusino I, Ceriotti F, Panteghini M. Standardizzazione in enzimologia clinica: una sfida per la teoria della riferibilità metrologica. Biochim Clin 2010;34:96-102.
9. Davidson DF, Watson DJM. Macroenzyme detection by polyethylene glycol precipitation. Ann Clin Biochem 2003;40:514-20.
10. Panteghini M. Laboratory evaluation of pancreatic diseases. Biochim Clin 2010;34:19-25.
11. Wyness SP, Hunsaker JJH, La'ulu SL. Reference intervals for six enzymes after polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration. Clin Chim Acta 2011;412:1161-2.
12. Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. Ann Clin Biochem 2008;45:233-5.
13. Wyness SP, Hunsaker JJH, La'ulu SL, et al. Detection of macro-creatine kinase and macroamylase by polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration methods. Clin Chim Acta 2011; doi:10.1016/j.cca.2011.01.023.