



Lezione 02 — Fondamenti di diagnostica enzimatica

Sommario

Se la prima lezione ha dato il vocabolario molecolare dell'enzima (catalisi, cinetica, inibizione), questa lezione dà il vocabolario metodologico: come si trasforma un concetto di biochimica in un dato di laboratorio interpretabile? Non introduce un solo enzima nuovo da imparare a memoria — è la lezione più “metodologica” del corso, gli strumenti concettuali con cui ogni enzima specifico verrà letto da Lezione 03 in avanti.

Il filo conduttore è una domanda in due parti: “cosa sto misurando e come lo chiamo” (contesti diagnostici, matrici biologiche, unità di misura, condizioni tecniche) e “perché quel numero è diverso da zero in un paziente malato” (meccanismi di rilascio nel sangue). Un valore enzimatico può avere insieme valore diagnostico (localizza il danno), dinamico (ne descrive l'andamento nel tempo) e prognostico (ne stima l'esito) — tre letture distinte dello stesso dato. La matrice biologica e le condizioni tecniche del dosaggio (substrato saturante, pH, cofattori) non sono dettagli: sono parte della definizione stessa del dato, perché un numero senza queste informazioni non significa nulla. L'Unità Internazionale misura una velocità di reazione standardizzata, non una quantità di proteina. Infine, un enzima intracellulare arriva nel sangue per uno tra quattro meccanismi precisi — necrosi, aumentata permeabilità di membrana, aumentata sintesi/induzione, ridotta clearance — ciascuno con un significato clinico diverso: non ogni aumento enzimatico implica danno cellulare in corso.

1. Contesti diagnostici del dosaggio enzimatico

1.1 Genetico vs acquisito

Il dosaggio di un enzima risponde, nella pratica del veterinario, a due domande concettualmente opposte. Nel contesto genetico il problema non è un eccesso, ma un difetto: l'enzima non viene espresso, oppure viene espresso in una forma strutturalmente alterata e perciò cataliticamente inerte. È un quadro raro nella clinica di tutti i giorni, e tuttavia va isolato subito, perché ribalta la logica con cui si legge il referto: la domanda non è più «quanto è alto rispetto al valore di riferimento», bensì «è presente o assente rispetto all'atteso». Il difetto si definisce genetico in senso stretto perché riconducibile a mutazioni del DNA che colpiscono due bersagli distinti: (i) le regioni promotrici che governano l'espressione genica, con conseguente riduzione della quantità di enzima prodotto; (ii) i residui critici per l'architettura del sito attivo, con perdita di attività a fronte di una proteina comunque sintetizzata. Da questo punto di vista la distinzione non è puramente teorica, poiché nel primo caso la carenza si manifesta come assenza del segnale, mentre nel secondo l'enzima può risultare quantitativamente presente e funzionalmente muto.

L'esempio da manuale è l'ipofosfatasia (deficit di fosfatasi alcalina, approfondita in Lezione 05): qui l'enzima “manca” nel senso funzionale anche quando la sua proteina è presente. Un deficit genetico non produce tipicamente uno zero assoluto, ma un valore stabilmente e marcatamente più basso del range di riferimento per età e specie.

Gli esempi classici del contesto genetico (fenilchetonuria, glicogenosi, ipofosfatasia) vengono tutti dalla medicina umana. Due enzimopatie ereditarie propriamente veterinarie, entrambe a



carico dell'eritrocita, rendono lo stesso concetto immediatamente riconoscibile in clinica dei piccoli animali:

- **Deficit eritrocitario di piruvato chinasi (PK)** — descritto in Basenji, Beagle, West Highland White Terrier e Cairn Terrier, nonché nei gatti Abissino e Somalo. L'eritrocita, privo di mitocondri, dipende esclusivamente dalla glicolisi per produrre ATP: il blocco del suo ultimo passaggio ne riduce la vita media e determina un'**anemia emolitica ereditaria**, di solito cronica e rigenerativa. Il fenotipo non è uniforme: nel cane il quadro può essere grave e complicarsi nel tempo con emosiderosi/emocromatosi e osteosclerosi; nel gatto Abissino e Somalo l'espressione è più variabile, con episodi emolitici intermittenti.
- **Deficit di fosfofruttochinasi (PFK)** — descritto soprattutto nell'English Springer Spaniel e nell'American Cocker Spaniel (la stessa variante del gene *PFKM* è riportata anche in Whippet e in meticci). Coesistono un'emolisi cronica spesso compensata e **crisi episodiche di emolisi intravascolare**, con emoglobinemia, emoglobinuria e bilirubinuria. Il meccanismo delle crisi è caratteristico: eccitazione, esercizio, calore o ansimare prolungato provocano iperventilazione e quindi alcalosi respiratoria transitoria, e gli eritrociti PFK-deficienti hanno un'aumentata **fragilità alcalina** — bastano quei minuti di alcalemia a farli lisare, in un animale che il resto del tempo appare normale.

Due implicazioni metodologiche. La prima: qui l'enzima non si dosa nel siero ma **dentro l'eritrocita**, un'anticipazione concreta della logica di compartimentazione ripresa in § 5.4. La seconda riguarda la conferma diagnostica: nella pratica corrente ci si basa preferenzialmente su **test genetici razza-specifici**, validi però solo per la mutazione validata in quella razza o specie e non trasferibili a un soggetto di razza diversa; la misurazione dell'attività enzimatica eritrocitaria resta la **conferma biochimico-funzionale** — non un test obsoleto, ma un risultato da interpretare insieme al quadro clinico, perché un'intensa reticolocitosi, una trasfusione recente o isoenzimi compensatori possono restituire un'attività apparentemente quasi normale in un soggetto realmente deficitario.

Il **danno acquisito** è di gran lunga il caso più frequente nella pratica clinica veterinaria ed è il filo conduttore di tutto il resto del corso: da Lezione 03 in poi, "enzima elevato" significa implicitamente questo scenario. È importante non confondere "acquisito" con "patologico": anche fattori fisiologici (età, gravidanza, esercizio fisico intenso) o pre-analitici (emolisi) possono produrre un aumento acquisito senza vera patologia — un cane dopo sforzo fisico intenso può mostrare CK moderatamente elevata per pura sollecitazione muscolare, non per danno.

1.2 I tre valori: diagnostico, dinamico, prognostico

Ogni volta che in clinica si guarda un valore enzimatico, ci si sta chiedendo una di tre cose, spesso insieme. Il **valore diagnostico** risponde a "c'è danno, e dove?": deriva da una singola misura (o da un pattern di più enzimi in un unico prelievo). Il **valore dinamico** risponde a "la situazione peggiora o migliora?": richiede necessariamente prelievi seriati nel tempo, spazati in funzione della cinetica dell'enzima considerato (concetto che sarà formalizzato più avanti



come “finestra diagnostica”) — due prelievi troppo ravvicinati per un enzima la cui cinetica si misura in giorni non aggiungono informazione dinamica reale. Il **valore prognostico** risponde a “che esito aspettarsi?”: non è quasi mai fornito da un singolo enzima isolato, ma dalla combinazione di entità dell’aumento, pattern con altri marcatori e andamento nel tempo — un errore comune è dedurre automaticamente una prognosi infausta da un singolo valore molto alto, ignorando che alcuni enzimi a emivita breve possono raggiungere picchi elevati anche in eventi acuti e reversibili.

Davanti a un’ALT elevata, il clinico si pone contemporaneamente tutte e tre le domande — c’è danno epatico? sta peggiorando o migliorando? che prognosi comporta? — ed è la stessa griglia interpretativa che il corso riapplierà identica a ogni enzima specifico da Lezione 03 in avanti.

2. Matrici biologiche e interferenze pre-analitiche

2.1 Dove si dosano gli enzimi

Siero e plasma coprono la quasi totalità dei dosaggi diagnostici enzimatici; le urine servono soprattutto per enzimi a basso peso molecolare filtrati dal glomerulo. Il siero è privo dei fattori della coagulazione (rimossi con la formazione del coagulo), il plasma li contiene ancora — una distinzione irrilevante per la maggior parte degli enzimi diagnostici ma cruciale quando si dosano enzimi della cascata coagulativa, o quando l’anticoagulante interferisce chimicamente con il dosaggio.

Un punto pratico importante: alcuni anticoagulanti (EDTA, citrato, ossalato) chelano il calcio e, per estensione, riducono la disponibilità di altri cationi bivalenti come magnesio o zinco — cofattori di diversi enzimi diagnostici, tra cui la fosfatasi alcalina. Per il dosaggio di enzimi metallo-dipendenti si preferisce quindi siero, o plasma eparinizzato (l’eparina non chela i cationi), piuttosto che plasma EDTA o citrato. In assenza di indicazioni specifiche, il siero resta la scelta di default più sicura, proprio perché privo di additivi chimici potenzialmente interferenti.

Esistono anche matrici alternative, con impieghi però circoscritti. I **versamenti cavitari** (essudati e trasudati addominali o pleurici) si dosano quando la domanda clinica riguarda la cavità stessa, e si interpretano non come valore assoluto ma come **rapporto versamento/siero**: un’attività di lipasi o amilasi nel liquido addominale nettamente superiore a quella sierica orienta verso un’origine pancreatica del versamento (logica ripresa in Lezione 05 con gli enzimi pancreatici). La **saliva** è attraente perché completamente non invasiva e ripetibile senza stress, ma resta prevalentemente una matrice di ricerca: concentrazioni enzimatiche più basse e più variabili che nel siero, e intervalli di riferimento non consolidati nella maggior parte delle specie. Il **latte** appartiene alla medicina della mammella, fuori dal perimetro di questo corso. Il criterio generale conta più dell’elenco: si sceglie una matrice diversa dal siero solo quando risponde a una domanda che il siero non può soddisfare — localizzare un processo in una cavità, valutare direttamente il tubulo renale, ottenere un prelievo non invasivo — mai per comodità.



2.2 Interferenze pre-analitiche: l'indice HIL

Il campione mal gestito produce un dato falso ma perfettamente credibile — l'errore non è visibile nel numero finale. Nei laboratori moderni si parla di **indice HIL**: emolisi, itterizia, lipemia, le tre condizioni ottiche che uno spettrofotometro rileva come anomalie prima ancora della lettura enzimatica vera e propria.

- **Emolisi:** la causa più frequente di AST e LDH inspiegabilmente elevate, spesso dovuta a tecnica di prelievo non ottimale (ago troppo sottile, aspirazione troppo rapida, agitazione violenta della provetta) — falsa completamente il risultato senza alcuna patologia emolitica in corso.
- **Lipemia:** torbidità da trigliceridi elevati, genera diffusione della luce e può sia sovrastimare sia sottostimare il risultato a seconda del metodo.
- **Itterizia:** bilirubina elevata, interferisce per assorbimento cromatico a lunghezze d'onda vicine a quelle usate per molti dosaggi enzimatici.

Tutte e tre alterano la lettura ottica del saggio senza alcuna reale variazione dell'attività enzimatica del paziente. Un quarto fattore, meno spettacolare ma rilevante, è il tempo e la temperatura di conservazione: un siero lasciato troppo a lungo a temperatura ambiente prima della lettura può perdere attività per instabilità intrinseca di enzimi labili — con un effetto opposto all'emolisi, una sottostima falsa invece di una sovrastima falsa.

3. Unità di misura

3.1 Unità Internazionale e katal

L'**Unità Internazionale (U o UI)** è la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di 1 micromole di substrato al minuto, in condizioni standard definite. Il **katal** è l'unità SI (mol/s) ma resta poco usata perché i valori risultano scomodi: 1 U equivale a circa 16,7 nanokatal ($1\text{ U} = 1\text{ }\mu\text{mol/min} = 1/60\text{ }\mu\text{mol/s} \approx 16,7\text{ nmol/s}$). In pratica tutti i referti veterinari italiani riportano UI/L, mai katal — le UI/L danno numeri interi maneggevoli, facili da confrontare a colpo d'occhio con l'intervallo di riferimento. L'unità internazionale, per essere confrontabile tra laboratori diversi, presuppone condizioni di dosaggio standardizzate: due laboratori che dichiarano entrambi "UI/L" ma con metodi non armonizzati possono comunque dare risultati non perfettamente sovrapponibili.

3.2 Espressione clinica e intervallo di riferimento

L'attività si riporta sempre per unità di volume (UI/L, o UI/dL) e si legge sempre contro l'intervallo di riferimento del metodo: non esiste un valore "giusto" assoluto, valido per ogni laboratorio o specie. Tre fattori di variazione da conoscere prima di sospettare una patologia:

1. **Metodo analitico:** substrato usato, temperatura di incubazione, strumentazione e calibrazione diversi possono dare intervalli di riferimento leggermente diversi per lo stesso enzima nella stessa specie.
2. **Specie:** l'intervallo di riferimento è specie-specifico, non universale — il range di un cane non vale per un gatto (l'attività basale di molti enzimi, in particolare la fosfatasi alcalina, varia sensibilmente tra specie).



3. **Età:** in molte specie gli animali giovani in accrescimento mostrano fisiologicamente valori più elevati di alcuni enzimi legati al turnover tissutale attivo — vanno confrontati con range specifici per età, non con il range dell'adulto.

In un referto reale, ogni riga enzimatica è un'attività per volume con il proprio intervallo di riferimento a fianco: enzimi diversi possono avere range di riferimento di ordine di grandezza molto diverso tra loro (decine per alcune transaminasi, migliaia per l'amilasi), promemoria diretto del perché un valore assoluto non ha alcun significato senza il proprio range a fianco. Molti referti segnalano automaticamente i valori fuori range, ma questo non sostituisce la lettura critica: un valore appena sopra soglia e uno dieci volte il limite superiore, segnalati allo stesso modo, possono avere un significato clinico completamente diverso.

4. Condizioni tecniche del dosaggio

Principio guida di questa sezione: si misura una velocità di reazione, quindi bisogna controllare tutto ciò che influenza quella velocità tranne la sola variabile di interesse, la concentrazione di enzima.

4.1 Substrato saturante

Applicazione diretta di Lezione 01: solo in zona di plateau (V_{max}) la velocità di reazione è proporzionale alla concentrazione di enzima, non a quella di substrato — a substrato saturante la reazione si comporta cinematicamente come di ordine zero rispetto al substrato, condizione che un dosaggio ben progettato deve mantenere per tutta la durata della lettura. Ogni saggio diagnostico va quindi progettato con substrato in largo eccesso rispetto alla concentrazione attesa di enzima. Attenzione all'eccesso opposto: alcuni substrati inibiscono ad alte concentrazioni (inibizione da eccesso di substrato, vista in Lezione 01), e la curva ricade invece di restare a plateau — un metodo mal validato può quindi paradossalmente sottostimare l'attività reale.

4.2 pH ottimale

Il pH del saggio è parte della definizione del metodo, non un dettaglio secondario: uno scostamento anche modesto altera la velocità misurata indipendentemente da quanto enzima sia realmente presente. Il motivo biochimico è che il pH influenza lo stato di ionizzazione dei residui amminioacidici del sito attivo, gli stessi gruppi responsabili della catalisi acido-base vista in Lezione 01. Il pH è anche uno strumento di discriminazione: fosfatasi alcalina e fosfatasi acida catalizzano reazioni simili su substrati simili ma hanno pH ottimali diversi (alcalino l'una, acido l'altra) — il tampone del saggio, scegliendo il pH, seleziona quale delle due si sta effettivamente misurando, senza bisogno di separarle fisicamente.

4.3 Cofattori

Se manca il cofattore, l'attività catalitica crolla e il referto sottostima l'enzima indipendentemente da quanto enzima sia realmente presente. **Metalloenzima** è il termine chiave: la fosfatasi alcalina, zinco- e magnesio-dipendente, è l'esempio guida (dettagliata in Lezione 05). Una carenza nutrizionale di questi cationi, o un campione raccolto nella provetta sbagliata (EDTA invece di siero), può ridurre l'attività ALP misurata anche in assenza di patologia epatica o ossea. Terminologia utile: l'**apoenzima** è la sola porzione proteica priva



del cofattore, cataliticamente inattiva o poco attiva; l'**oloenzima** è il complesso completo (proteina + cofattore), cataliticamente competente — un dosaggio di attività misura sempre e solo l'oloenzima funzionante, mai l'apoenzima da solo.

4.4 Specificità come vantaggio diagnostico

La specificità enzimatica — già descritta in Lezione 01 come proprietà del sito attivo — è ciò che rende possibile dosare selettivamente una singola sostanza in una matrice biologica complessa come il sangue, senza doverla prima isolare chimicamente. I metodi enzimatici moderni (es. glucosio ossidasi, esochinasi per il glucosio) hanno sostituito i vecchi metodi chimici, soggetti a interferenze da altre sostanze presenti nel plasma, sfruttando esattamente questa specificità. Un secondo vantaggio pratico: proprio perché la reazione è specifica e la sua velocità è proporzionale alla concentrazione di analita o di enzima, i metodi enzimatici sono spesso automatizzabili su larga scala con ottima riproducibilità. Nessuno dei fattori visti in questa sezione — substrato saturante, pH e cofattori corretti, specificità — da solo garantisce un dosaggio affidabile: è la loro combinazione, controllata simultaneamente, a rendere possibile misurare con precisione un singolo analita in una matrice biologica complessa.

5. Meccanismi di rilascio nel sangue

Domanda diagnostica fondamentale della seconda metà della lezione: se un enzima intracellulare si trova nel sangue, dove la sua sede naturale è quasi sempre altrove, perché ce lo troviamo? La risposta cambia completamente l'interpretazione clinica.

5.1 I quattro meccanismi dell'iperenzimemia

I meccanismi principali dell'aumento acquisito di un enzima nel sangue sono i seguenti:

1. **Necrosi cellulare:** rottura completa della membrana, svuotamento massivo del contenuto cellulare.
2. **Aumentata permeabilità di membrana:** danno parziale e spesso reversibile, fuoriuscita selettiva delle molecole più piccole o vicine alla membrana, prima che il danno diventi necrotico.
3. **Aumentata sintesi enzimatica (induzione):** la cellula è viva e produce più enzima del solito in risposta a uno stimolo (farmaco, ormone) — esempio: GGT indotta da alcol o farmaci, approfondito in chiave veterinaria in Lezione 05.
4. **Ridotta clearance:** l'enzima entra nel sangue alla velocità normale ma viene eliminato più lentamente del solito.

Solo i primi due implicano necessariamente un danno cellulare in corso; induzione e ridotta clearance no — un'insidia interpretativa da ricordare bene. Più meccanismi possono coesistere nello stesso paziente: un'epatopatia cronica può combinare permeabilità aumentata (danno in corso) e induzione (risposta a farmaci o tossine) sullo stesso profilo.

5.2 Classificazione funzionale

Distinzione operativa valida per tutto il resto del corso. Gli **enzimi plasma-specifici (plasmatici funzionali)** hanno la loro sede funzionale nel sangue stesso e in patologia tendono a **diminuire**:



esempio, i fattori della cascata coagulativa (sintetizzati dal fegato) e la colinesterasi plasmatica (pseudocolinesterasi), che diminuisce in insufficienza epatica grave e in intossicazione da organofosfati (Lezione 05). Gli **enzimi non plasma-specifici (intracellulari)** non hanno funzione plasmatica e in patologia tendono ad **aumentare**: è la categoria della stragrande maggioranza degli enzimi trattati nel resto del corso (transaminasi, LDH, CK, fosfatasi alcalina) — per questi, “più alto” significa quasi sempre “più danno”. Uno stesso organo, il fegato, può quindi produrre nello stesso paziente sia un segnale che sale (ALT, danno epatocitario) sia un segnale che scende (fattori della coagulazione, ridotta sintesi): un profilo epatico completo va letto in entrambe le direzioni.

5.3 Emivita e finestra diagnostica

Il valore osservato in un singolo prelievo è sempre un equilibrio dinamico tra due velocità contrapposte: rilascio tissutale e clearance dal sangue. Un'attività elevata può quindi significare più rilascio, oppure meno eliminazione. Un enzima a emivita brevissima, dosato troppo tardi rispetto all'evento acuto, può risultare falsamente normale anche se il danno c'è stato: la **finestra diagnostica** — l'intervallo di tempo in cui l'enzima resta rilevabile sopra soglia — va conosciuta prima di scegliere quale marcatore richiedere e quando prelevare. Gli enzimi plasmatici vengono rimossi principalmente per captazione da parte del sistema reticoloendoteliale (in particolare le cellule di Kupffer epatiche) e, in minor misura, per filtrazione renale se di peso molecolare sufficientemente basso: una compromissione epatica o renale può quindi prolungare artificiosamente l'emivita apparente di un enzima, complicando l'interpretazione.

5.4 Localizzazione subcellulare

Principio generale: più “profonda” è la localizzazione subcellulare dell'enzima rilasciato — citosol, poi mitocondrio, poi nucleo, in ordine crescente di gravità implicita — più severo è tipicamente il danno cellulare che ha causato il rilascio. Un enzima citosolico può fuoriuscire già con un semplice aumento di permeabilità di membrana; un enzima mitocondriale richiede una rottura più profonda, spesso francamente necrotica. Se in un profilo epatico compaiono contemporaneamente marcatori citosolici e mitocondriali elevati, l'interpretazione è di danno più severo rispetto a un profilo con solo marcatori citosolici. Esistono anche enzimi lisosomiali (rilasciati per danno alle membrane degli organelli digestivi, spesso associato a infiammazione o necrosi) ed enzimi di membrana (che possono essere rilasciati anche per semplice turnover fisiologico oltre che per danno vero e proprio).

6. Punti chiave

1. Un valore enzimatico ha significato diagnostico, dinamico e prognostico insieme — tre letture distinte dello stesso dato.
2. La matrice e le condizioni tecniche del dosaggio non sono dettagli: sono parte della definizione stessa del dato.
3. L'Unità Internazionale misura una velocità di reazione standardizzata, non una quantità di proteina.
4. Un enzima nel sangue ci arriva per uno tra quattro meccanismi precisi (necrosi, permeabilità, induzione, ridotta clearance), e ciascuno ha un significato clinico diverso.



Questa lezione non introduce un enzima nuovo da imparare a memoria: costruisce gli strumenti concettuali — vocabolario, unità, logica interpretativa — con cui ogni enzima specifico verrà letto da Lezione 03 alla fine del corso.

Glossario tecnico essenziale

Termine / Sigla	Definizione
UI (U)	Unità Internazionale: quantità di enzima che converte 1 μmol di substrato al minuto in condizioni standard.
Katal (kat)	Unità SI di attività catalitica (mol/s); 1 U $\approx$ 16,7 nkat. Poco usata nei referti clinici.
Indice HIL	Emolisi, Ictterizia, Lipemia — le tre interferenze pre-analitiche ottiche più comuni nei dosaggi spettrofotometrici.
Apoenzima	Porzione proteica di un metalloenzima priva del cofattore; inattiva o poco attiva.
Oloenzima	Complesso proteina + cofattore, cataliticamente competente.
Enzima specifico plasma-	Svolge la propria funzione nel plasma stesso (es. fattori della coagulazione); diminuisce in patologia.
Enzima non plasma-specifico (intracellulare)	Sede funzionale intracellulare; aumenta nel plasma in patologia.
Iperenzimemia	Aumento dell'attività enzimatica plasmatica; 4 meccanismi: necrosi, permeabilità di membrana, induzione, ridotta clearance.
Finestra diagnostica	Intervallo di tempo in cui un enzima resta rilevabile sopra soglia dopo un evento patologico.
Localizzazione subcellulare	Sede intracellulare dell'enzima (citosol, mitocondrio, lisosoma, membrana); correla con la gravità del danno necessario al rilascio.