

## **LA BIOPSIA RENALE**

Con questo documento cercheremo di fornire alcuni consigli utili ai colleghi che si interessano di nefrologia e vogliono approcciare una biopsia del parenchima renale. Per tale scopo, chiederemo il parere dei nostri esperti di settore, il dr. Francesco Dondi per la parte internistica e i dr. Silvia Benali e prof. Luca Aresu per quella patologica.

### **Iniziamo con Francesco Dondi, al quale vorremmo chiedere innanzi tutto in quali situazioni cliniche è consigliabile il ricorso a questa procedura diagnostica?**

**Francesco Dondi:** l'indicazione principale per la biopsia renale, o più in generale per l'esame istopatologico del rene, attualmente è rappresentata dalle glomerulopatie proteinuriche. La biopsia, inoltre, può essere utile anche per chiarire l'eziologia in corso di danno renale acuto (AKI) o più raramente in corso di malattia renale cronica (CKD), quando si assiste ad una progressione rapida e inattesa della patologia stessa. In queste ultime due condizioni, tuttavia, si ricorre raramente alla biopsia renale poiché solo in pochi casi il risultato della valutazione patologica è in grado di impattare significativamente sulle terapie che vengono somministrate al paziente e sul decorso clinico della malattia.

In corso di glomerulopatia, al contrario, è fondamentale discriminare tra patologie a patogenesi immunologica che possano beneficiare o risolversi completamente con terapia immunosoppressiva e patologie di natura degenerativa/cronica (glomerulosclerosi, amiloidosi) che solitamente vengono trattate con la sola terapia standard della glomerulopatia. Tale distinzione può essere raggiunta esclusivamente attraverso la corretta analisi istopatologica di campioni di tessuto renale.

Da un punto di vista clinico un paziente candidato per la biopsia renale è quindi un soggetto proteinurico (a volte come unico segno, c.d. proteinuria asintomatica), frequentemente ipoalbuminemico o più raramente che presenta edemi periferici e versamenti cavitari trasudatizi (sindrome nefrosica). La funzione renale può essere normale e proprio questo paziente sarà il candidato ideale per eseguire una biopsia renale, poiché più la funzione renale è compromessa maggiori sono i rischi della procedura stessa così come i rischi di ottenere un risultato poco utile al clinico. "Più grave è la proteinuria e migliore è la funzione renale, maggiore è l'indicazione per la biopsia renale": questa è un'ottima regola da tenere a mente e che spesso il clinico ignora

tardando ad eseguire un esame fondamentale. Tipicamente, i reni di questi pazienti presentano scarse o nulle alterazioni ecografiche. Anche questo aspetto è di notevole importanza: maggiori sono le alterazioni ecografiche (soprattutto quelle caratteristiche di CKD) minori saranno i dati diagnostici utili che potremo ottenere dalla biopsia poiché avremo di fronte campioni con grave fibrosi e lesioni che raramente o mai rispondono alla terapia immunosoppressiva.

### **Quali procedure diagnostiche sono necessarie PRIMA di eseguire la biopsia?**

**Francesco Dondi:** prima di pensare di eseguire una biopsia renale, il paziente deve ricevere una valutazione clinica e diagnostica collaterale completa. Da un punto di vista clinico bisogna fare particolare attenzione alla presenza di ipertensione arteriosa, edemi e versamenti (possibile sindrome nefrosica), alla valutazione dei polsi periferici e delle caratteristiche del respiro (possibili trombosi), così come ai segni clinici specifici di possibili eziologie di glomerulopatia (es.: malattie trasmesse da vettore come Leishmaniosi, Ehrlichiosi, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie/non infettive). Un paziente di questo tipo deve ricevere una approfondita valutazione ecografica del parenchima renale ed in generale del cavo addominale.

La biopsia renale, non deve rappresentare una procedura da eseguire in urgenza (salvo quando la si voglia utilizzare in corso di AKI), ma il paziente deve essere adeguatamente stabilizzato. Visto che spesso si tratta di pazienti con glomerulopatie proteinuriche e ipoalbuminemia grave, nella pratica quotidiana dobbiamo prenderci il tempo necessario a trattare le principali problematiche associate, iniziare eventualmente una terapia standard per la glomerulopatia (con dieta renale a restrizione proteica, acidi grassi poli-insaturi, inibitori del sistema renina angiotensina aldosterone, anti-ipertensivi, etc.), e portare il paziente alla biopsia in condizioni stabili. Bisogna fare particolare attenzione alla terapia fluida (spesso abusata) sia con cristalloidi, sia con colloidali (naturali o sintetici), onde evitare sovra-idratazione del paziente e potenziale peggioramento della funzione renale.

### **Quindi quali esami di laboratorio consideri necessari prima della biopsia?**

**Francesco Dondi:** da un punto di vista del laboratorio la valutazione standard prevede l'esecuzione di:

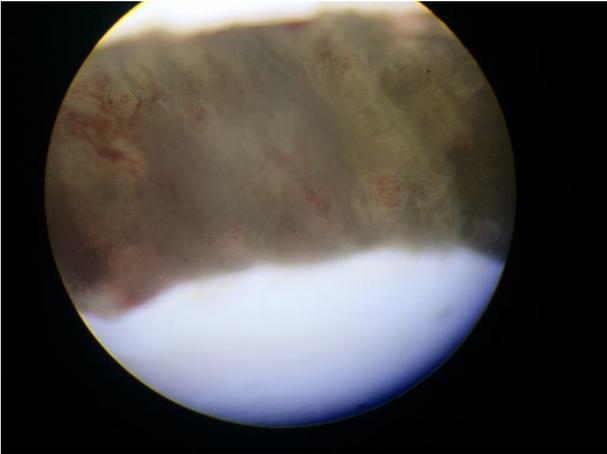
- esame emocromocitometrico
- profilo chimico completo

- profilo emostatico completo (AT, DD, Fibrinogeno)
- esame urine con rapporto PU/CU ed eventuale proteinuria qualitativa (elettroforesi urinaria)
- ricerca per malattie infettive o immunomediate/autoimmuni a seconda del sospetto clinico (solitamente sierologia quantitativa per *Leishmania spp.*, *Ehrlichia canis*, test per *Borrelia burgdorferi*, eventuale ANA test)
- altre ricerche eziologiche a seconda del sospetto clinico (test endocrini, etc.)

### **Hai consigli pratici per l'esecuzione della procedura?**

**Francesco Dondi:** la biopsia renale può essere ottenuta con vari metodi: alla cieca, ecoguidata, per via laparoscopica o laparotomica. Tutte queste procedure richiedono l'anestesia generale e conseguentemente, vista la complessità del paziente, il supporto di un anestesista esperto. Attualmente, salvo casi particolari, la quasi totalità delle biopsie renali viene eseguita per via ecoguidata utilizzando aghi tipo *Tru-Cut* a scatto (es.: 16G, 18G) con scarse o nulle complicazioni, se la procedura è eseguita nel modo corretto. Solitamente, in questo modo, si prelevano 2 o 3 frammenti biotici di circa 1 cm di lunghezza che poi vengono suddivisi o destinati tal quali alle tre principali valutazioni patologiche (istologia classica, immunofluorescenza e microscopia elettronica). Dopo l'esecuzione della biopsia il paziente deve essere monitorato ecograficamente subito dopo la procedura e ancora dopo 1 e 3 ore. Solitamente la procedura viene eseguita in day hospital in modo da poter monitorare in modo adeguato il paziente.

I campioni di tessuto, una volta raccolti, ma prima di essere fissati, possono essere osservati al microscopio ottico (50, 100 e 400X) per valutarne "l'adeguatezza" in merito alla presenza di glomeruli (vedi foto seguente).



Tale aspetto è molto importante onde evitare quello che può spesso accadere soprattutto ad un operatore inesperto, ovvero di fornire al patologo campioni inadeguati e quindi aver sottoposto il paziente ad una procedura inutile.

**Quali sono le complicazioni che possono capitare? E quando è assolutamente sconsigliata?**

**Francesco Dondi:** le complicazioni principali della biopsia renale ecoguidate sono rappresentate dall'emorragia nel sito di prelievo, solitamente minima e a sede sottocapsulare. Altre complicazioni sono più rare e sono rappresentate da emorragie di gravità maggiore, ematuria macroscopica (solitamente è assente o microscopia e perdura per qualche ora, max 48 ore), infarti renali e peggioramento della funzione renale.

La biopsia renale non è indicata in pazienti con:

- monorene;
- malattia renale cronica (CKD) in stadio avanzato o terminale (es.: stadio IV IRIS CKD);
- grave ipertensione arteriosa non in terapia;
- alterazioni dell'emostasi;
- infezione renale o peri-renale
- idronefrosi

**Passiamo ora la parola ai patologi esperti in patologia renale, Silvia Benali e Luca Aresu. Perché è importante una valutazione microscopica da parte di un patologo specialista in patologia renale?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** classicamente l'esecuzione di una biopsia renale e dell'esame istopatologico sono stati considerati un'indagine invasiva e poco utile, spesso non in grado di fornire diagnosi definitive e soprattutto con scarsi risvolti sulla gestione clinica del paziente. Questo perché si è sempre considerato il tessuto renale come un qualsiasi altro campione istologico a partire dall'interpretazione al microscopio ottico con la sola colorazione ematossilina-eosina che normalmente viene utilizzata nell'istologia di routine.

In realtà, così come in medicina umana, si è evidenziato recentemente che è necessario un approccio più articolato e completo, con colorazioni istochimiche speciali, l'utilizzo di tecniche diagnostiche aggiuntive, ovvero l'immunofluorescenza e la microscopia elettronica e, non da ultimo, un patologo con esperienza nella valutazione del tessuto renale e delle sue lesioni.

Negli ultimi decenni, si è visto come questo approccio "specialistico", fornisca diagnosi più accurata, identifichi patologie anche in forma lieve, ed infine fornisca informazioni utili e spendibili per l'approccio clinico (per esempio eseguire o meno una terapia immunosoppressiva in caso di glomerulo-nefrite immunomediata).

In particolare un gruppo di lavoro della WSAVA (World Small Animal Veterinary Association) ha pubblicato articoli scientifici che ribadiscono l'importanza di questo approccio fornendo le linee guida per una valutazione standardizzata delle biopsie renali nel cane.

**Che caratteristiche deve avere il campione prelevato per valutare le lesioni presenti e raggiungere una diagnosi?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** sembra una risposta banale ma per prima cosa il campione deve essere quantitativamente e qualitativamente adeguato. Questo significa che deve includere tessuto prelevato a livello della corticale renale e deve contenere un sufficiente numero di glomeruli.

In istologia, il numero minimo per considerare diagnostico una biopsia renale è di 9-10 glomeruli, 4-5 per l'immunofluorescenza, mentre per la microscopia elettronica ne basta generalmente 1, anche se un numero più elevato può aumentare la sensibilità e specificità della diagnosi finale.

Occasionalmente, un minor numero di glomeruli può comunque permettere di raggiungere una diagnosi, e il patologo cerca di fornire almeno un sospetto diagnostico, ma come sempre capita in patologia le dimensioni dei campioni influiscono sulla correttezza della diagnosi finale.

Come già anticipato, in questo approccio specialistico, si rende necessario affiancare all'istologia altre tecniche diagnostiche, ovvero, l'esame di immunofluorescenza e la microscopia elettronica. Queste tecniche vengono svolte su tessuto conservato in medium/fissativi specifici in cui il tessuto dovrà essere incluso al momento del prelievo. E' quindi essenziale essere in possesso di tali fissativi/medium quando si prevede di eseguire una biopsia renale. Tali fissativi possono essere richiesti e forniti dal laboratorio.

### **Quali colorazioni istochimiche speciali si utilizzano in istopatologia renale e a cosa servono?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** le colorazioni di routine sono 4 (PAS, Ematossilina-Eosina, Tricromica di Masson e PAMS/Jones methenamine silver) cui se ne aggiunge una quinta in caso di sospetto di amiloidosi (Rosso Congo).

La colorazione PAS è la più importante per l'analisi delle lesioni glomerulari. Si tratta di una colorazione utilizzata in istologia per la colorazione delle membrane basali e nello specifico, le membrane glomerulari e la matrice mesangiale.

L'Ematossilina-Eosina è utilizzata soprattutto per la valutazione del comparto tubulo-interstiziale ed in particolare la presenza di degenerazione/necrosi tubulare e tipizzazione dell'infiltrato infiammatorio.

La colorazione Tricromica di Masson ha una duplice utilità: in primis evidenzia l'eventuale fibrosi interstiziale e ne permette una quantificazione. In secondo luogo, può evidenziare la presenza di depositi proteici glomerulari generalmente riscontrabili in malattie glomerulari immunomediate.

Infine, la colorazione PAMS/Jones methenamine silver evidenzia la struttura glomerulare ed in particolare la presenza di alterazioni delle membrane, aree di sclerosi, ...

La colorazione Rosso Congo colora la sostanza amiloide e permette di confermare un eventuale sospetto di amiloidosi renale. Questa colorazione non viene generalmente eseguita di routine ma solo in caso di un sospetto di malattia da accumulo.

### **A cosa servono immunofluorescenza e microscopia elettronica?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** l'immunofluorescenza è una tecnica diagnostica utilizzata per rilevare la presenza e tipizzare anticorpi e complemento. Nello specifico nella patologia renale l'immunofluorescenza mira a ricercare frazioni di immunoglobuline e del complemento che compongono immuno-complessi a livello del glomerulo. Ovviamente per una diagnosi definitiva di glomerulopatia immunomediata, questa tecnica va integrata con valutazione istologica e con la microscopia elettronica.

La microscopia elettronica è una tecnica che permette di valutare la presenza di lesioni ultrastrutturali che non sono normalmente valutabili alla microscopia ottica. Nello specifico quando si esamina un campione di tessuto renale è possibile esaminare ed identificare lesioni a carico di podociti, capillari glomerulari, presenza e localizzazione di depositi, emboli lipidici,...

Queste tecniche, utilizzate in concerto con l'esame istopatologico sopra descritto rappresentano il processo ottimale per arrivare ad una diagnosi.

#### **Cosa fare quando vogliamo inviare una biopsia renale al lab (mylav)?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** come accennato precedentemente, al momento dell'esecuzione di una biopsia renale, l'ideale è suddividere immediatamente i campioni bioptici tra i vari fissativi (formalina per istologia, soluzione di Michel per immunofluorescenza e glutaraldeide per microscopia elettronica). I campioni in glutaraldeide e Michel vanno conservati a temperatura di refrigerazione (0-4°C) e conferiti al laboratorio. Come già detto è possibile richiedere al laboratorio dei kit che contengono 3 provette con i fissativi per conservare adeguatamente i campioni di tessuto. Per quanto riguarda la richiesta al laboratorio si rende necessario richiedere l'esame istologico della biopsia renale con "valutazione complessa", immunofluorescenza e la microscopia elettronica (se il campione è stato prelevato per tali indagini).

#### **Cosa fare se l'istologia non basta ma non ho altro tessuto conservato specificatamente per l'immunofluorescenza e/o la microscopia elettronica?**

**Silvia Benali e Luca Aresu:** purtroppo non c'è nulla da fare per quanto riguarda l'immunofluorescenza. Infatti, per l'esecuzione dell'immunofluorescenza, il tessuto deve essere adeguatamente conservato fin dall'inizio, immergendolo in un medium (soluzione di Michel) che permette di mantenere le caratteristiche a fresco per 24-48 ore, il tempo necessario a conferirlo al laboratorio dove verrà processato e congelato per la successiva analisi. Quindi se non abbiamo

agito in questo modo fin da subito non sarà possibile eseguire l'indagine di immunofluorescenza su quel campione.

Il discorso è diverso per quanto riguarda l'indagine di microscopia elettronica. Per tale tecnica è infatti possibile recuperare il campione fissato in formalina usato per l'istologia, ma è bene tenere in considerazione che la qualità delle immagini prodotte sarà più scadente e la valutazione potrebbe essere non ottimale. Inoltre una volta utilizzato il campione per la microscopia elettronica, non sarà possibile eseguire ulteriori sezioni istologiche del campione inviato.