

VALORE DIAGNOSTICO DELL'ESAME DI IMMUNOFLUORESCENZA NELLE BIOPSIE RENALI NEL CANE

DIAGNOSTIC VALUE OF IMMUNOFLUORESCENCE EXAM IN CANINE KIDNEY BIOPSIES

LUCA ARESU^{1*}, PAOLA PREGEL², LAURA CAVICCHIOLI¹, RENATO ZANATTA², FEDERICO VALENZA², MASSIMO CASTAGNARO¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Agripolis, Padova, Italia

²Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Torino), Italia

Riassunto

Introduzione: nel cane, le glomerulonefriti di origine immunomediata rappresentano le patologie primarie più frequenti a livello renale; d'altra parte la patogenesi delle lesioni renali può essere anche secondaria ad alterazioni vascolari od altre malattie sistemiche. Attraverso tecniche di immunofluorescenza, i depositi (immunoglobuline e complemento C3) vengono evidenziati sotto forma di strutture granulari a livello mesangiale o di membrana basale glomerulare (g.b.m.) e permettono di fornire dati supplementari per una possibile eziopatologia della lesione renale.

Materiali e metodi: allo scopo di stabilire la frequenza di deposizione di IgG, IgM, IgA e C3, sono state analizzate, attraverso tecnica di immunofluorescenza, 74 biopsie renali prelevate da cani con malattie renali diverse.

Risultati: i casi sono stati suddivisi in due gruppi sulla base delle caratteristiche istologiche ed ultrastrutturali seguendo i criteri della classificazione delle patologie renali umani fornita dall'OMS: Nefropatie Immuno Mediate (IMN) e Nefropatie Non Immuno Mediate (NIMN). Un'associazione significativa è stata riscontrata tra il gruppo delle Nefropatie Immuno Mediate e la deposizione di IgG nel mesangio e sulla membrana basale glomerulare, e di IgM solo a livello di mesangio. Il meccanismo di intrappolamento degli immunocomplessi nella sclerosi glomerulare causa la deposizione di IgM nelle Nefropatie Non Immuno Mediate.

Discussione: in conclusione, l'immunofluorescenza risulta di fondamentale importanza nelle patologie renali nel cane, così come già avviene nella patologia renale umana, al fine di implementare e migliorare i dati sulla patogenesi e ottenere possibili riscontri sulla terapia.

Summary

Introduction: Immune complex glomerulonephritis represents one of the most common forms of primary glomerular disease. Renal lesions may also be secondary to vascular alterations or other systemic diseases.

Materials and methods: Seventy-four renal cortical biopsies from dogs with varying degrees of renal failure were studied by immunofluorescence in order to assess the frequency and potential predominance of IgG, IgM, IgA and complement C3 deposition.

Results: Based on clinical parameters, the results of standard histological examination and electron microscopic analysis, the dogs were divided into two groups according to the origin of the disease: Immune Mediated Nephropathy (IMN) and Non Immune Mediated Nephropathy (NIMN). A strong association between IMN and the degree of immunofluorescence was detected for IgG in mesangium and in glomerular basement membrane and for IgM only in mesangium. The mechanism of immune complex trapping in the glomerulus also results in positive reactions to IgM in NIMN.

Discussion: Immunofluorescence staining was highly characteristic and in conjunction with conventional stains greatly enhanced histological diagnosis.

INTRODUZIONE

Nella patologia renale umana, le tecniche diagnostiche di routine per la valutazione delle biopsie renali comprendono: la microscopia ottica su campioni fissati in formalina, l'immunofluorescenza su sezioni al criostato e la microscopia elettronica. La microscopia ad immunofluorescenza è fondamentale per evidenziare i meccanismi patogenetici delle malattie e per la definizione di una diagnosi precisa in caso di malattie infiammatorie renali. Nel cane, lo strumento di indagine per la diagnosi di patologie renali è la semplice microscopia ottica. Diversi studi hanno dimostrato l'elevata prevalenza della deposizione di immunocomplessi circolanti nel meccanismo patogenetico delle glomerulonefriti nel cane. Attraverso tecniche di immunofluorescenza, tali depositi (immunoglobuline e complemento C3) vengono evidenziati sotto forma di strutture granulari a livello mesangiale o di membrana basale glomerulare (g.b.m.)^(1,2). In veterinaria, la diagnosi classica della principali patologie glomerulari viene effettuata esclusivamente a partire dall'esame istologico, di routine con ematossilina-eosina non riuscendo così in molti casi ad arrivare ad una precisa classificazione della patologia e/o ad una individuazione della causa. Infatti, la classificazione delle patologie infiammatorie renali nel cane è obsoleta e offre scarse correlazioni tra prognosi e lesioni osservate^(3,4,5,6,7,8). Inoltre, una inadeguata classificazione della patologia determina come conseguenza una incerta gestione clinica del paziente e una prognosi aleatoria. Nel presente studio sono state analizzate le principali patologie renali prelevate dall'archivio diagnostico del Laboratorio di Istopatologia Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino. I casi sono stati diagnosticati sulla base dell'esito della microscopia ottica, dell'immunofluorescenza e della microscopia elettronica, comparando le lesioni renali e la specifica deposizione di immunoglobuline e complemento. Scopo del presente lavoro è stato di confrontare i risultati dell'esame istologico con l'espressione delle differenti classi di immunoglobuline e della frazione C3 del complemento, valutata mediante l'esame in immunofluorescenza, nelle principali patologie renali del cane. L'immunofluorescenza dovrebbe essere considerata un utile strumento diagnostico, nonché un valido metodo di ricerca, nella patogenesi delle malattie renali nel cane, così come avviene nella patologia renale umana⁽¹¹⁾.

MATERIALI E METODI

Presso il Laboratorio di Istopatologia Veterinaria dell'Università di Torino sono state esaminate 74 biopsie renali di cane. I casi derivavano da prelievi effettuati attraverso truci e prelievi chirurgici in laparotomia eseguiti in un periodo di 4 anni, dal 2002 al 2006. Il protocollo di prelievo e processazione di ogni biopsia renale è stato standardizzato. In breve, una sezione del parenchima renale comprendente la corticale renale veniva fissata in formalina tamponata, inclusa in paraffina, e successivamente colorata con: Ematossilina Eosina, acido periodico di Schiff (PAS), fucsina acida e arancio G (AFOG), Tricromica di Masson, Ematossilina Fosfotungstica Acida (PTAH) ed elastina di Miller. Le lesioni istologiche sono state classificate secondo la

classificazione delle patologie renali nell'uomo fornita dall'OMS^(9,10). I casi sono stati così suddivisi in due gruppi sulla base delle caratteristiche istopatologiche ed ultrastrutturali seguendo i criteri della classificazione delle patologie renali umane fornita dall'OMS: Nefropatie Immuno Mediate (IMN) e Nefropatie Non Immuno Mediate (NIMN). Nella categoria IMN, gli autori hanno classificato le seguenti malattie: Glomerulonefrite Membrano-Proliferativa (MPGN), Glomerulonefrite Membranosa (MGN), Glomerulonefrite Mesangiale (MeGN), Glomerulonefrite Post-Infettiva (PiGN) e Glomerulosclerosi Focale Segmentale (FSGS). Nella categoria NIMN sono state incluse: Glomerulosclerosi Diabetica, Malattia a lesioni minime (MCD), Nefroangiosclerosi Ipertensiva e Nefrite Interstiziale (IN).

Per la preparazione del campione per l'esame in immunofluorescenza diretta, il materiale fresco veniva immerso in gel OCT e congelato in azoto liquido a -80°C . Successivamente, sezioni di $5\ \mu\text{m}$ di spessore ottenute al criostato venivano fissate in acetone per 15 minuti; dopo un lavaggio con PBS (due passaggi), le sezioni venivano incubate con anticorpi diretti contro IgA, IgG, IgM e complemento C3 specifici per il cane (Bethyl Laboratories INC., Montgomery, USA). I risultati venivano classificati in base al *pattern* osservato (granulare o lineare), alla localizzazione dei depositi (mesangio, membrana basale glomerulare, tubuli e vasi) e alla loro distribuzione (focale, diffusa, segmentale e globale) ed intensità. La microscopia elettronica a trasmissione è stata eseguita su ogni campione renale secondo procedure standard.

Analisi statistica

Lo studio trasversale per valutare l'associazione tra IMN e positività all'esame in immunofluorescenza è stato eseguito utilizzando il programma GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Il test esatto di Fisher a due code veniva considerato significativo per valori di P inferiori a 0,05 e veniva annotata la *odds ratio* corrispondente.

RISULTATI

Nello studio sono stati inclusi 74 cani, 40 femmine e 34 maschi. L'età del campione esaminato variava tra 13 mesi e 15 anni (media: 9 anni). Sono state esaminate tredici razze: Meticcio (36), Labrador Retriever (8), Pastore Tedesco (7), Rottweiler (5), Beagle (4 casi), Golden retriever (3), Pastore Bernese (3), West Highland White Terrier (2), Dalmata (2), Schnauzer (2), Collie (1), Yorkshire (1). La frequenza relativa delle diverse malattie renali riscontrate è stata schematizzata nella Tabella 1.

Sulla base della lesione istopatologica, le malattie sono state suddivise in due categorie correlate alla possibile origine della patologia, ovvero immunomediata o altre cause sistemiche.

Nefropatie Immuno Mediate. (vedi Tabella 2) Istologicamente, le glomerulonefriti membranose erano caratterizzate da un ispessimento della GBM (Fig. 1a) e all'immunofluorescenza venivano evidenziati prevalentemente depositi di IgG e C3, associati a presenza variabile di IgM. Il *pattern* di deposizione risultava di tipo granulare, lungo i ca-

Tabella 1
Frequenza relativa di IMN e NIMN

IMN		NIMN	
MPGN	13	MCD	11
MGN	11	Glomerulosclerosi Diabetica	4
PIGN	5	Nefroangiosclerosi	5
FSGS	4	IN	15
MeGN	6		
	39		35

pillari glomerulari (Fig. 1b). La glomerulonefrite membranoproliferativa era caratterizzata da un ispessimento irregolare della membrana basale glomerulare, da una proliferazione delle cellule mesangiali e da sclerosi (Fig. 1c). L'immunofluorescenza rivelava una positività agli anticorpi anti-IgG e anti-C3 in tutti i casi esaminati; la presenza di tali depositi è stata osservata nel mesangio e lungo la membrana basale glomerulare, con una distribuzione granulare. L'intensità e la distribuzione diminuivano in base alla progressione del danno, ove i depositi risultavano intrappolati nella matrice mesangiale e nelle aree di sclerosi (Fig. 1d).

Tabella 2
Frequenza relativa dei depositi in IF per i differenti antisieri in IMN

IMN	IgG	IgM	IgA	C3
MPGN	13/13	8/13	1/13	13/13
MGN	10/11	7/11	0/11	10/11
PIGN	5/5	1/5	0/5	4/5
FSGS	0/4	3/4	0/4	1/4
MeGN	2/6	5/6	1/6	2/6

Nella glomerulosclerosi focale segmentale, istologicamente, si osservavano glomeruli caratterizzati da una sclerosi focale e segmentale a livello del polo vascolare; in tali casi la deposizione di IgM e C3 era associata ad aree di sclerosi nei glomeruli (Fig. 2a, 2b). I casi di glomerulonefrite post-infettiva erano caratterizzati da una diffusa glomerulonefrite di tipo essudativo; i capillari glomerulari si presentavano notevolmente ispessiti in seguito al presenza di fenomeni essudativi (Fig. 2c). IgG e C3 erano i depositi più rappresentati, distribuiti secondo un *pattern* diffuso nel mesangio. Per contro, i casi di glomerulonefrite mesangiale erano associati ad una diffusa proliferazione delle cellule mesangiali ed esibivano un'intensa deposizione di IgM

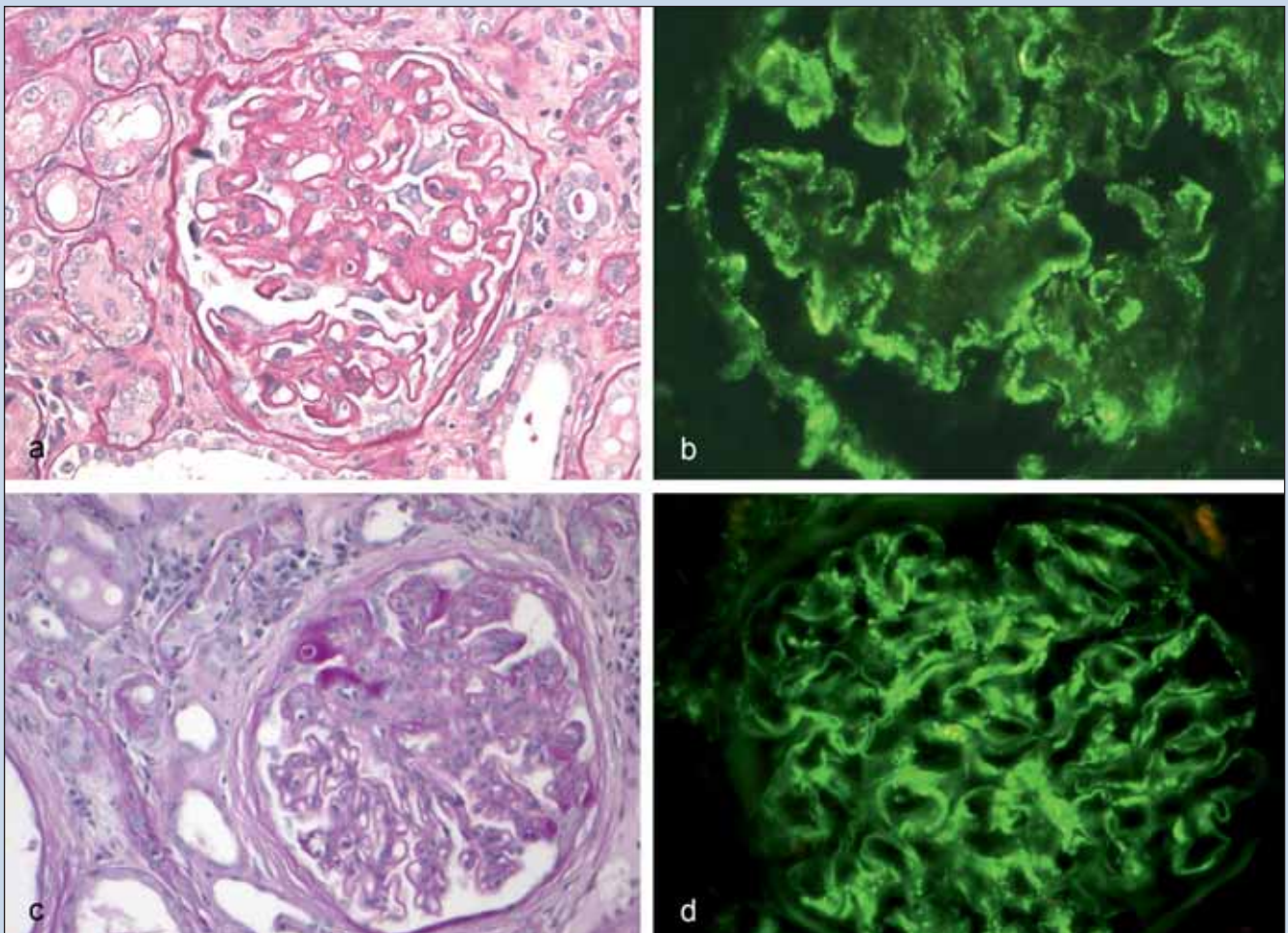


FIGURA 1

a) MGN, caratterizzata da uniforme ispessimento della GBM (PAS, x400).

b) Immunofluorescenza di un glomerulo MGN; diffusa ed intensa deposizione granulare lungo la GBM. (fluorescin-coniugated anti-goat IgG, x400).

c) MPGN, caratterizzata da ispessimento irregolare della membrana basale, proliferazione delle cellule mesangiali e sclerosi (PAS, x400).

d) Immunofluorescenza di un glomerulo con MPGN; sparsa deposizione granulare lungo la GBM e meno prominente pattern mesangiale. (fluorescin-coniugated anti-goat IgG, x400).

NIMN	Totale	Positività ad IF
MCD	11	IgG, IgM, C3
Glomerulosclerosi Diabetica	4	IgM, C3
Ipertensione	5	IgM, C3
IN	15	C3 nei tubuli

nel mesangio.

Nefropatie Non Immuno Mediate. (vedi Tabella 3) In alcuni casi di malattia a lesioni minime, sono stati osservati nel mesangio deposizioni minime di IgG, IgM e C3. Nella glomerulosclerosi diabetica, l'esame in immunofluorescenza ha mostrato una differente localizzazione di IgM e C3 nel mesangio, corrispondente a lesioni nodulari nei glomeruli sclerotici e a possibili aree di ialinosi (Fig. 2d). Nella nefroangiosclerosi ipertensiva, le lesioni erano consistenti con una diffusa mesangiolisi del glomerulo. I glomeruli mostravano una deposizione globale nel mesangio di IgM nelle corrispondenti aree di sclerosi, mentre la distribuzione di C3 era diffusa e presente nella parete delle arteriole, corrispondenti a depositi ialini a livello istologico. Nessun

deposito è stato osservato nei casi di nefrite interstiziale.

Risultati dell'analisi statistica

Nella Tabella 4 vengono schematizzati i risultati ottenuti nelle IMN e nelle NIMN per la positività all'immunofluorescenza e la corrispondente localizzazione per ciascun an-

	IF positivo				Odds Ratio
	Totale	IMN	NIMN	P valore	
IgG mesangio	40	33	7	p<0.0001	22.000
IgG g.b.m.	15	13	2	p<0.005	8.250
IgM mesangio	21	16	5	p<0.05	4.174
IgM g.b.m.	12	8	4	n.s.*	-
IgA mesangio	3	3	0	n.s.*	-
C3 mesangio	52	30	22	n.s.*	-
C3 g.b.m	19	13	6	n.s.*	-

* n.s.: non statisticamente significativa

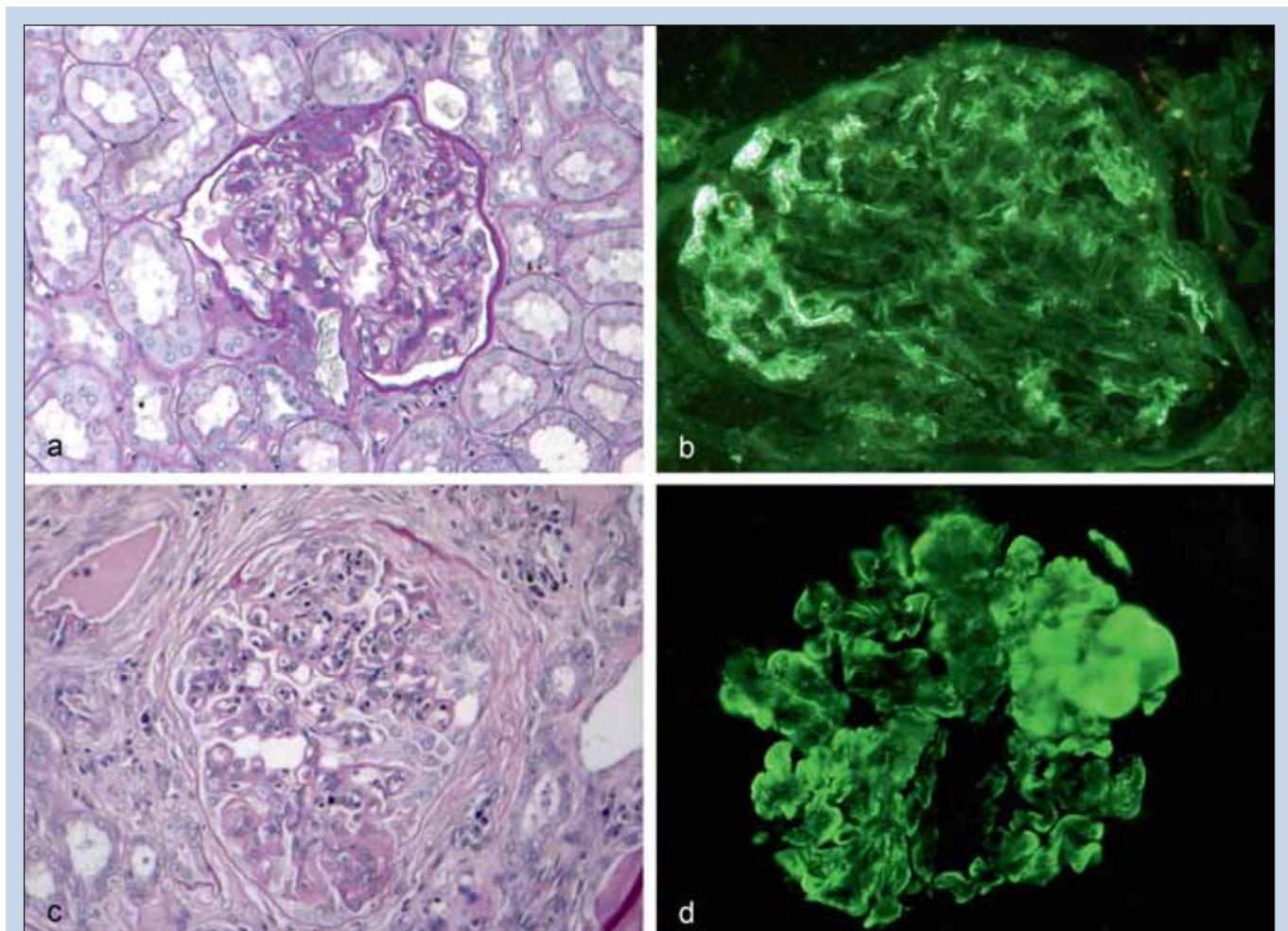


FIGURA 2
 a) FSGS, caratterizzata da aree segmentali di sclerosi e adesione alla capsula di Bowman (PAS, x400).
 b) Immunofluorescenza di un glomerulo con FSGS; area sclerotica con intrappolamento di IgM. (fluorescin-coniugated anti-goat IgM, x400).
 c) Glomerulonefrite Post-Infettiva, caratterizzata da diffuso essudato neutrofilico nei capillari del glomerulo (PAS, x400).
 d) Immunofluorescenza di un glomerulo con Nefropatia Diabetica; ispessimento della GBM e area nodulare di mesangiolisi. (fluorescin-coniugated anti-goat C3, x400).

ticorpo. È stata riscontrata un'associazione statisticamente significativa tra IMN e positività all'immunofluorescenza per le IgG nel mesangio e nella membrana basale glomerulare e per le IgM solo nel mesangio. La *odds ratio* corrispondente è stata riportata nell'ultima colonna della Tabella 4. Nei soggetti con IMN, rispetto ai soggetti con NIMN, è stata rilevata una fortissima associazione positiva (>20) con la positività alla determinazione delle IgG nel mesangio, un'associazione forte (>8) con le IgG nella g.b.m. ed un'associazione tra forte e moderata con le IgM nel mesangio (>4).

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, il riscontro dell'immunofluorescenza nei campioni renali è risultato essenziale per la diagnosi di alcune lesioni infiammatorie di natura immunomediata. La maggior parte dei casi di glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN) e membranosa (MGN) selezionati per il presente studio (18/24) è risultata secondaria a processi infettivi. In queste due classi, tale associazione è da mettere in relazione alla natura dell'agente eziologico, *Leishmania infantum* (12 cani) e *Dirofilaria immitis* (6 cani). In generale, la maggior parte degli agenti infettivi stimola la produzione di IgG e IgM, determinando la presenza di anticorpi che reagiscono con i loro corrispettivi antigeni circolanti per formare immunocomplessi in grado di attivare la catena del complemento⁽¹²⁾. Queste due immunoglobuline, in particolare le IgM, sono in grado di innescare la via classica di attivazione del complemento, attraverso la frazione C1q, con successiva attivazione della frazione C3 del complemento, fattore chemotattico per i leucociti polimorfonucleati. Le IgG sono la classe immunoglobulinica presente in maggior concentrazione nell'organismo e rappresentano la molecola di minori dimensioni in grado di fuoriuscire dal letto vasale^(12,13). A conferma di tale dato, nelle IMN si è riscontrata una frequenza elevata di deposizione di IgG e IgM in associazione con la frazione del complemento C3 (vedi Tabella 2).

I risultati ottenuti mediante l'immunofluorescenza mettono anche in luce la deposizione di IgM, indipendentemente dal meccanismo immunologico coinvolto. Nello specifico, nei casi di FSGS e di nefroangiosclerosi, è stata riscontrata la deposizione di IgM nelle aree sclerotiche⁽¹⁴⁾. Questo dato è stato messo in relazione alle grosse dimensioni della glicoproteina (880-941 kDa) e al meccanismo di intrappolamento all'interno del glomerulo. Nella categoria delle NIMN, la deposizione delle diverse molecole non è mai stata presa in considerazione, considerando la positività come un dato aspecifico. D'altronde, l'esame del preparato su congelato mette in luce una deposizione indipendente dal sito di origine della patologia. Nel presente lavoro, nei casi di MCD, la deposizione irregolare di depositi focali lungo la membrana basale glomerulare non è mai stata confermata all'esame ultrastrutturale; questo punto presenta ancora ampi margini di discussione, dal momento che le lesioni immunomEDIATE possono svilupparsi, anche in assenza di lesioni istologiche evidenti⁽¹⁵⁾.

L'associazione statisticamente significativa tra IMN e positività all'immunofluorescenza per la deposizione di IgG, sia a livello di mesangio sia di membrana basale glomerula-

re, conferma che la valutazione in immunofluorescenza per le IgG rappresenta un utile strumento diagnostico per differenziare la categoria delle IMN da quella delle NIMN. Nel presente studio, soggetti con IMN presentano, rispettivamente, una fortissima associazione positiva con la positività alla deposizione di IgG nel mesangio e una forte associazione positiva con la deposizione di IgG nella membrana basale. Analogamente, la deposizione mesangiale di IgM è significativa nelle nefropatie di origine immunomediata. Analizzando i dati ottenuti con i diversi anticorpi testati, risulta evidente come la deposizione di IgG sia stata riscontrata solo in associazione con la frazione C3 del complemento.

Quanto appena discusso dimostra che l'impiego costante delle tecniche di immunofluorescenza, in associazione con l'esame istologico, diventa estremamente significativo nel differenziare tra IMN e NIMN, ancor più se si tratta di casi di glomerulonefrite membranosa e membranoproliferativa. La dimostrazione della presenza di IgM e C3 nelle aree sclerotiche può essere considerata utile ai fini diagnostici in patologie come le FSGS, ove i depositi sono positivi in una sorta di meccanismo fisico di intrappolamento.

In conclusione, nel cane studi di immunofluorescenza sul tessuto renale in associazione con esami clinici sono essenziali nel differenziare i meccanismi immunopatologici coinvolti nel danno renale, rispetto ad altre cause di malattia. In molte patologie l'esame in immunofluorescenza è risultato estremamente caratteristico (vedi FSGS, MGN e MPGN). Tra i vantaggi più significativi di questa tecnica vi sono sicuramente la rapidità della metodica e l'ottenimento di un risultato altamente specifico e sensibile. Trattandosi di una tecnica di immunofluorescenza diretta non vi è possibilità che si verifichino falsi positivi e/o falsi negativi. Ulteriori indagini, e soprattutto l'esame completo delle biopsie renali, anche correlato dall'indagine ultrastrutturale, permetteranno una definizione completa delle lesioni renali. Quanto appena descritto risulta di fondamentale importanza nelle patologie renali nel cane, così come già avviene nella patologia renale umana, al fine di implementare e migliorare i dati sulla patogenesi e ottenere possibili riscontri sulla terapia.

Parole chiave

Cane, IgG, immunofluorescenza, malattia renale.

Key words

Dog, IgG, immunofluorescence, renal disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ: Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol* 34(2):85-96, 1997.
2. Rouse BT, Lewis RJ: Canine glomerulonephritis: prevalence in dogs submitted at random for euthanasia. *Can J Comp Med* 39(4):365-370, 1975.
3. Center SA, Smith CA, Wilkinson E, Erb HN, et al: Clinicopathologic, renal immunofluorescent, and light microscopic features of glomerulo-

- nephritis in the dog: 41 cases (1975-1985). *J Am Vet Med Assoc* 190(1):81-90, 1987.
4. Choi EW, Lee CW: Development of canine nephrotic syndrome model. *J Vet Med Sci* 66(2):69-174, 2004.
 5. Finco DR, Brown SA, Brown CA, Crowell WA, et al: Progression of chronic renal disease in the dog. *J Vet Intern Med* 13(6):516-528, 1999.
 6. Müller-Peddinghaus R, Trautwein G: Spontaneous glomerulonephritis in dogs. I. Classification and immunopathology. *Vet Pathol* 14(2):1-13, 1977.
 7. Vilafranca M, Wohlsein P, Trautwein G, Leopold-Temmler B, et al: Histological and immunohistological classification of canine glomerular disease. *Zentralbl Veterinarmed A* 41(8):599-610, 1994.
 8. Wagnild JP, Gutmann FD: Functional adaptation of nephrons in dogs with acute progressing to chronic experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 57(6):1575-1589, 1976.
 9. Churg J, Bernstein J, Glassock RJ: *Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases*, 2nd edition. New York, Igaku-Shoin, 1995.
 10. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG: *Heptinstall's Pathology of the kidney*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
 11. Smith LH Jr, Wilson CB: Immunological mechanisms of glomerulonephritis. *Calif Med* 116:47-52, 1972.
 12. Peters DK, Williams DG: Complement and the kidney. *Proc R Soc Med* 65(12):1095-1098, 1972.
 13. Michael AF Jr, Drummond KN, Good RA, Vernier RL: Acute poststreptococcal glomerulonephritis: immune deposit disease. *J Clin Invest* 45(2):237-248, 1966.
 14. Koffler D, Paronetto F: Immunofluorescent localization of immunoglobulins, complement, and fibrinogen in human diseases. II. Acute, subacute, and chronic glomerulonephritis. *J Clin Invest* 44(10):1665-1671, 1965.
 15. Nossent H, Berden J, Swaak T: Renal immunofluorescence and the prediction of renal outcome in patients with proliferative lupus nephritis. *Lupus* 9(7):504-510, 2000.