

REQUISITI MINIMI IN DIAGNOSTICA NEFROPATOLOGICA MEDICA

Anna Maria Asunis, Gianna Mazzucco, Andrea Onetti-Muda,
Fabio Pagni, Stefano Pizzolitto, Leonardo Resta,

INTRODUZIONE

La biopsia renale è un'indagine indispensabile per l'inquadramento diagnostico delle nefropatie mediche primitive e secondarie e fornisce importanti elementi prognostico-predittivi che consentono in molti casi di orientare al meglio la terapia.

Nella gestione del trapianto renale, la biopsia renale costituisce inoltre un cruciale momento diagnostico per indirizzare la gestione clinica e il trattamento del paziente.

La nefropatologia medica è un settore specialistico dell'Anatomia-Patologica che si avvale di numerose tecniche, tra loro indissolubilmente legate, di istologia, di istochimica e di immunoistochimica applicate sia alla microscopia ottica sia alla microscopia elettronica.

Si tratta pertanto di una diagnostica molto complessa e "time consuming", specialmente per quanto riguarda la microscopia elettronica. I frustoli agobiopistici ottenuti devono infatti essere trattati al di fuori della normale routine istopatologica, essendo necessari trattamenti dedicati, orientati non solo alle tecniche istologiche/istochimiche, ma anche a quelle di immunofluorescenza su materiale criopreservato e di microscopia elettronica su materiale incluso in resina. Un tale approccio metodologico necessita di tecnici e medici dedicati e specializzati in grado di garantire alti livelli di qualità dei preparati e di lettura degli stessi, con tempi di refertazione (TAT) clinicamente adeguati. Inoltre va sottolineata l'importanza di un adeguato background culturale di tipo clinico che il Nefropatologo deve possedere per affrontare tali problematiche.

La biopsia renale è una procedura invasiva che comporta un rischio di complicanze anche potenzialmente rilevanti. Pertanto la decisione di eseguire una biopsia renale deve basarsi sull'effettiva valutazione del rischio-beneficio e una volta che tale decisione venga presa è essenziale che il laboratorio e le procedure diagnostiche siano ottimali per raggiungere un elevato livello di beneficio clinico (clinical benefit). Si sottolinea inoltre che la valutazione finale dipende dalla combinazione tra i dati clinico-biumorali e morfologici, pena l'impossibilità di raggiungere una diagnosi definitiva completa e clinicamente adeguata.

Le raccomandazioni che seguono riguardano i requisiti minimi accettabili per un'efficace e corretta diagnostica della biopsia renale medica.

Staffing e workload

Il laboratorio di nefropatologia deve avere un numero sufficiente di patologi e tecnici di laboratorio in grado di garantire tutte le procedure diagnostiche grazie ad un'adeguata formazione continua.

Dai dati di letteratura segnalati dall'RPS (Renal Pathology Society) si evince che il numero ottimale di nefropatologi dovrebbe essere di 1 nefropatologo/mil/abitanti, mentre secondo l'ESP (European Society of Pathology: nephropathology working group) in Europa il numero si aggira intorno ai 0,4/mil/abitanti.

Sempre secondo l'ESP (European Society of Pathology: nephropathology working group) l'expertise di un nefropatologo già formato dovrebbe essere di non meno di 250 casi/anno.

Per quanto attiene la nostra realtà strutturale italiana si è convenuto che anche una expertise di 120 casi/anno possa garantire un sufficiente grado di affidabilità diagnostica a patto che il nefropatologo abbia acquisito una specifica formazione certificata presso centri di riferimento nazionali e/o esteri di almeno sei mesi e/o abbia esperienza di almeno 1000 biopsie renali. Inoltre deve aver partecipato a incontri multidisciplinari clinico-patologici (necessari per una robusta cultura clinica nefrologica).

Pertanto un centro accreditato secondo i numeri sopra riportati dovrebbe avere uno staff di due nefropatologi e due tecnici (non full-time) per garantire la continuità diagnostica.

Tale consistenza potrebbe richiedere un incremento da valutarsi nelle singole situazioni in caso di attività diagnostica trapiantologia, in particolare se viene richiesta la valutazione di idoneità pre-trapianto.

Caratteristiche del laboratorio di nefropatologia

Un laboratorio di nefropatologia accreditato dovrebbe essere equipaggiato con tutte le metodiche necessarie per l'analisi in microscopia ottica, in epifluorescenza e in microscopia elettronica (per le metodiche specifiche si rimanda ai successivi allegati tecnici).

Invio del campione e sua suddivisione

Di fondamentale importanza appare l'attività di suddivisione dei frustoli da sottoporre alle varie tipologie di indagine. Tale attività deve essere condotta su materiale fresco con l'ausilio di uno stereomicroscopio in Anatomia-Patologica.

Pertanto le biopsie devono giungere al laboratorio a fresco, bagnate da soluzione fisiologica

tamponata (PBS) per immersione o adagiate su filtro imbevuto, nel più breve tempo possibile a temperatura di 4C°. Per le biopsie che giungano da centri distanti dal laboratorio può essere previsto l'invio, oltre che per immersione in soluzione fisiologica tamponata (PBS) a 4C°, anche in liquidi preservanti tipo Belzer o Liquido Michael (Zeus), previa validazione da parte del laboratorio ricevente.

L'invio della biopsia renale deve necessariamente essere corredato da una scheda di notizie clinico-anamnestiche e laboratoristiche predisposta in accordo con i nefrologi (tale scheda potrebbe essere condivisa e unificata a livello nazionale ed eventualmente informatizzata).

Trattamento del campione

Per poter eseguire tutte le tecniche fondamentali per un'ottimale diagnostica nefropatologica sono ritenuti necessari almeno due frustoli biotipici. Il numero dei frustoli è condizionato dal loro diametro, che varia in rapporto al tipo di ago usato, 14G, 16G o 18G. Si segnala che i casi inadeguati per insufficiente materiale sono necessariamente più frequenti utilizzando aghi da 18G (14%) rispetto a quelli da 16G (5%).

Si ritiene ottimale poter osservare 15 glomeruli e 2 sezioni trasverse di vaso di medio calibro.

Microscopia ottica

Fissazione

La fissazione può essere condotta *a temperatura ambiente*

1. con fissativi acidi quali Liquido di Serra, Buoin e Dubosq-Brazil (vantaggi: migliore dettaglio morfologico insieme con un maggior contrasto nelle colorazioni speciali. Svantaggio: *controllo dei tempi di fissazione*, non riutilizzabili per ME e IF)
2. con formalina al 4% tampone fosfato pH 7,2 (vantaggi: riutilizzo per ME e IF. Svantaggi: minor definizione morfologica anche per shrinkage. Minor contrasto nelle colorazioni speciali)

Processazione/inclusione

L'allestimento dei preparati può essere condotto con strumenti di tipo convenzionale con processazione overnight ovvero, qualora richieste (attività trapiantologica o quadri clinici peculiari e urgenti), con modalità rapide (temperatura/sottovuoto).

Sezione e colorazione

Le sezioni al microtomo dovrebbero essere di 2–3 micron, ad eccezione delle fette riservate alla colorazione del Rosso Congo (6-8 micron).

Le sezioni dovrebbero essere continue e seriate con almeno 6 livelli. Su ciascun livello dovrebbero essere eseguite le colorazioni minime speciali.

Colorazioni irrinunciabili:

- PAS
- Tricromica di Masson

Altre colorazioni:

- E&E
- PASM o altra impregnazione argentica
- PTAH (acido fosfotungstico-ematossilina)
- AFOG (fuxina acida - orange G)

Su specifica valutazione del patologo:

- Elastic-Van Gieson
- Rosso Congo

Immunoistochimica

In nefropatologia per le indagini immunoistochimiche si possono usare tecniche di immunofluorescenza diretta su materiale fresco e criopreservato oppure tecniche di immunoperossidasi su materiale fissato e incluso in paraffina. Mentre le prime garantiscono una migliore definizione dei depositi immuni anche nella loro valutazione quantitativa in base all'intensità di fluorescenza e un'alta sensibilità con scarso background fluorescente, le seconde garantiscono sezioni permanenti con maggior dettaglio morfologico ma sono gravate da un elevato background e non sempre evidenziano le frazioni del complemento e la restrizione monotipica delle catene leggere. Pertanto è altamente preferibile l'adozione delle tecniche di immunofluorescenza su materiale fresco criopreservato.

Si sottolinea anche la possibilità di eseguire tecniche di immunofluorescenza su materiale fissato e incluso in paraffina (i risultati peraltro non sono comparabili con quelli ottenuti sul materiale congelato).

In considerazione del decadimento della fluorescenza sarebbe inoltre auspicabile:

- l'acquisizione fotografica dei reperti con archiviazione digitale delle immagini o in alternativa la conservazione dei vetrini positivi a -80°C*
- la conservazione del materiale residuo e di eventuali sezioni non colorate a -80°C per rendere ripetibile l'indagine*

L'immunofluorescenza su materiale criopreservato richiede le seguenti fasi di processo:

- congelamento del frustolo
- sezione al criostato
- reazione di immunofluorescenza
- lettura al microscopio in epifluorescenza

Tecniche di congelamento

Il congelamento deve avvenire immediatamente dopo la suddivisione del campione, utilizzando tecniche di raffreddamento rapido:

- inclusione del frammento in OCT
- immersione diretta di azoto liquido
- immersione in isopentano preraffreddato in azoto liquido

Sezioni al criostato

Le sezioni seriate di 3-3,5 μm di spessore per almeno 3 livelli dovrebbero essere preferibilmente effettuate utilizzando un criostato dedicato. Prima della seriazione è necessario verificare la presenza di glomeruli sulla sezione criostatata con colorazione rapida (E&E o Blu di Toluidina).

Reazione di immunostochimica

Il pannello di base è rappresentato da: IgG, IgA, IgM, C1q, C3, Fibrinogeno, Kappa, Lambda. In casi selezionati è possibile anche una tipizzazione delle sottoclassi delle IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

C4d in patologia del trapianto.

Altri anticorpi da utilizzare in casi selezionati: componenti dell'amiloide (A e P), fibronectina, collagene III, anticorpi anti-catene alfa nell'Alport.

Microscopia elettronica

Sarebbe consigliabile ottenere sempre, laddove il materiale lo consenta, un frustolo dedicato alla microscopia elettronica con le seguenti modalità:

- dimensioni di circa 1 mm³
- fissazione in glutaraldeide 2,5% 0,1 molare in tampone fosfato o cacodilato per 4-6 ore
- lavaggio ed eventuale conservazione in tampone fosfato o cacodilato
- post-fissazione osmica
- inclusione in resina
- sezioni semifini e ultrasottili
- colorazione/contrasto con sali di metalli pesanti (citrato di piombo e acetato di uranile)
- osservazione al microscopio elettronico a trasmissione.

Modalità di refertazione

Va sottolineata la necessità che la diagnosi nefropatologica sia affidata ad un patologo, sia unica e rappresenti la valutazione complessiva dei reperti microscopici ottici, immunostochimici e, quando necessari, ultrastrutturali. I patologi coinvolti nella sola indagine e *valutazione* ultrastrutturale devono poter disporre delle altre indagini in microscopia ottica e/o immunostochimica in accordo con il patologo inviante.

Un referto ideale dovrebbe essere effettuato con un sistema di refertazione informatizzato e

deve contenere una descrizione accurata ma sintetica dei vari compartimenti, glomerulare, tubulo-interstiziale e vascolare, facendo riferimento ai dati desunti dalle tecniche di microscopia ottica (colorazioni speciali) e di immunoistochimica.

Segue una diagnosi epicritica utilizzando termini standardizzati secondo le classificazioni internazionali, anche con la valutazione/indicazione di elementi prognostici (attività e cronicità della malattia) ovvero predittivi o di monitoraggio di risposta terapeutica.

Possono essere previsti commenti aggiuntivi relativi all'adeguatezza del materiale e/o alla necessità di un ricorso all'indagine ultrastrutturale.

Si ribadisce l'importanza della discussione interdisciplinare tra nefrologi e patologi.

Tempi di risposta (TAT)

I tempi di risposta devono essere adeguati al contesto clinico:

- Comunicazione verbale, certificabile attraverso eventuale comunicazione tipo read-back, per casi con urgenza clinica nel più breve tempo possibile (timeless)
- Referto nell'80% dei casi entro 5 giorni lavorativi per tutti gli altri casi sulla base dei dati morfologici ottici e di immunoistochimica.

Si sottolinea che una valutazione diagnostica finale dopo indagine ultrastrutturale richiede tempi non facilmente standardizzabili stante le ben note difficoltà organizzativo-gestionali che gravano su di un laboratorio di microscopia elettronica. Tuttavia si può ipotizzare che una valutazione ultrastrutturale possa essere ottenuta nell'80% dei casi entro 30 giorni lavorativi.

Per garantire questa tempistica le amministrazioni regionali e aziendali sono sollecitate ad assicurare tutte le necessarie risorse strumentali e umane.

Attività di formazione continua professionale e di Controllo di Qualità (di laboratorio e professionale, interna ed esterna)

Si auspica che le società SIAPEC e SIN possano a breve produrre documenti congiunti e condivisi relativi all'organizzazione di percorsi di formazione professionale continua sia per nefrologi sia per patologi e programmi di controllo di qualità.

Queste finalità possono essere perseguite anche con la formazione di una rete attraverso cui sperimentare forme di telepatologia in nefrologia.