

**SINTEZA PROIECTULUI DE CERCETARE  
RU-TE 112/2010  
-2013-**

**TEMA:  
ETIOMORFOPATOLOGIA GLOMERULONEFRITELOR  
IMUNE LA CÂINE**

**Director de proiect,  
Sef.lucr.dr. Sorin-Aurelian Pașca**

# **ELABORAREA UNEI METODOLOGII DE DIAGNOSTIC A GLOMERULONEFRITELOR LA CAINE**

## **PROTOCOLUL BIOPSIEI RENALE LA CÂINE**

Realizarea impetuasă a biopsiei renale își are argumente în stabilirea:

- a. diagnosticul specific
- b. severitatea bolii renale
- c. tratamentului etiologic.

Afecțiunile renale au o incidență ridicată la câine și pisică. Pentru diagnosticul diferențial al insuficienței renale acute sau cronice sau al unei leziuni glomerulare anamneza, examinarea clinică și examenele de laborator nu sunt întotdeauna suficiente. Biopsia renală este întotdeauna necesară pentru stabilirea severității leziunii și a diagnosticului definitiv. Diagnosticul histologic este deasemenea absolut necesar în stabilirea planului de tratament. Succesul tratamentului este strâns legat de cunoașterea tipului și severității leziunii.

Literatura de specialitate indică faptul că riscurile și complicațiile biopsiilor renale sunt extrem de scăzute. Totuși, alegerea pacientului și tehnicilor potrivite reduc considerabil riscurile și cresc în aceeași măsură succesul biopsiei.

Biopsia renală furnizează întotdeauna un diagnostic definitiv al bolii glomerulare, dar poate fi evitată atunci când se poate diagnostica boala iar tratamentul recomandat duce și la remiterea semnelor clinice renale.

În stadiile finale ale bolii renale, depistată prin examene clinice și paraclinice, biopsia renală este inutilă. În fazele mai puțin severe diagnosticul furnizat de examenul histologic al biopsiei este un factor important în succesul tratamentului bolii glomerulare la câine și pisică.

Studiile de specialitate arată că biopsia renală la pacienții cu insuficiență renală cronică nu sunt indicate, deoarece pot crește riscul complicațiilor.

## Considerații generale înainte de a efectua o biopsie renală

Este în general recomandat ca înaintea efectuării unei biopsii renale să se ia în considerare istoricul pacientului, rezultatul examenului fizic al acestuia, valorile presiunii sanguine, profilul biochimic, hemoleucograma, rezultatele analizei urinei și nu în ultimul rând parametrii coagulării sanguine.

Contraindicațiile biopsiei renale includ coagulopatiile, anemia severă, hidronefroza, hipertensiunea arterială, chiștii renali mari și multipli, abcesele perirenale, pielonefritele cu extindere mare și stadiul final al bolii renale (end -stage kidney). La pacienții cu un singur rinichi, biopsia nu este întotdeauna contraindicată, atât timp cât nu mai este nici o altă contraindicație. De asemenea se recomandă tratarea și vindecarea eventualelor infecții urinare în prealabil. Biopsia rinichiului cu hidronefroza severă este contraindicată, deoarece prin puncționarea profundă până la nivelul bazinetului renal destins cu urină lsub presiune se eliberează conținutul acesteia și în plus avem toate șansele de a întâlni vasele de sânge din medulară.

Identificarea pacienților cu tendință de sângerare (coagulopatii) este absolut necesară în selectarea pacienților ce pot fi biopsiați.

Nu recomandam efectuarea biopsiilor eco-ghidate câinilor cu trombocitopenie severă ( $\leq 80000/\mu\text{l}$ ), cu prelungirea timpului protrombinei (OSPT  $> 1,5 \times \text{normal}$ ), cu azotemie severă (creatinină serică  $> 5 \text{ mg/dL}$ ) cu hipertensiune arterială necontrolată sau acelor cărora li s-a administrat antiinflamatoare nesteroidiene în ultimile 5 zile. În cazul în care totuși biopsia este absolut necesară, după puncționare animalul trebuie monitorizat pentru a întâmpina eventualele hemoargii perirenale și eventual pregătit sânge pentru transfuzie.

Din punct de vedere tehnic, biopsiile se pot efectua transcutanat sau chirurgical. Cele transcutanate pot fi realizate cu ajutorul laparoscopului, a ecografului sau orb.

Indiferent de metoda utilizată, biopsia privește doar corticala renală, întrucât medulara renală este o zonă tisulară abundentă în vase de sânge, riscându-se în acest mod să se producă o hemoragie de mare întindere și în plus producerea de infarcte și fibroze.

Pentru biopsie este se recomandă zona corticală dintre polii apical și caudal. Rinichiul drept este de preferat, întrucât acesta este mai stabil (mai puțin flotant) fiind fixat de lobul caudat al ficatului.

Sedare și anestezie.

Realizarea biopsiei presupune imobilizarea animalului. Pentru realizarea unei cât mai bune imobilizări a animalului noi recomandăm anestezia sau sedarea. La animalele cu stare bună de sănătate, noi recomandăm anestezia generală, la cele cu o stare de sănătate precară recomandăm doar sedarea.

Alegerea acelor de biopsie percutanată se va face în funcție de caz, utilizându-le împreună cu pistolul de biopsie. Dimensiunea acelor poate varia (14G, 16G, 18G, 20G cu lungimea de 6, 9, 15 cm) în funcție de caz.

### **Complicații asociate biopsiei.**

Resultatele studiilor clinice au indicat că complicațiile biopsiilor renale au o frecvență aproximativă de la 1% la 18%. Această variație a complicațiilor este legată în mod direct de statusul de sănătate al câinelui în momentul biopsiei.

Incidența mai ridicată a complicațiilor post-biopsice a fost observată pe cazuistica noastră la câinii cu vârste peste 4-5 ani și greutate mai mică de 4 kg și cu nivel ridicat de creatinină (peste 5 mg/dl). De asemenea complicațiile au survenit și în urma anesteziei generale utilizate la câinii cu insuficiență renală severă.

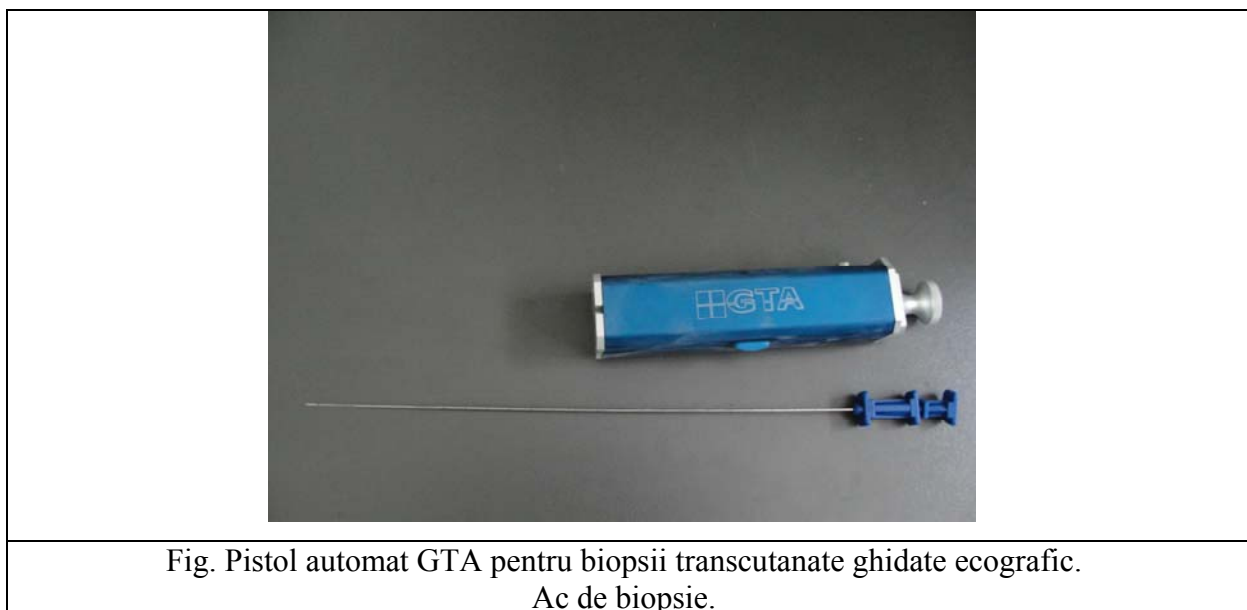


Fig. Pistol automat GTA pentru biopsii transcutanate ghidate ecografic.  
Ac de biopsie.



Fig. Pistol pregătit pentru biopsie.

### **PROTOCOLUL DE DIAGNOSTIC "INTRA VITAM" AL GLOMERULONEFRITELOR IMMUNE LA CÂINE.**

Depozitele reprezentate de complexe immune Ig A, Ig G și Ig M cu sau fără complement. Complexele immune pot fi preformate (circulante – CIC) sau pot fi antigene prinse care leagă anticorpi circulanți. Antigenele implicate pot fi rareori identificate dar pot fi demonstrate prin date anamnetice, examinare clinică, examen serologic, citologie sau PCR. Cauza adevărată este rareori descoperită deoarece imunohistochimia este foarte rar utilizată din cauza prețurilor prohibitive.

Complexele immune depuse la nivel glomerular induc inflamații (glomerulonefrite) prin intermediul mediatorilor, celulelor inflamatorii, complementului, activării trombocitelor, activării sistemului renină-angiotensină – aldosterone și a o serie de mediatori umorali și celulari care influențează activitatea de fagocitoză mezangială.

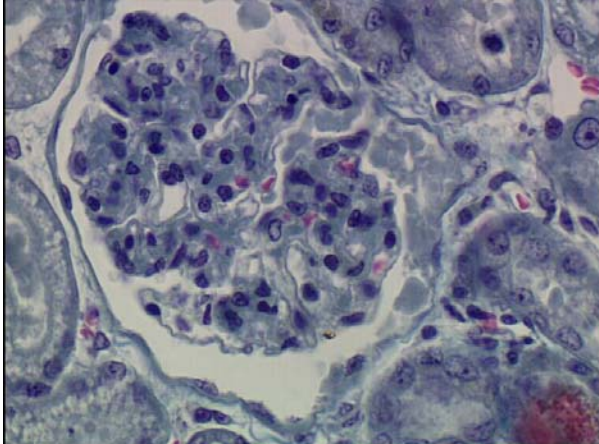
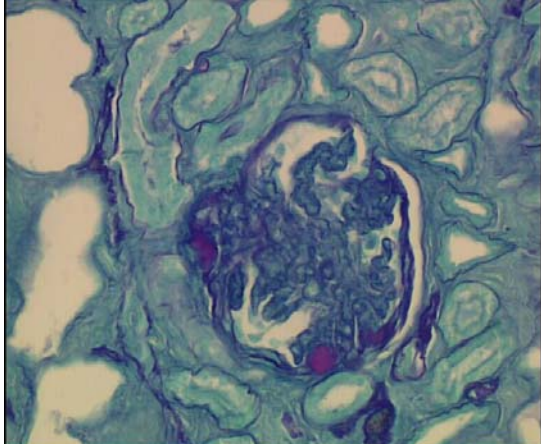
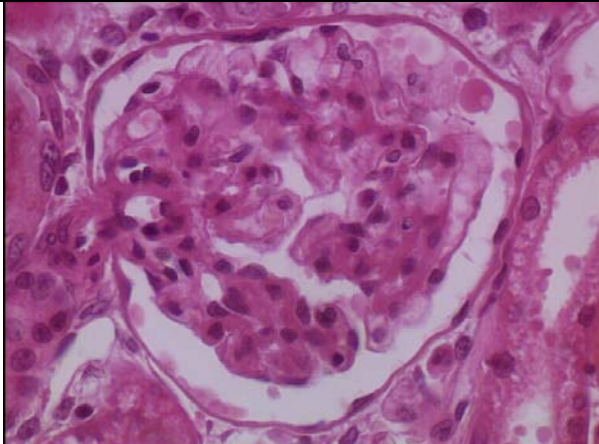
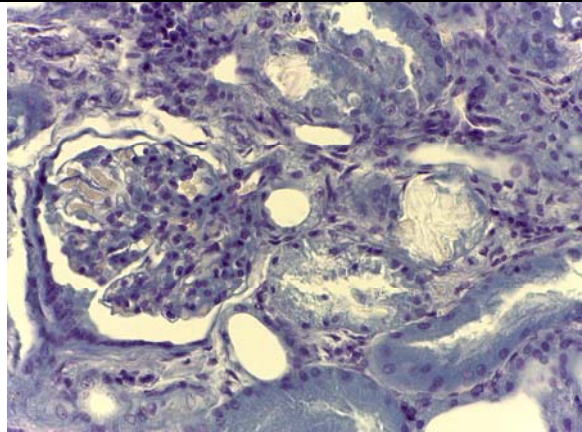
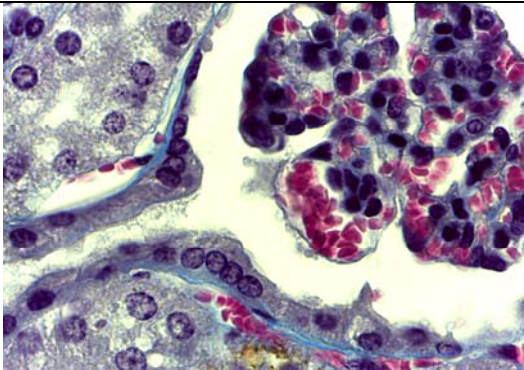
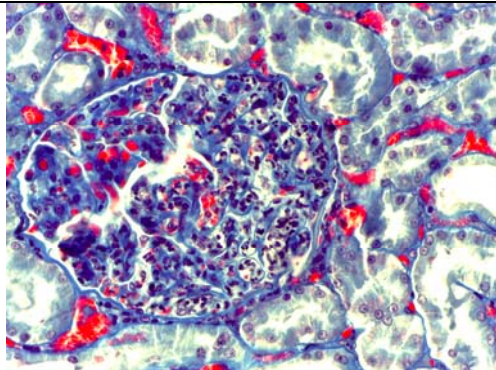
Glomerulonefrita membranoproliferativă (MPGN), este cunoscută sub două forme: glomerulonefrită proliferativă endocapilară și mesangială a avut o incidență moderată în cazuistica noastră. A fost remarcată în urma evoluției unor infecții în general sistemice (streptococie, stafilococie) la pacienții cu proteinuria moderată și severă.

La examenul histologic al biopsiei se observă proliferarea mezangială și afluxul la acest nivel de mononucleare (cel puțin 4-5 celule/mezangiu glomerular). Prin microscopie electronica cu transmisie se pot evidenția depozite granulare la nivelul membranelor bazale și in matricea mezangială. Prin intermediul imunohistochimiei s-au identificat depozite de Ig G și Ig M.

## ELABORAREA UNUI PROTOCOL DE LUCRU IN LABORATOR

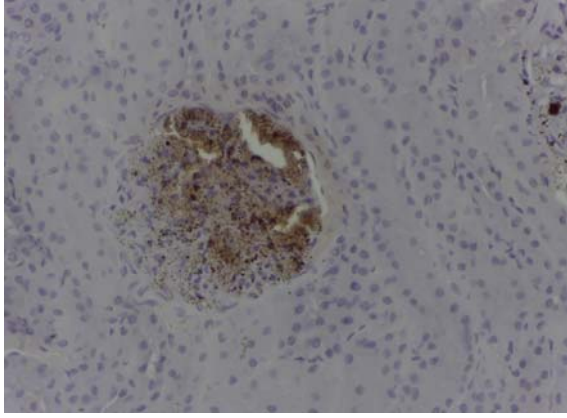
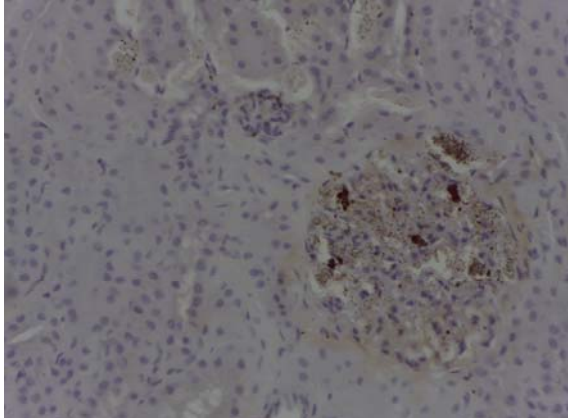
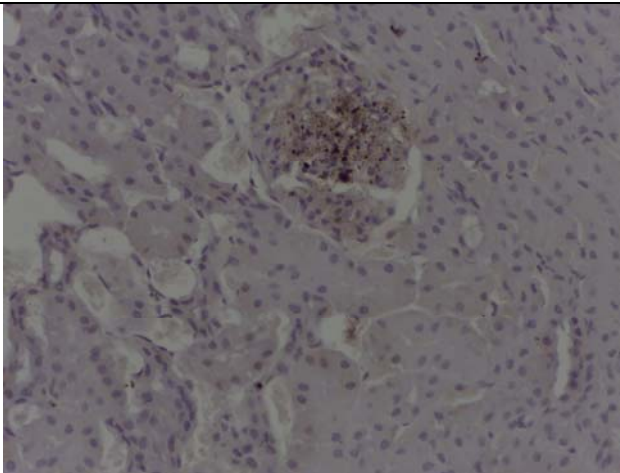
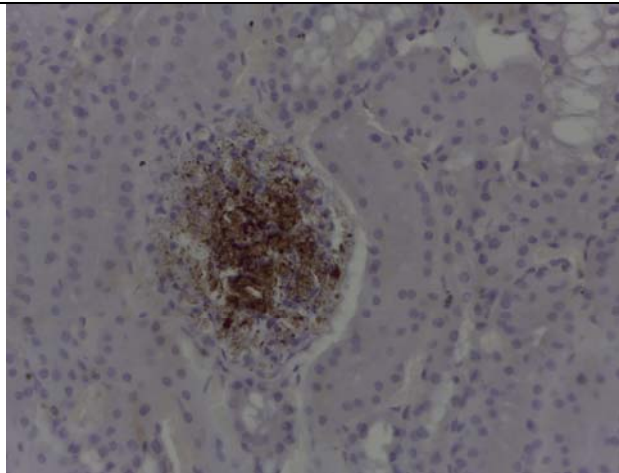
**Pacientii cu proteinurie severă au fost investigați după următorul protocol.**

1. Biopsie renală realizată cu pistol de biopsie (GTA –gun)
2. Examen histopatologic: includere la parafină, colorație HEA(tricromic Masson), PAS(PAS-verde luminos)
- 3.

	
Fig.1 Câine-dirofilarioză. Glomerulonefrită membranoasă. Col. HEA, x 400	Fig.2 Câine-dirofilarioză. Glomerulonefrită membranoasă. Col. PAS-verde luminos, x 200
	
Fig.3 Câine-dirofilarioză. Glomerulonefrită membranoasă. Col. PAS, x 400	Fig.4 Câine-intoxic cu antigel. Glomerulonefrită membranoasă. Col. HEA, x 200
	
Fig.5 Câine-boala lui Carré. Glomerulonefrită membranoproliferativă. Col. HEA, x 4000	Fig.6 Câine-boala lui Carré. Glomerulonefrită membranoproliferativă. Col. HEA, x 200

**3. Imunohistochimie (IHC)** – cu anticorpi anti Ig G, Ig A, C3-C5b, pentru evidențierea eventualelor complexe imune depozitate la nivel glomerular;

Metoda de lucru: fragmentele de rinichi au fost fixate și incluse în parafină, secționate la 5 μm. Acestea au fost deparafinate iar pentru demascarea epitopilor au fost încălzite la 95°C în 10 mmol soluție citrat pH6, timp de 10 minute la microunde și apoi lăsate spre racire la temperatura camerei timp de 20 minute. Lamele au fost apoi spălate de două ori în PBS (pH 7,5) timp de 5 minute. Apoi secțiunile au fost incubate cu primul anticorp diluat 1/200 în atmosferă umedă la temperatura camerei timp de o oră. După ce au fost spălate cu PBS, preparatele au fost incubate cu al doilea anticorp (anti specie) timp de o oră, în atmosferă umedă la 4 °C. Au fost apoi din nou spălate și incubate cu substratul cromogen (DAB) timp de 7 minute și colorate apoi cu hematoxilină. Clarificarea s-a realizat cu xilen.

	
Fig.7 Câine. Marcaj IgG la nivel glomerular. Background hematoxilinic. Col. HEA, 400	Fig.8 Câine - dirofilarioză. Marcaj IgA la nivel glomerular. Background hematoxilinic. Col. HEA, 400
	
Fig.9 Câine - dirofilarioză. Marcaj IgM la nivel glomerular(IHC). Background hematoxilinic.	Fig.10 Câine - dirofilarioză. Marcaj IgG la nivel glomerular (IHC). Background hematoxilinic.

#### 4. Microscopie electronica (TEM)

Metodă de lucru: pentru TEM, speci­me­nele au fost prefixate în soluție glutaraldehidă (2%) în tampon fosfat și fixate în soluție tetraoxid de osmiu ( $\text{OsO}_4$ ) în tampon fosfat (1%) și colorate în masă cu acetat de uranil 2% în alcool etilic (30%) și soluție alcoolică (70%) de acid fosfotungstic, după care probele au fost incluse în epon. Apoi au fost secționare la ultramicrotom și colorate cu acetat de uranil (1% soluție alcoolică) și soluție Reynolds.

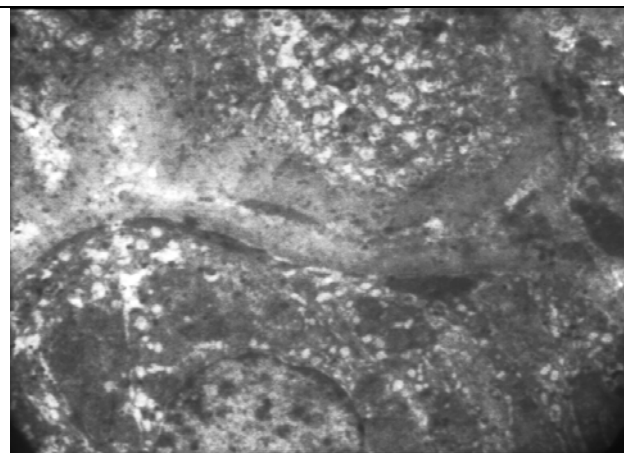


Fig.11 Câine. Depozite immune dense subendoteliale.(TEM) x1650

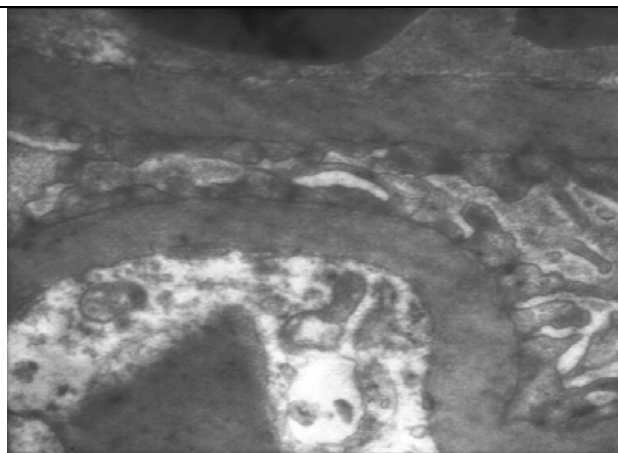


Fig.12 Câine. Depozite immune dense subepiteliale.(TEM)x6200