

IMUNOFLUORESCENȚA DIRECTĂ – O ABORDARE ACTUALIZATĂ A APLICAȚIILOR ȘI TEHNICII ÎN PEMFIGUSURI

Direct immunofluorescence – an updated view on the technique and applications in pemphigus

**Dr. Adina Alexandru, Dr. Carmen Maria Sălăvăstru, Dr. Răzvan Andrei,
Dr. Tiberiu Tebeica, Dr. Sabina Zurac, Dr. Florica Stăniceanu,
Prof. Dr. George-Sorin Țiplica**
Spitalul Colentina, București

REZUMAT

Imunofluorescența reprezintă un instrument util în diagnosticul și monitorizarea evoluției pemfigusurilor. Prin efectuarea imunofluorescenței directe a fost evidențiată prezența depozitelor imune cu dispunere specifică atât la nivel cutanat, cât și la nivelul foliculului pilos anagen în cazul pacienților cu pemfigus vulgar. Utilizarea foliculului pilos ca substrat pentru efectuarea imunofluorescenței directe are potențialul de a înlocui fragmentele cutanate sau mucoase prelevate prin biopsie, dar este necesară investigarea unui număr mai mare de pacienți pentru validarea metodei.

Cuvinte cheie: imunofluorescență, pemfigus, folicul pilos

ABSTRACT

Immunofluorescence is an useful tool for diagnosing and monitoring disease remission in pemphigus group of disorders. We demonstrated the presence of characteristic immune deposits by performing direct immunofluorescence both on skin fragments and anagen hair follicles in pemphigus vulgaris patients. Using the hair follicles as an alternate substrate for direct immunofluorescence has the potential of substituting skin or mucosal fragments taken by biopsies but a larger number of cases is needed in order to validate the method.

Key words: immunofluorescence, pemphigus, hair follicle

INTRODUCERE

Imunofluorescența reprezintă o tehnică de imunohistochimie prin marcarea cu compuși fluorescenți, utilizată pentru demonstrarea prezenței anticorpilor fixați la nivelul țesuturilor sau circulanți în fluidele organismului.

Această metodă este utilizată în dermatologie atât pentru investigarea fiziopatologiei afecțiunilor cutanate, cât și în scop diagnostic în multiple patologii, cu o valoare semnificativă mai ales în cazul afecțiunilor buloase autoimune și a bolilor autoimune de țesut conjunctiv.

Imunofluorescența directă (IFD) este o procedură ce determină identificarea anticorpilor legați de

antigene tisulare utilizând un fragment de țesut obținut de la pacient. În mod clasic se descriu două tipuri de probe ce pot fi examinate prin IFD, respectiv fragmente de tegument sau mucoase prelevate prin biopsie. IFD este o metodă extrem de valoroasă pentru confirmarea unui diagnostic de suspiciune și pentru efectuarea diagnosticului diferențial între maladiile imunobuloase. Imunofluorescența indirectă (IFID) este utilă în situațiile în care metoda directă este negativă sau nespecifică (1).

Diagnosticul pemfigusurilor

Pemfigusurile sunt afecțiuni buloase autoimune caracterizate de apariția autoanticorpilor îndreptați

Adresa de corespondență:

Dr. Adina Alexandru, Spitalul Clinic Colentina, Șos. Stefan cel Mare Nr. 19-21, București
e-mail: dr_adinaalexandru_ro@yahoo.com

împotriva unor proteine desmozomale keratino-citare, în principal desmogleina 3 și 1.

Diagnosticul de pemfigus se stabilește pe baza examinării clinice, a examenului histopatologic și este confirmat prin imunofluorescență.

Depunerea de IgG la nivel intercelular reprezintă marca pemfigusurilor (cu excepția pemfigusului cu IgA) și testarea prin IFD este pozitivă în 90-100% dintre cazurile de boală activă dacă fragmentul de țesut este prelevat corespunzător (1). Pattern-ul de fluorescență apare sub forma unor depozite liniare tipice pe suprafața keratinocitară, descris clasic sub formă de „rețea“.

Valoarea predictivă pozitivă a IFD pentru diagnosticul pemfigusurilor este de aproximativ 100%, în sensul că în cazul pozitivării acestui test probabilitatea confirmării diagnosticului de pemfigus este de circa 100% (1). Valoarea predictivă negativă se referă la situația în care un pacient cu un rezultat negativ al testării nu prezintă boala. În cazul pemfigusurilor această valoare se situează la circa 85-90%, deoarece există posibilitatea apariției unor rezultate fals negative (1).

IFD efectuată pe folicul pilos în pemfigusuri

Desmogleinele 3 și 1, proteine transmembranare din familia caderinelor, au fost identificate atât la nivelul epidermului interfolicular, cât și la nivelul foliculului pilos (FP), cu o dispunere specifică diferențierii (2,3): desmogleina 1 se exprimă la nivelul tecii epiteliale interne (TEI) și straturilor interne ale tecii epiteliale externe (TEE), desmogleina 3 se exprimă la nivelul tuturor straturilor TEE.

Prezența depozitelor imune specifice pemfigusului la nivelul FP a fost demonstrată anterior (4-7) prin efectuarea IFD.

Cercetare personală

Au fost analizate 9 cazuri de pemfigus vulgar (PV): 3 cazuri la debut înainte de inițierea terapiei, 5 pacienți cu boală activă în curs de tratament și un caz în remisiune clinică. Pentru fiecare pacient s-au prelevat biopsii cutanate pentru efectuarea examenului histopatologic și a IFD convenționale cutanate. S-au prelevat, de asemenea, fire de păr anagene de la nivelul scalpului pentru efectuarea IFD pe FP. Prin IFD s-a evaluat exprimarea IgA, IgM, IgG, C3 și fibrinogen, atât la nivel cutanat, cât și la nivelul FP. În cazul unui pacient s-au prelevat și fire de păr axilare și inghinale ce au fost testate prin IFD.

REZULTATE

Depozitele imune de IgG cu dispunere caracteristică în rețea au fost identificate la nivel cutanat

și al FP în toate cazurile de pemfigus investigate (Fig. 1, 2). Depozitele de C3 au fost identificate în FP într-un procent mai mic decât la nivel cutanat și cu o intensitate mai scăzută a fluorescenței. Cu toate acestea, aspectul în rețea pentru IgG evidențiat la nivelul FP a prezentat caractere specifice pentru diagnosticul de pemfigus, similar aspectului IFD efectuat pe fragmente cutanate. Testarea pentru IgA, IgM, fibrinogen a fost negativă (Fig. 3).

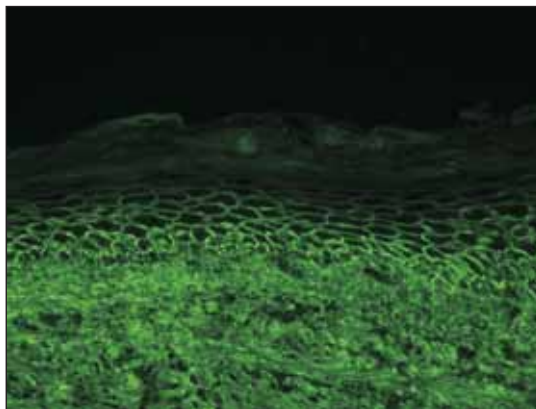


FIGURA 1. IFD cutanat – depozite IgG cu aspect de rețea

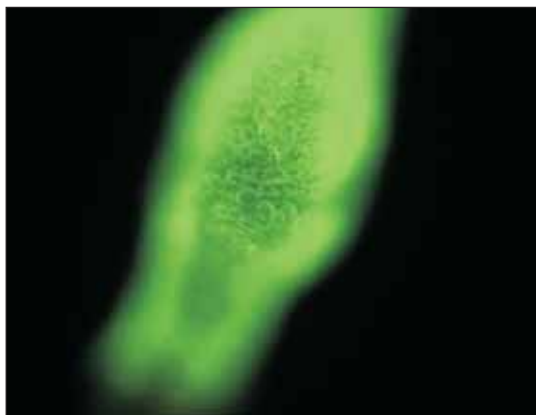


FIGURA 2. IFD folicul pilos – depozite IgG cu aspect de rețea

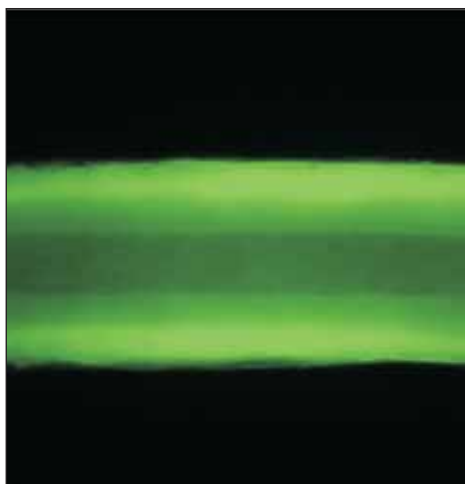


FIGURA 3. IFD pe folicul pilos – rezultat negativ

DISCUȚII

Sensibilitatea diagnostică a IFD pe FP la cazurile investigate, comparativ cu testarea cutanată, este similară, dar în mod evident este necesară investigarea unui lot lărgit de pacienți în scopul validării metodei.

Este remarcabilă concordanța rezultatelor obținute în contextul includerii în lotul de pacienți investigat a forme diferite de PV din punct de vedere al duratei de evoluție: atât cazurile la debut, cât și cele cu evoluție mai îndelungată sau chiar în remisiune clinică și sub tratament la momentul examinării au prezentat rezultate pozitive.

Prelevarea firelor de păr a fost efectuată de la nivelul scalpului, indiferent dacă pacienții prezentau sau nu leziuni vizibile la acest nivel. Apariția acantolizei și clivajului suprabazal, caracteristice PV, este evidențiable la nivelul epitelului folicular și poate constitui un indiciu preliminar pentru diagnosticul precoce al acestei afecțiuni la examinarea histopatologică, întrucât poate fi limitată strict la acest nivel, fără a fi regăsită la nivelul epidermului (8). Pozitivarea IFD efectuată pe FP prelevat de la nivelul scalpului ar putea fi evidențiată atât la pacienții care prezintă leziuni ale scalpului, cât și în cazul în care nu se constată prezența acestor leziuni, în condițiile în care boala este imunologic activă.

În cazul unui pacient cu PV la debut a fost efectuat IFD pe FP recoltând fire de păr atât de la nivelul scalpului, cât și de la nivel axilar și inghinal. Rezultatele au fost pozitive pentru toate tipurile de fire recoltate, dar cu o intensitate mai scăzută a fluorescenței la nivelul firelor axilare și inghinale comparativ cu cele de la nivelul scalpului, constatare explicabilă prin prisma cantității mari de antigene specifice PV de la nivelul scalpului comparativ cu alte zone anatomice (9).

Nu au fost testate prin această metodă alte forme clinice de pemfigus. Raportări anterioare (7) relevă faptul că aspecte similare pentru IFD au fost identificate și în cazuri de pemfigus vegetant, foliaceu sau eritematos.

IFD pe FP în PV aflat în remisiune clinică

A fost testat prin IFD efectuat pe FP recoltat de la nivelul scalpului un pacient aflat în remisiune clinică la momentul investigării, diagnosticat anterior cu PV și aflat la momentul testării în curs de tratament cu o doză scăzută de corticosteroizi sistemici. Testarea a fost pozitivă pentru IgG. Acest rezultat demonstrează faptul că afecțiunea se afla în remisiune clinică, dar nu imunologică.

Această constatare poate pune în discuție valoarea efectuării IFD pe folicul pilos în cazul

monitorizării remisiunii clinice și imunologice la pacienții cu pemfigus. Monitorizarea remisiunii în pemfigusuri și decizia de întrerupere a terapiei se bazează pe criterii clinice sau/și imunologice, opțiunea clinicianului fiind la baza acestei decizii. Din punctul de vedere al monitorizării remisiunii imunologice, clasic efectuată prin IFD, aceasta se poate realiza, conform studiilor publicate, prin IFD, într-un mod chiar mai eficient decât prin IFID (10). Managementul acestor pacienți presupune inducerea remisiunii clinice și imunologice a bolii prin terapia instituită, pentru ca ulterior aceasta să poată fi întreruptă și reinițată în cazul recăderii.

Un studiu recent (11) investighează posibilitatea efectuării IFD pe FP (fire de păr anagen recoltate de la nivelul scalpului) în scopul monitorizării remisiunii imunologice a pemfigusurilor, analizând 55 de pacienți diagnosticați cu PV, aflați în remisiune clinică și în curs de tratament de întreținere, prin efectuare atât a IFD pe FP, cât și IFD convențional (piele sau mucoase). IFD efectuat pe FP a fost pozitiv în 65,5% din totalul pacienților pe când IFD convențional a fost pozitiv în 50,9% dintre cazuri. Prin urmare, au existat cazuri în care, deși IFD convențional era negativ, activitatea imunologică era încă prezentă și relevantă de pozitivarea IFD pe FP. În aceste situații întreruperea tratamentului doar pe baza rezultatului IFD convențional ar fi fost prematură.

Manevra de prelevare a firelor de păr este facilă, nedisconfortantă pentru pacient și mai ieftină decât efectuarea biopsiilor cutanate sau mucoase, aplicabilă și în cazul pacienților la care biopsiile sunt dificile (copii, localizări mucoase, adulți necooperanți). Astfel, acest tip de testare ar putea fi utilizat ca metodă diagnostică sau de monitorizare prin IFD a remisiunii imunologice în pemfigusuri fără a exista dificultatea efectuării biopsiilor seriate.

CONCLUZII

Aceste constatări preliminare necesită investigație suplimentară prin constituirea unor loturi lărgite de pacienți astfel încât metoda să poată fi verificată din punct de vedere al sensibilității în diagnosticul și monitorizarea remisiunii imunologice în pemfigusuri. Avantajele utilizării unei astfel de metode sunt prelevarea facilă a probelor comparativ cu IFD convențional sau chiar o posibilă sensibilitate mai mare a acestui tip de testare comparativ cu testarea cutanată sau mucoasă în cazurile de pemfigus în remisiune clinică.

BIBLIOGRAFIE

1. **Mutasim D.F., Adams B.B.** – Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:803-822
2. **Wu H., Stanley J.R., Cotsarelis G.** – Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol* 2003; 120:1052-7.
3. **Wilson C.L., Dean D., Wojnarowska F.** – Pemphigus and the terminal hair follicle. *J Cutan Pathol* 1991; 18:428-31
4. **Schaerer L., Trueb R.M.** – Direct immunofluorescence of plucked hair in pemphigus. Rao R., Shenoi S.D., Balachandran C. *Arch Dermatol* 2003; 139:228-9
5. **Demonstration of pemphigus specific immunofluorescence pattern by direct immunofluorescence of plucked hair.** *J Am Acad Dermatol* 2008; 58:AB85.
6. **Daneshpazhooh M., Asgari M., Naraghi Z.S. et al.** – A study on plucked hair as a substrate for direct immunofluorescence in pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:129-31
7. **Kumaresan M., Rai R., Sandhya V.** – Immunofluorescence of the outer root sheath: an aid to diagnosis in pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36(3):298-301
8. **Mahalingam M.** – Follicular acantholysis: a subtle clue to the early diagnosis of pemphigus vulgaris. *Am J Dermatopathol* 2005; 27:237-239
9. **Ioannides D., Hytiroglou P., Phelps R.G., Bystryk J.C.** – Regional variation in the expression of pemphigus foliaceus, pemphigus erythematosus and pemphigus vulgaris antigens in human skin. *J Invest Dermatol* 1991; 96; 159-161
10. **David M., Weissman-Katzenelson V., Ben-Chetrit A. et al.** – The usefulness of immunofluorescent tests in pemphigus patients in clinical remission. *Br J Dermatol* 1989; 120:391-5.
11. **Daneshpazhooh M., Zahra S., Naraghi Z.S. et al.** – Direct immunofluorescence of plucked hair for evaluation of immunologic remission in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2011 June 21, ahead of print, doi:10.1016/j.jaad.2010.09.721