

## Ανοσοφθορισμός: Η συμβολή της μεθόδου στη μελέτη των πομφολυγωδών νοσημάτων του δέρματος

Αυγερινού Γ., Ζαραφονίτης Γ., Σταυρόπουλος Π.Γ.

### *Immunofluorescence: Applications for the study of bullous diseases of the skin*

Avgerinou G., Zarafonitis G., Stavropoulos P.G.  
Immunodermatology lab "A. Syngros" Hospital, Athens

*The immunofluorescent techniques have contributed significantly in the diagnosis, therapy and understanding of the pathogenesis of the bullous diseases the last years.*

*There are three basic types of immunofluorescence-combined where necessary with split-skin technique-used in dermatology: direct immunofluorescence, indirect immunofluorescence and complement indirect immunofluorescence.*

*The direct immunofluorescence detects the deposition of immunoglobulin, complement and fibrin in the skin in a biopsy specimen. The biopsy site should be considered carefully, as an improper sampling site produces misleading results. It is especially important that the dermatologist and the pathologist coordinate their efforts to ensure optimal results. The indirect immunofluorescence detects the circulating antibodies to intercellular substance and basement membrane zone, as occur in pemphigus and bullous pemphigoid, respectively. The examiner identifies the immunoglobulin class or subclass, the site of deposition and the title. The circulating antibodies are mainly IgG class. The complement indirect technique makes use of the principle that two IgG antibodies bound to antigen can generate many molecules of C3. The complement indirect technique enhances the sensitivity of the indirect immunofluorescent. This technique also detects in serum or other tissues-fluids antibodies that fix complement. The technique mainly applies for the diagnosis of the pemphigoid gestations. The split-skin technique separates the skin at the epidermal-dermal junction. The technique contributes in distinction to: whether the immunoreactants are deposited to the epidermal side or the dermal side of the cleavage. This distinction has offered significantly in the differential diagnosis for diseases as epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. The methodology of the immunofluorescent techniques is described, as applied in the bullous diseases*

of the skin.

**Key words:** immunofluorescence, bullous diseases

Τα τελευταία χρόνια ο ανοσοφθορισμός έχει συνεισφέρει τα μέγιστα στη διάγνωση, θεραπεία και κατανόηση των πομφολυγωδών νοσημάτων. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι ανοσοφθορισμού που πρέπει να συνδυαστούν με την τεχνική διαχωρισμού δέρματος – όπου απαιτείται – που εφαρμόζεται στη δερματολογία: ο άμεσος ανοσοφθορισμός, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η έμμεση τεχνική δέσμευσης του συμπληρώματος.

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός ανιχνεύει τις εναποθέσεις των ανοσοσφαιρινών, του συμπληρώματος και της ινικής, στο δέρμα, σε υλικό βιοψίας. Η δέση λήψης της βιοψίας, πρέπει να επιλέγεται και να εκλέγεται προσεκτικά καθώς ακατάλληλο δείγμα οδηγεί σε λάθος αποτελέσματα. Είναι εξαιρετικά σημαντικό ο δερματολόγος και ο παθολογοανατόμος να συντονίζουν τις προσπάθειες για να σιγουρέψουν τα καλύτερα αποτελέσματα.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός ανιχνεύει κυκλοφορούντα αντισώματα που κατευδύνονται έναντι των διακυτταρίων ουσιών της επιδερμίδας ή της ζώνης της βασικής μεμβράνης, όπως συμβαίνει στη πέμφιγα και στο πεμφιγοειδές αντιστοίχως. Ο εξεταστής σημειώνει την κατηγορία ή υποκατηγορία των ανοσοσφαιρινών, την εντόπιση των εναποθέσεων και τις διαδοχικές αραιώσεις (τιτλοποίηση). Τα κυκλοφορούντα αντισώματα είναι κυρίως τάξης IgG.

Η έμμεση τεχνική δέσμευσης του συμπληρώματος χρησιμοποιεί την αρχή ότι δύο IgG αντισώματα δεσμευμένα με αντιγόνο, δημιουργούν πολλά μόρια του κλάσματος C<sub>3</sub> του συμπληρώματος. Η τεχνική αυτή αυξάνει την ευαισθησία της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η τεχνική επίσης ανιχνεύει στον ορό ή σε υγρά άλλων ιστών αντισώματα που δεσμεύουν το συμπλήρωμα. Η κύρια εφαρμογή της αφορά τη διάγνωση του πεμφιγοειδούς της κηύσεως.

Η τεχνική διαχωρισμού του δέρματος διαχωρίζει το δέρμα στη συμβολή της επιδερμίδας με το χόριο και συνδυάζεται τόσο με το άμεσο όσο και με το έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η τεχνική συμβάλει στη διάκριση του αν οι ανοσοδραστικές ουσίες εντοπίζονται στην πλευρά της επιδερμίδας ή στην πλευρά του χορίου. Η διάκριση αυτή έχει βοηθήσει στη διαφορετική διάγνωση νοσημάτων όπως της επίκτητης πομφολυγώδους επιδερμόλυσης από το πομφολυγώδες πεμφιγοειδές. Η μεθοδολογία των τεχνικών του ανοσοφθορισμού, όπως εφαρμόζεται στα νοσήματα αυτά, περιγράφεται παρακάτω.

**Λέξεις κλειδιά:** ανοσοφθορισμός, πομφολυγώδη νοσήματα

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μια εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την απόδειξη της παρουσίας αντισωμάτων τόσο σε ιστούς όσο και σε σωματικά υγρά. Στη δερματολογία έχει ήδη τεκμηριωθεί η κλινική χρησιμότητα της.

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι της τεχνικής που εφαρμόζεται στη δερματολογία: ο άμεσος

ανοσοφθορισμός, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός με δέσμευση του συμπληρώματος. Οι τρεις αυτοί βασικοί τύποι μπορεί να συνδυαστούν με την τεχνική του διαχωρισμού του δέρματος (split-skin technique).

Η χρησιμότητα των τεχνικών αυτών αφορά τόσο τη διάγνωση όσο και τη θεραπεία των πομφολυγωδών αυτών νοσημάτων. Κατά περι-

πτωση, οι τεχνικές του ανοσοφθορισμού μπορούν να συμπληρώνονται με ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπηση ή και ανοσοαποτύπωση για την οριστική διάγνωση των νοσημάτων αυτών.

## 2. ΒΙΟΨΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός απαιτεί τη λήψη βιοψίας δέρματος ή βλεννογόνου του ασθενούς. Βιοψία από την ίδια τη βλάβη δεν είναι πάντα ικανοποιητική αφού τόσο οι ανοσοδραστικές ουσίες όσο και η αρχιτεκτονική των ιστών έχουν αλλοιωθεί, δυσκολεύοντας την ερμηνεία και ανάλυση της εικόνας στη μικροσκοπηση. Είναι ιδανικό η λήψη βιοψιών τόσο από κλινικά υγιές δέρμα, όσο και από δέρμα γειτονικό της βλάβης. Κατάλληλα δείγματα είναι: α. βιοψία δέρματος "punch" 3-4mm, από κλινικά υγιές δέρμα β. δέρμα γύρω από τη βλάβη από το άκρο της κλασσικής ατρακτοειδούς σχήματος βιοψίας.

Θα πρέπει η βιοψία να λαμβάνεται από τη βλάβη εντός 24-48h από το σχηματισμό της<sup>1</sup>. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τις προτιμητέες θέσεις βιοψίας για τα παμφολυγώδη νοσήματα. Τα δείγματα της βιοψίας πρέπει να συλλέγονται άμεσα και να καταψύχονται ταχέως. Στις περιπτώσεις που δεν είναι άμεσα διαθέσιμη η τεχνική του ανοσοφθορισμού, πρέπει τα δείγματα αφού πλυθούν σε απεσταγμένο νερό ή φυσιολογικό ορό να τοποθετούνται μέσα στο διάλυμα του Michel<sup>2</sup>. Το διάλυμα του Michel (Michel liquid fixative) περιέχει αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων, οι οποίοι εμποδίζουν την αυτόλυση των ιστών. Τα δείγματα δύναται να παραμείνουν έως 6 μήνες στο διάλυ-

μα αυτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο εργαστήριο, μόλις ληφθούν τα δείγματα μέσα στο διάλυμα του Michel, πλένονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline-PBS) για 30 min και κατόπιν καταψύχονται ταχέως.

## 3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Δείγματα αίματος απαιτούνται για τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων αντισωμάτων με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Περίπου 10 ml αίματος λαμβάνονται σε σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό και μεταφέρονται στο εργαστήριο το αργότερο εντός 48h. Ο ορός κατόπιν διαχωρίζεται από το πήγμα με φυγοκέντρηση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -25°C έως ότου εξετασθεί.

## 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

### 4.1 Άμεσος ανοσοφθορισμός

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική ενός σταδίου, που χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει την ύπαρξη και να καθορίσει τον τύπο της εναπόθεσης in vivo των ανοσοδραστικών ουσιών στο δέρμα ή στους βλεννογόνους των ασθενών. Η τεχνική αρχίζει με τη λήψη στον κρουοστάτη τομών πάχους 4μm σε θερμοκρασία από -25°C έως -30°C. Οι τομές τοποθετούνται πάνω σε καλυπτρίδα (ή σε αντικειμενοφόρο πλάκα). Οι τομές καλύπτονται κατά σειρά με τους εξής ειδικούς αντιορούς σημασμένους με φλουοροσεΐνη: IgM, IgG, IgA, C<sub>3</sub> και ινωδογόνου. Αφού καλυφθούν οι καλυπτρίδες με τους ειδικούς αντιορούς επωάζονται σε 37°C για περίπου μια ώρα. Μετά

**Πίνακας 1.** Θέσεις βιοψίας στον άμεσο ανοσοφθορισμό

Νόσημα	Θέσεις βιοψίας
Πέμφιγα (όλοι οι τύποι)	Δέρμα γύρω από τη βλάβη και δέρμα Κλινικά υγιές (γλουτός)
Πεμφιγοειδές (όλοι οι τύποι)	Δέρμα γύρω από τη βλάβη και δέρμα Κλινικά υγιές (μηρός ή βραχίονας)
Πεμφιγοειδές κυήσεως	Δέρμα γύρω από τη βλάβη
Γραμμική IgA νόσος	Δέρμα γύρω από τη βλάβη και δέρμα Κλινικά υγιές (γλουτός)
Επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση	Δέρμα γύρω από τη βλάβη
Ερπητοειδής Δερματίτις	Δέρμα κλινικά υγιές
Δισκοειδής Ερυθημ. Λύκος και	Δέρμα από τη βλάβη και δέρμα κλινικά υγιές εκτεθειμένο στον ήλιο (γλουτός) και μη εκτεθειμένο
Συστηματικός Ερυθημ. Λύκος	

την επώαση, πλένονται σε PBS για 10 min, ξεπλένονται σε απεσταγμένο νερό και αφού στεγνώσουν, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες για τη μικροσκόπηση. Ο βαθμός του φθορισμού (αδύνατος, μέτριος, ισχυρός) μπορεί να εκτιμηθεί μόνο κατά προσέγγιση από τον εξεταστή. Στη μικροσκόπηση καταγράφονται η κατανομή και ο τύπος των ανοσοδραστικών ουσιών. Σημειώνεται η τάξη των ανοσοσφαιρίνων και η παρουσία ή όχι συμπληρώματος. Εάν υπάρχει περίσσεια εναπόθεσης ινωδογόνου, αυτό προσδιορίζει ότι οι ανοσοαντιδραστής είναι παρόντες στις θέσεις βιοψίας, τουλάχιστον για 24-48h. Οι ανοσοδραστικές ουσίες εναποτίθενται σε δύο θέσεις: α. ενδιάμεσα των κυττάρων της επιδερμίδας β. κατά μήκος της βασικής μεμβράνης

Οι εναποθέσεις ανάμεσα στα κύτταρα της επιδερμίδας, μπορεί να αφορούν όλο το πάχος αυτής ή μόνο συγκεκριμένες στιβάδες. Πρέπει να προσεχθεί ιδιαίτερα η ύπαρξη ενός αριθμού ψευδώς θετικών artefacts, τα οποία ο εξεταστής οφείλει να τα διαφοροδιαγνώσκει από τα πραγματικά θετικά ευρήματα<sup>3</sup>. Στα ανωτέρω προβλήματα περιλαμβάνονται ο αυτοφθορισμός από πρωτεΐνες όπως η κερατίνη και οι ελαστικές ίνες. Ως πρόβλημα επίσης υπάρχει ο μη ειδικός ανοσοφθορισμός ο οποίος προκαλείται από τη δέσμευση της φθορίζουσας χρωστικής, είτε στους ιστούς που μελετώνται, είτε σε κυτταρικές διηθήσεις των ιστών αυτών από διάφορες ομάδες κυττάρων (π.χ. ηωσινόφιλα). Οι γνώσεις δερμοπαθολογιστρι-

τομίας και ανοσοφθορισμού μαζί με τη παράλληλη ιστολογική εξέταση της δομής των στοιχείων που φθορίζουν βοηθούν σημαντικά. Τα ευρήματα του άμεσου ανοσοφθορισμού στα διάφορα πομφολυγώδη νοσήματα του δέρματος παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Είναι ανάγκη να επισημάνουμε ότι ο άμεσος ανοσοφθορισμός είναι ποιοτικής εκτίμησης τεχνική και όχι ποσοτική και ως τούτου δεν προσδιορίζει τίτλο αντισωμάτων.

#### 4.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική δυο σταδίων που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ή στο πλάσμα ή σε υγρά άλλων ιστών, αντισωμάτων, που κατευθύνονται έναντι δέρματος ή βλεννογόνων των ασθενών με πομφολυγώδες νόσημα του δέρματος. Τα αντισώματα αυτά ανήκουν κυρίως στην τάξη των IgG ή IgA αντισωμάτων. Στο πρώτο στάδιο της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού, διαδοχικές αραιώσεις του ορού του ασθενούς σε διάλυμα PBS (phosphate buffered saline) επωάζονται με τομές του υποστρώματος. Ως υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα, οισοφάγος πιθήκου και οισοφάγος ινδικού χοιριδίου. Για κάθε ορό, τουλάχιστον 2 τομές φυσιολογικού ανθρώπινου δέρματος πάχους 4mm προετοιμάζονται ως εξής: αφού κοπούν στον κρουστάτη, τοποθετούνται σε καλυπτρίδες (μια τομή ανά καλυπτρίδα), στεγνώνονται για 10min, πλένονται σε PBS για 10min και

**Πίνακας 2.** Ευρήματα άμεσου ανοσοφθορισμού στα πομφολυγώδη νοσήματα

Νόσημα	Άμεσος Ανοσοφθορισμός
Πέμφιγα: φυλλώδης κοινή βλαστική	Εναποθέσεις κυρίως IgG αλλά και IgM, IgA, C <sub>3</sub> στα μεσοκυττάρια διαστήματα της επιδερμίδας
Πέμφιγα: παρανεοπλασματική	Εναποθέσεις κυρίως IgG αλλά και IgM, IgA, C <sub>3</sub> στα μεσοκυττάρια διαστήματα της επιδερμίδας και στη βασική μεμβράνη
Πέμφιγα: ερυθηματώδης	Μικτός τύπος: Εναποθέσεις μεταξύ των κυττάρων της επιδερμίδας και κοκκιώδεις εναποθέσεις στη βασική μεμβράνη
Πεμφιγοειδές: πομφολυγώδες	Γραμμικές εναποθέσεις IgG ή και C <sub>3</sub> στην ουλωτικό βασική μεμβράνη
Πεμφιγοειδές: κήσες	Γραμμικές εναποθέσεις κυρίως C <sub>3</sub> στη βασική μεμβράνη
Επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση	Γραμμικές εναποθέσεις κυρίως IgG αλλά και IgA στη βασική μεμβράνη
Γραμμική νόσος IgA (ενηλίκων, παιδών)	Γραμμικές εναποθέσεις IgA κυρίως στη βασική μεμβράνη
Ερπητοειδής δερματίτις	Κοκκιώδεις εναποθέσεις IgA κυρίως αλλά και C <sub>3</sub> στις δηλές του χορίου
Ομαλός λειχήν πεμφιγοειδής	Γραμμικές εναποθέσεις κυρίως C <sub>3</sub> ή και IgG και κυττοειδή σώματα στο χόριο με IgG, IgM, IgA και C <sub>3</sub>

στεγνώνονται για 10 min. Τότε επάζονται με τον ορό του ασθενούς σε συγκεντρώσεις 1/10 και 1/100 σε PBS (αν η δεύτερη επάση που ακολουθεί, αφορά δέσμευση με IgG αντι-ορό) ή σε συγκεντρώσεις 1/5 και 1/10 (αν η δεύτερη επάση που ακολουθεί, αφορά δέσμευση με IgA αντι-ορό)<sup>1</sup>. Η πρώτη αυτή επάση του ορού με το υπόστρωμα διαρκεί 60 min και γίνεται σε θερμοκρασία 37°C. Αφού προηγηθεί πλύσιμο σε PBS ώστε να απομακρυνθεί κάθε στοιχείο ορού που δεν ενώθηκε με το υπόστρωμα, ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της τεχνικής όπου τα ήδη συνδεδεμένα με το υπόστρωμα αντισώματα του ορού, επισημαίνονται με τη χρήση αντι-ανθρώπων ανοσοσφαιρίνων, συνδεδεμένων με τη φθορίζουσα ουσία. Χρησιμοποιούνται αντισώματα κατά των τάξεων IgG ή IgA συνήθως, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα κατά οποιασδήποτε τάξεως, ακόμα και υποτάξεως. Η δεύτερη αυτή επάση διαρκεί επίσης 60 min στους 37°C. Κατόπιν ακολουθεί πλύσιμο των καλυπτρίδων σε PBS για 10 min και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες για τη μικροσκόπηση.

Πολλά διαφορετικού τύπου επιθήλια έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα όπως ήδη αναφέρθη αλλά αυτά που προέρχονται από ινδικό χοιρίδιο εμφανίζουν αρκετά υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων και δεν ενδείκνυνται. Όμως υπάρχει μελέτη που δείχνει υπεροχή στη χρήση ως υποστρώματος

του οισοφάγου πιθήκου (monkey oesophagus) για τον διαχωρισμό των διαφόρων τύπων της πέμφιγας<sup>4</sup>. Φαίνεται ότι στη περίπτωση συγκεκριμένων νοσημάτων, υπάρχουν και συγκεκριμένα ζωικά επιθήλια με πολύ καλή εφαρμογή ως υποστρώματα<sup>5</sup>. Στη περίπτωση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται το φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα υπερέχει αυτό που προέρχεται από μη εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές του κορμού και των καμπτικών επιφανειών των άκρων. Αυτό το δέρμα εύκολα ανευρίσκεται στο εργαστήριο, από πλαστικές επεμβάσεις στήθους ή κοιλιακού τοιχώματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε σειρά της τεχνικής, πρέπει να συμπεριλαμβάνει γνωστά θετικά και αρνητικά controls. Ο εξεταστής σημειώνει την κατηγορία ή υποκατηγορία των ανοσοσφαιρίνων, τις διαδοχικές αραιώσεις (τιτλοποίηση) και τη μορφολογία και εντόπιση των εναποθέσεων. Τα κυκλοφορούντα αντισώματα είναι κυρίως τάξεως IgG. Η τάξη IgA είναι παρούσα σε συγκεκριμένες διαταραχές καθώς και υποτάξεις της<sup>6</sup>. Οι ανοσοσφαιρίνες μπορεί να εντοπίζονται πάνω στη βασική μεμβράνη ή στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των κυττάρων της επιδερμίδας. Τα ευρήματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού στα πομφολυγώδη νοσήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

### 4.3 Έμμεση τεχνική δέσμευσης του συμπληρώματος

Ένα και μοναδικό IgG αντίσωμα ή δυο

**Πίνακας 3.** Ευρήματα έμμεσου ανοσοφθορισμού στα πομφολυγώδη νοσήματα

Νόσημα		Έμμεσος Ανοσοφθορισμός
Πέμφιγα:	φυλλώδης κοινή βλαστική	Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι των ενδιάμεσων διαστημάτων των κερατινοκυττάρων
Πέμφιγα:	παρνεοπλασματική	Υψηλός τίτλος κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι του μεταβατικού επιθηλίου
Πέμφιγα:	ερυθηματώδης	Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι των ενδιάμεσων διαστημάτων των κερατινοκυττάρων αλλά και αντιπυρηνικά αντισώματα
Πεμφιγοειδές:	πομφολυγώδες ουλωτικό	Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι της βασικής μεμβράνης
Πεμφιγοειδές:	κυστώδες	Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι της βασικής μεμβράνης, τα οποία δεσμεύουν το συμπλήρωμα
Επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση		Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι της βασικής μεμβράνης
Γραμμική νόσος IgA (ενήλικων, παιδών)		Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι της βασικής μεμβράνης
Ομαλός λειχήν πεμφιγοειδής		Κυκλοφορούντα αντισώματα τάξης IgG έναντι της βασικής μεμβράνης

IgG αντισώματα δεσμευμένα σε αντιγόνο μπορούν να δημιουργούν πολλά μόρια του κλάσματος C<sub>3</sub> του συμπληρώματος. Η έμμεση τεχνική δέσμευσης του συμπληρώματος χρησιμοποιεί αυτή την αρχή ενίσχυσης για να αυξήσει της ευαισθησία της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Επίσης αυτή η τεχνική δύναται να μετρήσει πόσο καλά τα αντισώματα δεσμεύουν το συμπλήρωμα. Η τεχνική αυτή έχει τρία στάδια και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση στον ορό αντισωμάτων που δεσμεύουν το συμπλήρωμα. Η κύρια εφαρμογή της μεθόδου αφορά τη διάγνωση του πεμφιγοειδούς της κυήσεως. Στο νόσημα αυτό, τα αντισώματα στον ορό του ασθενούς δεσμεύουν πολύ ενεργά το συμπλήρωμα, αλλά είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με την κλασσική μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού<sup>7</sup>.

Στο πρώτο στάδιο, για κάθε ορό προετοιμάζονται 2 τομές υποστρώματος πάχους 4μm, οι οποίες επωάζονται με δύο αραιώσεις του ορού σε PBS: 1/2 και 1/4 για 60 min σε 37°C.

Αφού πλυθούν και στεγνώσουν, ακολουθεί η δεύτερη επώαση με το συμπλήρωμα, χρησιμοποιώντας ως πηγή συμπληρώματος ανθρώπινο ορό υγιούς μάρτυρα, σε διάλυμα 1/20 με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα συμπληρώματος. Ύστερα από τη δεύτερη επώαση, ακολουθεί πλύσιμο, στέγνωμα και η τελική επώαση με αντι-C<sub>3</sub> αντιορό συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες με τις τομές πλένονται σε PBS, στεγνώνονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες για τη μικροσκόπηση.

#### 4.4 Τεχνική διαχωρισμού του δέρματος

Οι τεχνικές διαχωρισμού του δέρματος (split-skin techniques) έχουν εύρει εφαρμογή στη μελέτη των πομφολυγωδών νοσημάτων, εκεί όπου αφενός επικαλύπτονται τα κλινικά ευρήματα και αφετέρου οι κλασσικές μέθοδοι της ιστολογικής εξέτασης και του ανοσοφθορισμού παρουσιάζουν κοινά ευρήματα δυσκολεύοντας τη διαφορική διάγνωση.

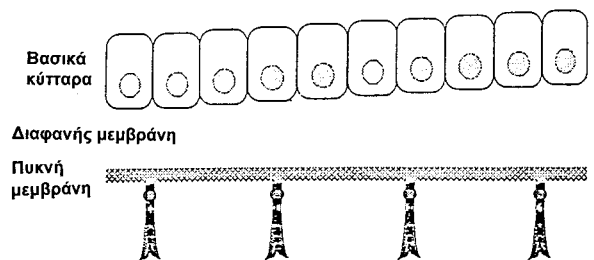
Οι τεχνικές αυτές διαχωρίζουν το δέρμα στη συμβολή της επιδερμίδας με το χόριο. Ο πίνακας 4 παρουσιάζει τους τρόπους που δια-

χωρίζεται το δέρμα. Όλες οι μέθοδοι διαχωρίζουν το δέρμα στο επίπεδο της διαφανούς μεμβράνης (lamina lucida) όπου είναι το σημείο ελαχίστης αντίστασης στη βασική μεμβράνη (Εικόνα 1). Η πλέον αξιόπιστη μέθοδος είναι αυτή της επώασης σε διάλυμα 1M NaCl για 24-48h σε θερμοκρασία 4°C<sup>8</sup>. Η τεχνική split-skin δύναται να εφαρμόζεται τόσο σε βιοψίες δέρματος για άμεσο ανοσοφθορισμό όσο και σε φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα που λειτουργεί ως υπόστρωμα στο έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Στο άμεσο ανοσοφθορισμό η τεχνική αυτή διαχωρίζει το τεμάχιο δέρματος της βιοψίας στο σημείο συμβολής επιδερμίδας και χορίου και εν συνεχεία με τη φθορίζουσα ουσία ανιχνεύονται εάν οι ανοσοδραστικές ουσίες εναποτίθενται προς την πλευρά της επιδερμίδας ή την πλευρά του χορίου. Αυτή ακριβώς η εντόπιση από τη μια ή την άλλη πλευρά συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση των πομφολυγωδών νοσημάτων. Σε ορισμένα νοσήματα όπως το πεμφιγοειδές, οι ανοσοδραστικές ουσίες εντοπίζονται στο επίπεδο του διαχωρισμού προς την πλευρά της επιδερμίδας και σε άλλα νοσήματα εντοπίζονται προς την πλευρά του χορίου (π.χ. επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση<sup>9</sup> - Εικόνα 2).

Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό η τεχνική split-skin διαχωρίζει το φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα. Ακολουθεί ο έμμεσος ανοσοφθορισμός όπου εντοπίζει εάν τα κυκλοφορούντα αντισώματα στον ορό του ασθενούς κατευθύνονται προς την πλευρά της επιδερμίδας ή του χορίου του δέρματος.

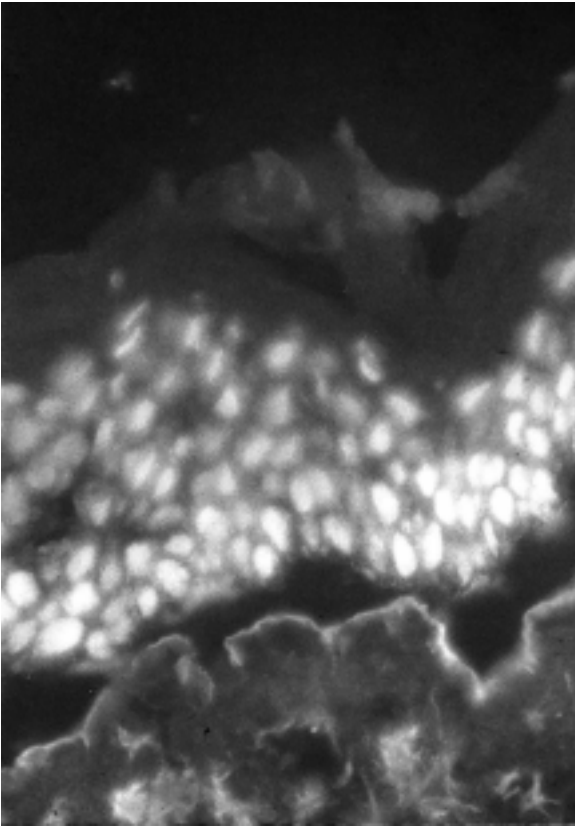
Αυτό επίσης συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση των πομφολυγωδών νοσημάτων. Άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι όταν η τεχνική split-



**Εικόνα 1.** Σχέδιο του διαχωρισμού του δέρματος στο επίπεδο της lamina lucida (διαφανής μεμβράνη) μετά από επώαση σε 1M NaCl για 24-48 ώρες σε 4°C.

#### Πίνακας 4. Μέθοδοι διαχωρισμού δέρματος

- Επώαση σε 1M NaCl για 24-48 ώρες σε 4°C
- Επεξεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα
- Πρόκληση πομφόλυγας ιατρογενώς



**Εικόνα 2.** Γραμμικού τύπου ανοσοφθορισμός σε τεχνητώς διαχωρισμένο δέρμα εντοπισμένος προς την πλευρά του χορίου (επίκτητη πομφολυγώδης επιδερμόλυση).

skin προηγείται του έμμεσου ανοσοφθορισμού, αυξάνει την ευαισθησία ανίχνευσης των κυκλοφορούντων αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς<sup>10</sup>.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχουν επιτευχθεί μεγάλα βήματα προόδου στη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών των πομφολυγώδων νοσημάτων του δέρματος. Μια σημαντική μερίδα της προόδου αυτής οφείλεται στη χρήση του ανοσοφθορισμού που διευκόλυνε τη διερεύνηση της ανοσολογικής βάσης αυτών των νοσημάτων. Ο ανοσοφθορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών, του συμπληρώματος και της ινικής. Η ανίχνευση των ανωτέρω ουσιών (ανοσοδραστικές ουσίες) έχει ιδιαίτερη αξία στη καθημερινή αντιμετώπιση των πομφολυγώδων νοσημάτων. Ο άμεσος ανοσοφθορισμός ανι-

χνεύει τις ουσίες αυτές στο προσβεβλημένο δέρμα, ενώ ο έμμεσος ανοσοφθορισμός προσδιορίζει την ύπαρξη τους στον ορό του ασθενούς. Ο τίτλος των αντισωμάτων που καθορίζεται με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό σε ορισμένα από τα νοσήματα είναι δείκτης της ενεργότητας αυτών των νόσων.

Σε ορισμένα νοσήματα τα ευρήματα του ανοσοφθορισμού είναι ειδικά της νόσου και παθογνωμονικά. Αυτό είναι αληθές σε ορισμένα από τα πομφολυγώδη νοσήματα στα οποία τα ευρήματα από τον ανοσοφθορισμό καθορίζουν και την οριστική διάγνωση του νοσήματος. Τα δε τελευταία χρόνια με την εφαρμογή της τεχνικής διαχωρισμού του δέρματος (split-skin technique) και με τα νέα ανοσολογικά ευρήματα έχουν ταξινομηθεί και διερευνηθεί νέες νοσολογικές οντότητες στην ομάδα των πομφολυγώδων νοσημάτων. Αυτό έχει επιτευχθεί γιατί η τεχνική διαχωρισμού του δέρματος βοηθά στον προσδιορισμό του σημείου εναπόθεσης των ανοσοδραστικών ουσιών, πληροφορία που μπορούσε να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση της ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας ή της ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting)<sup>11</sup>. Η τεχνική split-skin πρωτοχρησιμοποιήθηκε για τη διαφορετική διάγνωση του πομφολυγώδους πεμφιγοειδούς από την επίκτητη πομφολυγώδη επιδερμόλυση, αλλά έχει πλέον αποδειχθεί χρήσιμη στη διερεύνηση νοσημάτων όπως η πομφολυγώδης μορφή του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, του ουλωπτικού πεμφιγοειδούς, της γραμμικής IgA πομφολυγώδους δερματοπάθειας και του πεμφιγοειδούς ομαλού λειχήνα<sup>12</sup>.

Επί τη βάση των τελευταίων δεδομένων είναι υποχρέωση τόσο του δερματοπαθολογοανατόμου όσο και του δερματολόγου να ζητά την εκτέλεση των τεχνικών του ανοσοφθορισμού στη διαγνωστική προσπέλαση – ταξινόμηση, αλλά και στην παρακολούθηση της εξέλιξης των πομφολυγώδων νοσημάτων του δέρματος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bhogal B.S. and Black M.M. The immunological bullous diseases-Diagnosis, diagnostic and research techniques. In: Wojnarowska F and Briggaman R. Management of blistering diseases. Chapman and Hall Ltd, London, 1990: 15-35.
2. Vaughan Jones SA, Palmer I, Bhogal BS et al. The use of Michel' s transport medium for

- immunofluorescence and immunoelectron microscopy in autoimmune bullous diseases. *J. Cutan Pathol* 22:365-370, 1995.
3. Jenkins RE, Bhogal BS, Willstead E et al. Artefacts in immunofluorescence microscopy: a potent source of diagnostic confusion. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1:1741-1777, 1992.
  4. Sobolinski ML, Beutner EH, Kransky S et al. Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig oesophagus sections. *J Invest Dermatol* 88(5):545-9, 1997.
  5. Liu AY, Valenzuela R, Helm TN et al. Indirect immunofluorescence on rat bladder transitional epithelium: a test with high specificity for paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 28(5):696-699, 1993.
  6. Wojnarowska F, Bhogal BS, Black MM. Chronic bullous disease of childhood and linear IgA disease of adults are IgA1-mediated diseases. *Br J Dermatol* 131:201-204, 1994.
  7. Provost TT and Tomasi TB. Evidence for complement activation via the alternate pathway in skin disease: herpes gestationis, systemic lupus erythematosus and bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 52:1179-1787, 1973.
  8. Willstead EM, Bhogal BS, Das A et al. An ultrastructural comparison of dermo-epidermal separation techniques. *J Cutan Pathol* 18:8-12, 1990.
  9. Gammon NR, Fine JD, Briggaman R.A. Immunofluorescence on split-skin for the detection and differentiation of basement membrane antibodies. *J Am Acad Dermatol* 27:79-87, 1992.
  10. Willstead E, Bhogal BS, Black MM et al. Use of 1M NaCl split-skin in the indirect immunofluorescence of the linear IgA bullous dermatoses. *J. Cutan Pathol* 17:144-148, 1990.
  11. Dmochowski M, Hashimoto T, Bhogal BS et al. Immunoblotting studies of linear IgA disease. *J Dermatol Sci* 6:194-200, 1993.
  12. Gately L and Nesbitt L. Update on immunofluorescent testing in bullous diseases and lupus erythematosus. In Rapini R. *Use of the Laboratory in Dermatology. Dermatologic Clinics* 12:133-142, 1994.

---

**Corresponding author:**

Avgerinou G,  
Immunodermatology lab  
"A. Syngros" Hospital,  
J. Dragoumi 5 Athens 16121  
Tel.: 2107293395

---

**Υπεύθυνος αλληλογραφίας:**

Αυγερινού Γ,  
Ανοσοδερματολογικό Εργαστήριο  
Νοσοκομείο "Α. Συγγρός"  
Ιων. Δραγούμη 5 Αθήνα 16121  
Τηλ.: 2107293395