

DIAGNOSI DELLE MALATTIE PUSTOLOSE E VESCICOLO/BOLLOSE CUTANEE DI ORIGINE AUTOIMMUNE

FRANCESCA ABRAMO, FRANCESCO ALBANESE#, VANNI CELLAI*,
MICHELE CORAZZA°, MICHELA CALANDRELLA, E ALESSANDRO POLI

Dipartimento di Patologia Animale e °Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa -
#Libero Professionista, Napoli - *Libero Professionista, Firenze

Riassunto

Nel cane e nel gatto le malattie cutanee pustolose e vescicolo/bollose autoimmuni sono rare e, se non diagnosticate, possono avere conseguenze fatali per l'animale. La diagnosi si basa su una accurata anamnesi, su un attento esame clinico e dermatologico che tenga in considerazione tipologia e distribuzione delle lesioni, ma solo l'esame istopatologico ed indagini specifiche di laboratorio consentono una conferma della malattia. In questo lavoro verranno indicati l'iter diagnostico da seguire in caso di sospetto clinico di malattia cutanea autoimmune e le principali tecniche di laboratorio attualmente a disposizione per la diagnosi e per una più accurata classificazione di queste malattie.

Summary

Pustular and vesicle/bullous autoimmune skin diseases are rare in dogs and cats and their misdiagnosis can be fatal for the animal. The diagnosis is based on accurate clinical history and clinical evaluation of type and distribution of the lesions only histopathology and laboratory specific techniques allow to confirm the diagnosis. The authors will focus on the correct clinical examination approach and will describe the main laboratory techniques nowadays used for the diagnosis and accurate characterization of these diseases.

INTRODUZIONE

Nel cane e nel gatto le malattie cutanee pustolose e vescicolo/bollose autoimmuni sono piuttosto rare e sono una conseguenza della produzione, da parte dell'animale, di autoanticorpi diretti contro i normali costituenti dell'epidermide (desmosomi, emidesmosomi e vari componenti della membrana basale).¹ Attualmente sia in medicina umana che in medicina veterinaria la classificazione delle malattie pustolose e vescicolo/bollose autoimmuni della cute si basa sul tipo di antigene target dell'autoanticorpo. Nelle malattie che fanno parte del complesso del pemfigo l'antigene coinvolto è localizzato a livello delle strutture desmosomiali, e più precisamente la desmogleina 1 in caso di pemfigo foliaceo (PF) e la desmogleina 3 in caso di pemfigo volgare (PV).² Se gli autoanticorpi sono diretti contro antigeni strutturali della giunzione dermo-epidermica, le malattie che ne conseguono sono classificate, sia

in medicina umana che veterinaria, in: pemfigoide bolloso (l'antigene target è il collagene XVII presente nell'emidesmosoma), epidermolisi bollosa acquisita e lupus eritematoso sistemico bolloso tipo-I (l'antigene target è il collagene VII, fibrilla di ancoraggio presente nella sublamina densa della membrana basale), epidermolisi bollosa giunzionale acquisita (l'antigene target è la laminina 5 presente nella lamina densa della membrana basale) e il pemfigoide cicatriziale (gli antigeni target sono il collagene XVII e la laminina 5 presenti nell'emidesmosoma e nella membrana basale).³ Poiché queste malattie presentano tra loro differenze cliniche e prognostiche importanti, è fondamentale effettuare una diagnosi corretta e precoce in maniera da evitare conseguenze fatali per l'animale. Un'accurata anamnesi, un esame obiettivo generale e l'esame dermatologico sono la base per un primo approccio diagnostico verso questo tipo di malattie che devono essere confermate con l'ausilio di tecniche di laboratorio. Gli esami routinari di laboratorio quali l'emogramma, il profilo biochimico, l'esame chimico-fisico delle urine e l'elettroforesi delle proteine sieriche sono aspecifici e quindi non utili alla diagnosi definitiva.⁴

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 5/12/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 5/9/2004".



FIGURA 1 - Ampie pustole non follicolari con alone eritematoso in un cane affetto da pemfigo foliaceo.



FIGURA 2 - Grave stomatite ulcerativa in un cane con epidermolisi bollosa. Si noti la presenza di una vescicola integra sulla gengiva (freccia).

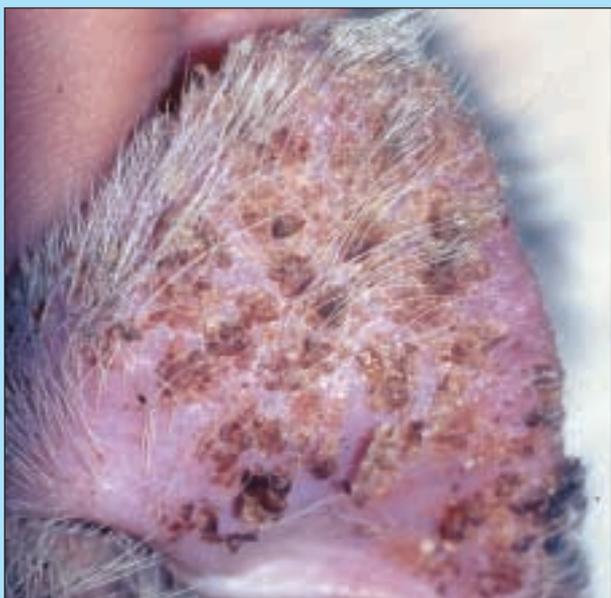


FIGURA 3 - Croste giallastre sul padiglione auricolare di un gatto con pemfigo foliaceo.

Di seguito verrà indicato l'iter diagnostico da seguire in caso di sospetto clinico di queste malattie autoimmuni con particolare riferimento all'esame clinico, citologico ed istologico. Verranno inoltre descritte le principali tecniche di laboratorio da utilizzare per la conferma e per una miglior classificazione di queste malattie.

ESAME CLINICO

Le pustole e le vescicole/bolle sono lesioni primarie che assumono una notevole importanza diagnostica e la loro visualizzazione sulla cute o sulla mucosa del cane e del gatto deve sempre far sospettare una malattia autoimmune. Per definizione la pustola è un rilievo circoscritto localizzato nell'epidermide a contenuto denso, di colore giallo, costituito da cellule infiammatorie (es. granulociti neutrofili in corso di piodermite) (Fig. 1). All'interno delle pustole possiamo ritrovare a seconda della malattia anche batteri e cellule epiteliali. La vescicola è invece una raccolta di fluido trasparente che può localizzarsi all'interno o al di sotto dell'epidermide e che può contenere occasionali elementi infiammatori e/o cellule epiteliali; le vescicole con diametro superiore ad 1 cm sono definite bolle (Fig. 2).

Per lo spessore esiguo dell'epidermide nel cane e nel gatto, sia le pustole sia le vescicole tendono a rompersi facilmente, pertanto il reperimento di queste lesioni non è costante e più spesso è possibile osservare le lesioni secondarie che si formano in seguito alla loro evoluzione temporale. Le pustole tendono ad essiccarsi e a dare origine in un primo momento ad una crosta di colore giallo intenso e in seguito ad una lesione caratterizzata da un'area circolare esfoliativa (collareto epidermico). Clinicamente la morfologia delle pustole che si sviluppano in corso di malattia autoimmune (pemfigo) è simile a quella che si osserva in corso di altre malattie dermatologiche quali la piodermite (malattia molto più frequente) o altre rare malattie pustolose non autoimmuni. Il clinico deve quindi saper ricavare dal segnalamento, dalla raccolta di una accurata anamnesi, nonché dalle valutazioni citologiche, utili informazioni che gli suggeriscano l'esecuzione di ulteriori test diagnostici. Dal punto di vista clinico bisogna valutare con molta attenzione la distribuzione anatomica delle lesioni, nel cane le lesioni del PF si localizzano prevalentemente alla testa e più precisamente su dorso del naso, tartufo, regione periorbitale, faccia interna dei padiglioni auricolari e cuscinetti plantari. È possibile osservare una generalizzazione progressiva delle lesioni a tutto il corpo. In corso di piodermite invece, le lesioni hanno una distribuzione meno prevedibile e raramente coinvolgono i padiglioni auricolari. Nel gatto, le lesioni del PF sono osservabili in particolare sui padiglioni auricolari (Fig. 3), sul muso, attorno ai capezzoli e nei letti ungueali. In quest'ultima sede il pus si disidrata ed esita nella formazione di un materiale bianco-giallastro simil-caseoso. Tali suggestive localizzazioni, unitamente alla estrema rarità delle piodermiti in questa specie, fa sì che la loro osservazione debba indirizzare subito il clinico verso l'esecuzione di ulteriori procedure diagnostiche. Nel PV le lesioni vescicolo/bollose coinvolgono quasi sempre la cavità orale.

Le vescicole/bolle, una volta rotte, esitano in erosioni (se la lesione è intraepidermica) o in ulcere (se la lesione è sottoepidermica). Purtroppo le lesioni vescicolo/bollose che si formano in corso di malattia autoimmune sono simili per morfologia a quelle che si sviluppano in numerosissime altre malattie di natura infettiva (virale), traumatica, ecc. Anche in questi casi saranno l'esame clinico-dermatologico e l'esecuzione di indagini laboratoristiche specifiche a consentire di effettuare la diagnosi. Alla luce di recenti studi epidemiologici sulle malattie vescicolo/bollose autoimmuni nel cane e nel gatto³ emerge come un esame clinico accurato, che consideri con particolare attenzione la distribuzione delle lesioni dermatologiche, sia il primo passo dell'approccio diagnostico nei confronti di queste malattie. Lesioni vescicolose/ulcerative in cavità orale, planum nasale, aree periorbitali, canale auricolare, regione anale e genitale indirizzano verso una diagnosi di pemfigoide delle membrane mucose (PMM), sulla faccia concava dei padiglioni auricolari, tronco, addome, ascelle e giunzioni mucocutanee verso una diagnosi di pemfigoide bolloso (PB) e lesioni su muso, ascelle, inguine, cavità orale (Fig. 2), giunzioni mucocutanee e cuscinetti verso una diagnosi di epidermolisi bollosa (EB).³ Occasionalmente possono essere presenti segni sistemici quali ipertermia, anoressia e depressione del sensorio e alitosi con scialorrea nei casi di interessamento orale.

Nelle Figure 4 e 5 vengono riportate le localizzazioni anatomiche delle lesioni nelle diverse malattie.

ESAME CITOLOGICO

L'esame citologico è un esame diagnostico che può risultare di grande utilità al fine di avere un primo dato orientativo sulla natura della lesione e poter immediatamente, con costi contenuti e con pratiche non invasive, escludere alcune patologie.

Questo tipo di indagine può infatti essere eseguita direttamente dal clinico con il solo ausilio di pochi strumenti diagnostici (vetrini, normali soluzioni di coloranti di tipo ambulatoriale quali il Diff Quick® e un microscopio ottico). La raccolta di materiale da una pustola integra può essere effettuata con diverse tecniche: i) per agoaspirazione/agoinfissione mediante una siringa/ago da insulina ii) rompendo con un ago sottile la periferia della pustola, sollevando e capovolgendo il tetto della stessa e infine apponendo un vetrino portaoggetti direttamente sul materiale purulento iii) se sono già presenti lesioni crostose, è possibile staccare le croste ed apporre con il loro lato essudatizio su un vetrino. Nel PF l'esame citologico effettuato da pustole intatte (lesioni recenti) rivela la presenza di granulociti neutrofili che non mostrano significativi segni di degenerazione nucleare (solitamente non degenerati), occasionalmente eosinofili e numerose cellule acantolitiche (Fig. 6). Queste ultime sono cheratinociti degli strati squamoso e granuloso dell'epidermide che si formano a seguito del processo di acantolisi che è alla base della formazione delle pustole in corso di PF. Le cellule acantolitiche sono riconoscibili per la loro forma tendenzialmente a profilo regolare rotondo, nucleo centrale e citoplasma intensamente basofilo, sono

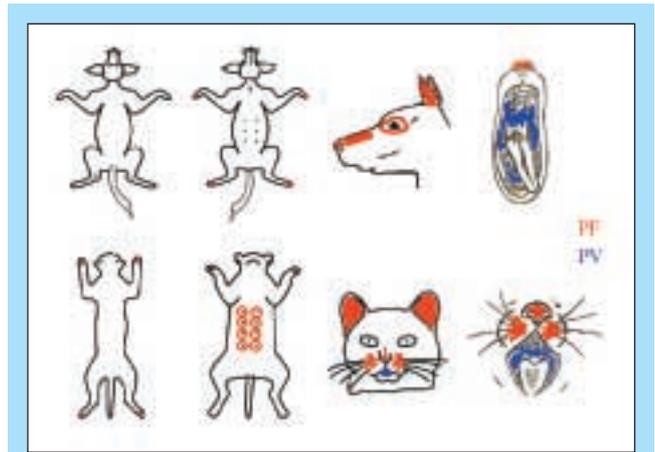


FIGURA 4 - Rappresentazione schematica della distribuzione clinica delle lesioni in corso di pemfigo foliaceo (PF) e pemfigo volgare (PV).

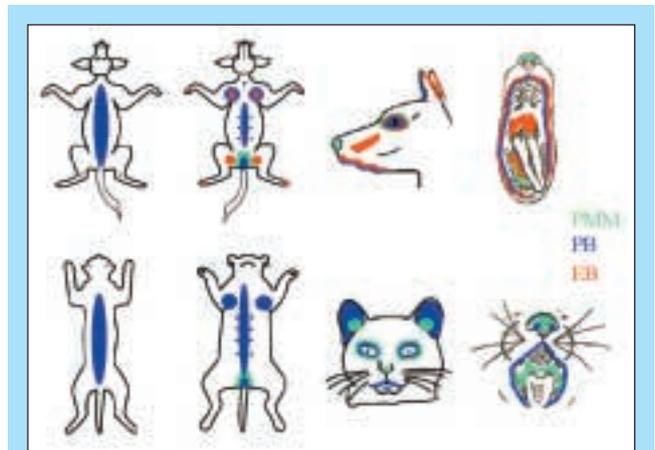


FIGURA 5 - Rappresentazione schematica della distribuzione clinica delle lesioni in corso di pemfigoide delle membrane mucose (PMM), pemfigoide bolloso (PB), ed epidermolisi bollosa (EB).

osservabili come elementi singoli o come piccoli aggregati coesi. Nelle pustole integre non si rinvenivano batteri in quanto il PF è una malattia sterile, ma qualora ci fosse una malattia batterica secondaria si potrebbero osservare alcuni batteri unitamente a segni degenerativi dei neutrofili, rendendo quindi impossibile la differenziazione tra PF ed una piodermite. Le cellule acantolitiche possono essere osservate anche in corso di piodermite in quanto il fenomeno di acantolisi può essere indotto dalla liberazione di proteasi batteriche. Per questo motivo è opportuno prescrivere una terapia antibiotica adeguata e rivalutare l'animale dopo due settimane; la persistenza delle pustole è fortemente indicativa di PF ed indirizza il clinico verso l'esecuzione di prelievi bioptici. L'esame citologico è quindi di particolare ausilio nella diagnosi del pemfigo foliaceo, è meno significativo in caso di pemfigo volgare in cui è più raro e difficile il riscontro di cellule acantolitiche mentre non è diagnostico in caso di malattie bollose della giunzione in quanto le lesioni vescicolo/bollose contengono solo fluido e occasionali cellule infiammatorie (neutrofili e/o eosinofili) a seconda dello stadio evolutivo della malattia.

ESAME ISTOPATOLOGICO

L'esame istopatologico viene solitamente eseguito per confermare la diagnosi ed è sempre consigliabile eseguire biopsie cutanee multiple. La zona da prelevare deve essere tricotomizzata con le forbici avendo cura di non danneggiare le lesioni dell'epidermide. Poiché sia le pustole sia le vescicole/bolle sono estremamente fragili è consigliabile effettuare la biopsia mediante tecnica escissionale e non utilizzando i comuni punch da biopsia per due motivi: i) il diametro delle lesioni è spesso superiore al diametro del punch, ii) la rotazione del punch potrebbe determinare la rottura del tetto di pustole o vescicole. Il campione di cute deve essere adagiato su un supporto di carta bibula facendone aderire la porzione profonda

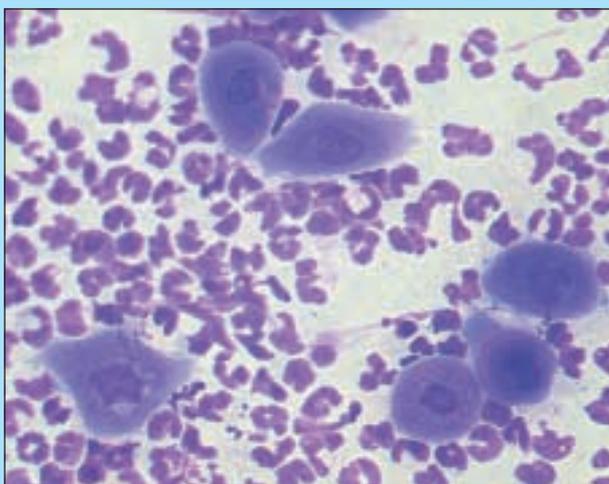


FIGURA 6 - Numerosi cheratinociti acantolitici (acantociti) e granulociti neutrofili non degenerati sono suggestivi di un pemfigo foliaceo.

(derma), e immediatamente fissato in formalina tampognata al 10%. Tale accorgimento impedisce la distorsione del campione, facilitando al patologo l'orientamento del preparato durante la fase di prelievo. La scelta delle lesioni è decisiva in quanto da questa dipende gran parte dell'esito istopatologico. Dovranno infatti essere prescelte zone in cui siano presenti lesioni primarie in stadio recente, mentre in assenza di queste le biopsie dovranno essere effettuate da croste (esito di pustole) o nella zona di passaggio tra lesione erosiva/ulcerativa e cute sana (in caso di vescicole/bolle). Il campionamento di lesioni primarie intatte aumenta notevolmente la possibilità di differenziare istologicamente tra i due grandi gruppi di malattie autoimmuni cutanee: le malattie pustolose del complesso del pemfigo e le malattie vescicolo/bollose della giunzione dermo-epidermica (Fig. 7). Istologicamente una pustola è definita come una raccolta intraepidermica di cellule infiammatorie e può o meno contenere cellule acantolitiche, una vescicola è una cavità contenente fluido che può formarsi nello spessore dell'epidermide o a livello di giunzione dermo-epidermica. Nel caso di malattie del complesso del pemfigo sarà possibile differenziare tra pemfigo foliaceo e pemfigo volgare in base alla tipologia e localizzazione intraepidermica delle pustole. Un'acantolisi sub-corneale o intragranulare con tendenza alla formazione di pustole ricche di granulociti neutrofili e/o eosinofili e di cellule acantolitiche (Fig. 8), sarà indicativa di pemfigo foliaceo, mentre una acantolisi soprabasilare con tendenza alla formazione di pustole a scarso contenuto sia di cellule infiammatorie che di cellule acantolitiche sarà indicativa di pemfigo volgare. Nel primo caso il rilievo di fenomeni di "cling's on" (distacco non ancora completo di cheratinociti dal tetto della pustola) e nel secondo caso la presenza di cellule basali allineate in singola fila sul fondo della pustola ("tombe stone" o pietre tombali) saranno ulteriori rilievi indicativi per la diagno-

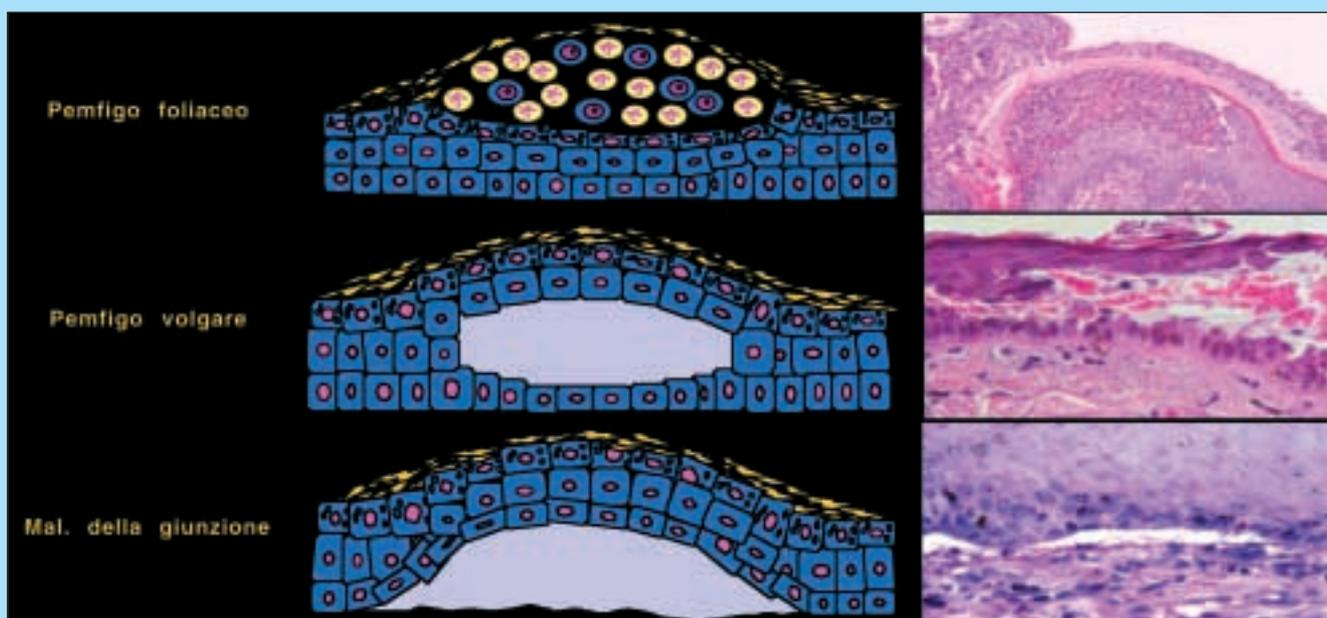


FIGURA 7 - Rappresentazione schematica della localizzazione di pustole/bolle cutanee in corso di pemfigo e malattie della giunzione e loro corrispondente immagine istologica.

si.^{2,5} In presenza di pustole subcorneali la prima diagnosi differenziale nei confronti di pemfigo foliaceo è sicuramente la piodermite superficiale. L'azione proteolitica degli enzimi batterici può determinare la rottura dei desmosomi e la formazione di pustole in cui sono rilevabili cellule acantolitiche. Le pustole in corso di infezione piodermica sono però più estese, sono multiloculari, spesso spongiotiche ed il numero di cellule acantolitiche è esiguo. Nel caso del gruppo di malattie vescicolo/bollose della giunzione, l'esame istopatologico consente di escludere con certezza il coinvolgimento dell'epidermide ed orienta piuttosto la diagnosi verso una patologia che coinvolga uno degli antigeni presenti a livello dell'interfaccia dermo-epidermica. La maggior parte delle volte risulta molto difficile, se non impossibile, una ulteriore sottoclassificazione di queste malattie. La presenza di eosinofili nell'infiltrato dermico può orientare verso una diagnosi di pemfigoide bolloso (PB) piuttosto che di epidermolisi bollosa acquisita (EBA) o pemfigoide delle membrane mucose (PMM) nel cane, ma deve essere tenuto in considerazione il fatto che nelle fasi avanzate del PB l'infiltrato eosinofilo può essere sostituito gradualmente da granulociti neutrofili; nel gatto tale infiltrato può non essere presente. Ne emerge che in questo gruppo di malattie l'esame istopatologico può essere utile nel confermare il coinvolgimento patogenetico della giunzione ma deve essere affiancato da un accurato esame clinico e da altri esami di laboratorio. Una delle diagnosi differenziali nei confronti di questo gruppo di malattie su base autoimmune sono malattie congenite su base genetica (EB semplice, giunzionale e distrofica) in cui la proteina difettiva appartiene a componenti strutturali della membrana basale (es: laminina, collagene VII). Questi stessi componenti strutturali possono essere target di autoanticorpi nelle forme acquisite; la laminina 5 può essere target di autoanticorpi nell'epidermolisi bollosa giunzionale acquisita³ o essere geneticamente alterata nell'epidermolisi bollosa giunzionale³. Solo sofisticate indagini di biologia molecolare, o l'esclusione di una patogenesi autoimmune possono risultare definitive ai fini della diagnosi.

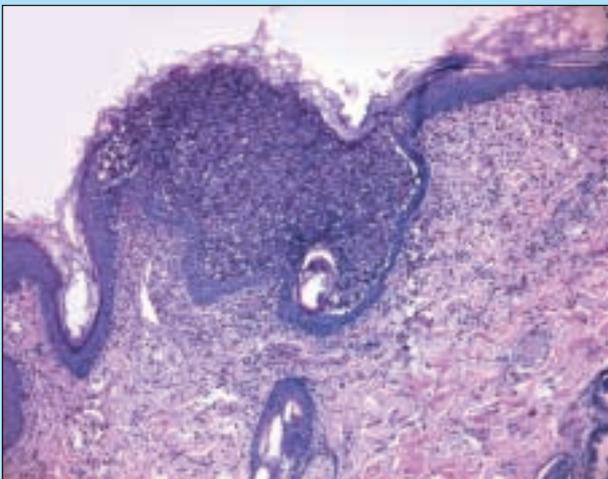


FIGURA 8 - Cane con pemfigo foliaceo. Immagine istologica di pustola subcorneale contenente neutrofili e gruppi di cellule acantolitiche (medio ingrandimento, E&E).

ALTRI ESAMI DI LABORATORIO

A) Tecniche immunoistochimiche

L'immunofluorescenza (IF) e l'immunoperossidasi, tecniche oggi molto utilizzate in ambito dermatologico (soprattutto in medicina umana), consentono di visualizzare nelle sezioni di tessuto antigeni, anticorpi, frazioni del complemento ed altri mediatori, in sede intracellulare e/o extracellulare. L'impiego della tecnica di IF per la diagnosi delle malattie autoimmuni cutanee risale al 1964, data in cui Beutner e Jordon⁶ dimostrarono per primi, nel siero di pazienti affetti da pemfigo, la presenza di autoanticorpi che si legavano agli spazi intercellulari di epitelio squamoso stratificato. Uno dei principali vantaggi nell'utilizzo di questa tecnica è quello di avere una buona combinazione di specificità e sensibilità immunologica oltre a consentire una localizzazione morfologica.

La tecnica di IF viene utilizzata nella diagnostica immunologica dermatologica per due finalità fondamentali:

i. Rilievo di antigeni, anticorpi o immunocomplessi depositati nella cute

Con questa tecnica i diversi antigeni nelle sezioni di tessuto possono essere evidenziati in seguito ad incubazione dei preparati con anticorpi specifici (anti IgG, IgM, IgA, C3, desmogleina, ecc...). Le biopsie cutanee prelevate da zone lesionate devono essere immediatamente congelate a -80°C in azoto liquido e sezionate al criostato entro poche settimane. Tale metodica è di difficile attuazione in campo veterinario dove molto spesso la sede ambulatoriale non è annessa ad una struttura specializzata (laboratorio o università) e pertanto il congelamento della biopsia cutanea risulterebbe inattuabile. Recentemente le metodiche di IF diretta e dell'immunoperossidasi sono state applicate su sezioni allestite in paraffina e la biopsia cutanea da analizzare può essere quindi routinariamente prelevata e fissata in formalina tamponata al 10%.⁷

ii. Rilievo nel siero del soggetto affetto da malattia autoimmune di autoanticorpi diretti verso particolari target tissutali

Il rilievo di autoanticorpi sierici può essere effettuato mediante

- *metodo indiretto su substrato congelato*. A questo proposito vengono utilizzati substrati tissutali provenienti da diverse specie animali, sedi anatomiche o da colture cellulari, in cui sono espressi tali antigeni.⁸ Il substrato viene allestito mediante tecnica di congelamento e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Porzioni congelate di esofago di scimmia sono attualmente i substrati di elezione in medicina umana. La scelta del substrato è finalizzata al reperimento di sezioni di tessuto in cui vengano espressi in modo rilevante gli antigeni che devono essere ricercati (Desmogleina 1 e 3 in caso di pemfigo, antigeni della giunzione dermo epidermica in caso delle malattie bollose subepidermiche). La mucosa di labbro di cucciolo sembra essere un buon compromesso per quanto riguarda l'espressione di questi antigeni ed è inoltre di facile reperimento (Fig. 9). Recentemente l'applicazione del metodo indiretto su substrato ottenuto da mucosa vescicale ha consentito di individuare la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni espressi nell'epitelio transizionale (plachine), in un cane con pemfigo paraneoplastico.⁹

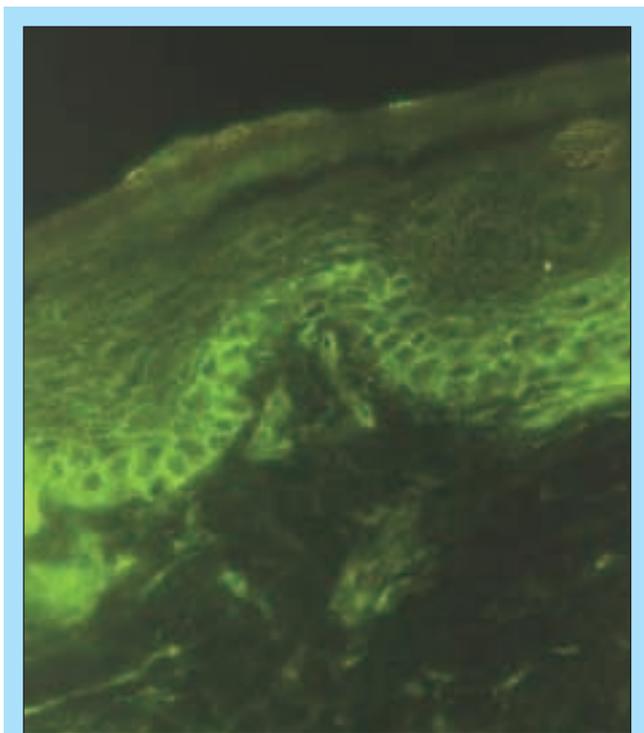


FIGURA 9 - IF indiretta su substrato congelato (mucosa orale), positività intercellulare attorno ai cheratinociti dello strato basale per deposito di autoanticorpi (IgG).

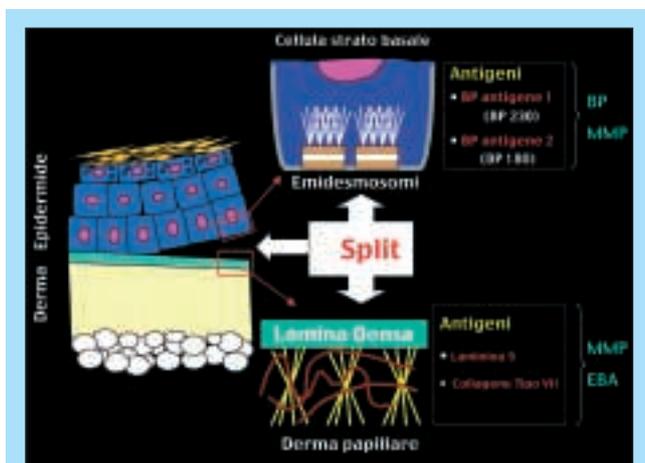


FIGURA 10 - Rappresentazione schematica della separazione tra derma ed epidermide indotta chimicamente tramite tecnica "salt-split".

- metodo indiretto su substrato congelato "salt-split".

L'incubazione di un frammento di cute in una soluzione 1M di NaCl determina la separazione del derma dall'epidermide attraverso la lamina lucida della membrana basale (MB).¹⁰ La MB è costituita da 3 parti, la lamina lucida, la lamina densa e la sublamina densa. Nella lamina lucida sono intercalate strutture antigeniche appartenenti ai complessi emidesmosomiali del cheratinocita basale, nella lamina densa e nella sublamina densa sono invece presenti antigeni strutturali di membrana e fibrille di ancoraggio quali laminina 5 e collagene VII. Durante la separazione alcune molecole come il bullous pemphigoid antigen 2 (PBAG2) o collagene XVII resta adeso alla porzione epi-

dermica dello split mentre altre, quali la laminina 5 e il coll. VII restano adese alla porzione dermica dello split (Fig. 10). L'implicazione pratica è che una metodica indiretta di IF su preparazioni salt-split può essere utilizzata per classificare le malattie bollose subepidermiche. Un pattern di fluorescenza lineare nel versante superiore della separazione (versante epidermico) sarà indicativo del fatto che gli autoanticorpi presenti nel siero del paziente erano diretti verso componenti emidesmosomiali e che pertanto il soggetto è affetto da pemfigoide. Viceversa un pattern di fluorescenza lineare sul pavimento della fessurazione (versante dermico) indicherà che il soggetto è affetto da una forma di EB in quanto gli autoanticorpi riconoscono antigeni della membrana basale. Recentemente sono state descritte numerose malattie su base autoimmune in cui gli autoanticorpi circolanti hanno come target più di un antigene strutturale.¹¹

B) Microscopia elettronica

L'indagine ultrastrutturale consente uno studio morfologico dettagliato dei sistemi di giunzione e della membrana basale ed è particolarmente indicato per la diagnosi delle malattie bollose della cute su base genetica. Il deficit di determinati antigeni si manifesta con alterazioni morfologiche delle strutture di cui sono parte integrante, il distacco completo della lamina densa dal derma sottostante è evidenziabile nei soggetti con EB distrofica, malattia su base genetica in cui è deficitario il collagene VII. Se la malattia è su base autoimmune l'immunoistochimica applicata su preparati per ultrastruttura (tecnica di immunoelettromicroscopia) consente di rilevare la presenza di oro colloidale (analogo del fluorocromo utilizzato per marcare l'anticorpo primario nella tecnica di IF) in prossimità delle strutture antigeniche target degli autoanticorpi.¹² La microscopia elettronica e l'immunoistochimica sono comunque da considerarsi tecniche laboriose e costose da non utilizzarsi per la diagnosi routinaria delle malattie bollose. La biopsia cutanea deve essere ridotta a frammenti molto piccoli (di circa 1 mm²), deve essere fissata in glutaraldeide al 2,5% e subire immediatamente una lunga processazione attuabile solo in laboratori altamente specializzati.

C) Immunoblotting

La tecnica di immunoblotting consente di acquisire informazioni sul peso molecolare di un antigene del quale se ne può estrapolare in seguito l'identità, confrontandolo con una molecola conosciuta. Se per esempio il siero di un soggetto identifica in immunoblotting un antigene del peso molecolare di circa 130 kDa, è molto probabile che l'antigene sia la desmogleina 3 e che il soggetto sia affetto da pemfigo volgare.¹³ Solitamente come sorgente di antigene per immunoblotting vengono utilizzati estratti di epidermide o colture cellulari. L'antigene presente nell'estratto viene separato mediante elettroforesi in gel di poliaccrilamide (SDS). La metodica è molto specifica ma può risultare in alcuni casi poco sensibile, durante la fase di elettroforesi vengono infatti rilevati solo epitopi lineari, ma se questi sono conformazionali in origine potrebbero non essere rilevati.

D) Elisa

Recentemente sono stati messi a punto test di ELISA che utilizzano antigeni ricombinanti altamente purificati.¹⁴ Tale innovazione aumenta notevolmente sia la specificità che la sensibilità dei metodi precedentemente descritti.

DISCUSSIONE

Le malattie autoimmuni cutanee nel cane e nel gatto, per quanto rare, hanno un'importanza clinica rilevante in quanto possono avere conseguenze fatali per l'animale se non correttamente diagnosticate e trattate. Attualmente la diagnosi di malattia cutanea autoimmune è suggerita dal quadro clinico e confermata con l'esame istopatologico. Quest'ultimo è decisivo per la diagnosi se la biopsia viene effettuata nella sede in cui sono presenti lesioni primarie (pustole e vescicole/bolle). Nonostante ciò, talvolta questo esame non è in grado di definire con precisione la malattia ma è solo indicativo di un gruppo di malattie. Per questo motivo sono in atto numerosi studi in medicina umana e veterinaria, allo scopo di affinare le possibilità diagnostiche. L'identificazione di autoanticorpi specifici nel siero di soggetti affetti consente una diagnosi esatta di malattia senza dover ricorrere ad un prelievo biotico, indagine invasiva rispetto ad un semplice prelievo di sangue.¹⁵ Il monitoraggio della malattia mediante prelievi di sangue a distanza di tempo consentirebbe inoltre di valutare appropriatamente l'efficacia della terapia instaurata ed eventualmente di prevedere la ricaduta della malattia in corso o dopo il trattamento. In questa trattazione sono state prese in considerazione le principali malattie pustolose e vescicolo/bollose autoimmuni della cute con interessamento di epidermide e giunzione dermo-epidermica. Non sono state trattate malattie autoimmuni cutanee in cui l'antigene target è localizzato a livello dei follicoli (alopecia areata e pseudopelade)¹⁶ e di altre malattie di cui recentemente si è arricchita la letteratura.¹⁷ Negli ultimi 10 anni grazie allo sviluppo di nuove tecnologie per la diagnosi di queste malattie autoimmuni sono stati descritti in letteratura nuovi casi in cui nonostante l'antigene target fosse tra quelli già conosciuti, la particolare presentazione clinica non permetteva una corretta classificazione della malattia (pemfigo volgare con unica localizzazione nasale)^{18,19} o nuove malattie che sono state identificate in base ad alcune analogie con le corrispettive forme umane.²⁰ È auspicabile che la conoscenza di un corretto protocollo per la diagnosi di queste malattie possa consentire di effettuare in futuro indagini epidemiologiche su un numero cospicuo di casi.

Parole chiave

Malattie cutanee autoimmuni, pustola, vescicola/bolla, cane, gatto, tecniche di laboratorio, immunofluorescenza diretta e indiretta.

Key words

Autoimmune skin diseases, pustule, vesicle/bulla, dog, cat, laboratory techniques, direct and indirect immunofluorescence.

Bibliografia

1. Suter MM, De Bruin A, Wyder M, Wurm S, et al: Autoimmune diseases of domestic animals: an update. In: *Advances in Veterinary dermatology*, Vol 3 Eds K.W. Kwochka, T. Willemse, C. von Tscharner. Butterworth Heinemann, Oxford 1998, pp 321-337.
2. Olivry T, Joubert S, Dunston SM, Nishiyama T, et al: Desmoglein-3 is a target autoantigen in spontaneous canine pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 12: 198-204, 2003.
3. Olivry T: Dermo-Epidermal junction: animal pathology. *Proceedings of the 18 th Annual Congress of the ESVD-ECVD, Nice-France, September 26-28, 2002.*
4. Scott DW: Pemphigus in domestic animals. *Clin Dermatol* 1:141-52, 1983.
5. Shinya K, Nomura K, Wada S, Morioka H et al: Pemphigus foliaceus with typical histological and immunohistological findings in a dog. *J Vet Med Sci* 58: 815-817, 1996.
6. Beutner EH, Jordon RE: Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 505-10, 1964.
7. Bradley GA, Mays MB: Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparison to immunofluorescence results. *Vet Immunol Immunopathol* 26: 105-13, 1990.
8. Iwasaki T, Shimizu M, Obata H, Ogata M, et al: Effect of substrate on indirect immunofluorescence test for canine pemphigus foliaceus. *Vet Pathol* 33: 332-6, 1996.
9. Lemmens P, de Bruin A, De Meulemeester J, Wyder M, et al: Paraneoplastic pemphigus in a dog. *Vet Dermatol* 9:127-134, 1998.
10. Willstead EM, Bhigal BS, Das A, Bekir SS et al: An ultrastructural comparison of dermo-epidermal separation techniques. *J Cutan Pathol* 18: 8-12, 1991.
11. Olivry T, Alhaidari Z, Ghohestani RF: Anti-plakin and desmoglein auto-antibodies in a dog with pemphigus vulgaris. *Vet Pathol* 2000 37: 496-9.
12. Shimizu H: New insights into the immunultrastructural organization of cutaneous basement membrane zone molecules. *Exp Dermatol*, 7: 303-313, 1998.
13. Iwasaki T, Shimizu M, Obata H, Isaja M, et al: Detection of canine pemphigus foliaceus autoantigen by immunoblotting. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 1-10, 1997.
14. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y. et al: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140: 351-7, 1999.
15. Favrot C, Dunston S, Deslandes J, Paradis M, et al: Effect of substrate selection on indirect immunofluorescence testing of canine autoimmune subepidermal blistering diseases. *Can J Vet Res* 66: 26-30, 2002.
16. Olivry T, Power HT, Woo JC, Moore PF et al: Anti-isthmus autoimmunity in a novel feline acquired alopecia resembling pseudopelade of humans. *Vet Dermatol* 11: 261-270.
17. Olivry T, Jackson HA: Diagnosing new autoimmune blistering skin diseases of dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 16: 225-229, 2001.
18. Olivry T, Jackson HA: An alopecic phenotype of canine pemphigus vulgaris? *Br J Dermatol* 145: 176-8, 2001.
19. Foster AP, Olivry T: Nasal dermatitis as a manifestation of canine pemphigus vulgaris. *Vet Rec* 148: 450-1, 2001.
20. Olivry T, Dunston SM, Zhang G, Ghohestani RF: Laminin-5 is targeted by autoantibodies in feline mucous membrane (cicatricial) pemphigoid. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 123-129, 2002.