

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI MEDICINA – DIMED

Direttore: Prof. Paolo Simioni

CLINICA DERMATOLOGICA

Direttore: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

TESI DI LAUREA

## **IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA SU PRELIEVO BIOPTICO FISSATO IN FORMALINA DI PATOLOGIE BOLLOSE AUTOIMMUNI: STUDIO PILOTA**

RELATORE: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

CORRELATORE: Dott. Alvise Sernicola

LAUREANDA: Aleksandra Medvedeva

Anno Accademico 2023-2024



# INDICE

<b>SINOSSI</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>I.INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI</b> .....	<b>3</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Gruppo del pemfigoide .....	4
2.2 Gruppo del pemfigo.....	4
<b>3. IMMUNOPATOGENESI</b> .....	<b>5</b>
3.1 Gruppo del pemfigoide .....	5
3.1.1 Ruolo dell'immunità umorale.....	6
3.1.2 Ruolo dell'immunità cellulo-mediata .....	7
3.1.3 Ruolo della genetica.....	8
3.1.4 Fattori predisponenti .....	9
3.2 Gruppo del pemfigo.....	9
3.2.1 Ruolo dell'immunità umorale.....	10
3.2.2 Ruolo dell'immunità cellulo-mediata .....	12
3.2.3 Ruolo della genetica.....	12
3.2.4 Fattori predisponenti .....	12
<b>4. CLASSIFICAZIONE CLINICA</b> .....	<b>13</b>
4.1 Gruppo del pemfigoide .....	13
4.1.1 Pemfigoide bolloso .....	13
4.1.2 Pemfigoide delle membrane mucose .....	15
4.1.3 Altre forme più rare, tra cui: pemfigoide gestazionale, epidermolisi bollosa acquisita, dermatite erpetiforme, dermatosi a IgA lineari.....	18
4.2 Gruppo del pemfigo.....	22
4.2.1 Pemfigo volgare.....	22
4.2.2 Pemfigo foliaceo .....	24
4.2.3 Altre forme più rare, tra cui: pemfigo a IgA, pemfigo paraneoplastico, pemfigo neonatale .....	25
<b>5. DIAGNOSTICA</b> .....	<b>26</b>
5.1 Gruppo del pemfigoide.....	26
5.2 Gruppo del pemfigo.....	28

<b>6. TERAPIA .....</b>	<b>31</b>
6.1 Gruppo del pemfigoide.....	31
6.1.1 Obiettivi del trattamento.....	31
6.1.2 Panoramica dell'approccio terapeutico .....	32
6.1.3 Corticosteroidi topici ad alta potenza.....	32
6.1.4 Prednisone e doxiciclina.....	33
6.1.5 Altre possibilità terapeutiche .....	33
6.1.6 Malattia refrattaria .....	34
6.2 Gruppo del pemfigo.....	34
6.2.1 Obiettivi del trattamento.....	34
6.2.2 Panoramica dell'approccio terapeutico .....	35
6.2.3 Glucocorticoidi sistemici.....	36
6.2.4 Rituximab .....	37
6.2.5 Immunosoppressori convenzionali .....	39
6.2.6 Valutazione della risposta alla terapia .....	40
6.2.7 Malattia refrattaria .....	40
<b>7. PROGNOSI.....</b>	<b>43</b>
7.1 Gruppo del pemfigoide.....	43
7.2 Gruppo del pemfigo.....	44
<b><i>II. SCOPO DELLO STUDIO.....</i></b>	<b>45</b>
<b><i>III. MATERIALI E METODI.....</i></b>	<b>46</b>
<b>1. POPOLAZIONE OGGETTO DI STUDIO .....</b>	<b>46</b>
<b>2. ANALISI DI LABORATORIO .....</b>	<b>46</b>
<b>3. ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>47</b>
<b><i>IV. RISULTATI.....</i></b>	<b>48</b>
<b><i>V. DISCUSSIONE.....</i></b>	<b>53</b>
<b><i>VI. CONCLUSIONI .....</i></b>	<b>60</b>
<b><i>VII. BIBLIOGRAFIA.....</i></b>	<b>62</b>





## SINOSI

**Introduzione:** Le patologie bollose autoimmuni sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi prevalentemente di classe IgG diretti contro le molecole di adesione cellulare dell'epitelio, che portano alla formazione di bolle ed erosioni a livello di cute e/o mucose. La diagnosi di queste malattie si basa sempre su procedure laboratoristiche, in particolare, sull'immunofluorescenza diretta su campione di cute del paziente estratto a fresco, che costituisce il gold standard diagnostico per evidenziare gli autoanticorpi. Tuttavia, questa metodica presenta dei limiti, in quanto è necessario ottenere un campione adeguato che deve essere processato in tempi rapidi e non può essere conservato a lungo.

**Scopo dello studio:** L'obiettivo del presente studio è valutare l'utilità dell'analisi di immunofluorescenza diretta su campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo confrontato i risultati di tale procedura con quelli della immunofluorescenza diretta di routine sul campione a fresco.

**Materiali e metodi:** Questo studio pilota ha arruolato 5 pazienti con diagnosi di patologie bollose autoimmuni confermate istologicamente e tramite immunofluorescenza diretta. Sono stati utilizzati campioni di cute fissati in formalina e inclusi in paraffina. Il tessuto è stato tagliato in sezioni sottili e fissato su vetrini istologici carichi positivamente. Il materiale è stato poi sottoposto a deparaffinizzazione e reidratazione e, in seguito, al Heat-Induced Antigen Retrieval (HIAR) in combinazione con anticorpi marcati a fluorescenza.

**Risultati:** I nostri risultati hanno mostrato una concordanza tra il campione a fresco e il campione in formalina per quanto riguarda il pemfigo, mentre, per i soggetti con pemfigoide non sono stati evidenziati gli anticorpi nei campioni fissati in formalina.

**Conclusioni:** La metodica proposta può essere una valida alternativa all'immunofluorescenza di routine per la diagnosi delle patologie del gruppo del pemfigo, quando non è disponibile un campione a fresco. Tuttavia, non è utile per le patologie del gruppo del pemfigoide.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Autoimmune bullous diseases are characterized by the presence of predominantly IgG class autoantibodies directed against epithelial cell adhesion molecules, leading to the formation of blisters and erosions on the skin and/or mucous membranes. The diagnosis of these diseases is always based on laboratory procedures, particularly on direct immunofluorescence on fresh frozen tissue samples, which currently is the diagnostic gold standard. However, this method presents some limitations, as it requires obtaining an adequate fresh sample that must be processed rapidly and cannot be preserved.

**Study purpose:** The aim of this study is to evaluate the utility of direct immunofluorescence analysis on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. To achieve this goal, we compared the results of this procedure with those of routine direct immunofluorescence on fresh samples.

**Materials and Methods:** This pilot study enrolled 5 patients diagnosed with autoimmune bullous diseases already confirmed histologically and with direct immunofluorescence. Formalin-fixed paraffin-embedded skin samples were used. The tissue was sectioned thinly and mounted on positively charged histological slides. The material was then subjected to deparaffinization and rehydration, followed by heat-induced antigen retrieval in combination with fluorescence-labeled antibodies.

**Results:** Our results showed concordance between fresh and formalin-fixed samples for pemphigus, while, in patients with pemphigoid, no antibodies were detected in the formalin-fixed samples.

**Conclusions:** The proposed method may serve as a valid alternative to routine immunofluorescence for the diagnosis of pemphigus group pathologies in cases where there are no fresh samples available. While it is not useful in pemphigoid group disorders.



# I.INTRODUZIONE

## 1. MALATTIE BOLLOSE AUTOIMMUNI

Le malattie bollose autoimmuni sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi di classe IgG diretti contro le molecole di adesione cellulare dell'epitelio, che portano alla formazione di bolle ed erosioni a livello di cute e/o mucose.

In base alle proteine bersaglio e, di conseguenza, al livello di cute interessato, si possono individuare due principali gruppi di patologie:

- I. Gruppo del pemfigoide, ove il bersaglio sono gli emidesmosomi, che mediano l'adesione tra i cheratinociti e il derma. Il livello di clivaggio è subepidermico. Comprende i seguenti sottotipi clinici:
  - 1) Pemfigoide bolloso
  - 2) Pemfigoide delle membrane mucose, noto anche come pemfigoide cicatriziale, proprio in virtù del fatto che le cicatrici, formatesi nonostante l'infiammazione modesta, possono portare a deformità permanenti
  - 3) Altre forme più rare, tra cui: pemfigoide gestazionale, epidermolisi bollosa acquisita, dermatite erpetiforme, dermatosi a IgA lineari [1]
  
- II. Gruppo del pemfigo, ove il bersaglio sono i desmosomi, che mediano l'adesione tra cheratinociti adiacenti; in questo caso, il livello di clivaggio è intraepidermico. I sottotipi principali che appartengono a questo gruppo sono:
  - 1) Pemfigo volgare
  - 2) Pemfigo foliaceo
  - 3) Altre forme più rare, tra cui: pemfigo paraneoplastico, pemfigo iatrogeno, pemfigo neonatale e pemfigo a IgA [2]

È importante sottolineare alcuni aspetti che rendono queste patologie importanti da approfondire non solo per i dermatologi, ma anche per gli specialisti di medicina interna e altre discipline mediche correlate. In particolare, il gruppo del pemfigoide, mostra una stretta correlazione con l'avanzare dell'età e l'uso di specifiche terapie farmacologiche, come i checkpoint-inhibitors. Considerando l'invecchiamento

progressivo della popolazione e l'incidenza crescente di malattie croniche, è evidente come queste patologie siano sempre più comuni nelle pratiche ambulatoriali. [3]

Il gruppo del pemfigo, sebbene meno frequente, riveste un'enorme importanza clinica in quanto comprende malattie estremamente gravi, talvolta fatali per il paziente.

## 2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.1 Gruppo del pemfigoide

Dal punto di vista epidemiologico, il gruppo del pemfigoide rappresenta il 75% delle malattie bollose subepidermiche. L'incidenza annuale si stima intorno ad almeno 4-22 nuovi casi/milione di abitanti. Alcuni studi retrospettivi suggeriscono che negli ultimi anni l'incidenza del pemfigoide bolloso stia aumentando. [4]

Tuttavia, studi più recenti suggeriscono un'incidenza reale 3-4 volte più elevata, dovuta soprattutto all'aumento dell'età media della popolazione. Il legame con l'età avanzata è evidente dal fatto che, nei pazienti sopra i 90 anni, l'incidenza risulti essere 300 volte più elevata, rispetto ai pazienti di età  $\leq 60$ . Sebbene molto raramente, la patologia si può presentare anche in pazienti più giovani, in una forma tendenzialmente più severa, a causa di una maggiore espressione di autoanticorpi anti-BP180. Inoltre, risulta più frequente nel sesso maschile. [5]

### 2.2 Gruppo del pemfigo

Per quanto riguarda il gruppo del pemfigo, l'età media d'insorgenza è tra i 50 e 60 anni, senza significative differenze di genere. L'incidenza è stimata tra 0,1-0,5 casi/100000 abitanti/anno, con alcune differenze legate all'etnia. In alcune regioni l'incidenza risulta maggiore rispetto alla media (India, Sud-Est Europa, Medio Oriente). Inoltre, vi sono alcune differenze di sottotipo clinico: per esempio, nel Nord Africa e Sud America, è più frequente la variante di pemfigo foliaceo rispetto al pemfigo volgare (prevalente invece in altre regioni).

I dati sull'epidemiologia del pemfigo a IgA risultano scarsi. È noto che può insorgere a qualsiasi età ed è leggermente più frequente nel sesso femminile.

Il pemfigo paraneoplastico è molto raro ed è più comune nei pazienti di mezza età.  
[6]

### 3. IMMUNOPATOGENESI

#### 3.1 Gruppo del pemfigoide

La variante più comune di questo gruppo, ovvero il pemfigoide bolloso, rappresenta un perfetto esempio di malattia autoimmune, che associa una risposta umorale ad una risposta cellulo-mediata, entrambe dirette contro antigeni ben definiti:

- BP180, conosciuta anche come BPAG2 o collagene tipo XVII,
- BP230 o BPAG1.

BP180 è una proteina transmembrana, con un dominio collagene extra-cellulare di grandi dimensioni. BP230 è una proteina citoplasmatica, che appartiene alla famiglia delle plakine e si trova nei cheratinociti basali. Entrambe sono componenti importanti degli emidesmosomi, ovvero dei complessi di adesione epitelio-stromale negli epitelii stratificati. Il taglio proteolitico e l'internalizzazione anticorpo-mediata della proteina BP180 porta all'indebolimento degli emidesmosomi della giunzione dermo-epidermica e all'acantolisi, cui consegue la formazione della tipica lesione bollosa. [7]

Per quanto riguarda il pemfigoide delle membrane mucose, sono stati riscontrati diversi antigeni della membrana basale, di cui alcuni associati a particolari forme cliniche:

- BP180 (dominio C-terminale) e BP230
- Laminina 332 (laminin 5/epiligrin): forme associate all'aumentato rischio di malignità
- Alpha-6 beta-4 integrina: forme oculari
- Collagene tipo VII (v. tabella I) [8]

Tabella I Principali autoantigeni delle malattie bollose autoimmuni a coinvolgimento subepidermico (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.511)

MAJOR AUTOANTIGENS OF SUBEPIDERMAL AUTOIMMUNE-MEDIATED BLISTERING DISEASES			
Disease	Target antigen(s)	Mol. wt. (kDa)	Morphologic structures
Bullous pemphigoid (BP)	BP180/BPAG2/collagen XVII BP230/BPAG1e	180 230	Hemidesmosomal plaque/anchoring filaments Hemidesmosomal plaque
Gestational pemphigoid	BP180/BPAG2/collagen XVII BP230/BPAG1e	180 230	Hemidesmosomal plaque/anchoring filaments Hemidesmosomal plaque
Mucous membrane (cicatricial) pemphigoid	BP180/BPAG2/collagen XVII BP230/BPAG1e <sup>†</sup> Laminin 332 (laminin 5; $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ ; epiligrin) Laminin 311 (laminin 6; $\alpha_3\beta_1\gamma_1$ ) <sup>‡</sup> Integrin $\beta_4$ subunit <sup>§</sup>	180 230 165, 140, 105 165, 220, 200 200	Hemidesmosomal plaque/anchoring filaments Hemidesmosomal plaque Anchoring filaments Anchoring filaments/extracellular matrix Hemidesmosomal plaque/anchoring filaments
Linear IgA bullous dermatosis (LABD)	LAD antigen <sup>¶</sup> BP180/BPAG2/collagen XVII BP230/BPAG1e <sup>†</sup> Type VII collagen <sup>†</sup>	97/120 180 230 290/145	Anchoring filaments Hemidesmosomal plaque/anchoring filaments Hemidesmosomal plaque Anchoring fibrils
Epidermolysis bullosa acquisita	Type VII collagen <sup>†</sup>	290/145	Anchoring fibrils
Anti-laminin $\gamma 1$ pemphigoid (previously known as anti-p200 pemphigoid)	Laminin gamma-1 chain	200	Extracellular matrix
Bullous systemic lupus erythematosus	Type VII collagen <sup>†</sup>	290/145	Anchoring fibrils

<sup>†</sup>Detectable in a subset of patients.  
<sup>‡</sup>Binding to laminin 311 depends on the presence of cross-reactive autoantibodies directed against the  $\alpha$ -chain of laminin 332 (laminin 5).  
<sup>§</sup>Reactivity with the cytoplasmic domain of the  $\beta_4$  subunit of the  $\alpha_3\beta_4$  integrin described in a subset of patients with ocular cicatricial pemphigoid.  
<sup>¶</sup>It constitutes the most characteristic serologic marker for LABD. The 120 kDa LAD antigen corresponds to the cleaved, shed extracellular domain of BP180/BPAG2. The 97 kDa protein results from its further proteolytic degradation (see Fig. 31.9).

### 3.1.1 Ruolo dell'immunità umorale

Studi di immunomicroscopia elettronica hanno dimostrato che, in vivo, gli anticorpi IgG si localizzano proprio nelle sedi di presenza di BP230 e BP180, ovvero a livello placca emidesmosomiale e all'esterno della membrana basale plasmatica, sotto l'emidesmosoma. Studi sia in vitro che in vivo su modelli animali hanno confermato il ruolo patogenetico degli anticorpi anti-BP. In particolare, in uno studio sul modello murino neonatale, il trasferimento passivo di anticorpi anti-BP180 (con BP180 completamente o parzialmente umanizzato tramite editing genetico), contro il dominio NC16A, hanno indotto un quadro di malattia bollosa che mima perfettamente il pemfigoide bolloso. In un altro modello murino, gli anticorpi anti-BP230 hanno indotto una reazione infiammatoria e formazione di bolle subepidermiche. [9]

La classe prevalente di anticorpi è la IgG4; tuttavia, sono presenti di frequente anche gli IgG1 e IgG2, e, talvolta, IgA e IgE. Il ruolo delle IgA è tuttora incerto, mentre per le IgE vi è un piccolo studio retrospettivo che identifica un nesso con

una forma di malattia più severa. Inoltre, è presente uno studio ove gli anti-BP180 NC16A di classe IgE sono state riscontrate in 47 pazienti su 117, sottolineando quindi una correlazione tra il livello di IgE e attività di malattia. [10]

Attualmente, il meccanismo patogenetico prevede il ruolo critico soprattutto di anticorpi anti-BP180, mentre quelli contro BP230 rappresentano un evento secondario che contribuisce ad amplificare il danno tissutale. Infatti, i livelli sierici di anti-BP230 non presentano una correlazione significativa con l'attività di malattia. Inoltre, la localizzazione intracellulare di BP230 verosimilmente limita l'accesso degli anticorpi all'antigene.

Tuttavia, vi è un subset di pazienti con un aumentato livello di anti-BP230 a fronte di un normale livello di anti-BP180. Questo riscontro è più frequente nei pazienti con forme non-bollose di pemfigoide. [11]

### *3.1.2 Ruolo dell'immunità cellulo-mediata*

Oltre alla risposta anticorpale, i pazienti con il PB presentano una risposta T-mediata contro BP180 e BP230, la quale risulta fondamentale per stimolare i linfociti B a produrre gli autoanticorpi. Le cellule T autoreattive sono HLA-ristrette (HA-DQB1\*0301) e di fenotipo CD4+. Producono sia citochine Th1 (e.g.interferone gamma), sia Th2 (e.g.interleuchine IL-4, IL-5; IL-13). In particolare, queste ultime risultano essere particolarmente rilevanti dal punto di vista fisiopatologico: infatti, la classe di immunoglobuline prevalente è la IgG4 (la cui secrezione è regolata proprio dalle citochine Th2). [12]

Dopo il legame degli autoanticorpi agli antigeni BP180 e BP230, i complessi Ag-Ab attivano il complemento e reclutano cellule infiammatorie, le quali a loro volta liberano mediatori pro-infiammatori e proteasi (metalloproteinasi-9, elastasi neutrofila, proteasi mastocitarie..). Queste degradano le proteine della matrice extracellulare e, soprattutto, la proteina BP180.

In particolare, l'infiltrazione delle cellule dell'immunità innata (macrofagi, neutrofili, mastociti ed eosinofili) contribuisce al danno tissutale anche tramite il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-4, -5, -8, -17 ed eotassina). Inoltre, gli

autoanticorpi IgG stimolano i cheratinociti ad esprimere citochine infiammatorie anche in maniera diretta. [13]

In sintesi, gli anticorpi IgG riducono il contenuto emidesmosomiale di BP180 contribuendo così all'indebolimento complemento-indipendente della coesione dermo-epidermica. (v. figura 1) [13]

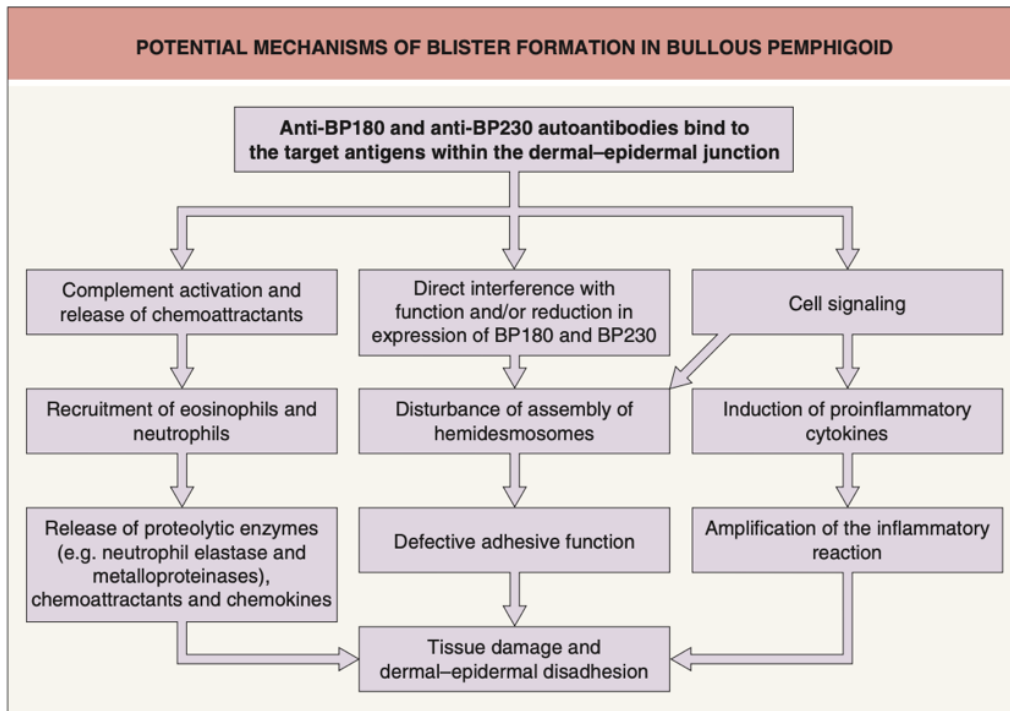


Figura 1 Potenziali meccanismi di formazione della lesione bollosa nel pemfigoide bolloso (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, *Pemphigoid Group*, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.511)

### 3.1.3 Ruolo della genetica

Alcune classi HLA II sono presenti nei pazienti con PB più frequentemente rispetto alla popolazione generale. Nei Caucasici è stata evidenziata una significativa associazione con l'allele DQB1\*0301; nei pazienti Giapponesi, invece, vi è un'aumentata frequenza degli alleli DRB1\*04, DRB1\*1101, e DQB1\*0302. Tali HLA contribuiscono a facilitare la presentazione degli antigeni della membrana basale ai linfociti T. [14]

### 3.1.4 Fattori predisponenti

Vi è un possibile legame con i trigger di natura infettivologica. È, infatti, possibile, che queste patologie siano dovute ad un meccanismo di cross-reattività con gli antigeni microbici. In un piccolo studio case-control è stata riscontrata una maggiore prevalenza di sieropositività all'HBV, HCV, H. pylori, T. gondii e CMV nei pazienti con pemfigoide/pemfigo. [15] Inoltre, è stata riscontrata l'associazione con recenti vaccinazioni in almeno 25 pazienti con BP. Tuttavia, un chiaro rapporto causa-effetto non è stato ancora dimostrato. [16]

Vi sono sempre maggiori evidenze riguardo l'associazione tra alcune terapie farmacologiche e l'insorgenza del BP/MMP[17]. In particolare, si tratta di:

- Dipeptidil peptidasi-4 inhibitors, come la vildagliptina, linagliptina e sitagliptina, largamente utilizzate nella terapia del diabete mellito
- Checkpoint inhibitors, tra cui gli inibitori di PD-1 e PD-L1 [18].

Infine, è stata proposta un'associazione con l'epitope spreading. Si tratta dell'induzione di risposta autoimmune contro autoantigeni normalmente tollerati in seguito all'esposizione di tali antigeni durante l'infiammazione tissutale immunomediata. Ad esempio, il pemfigoide cicatriziale oculare potrebbe essere legato all'infiammazione congiuntivale dovuta alla sindrome di Stevens-Johnson; la forma di pemfigoide lichen planus-like al lichen planus; il BP alla radioterapia che comporta l'esposizione degli antigeni della membrana basale durante il trattamento. [19]

### 3.2 Gruppo del pemfigo

L'hallmark del pemfigo è il riscontro di anticorpi IgG contro la superficie cellulare dei cheratinociti. Tali anticorpi giocano un ruolo primario nell'induzione della perdita di adesione tra i cheratinociti e nella formazione della tipica bolla. I target degli anticorpi sono le desmogleine, ovvero proteine transmembrana della famiglia delle caderine (molecole di adesione calcio-dipendenti), che costituiscono i desmosomi. In particolare, le forme di desmogleine maggiormente coinvolte sono

la desmogleina 1 (presente soprattutto nelle porzioni superiori dell'epidermide) e la desmogleina 3 (sopr. strato basale e parabasale; a livello delle mucose è presente, invece, a tutto spessore). (v. tabella II) [20]

*Tabella II Antigeni target nel pemfigo (Tratta da M. Amagai, Pemphigus, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.496)*

TARGET ANTIGENS IN PEMPHIGUS			
Disease	Autoantibodies	Antigens	MW (kDa)
<b>Pemphigus vulgaris</b> Mucosal-dominant type Mucocutaneous type	IgG	Desmoglein 3	130
	IgG	Desmoglein 3	130
		Desmoglein 1	160
<b>Pemphigus foliaceus</b>	IgG	Desmoglein 1	160
<b>Paraneoplastic pemphigus</b>	IgG	Desmoglein 3	130
		Desmoglein 1	160
		Plectin*	500
		Epiplakin*	500
		Desmoplakin I*	250
		Desmoplakin II*	210
		BPAG1*	230
		Envoplakin*	210
		Periplakin*	190
A2ML1	170		
<b>Drug-induced pemphigus</b>	IgG	Desmoglein 3	130
		Desmoglein 1	160
<b>IgA pemphigus†</b>			
Subcorneal pustular dermatosis type	IgA	Desmocollin 1	110/100
Intraepidermal neutrophilic type	IgA	?	?

\*Members of plakin family.  
†A subset of patients have IgA autoantibodies against Dsg1 or Dsg3.

### 3.2.1 Ruolo dell'immunità umorale

È stata proposta la cosiddetta “desmoglein compensation theory”, la quale spiegherebbe la correlazione tra le caratteristiche cliniche e il profilo anticorpale nel PV e PF. Infatti, a seconda della tipo prevalente di anticorpi e del rispettivo compenso, si possono individuare tre gruppi di pazienti:

- i pazienti con solo anticorpi anti-desmogleina 3 presentano la forma di pemfigo volgare a predominanza mucosale, perché la Dsg1 compensa la perdita della Dsg3 a livello cutaneo, ma non a livello mucosale;
- pazienti con solo anticorpi anti- desmogleina 1: sviluppano la forma di pemfigo foliaceo, perché negli strati più profondi della cute Dsg3 compensa la perdita di Dsg1;



- pazienti con entrambi i tipi di anticorpi, anti-Dsg1 e anti-Dsg3, presentano una forma mucocutanea, perché, essendo implicate sia la Dsg1 che la Dsg3, non vi è sufficiente compenso di nessuna delle due. (v.figura 2) [21]

Nella realtà clinica, la patogenesi del pemfigo è molto più complessa. La discordanza tra la clinica e i profili sierologici è presente in circa 1/3 dei pazienti. Inoltre, il fatto che in presenza di anticorpi anti-Dsg1 e anti-Dsg3 non vi sia una completa dissoluzione dell'epitelio suggerisce che vi siano implicati anche altri fattori. Infatti, sono stati osservati ab anti-desmocollina 3 (proteina transmembrana desmosomiale), anti-desmogleina 4, anti-recettore dell'acetilcolina, pemfaxina. Tuttavia, il loro ruolo nella patogenesi della malattia è ancora dibattuto.

Nella forma del pemfigo a IgA il target è la desmocollina 1, il che porta alla dermatosi pustolosa subcorneale. Inoltre, sono stati inoltre degli autoanticorpi contro altre proteine non desmosomiali attualmente non definite. [22]

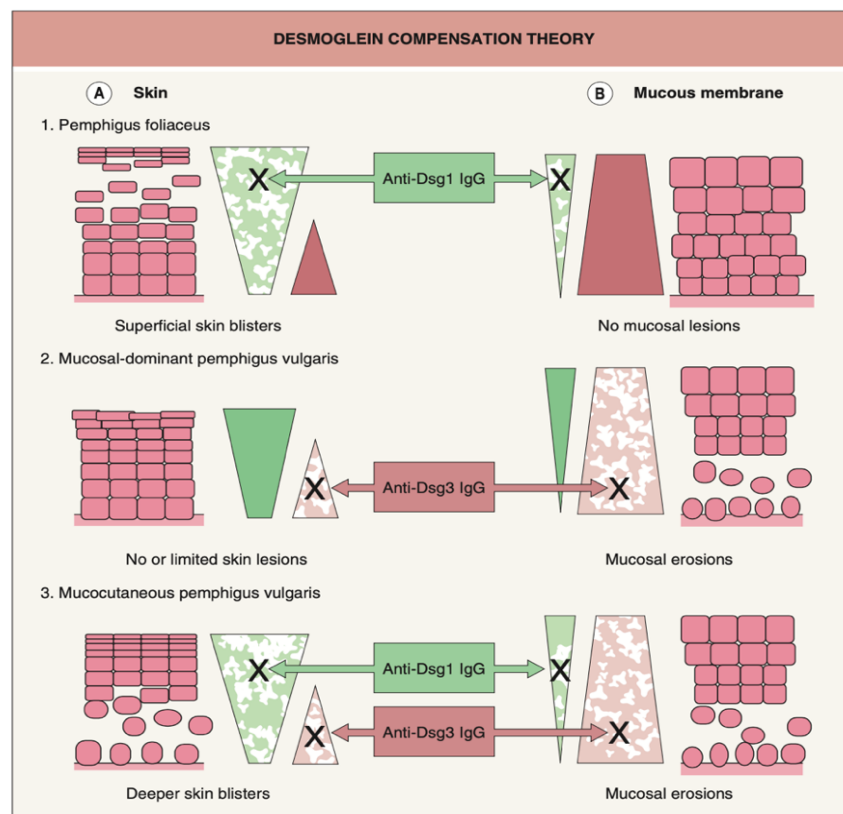


Figura 2 Spiegazione del meccanismo di formazione della lesione bollosa nella forma classica del pemfigo in relazione alla teoria di compensazione delle desmogleine (Tratta da M. Amagai, Pemphigus, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatologia (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.498)

### *3.2.2 Ruolo dell'immunità cellulo-mediata*

Come già menzionato sopra, gli anticorpi nel pemfigo sono per lo più isotipi di IgG. Essi hanno una forte avidità verso l'antigene grazie allo switch isotipico e maturazione dell'affinità. Inoltre, alcuni epitopi delle desmogleine e la presenza di autoanticorpi è correlata con specifiche classi HLA (DRB1\*0402, DRB1\*1401 e DQB1\*0302 nei Caucasicci). Tutto suggerisce quindi che la produzione di anticorpi sia correlata alle cellule T, in particolare i linfociti T helper di tipo 2 (Th2).

Inoltre, di recente, cellule T reattive contro Dsg3 sono state riscontrate nel sangue periferico sia dei pazienti con il pemfigo volgare e sia nei pazienti sani. Tuttavia, alcuni peptidi di Dsg3, che si suppone siano legati al DRB1\*0402 pocket, sono in grado di stimolare le cellule T prelevate solo dai pazienti con il pemfigo. [23]

### *3.2.3 Ruolo della genetica*

Molti studi hanno valutato la relazione del pemfigo volgare e pemfigo foliaceo con gli HLA di classe II. Il pemfigo volgare è associato maggiormente con DR4/DR14. In particolare, HLA-DRB1 0402 è maggiormente presente negli ebrei Ashkenaziti, mentre DRB1 1401/04 e DQB1 0503 si riscontrano più spesso in altre popolazioni. Altre associazioni sono state riscontrate sporadicamente tra il pemfigo foliaceo e DR4, DR14, DR1. [24,25]

### *3.2.4 Fattori predisponenti*

La maggior parte dei casi di pemfigo è idiopatica, tuttavia, vi sono dei fattori ambientali che sembrano essere implicati nell'eziopatogenesi. Ad esempio:

- Farmaci: vi sono delle associazioni anche con penicilline, cefalosporine, captopril, enalapril, rifampicina, FANS; si osserva un importante legame anche con i checkpoint inhibitors [26]
- *Simulium nigrimanum* (black fly) e altre forme di insetti potrebbero essere coinvolte nella trasmissione del fogo selvagem (forma endemica di pemfigo foliaceo). [27]

- Radiazioni: i raggi ultravioletti potrebbero esacerbare forme di pemfigo preesistenti e scatenare forme ex novo in seguito ad ustioni; si osserva un possibile link anche con le radiazioni ionizzanti [28]
- Infezioni virali per possibili meccanismi di cross-reattività
- Dieta: aglio, cipolla, pepe nero, peperoncino, vino rosso e tè sono menzionati come possibili trigger in alcuni case report. Tuttavia, rispetto ad altri fattori ambientali, l'evidenza del nesso causale con l'alimentazione risulta meno forte
- Pesticidi [29].

## 4. CLASSIFICAZIONE CLINICA

### 4.1 Gruppo del pemfigoide

#### 4.1.1 Pemfigoide bolloso

Il pemfigoide bolloso si manifesta con una serie di caratteristiche cliniche importanti. Queste includono una fase iniziale, che può durare settimane o mesi prima della comparsa delle vesciche cutanee. Durante questa fase, possono comparire lesioni cutanee pruriginose, eczematose, o papulari. In una fase successiva si sviluppano lesioni bollose che sono tipicamente tese e su base eritematosa, di dimensioni comprese tra 1 e 3 cm (v.figura 3). Le aree più colpite includono il tronco, le pieghe delle estremità, e le pieghe ascellari e inguinali. Le lesioni mucose si osservano nel 10-30% dei pazienti, con la mucosa orale come sede più comune. Inoltre, possono verificarsi cambiamenti alle unghie. Il prurito è un sintomo comune e spesso molto intenso. [30]

Il pemfigoide bolloso può anche presentarsi in varianti cliniche anche non bollose, che possono includere manifestazioni eczematose (v. figura 4), orticariode (v.figura

5) e simil-puriginose, nonché il pemfigoide bolloso con prurito senza lesioni cutanee primarie. [31]



*Figura 3 Tipiche lesioni bollose a tetto teso con esiti (Per concessione della Clinica Dermatologica)*



*Figura 4 Pemfigoide bolloso – presentazione eczematosa (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.513)*



*Figura 5 Pemfigoide bolloso – presentazione orticarioide (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.513)*

#### *4.1.2 Pemfigoide delle membrane mucose*

Il pemfigoide delle membrane mucose (MMP), o pemfigoide cicatriziale, rappresenta un gruppo di disturbi bollosi cronici ed eterogenei che colpiscono principalmente le superfici mucose. Questa condizione si caratterizza per il coinvolgimento mucoso, che può manifestarsi con o senza coinvolgimento cutaneo associato.

Le caratteristiche cliniche tipiche del MMP includono erosioni mucose con esiti cicatriziali. Il MMP si presenta con infiammazione ed erosioni mucose ricorrenti e remittenti. La comparsa di vescicole o bolle intatte sulla mucosa è rara. Rispetto alle lesioni mucose del pemfigo, il dolore associato alle lesioni orali di MMP è generalmente meno intenso.

La cavità orale è il sito più comunemente coinvolto (v.figura 6). In uno studio che ha analizzato i siti di coinvolgimento in 457 pazienti con MMP, si è osservata la seguente frequenza di interessamento:

- Mucosa orale (85%)
- Congiuntiva oculare (64%)
- Pelle (24%)
- Faringe (19%)
- Genitali esterni (17%)
- Mucosa nasale (15%)
- Laringe (8%)
- Ano (4%)
- Esofago (4%) [32]

Nella cavità orale, le mucose gengivali e buccali sono le più comunemente coinvolte. La malattia gengivale di solito si manifesta come una gengivite desquamativa o erosiva e, nei casi lievi, può presentare solo eritema ed edema gengivali.

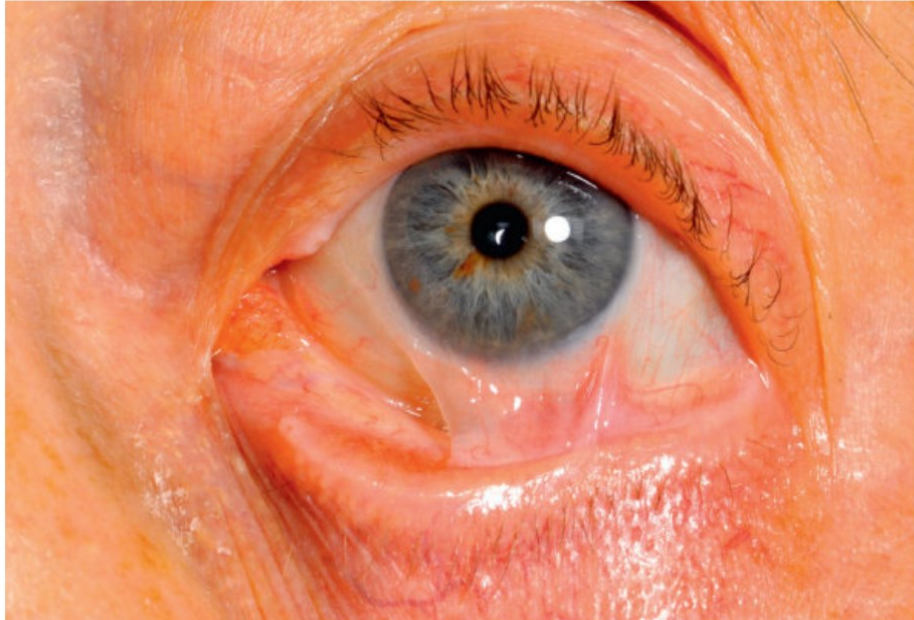
Gli esiti cicatriziali sono una conseguenza comune della MMP (v. figura 7) e la differenziano dall'interessamento mucoso nel pemfigoide bolloso, che solitamente non porta a cicatrici. Consistono in striature bianche reticolate di fibrosi mucosa e possono causare limitazioni funzionali.

Il coinvolgimento cutaneo nei pazienti con MMP coinvolge tipicamente il cuoio capelluto, il viso o il tronco superiore. Le lesioni bollose assomigliano a quelle osservate nel pemfigoide bolloso ma, simili alle lesioni mucose della MMP, spesso guariscono con cicatrici. [33]





*Figura 7 Pemfigoide delle mucose (cicatrizziale) - Gengivite desquamativa con eritema ed erosioni dei margini gengivali (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.520)*



*Figura 6 Pemfigoide delle mucose (cicatrizziale). Coinvolgimento oculare tipico- simblefaron parziale (Tratta da P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.521)*

#### *4.1.3 Altre forme più rare, tra cui: pemfigoide gestazionale, epidermolisi bollosa acquisita, dermatite erpetiforme, dermatosi a IgA lineari*

Il pemfigoide gestationis è una rara eruzione vescicolo-bollosa pruriginosa che si sviluppa durante la tarda gravidanza o subito dopo il parto. L'incidenza del pemfigoide gestationis varia tra 1 su 1.700 e 1 su 50.000 gravidanze, correlando con la prevalenza degli alleli HLA-DR3 e HLA-DR4 in diverse popolazioni. In passato, si pensava che il pemfigoide gestationis fosse causato da un "fattore sierico" anti-BMZ (il cosiddetto "fattore herpes gestationis"), che induceva la deposizione di C3 lungo la giunzione dermo-epidermica. Oggi si sa che questo fattore consiste in autoanticorpi della sottoclasse IgG1 che fissano il complemento, diretti contro una proteina transmembrana degli emidesmosomi di 180 kDa (BP180; BPAG2; collagene XVII). Come nei pazienti con pemfigoide bolloso (BP), il segmento non collagene (NC) più vicino alla membrana plasmatica del cheratinocita basale, NC16A, è la regione immunodominante del BP180. Gli anticorpi circolanti sono quasi esclusivamente diretti contro questo dominio, come dimostrato da studi ELISA e immunoblot su sieri materni o neonatali.

Il pemfigoide gestazionale può svilupparsi in qualsiasi trimestre, così come subito dopo il parto, ma classicamente si manifesta durante la tarda gravidanza. L'insorgenza delle lesioni cutanee è improvvisa e colpisce il tronco, in particolare l'addome, spesso intorno o vicino all'ombelico. Si ha una rapida progressione a un'eruzione generalizzata simile al pemfigoide, con papule e placche urticarie pruriginose, seguite da vescicole raggruppate (erpetiformi) o bolle tese su una base eritematosa (v. figura 8). L'eruzione può coinvolgere l'intero corpo, risparmiando le mucose. La presentazione clinica e il decorso possono variare notevolmente, ma un miglioramento spontaneo verso la fine della gravidanza è comune, seguito da una riacutizzazione al momento del parto nel 75% dei pazienti. Queste riacutizzazioni possono essere drammatiche, con la comparsa esplosiva di bolle nel giro di poche ore. La maggior parte dei casi si risolve spontaneamente nelle settimane o mesi successivi al parto, ma ci sono segnalazioni isolate di un decorso prolungato nel post partum. Le riacutizzazioni e le recidive in associazione con il ciclo mestruale sono comuni e nel 25-50% dei pazienti possono essere indotte dai contraccettivi orali. Il pemfigoide gestationis potrebbe non manifestarsi durante la prima gravidanza, ma, una volta insorto, è probabile che si ripresenti nelle



gravidezze successive, solitamente con un esordio più precoce e un decorso più grave. Gravidanze "saltate" sono state osservate nel 5-8% delle donne.



*Figura 8 Pemfigoide gestationis (Tratta C.M. Ambros-Rudolph, , Pregnancy Dermatoses, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevier, 2018, p.472)*

Circa il 10% dei neonati sviluppa un lieve coinvolgimento cutaneo a causa del trasferimento passivo di anticorpi materni, che si risolve spontaneamente nel giro di giorni o settimane. Vi è un aumento del rischio di prematurità e di neonati di piccole dimensioni per l'età gestazionale, probabilmente a causa di insufficienza placentare cronica. Recentemente è stato dimostrato che questo rischio è correlato con la gravità della malattia, ovvero la comparsa di bolle e l'esordio precoce, e non con l'uso di corticosteroidi sistemici. [34]

L'epidermolisi bollosa acquisita è una rara malattia bollosa subepidermica acquisita, causata da un'autoimmunità contro il collagene di tipo VII, il principale componente delle fibrille di ancoraggio nella giunzione dermo-epidermica. I pazienti possono presentare un quadro clinico meccano-bollosa, simile all'epidermolisi bollosa distrofica, oppure manifestazioni che ricordano il pemfigoide bollosa, o, più raramente, pemfigoide delle membrane mucose (v.figura 9). La diagnosi si basa su esami immunopatologici, in particolare la microscopia a immunofluorescenza, studi immunochimici e, talvolta, la microscopia

immunoelettronica. La malattia tende a essere cronica e più difficile da trattare rispetto alla BP. [35]



*Figura 9 Epidermolisi bollosa acquisita (Tratta J-D. Fine and J.E. Mellerio, , Epidermolysis Bullosa, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di),Dermatology (Fourth Edition), Amsterdam, Elsevie, 2018, p.541)*

La dermatosi a IgA lineari si manifesta con un'eruzione vescico-lobollosa subepidermica mediata dal sistema immunitario che si verifica sia negli adulti che nei bambini. È caratterizzata da una particolare eziopatogenesi che consiste nella deposizione lineare di IgA lungo la zona della membrana basale cutanea. Negli adulti, i reperti clinici associati a questo pattern immunopatologico possono somigliare a quelli della dermatite erpetiforme (DH) o del pemfigoide bolloso (BP) (v. figura 10). La LABD può essere difficile da diagnosticare clinicamente, soprattutto negli adulti, ed è spesso confusa con la DH e la BP. Per definizione, la LABD si distingue dalla DH e dalla BP sulla base dei risultati dell'immunofluorescenza diretta (DIF). La deposizione lineare di IgA lungo la zona della membrana basale nella pelle perilesionale è caratteristica della LABD, in contrasto con la DH, che mostra una deposizione granulare di IgA nelle punte delle papille dermiche o in un pattern continuo lungo la membrana basale, o la BP, che mostra una deposizione lineare di IgG lungo la zona della membrana basale epidermica. Il decorso naturale della malattia è caratterizzato da una persistenza di diversi anni con una possibile remissione spontanea in molti pazienti. [36]



Figura 10 Dermatosi a IgA lineari - (Tratta da C.M. Hull and J.J. Zone, , *Dermatitis Herpetiformis and Linear IgA Bullous Dermatitis*, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.535)

La dermatite erpetiforme si differenzia dalla dermatite bollosa lineare da IgA (LABD) sulla base della deposizione di IgA granulare rispetto a quella lineare nella zona della membrana basale, come osservato tramite immunofluorescenza diretta. La DH è una manifestazione cutanea della malattia celiaca (CD) ed è associata alla sensibilità al glutine in quasi tutti i casi (v.figura 11) . DH e CD sono disturbi genetici fortemente associati ai genotipi HLA-DQ2 (86%) e HLA-DQ8 (12%), nei quali gli anticorpi IgA anti-endomisio sono diretti contro la transglutaminasi tissutale; il presunto autoantigene nella pelle è la transglutaminasi epidermica. La malattia intestinale e cutanea nella DH può essere controllata tramite una dieta priva di glutine; sia la DH che la LABD rispondono alla terapia con solfoni. Negli adulti, la LABD è spesso indotta da farmaci. [37]



Figura 11 Dermatite erpetiforme (Tratta da C.M. Hull and J.J. Zone, *Dermatitis Herpetiformis and Linear IgA Bullous Dermatosi*, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.531)

## 4.2 Gruppo del pemfigo

### 4.2.1 Pemfigo volgare

La quasi totalità dei pazienti affetti da pemfigo volgare sviluppa lesioni alle mucose. La cavità orale è il sito più comune, spesso il primo coinvolto. Anche altre mucose come la congiuntiva, il naso, l'esofago, la vulva, la vagina, il collo dell'utero e l'ano possono essere coinvolte. Le vesciche mucose risultando spesso in erosioni, che si presentano come unico segno clinico. Il dolore associato alle lesioni mucose del pemfigo volgare può essere intenso, soprattutto durante la masticazione e la deglutizione, il che può portare a problemi alimentari, perdita di peso e malnutrizione. [38]

La maggior parte dei pazienti sviluppa anche lesioni cutanee, caratterizzate da vesciche flaccide, a volte su cute eritematosa. Queste vesciche si rompono facilmente, causando dolorose erosioni emorragiche (v. figura 12). Il prurito è generalmente assente. Anche se teoricamente possono coinvolgere qualsiasi area della pelle, di solito non compaiono sui palmi delle mani e sulle piante dei piedi. Spesso, si può riscontrare il segno di Nikolsky, che consiste nella formazione di bolle per sfregamento e pressione. [39]



Altre presentazioni cliniche meno comuni includono:

- Pemfigo vegetante: placche vegetanti composte da tessuto granuloso e croste eccessive.
- Pemfigo erpetiforme: lesioni urticariali e vescicole disposte in un modello erpetiforme o anulare. Il prurito è spesso presente, mentre il coinvolgimento mucoso è raro.
- Qualora non vi fosse coinvolgimento mucoso, si tratterebbe del "pemfigo volgare di tipo cutaneo". [40]



*Figura 12 Lesioni da pemfigo volgare (Per concessione della Clinica Dermatologica)*

#### 4.2.2 Pemfigo foliaceo

Il pemfigo foliaceo si presenta come una variante superficiale del pemfigo, manifestando principalmente lesioni cutanee e risparmiando, di solito, le mucose. Questa condizione si sviluppa tipicamente con una distribuzione nelle zone più seborroiche, ovvero il cuoio capelluto, il viso e il tronco. Le lesioni cutanee iniziali consistono in piccole vescicole superficiali sparse che, nel tempo, evolvono in erosioni squamose e ricoperte da croste (v. figura 13). Spesso il segno di Nikolsky risulta positivo. In alcuni casi, le lesioni possono rimanere localizzate, mentre in altri possono estendersi a coprire ampie aree della pelle, a volte evolvendo fino ad un quadro di eritrodermia esfoliativa.

Esistono diverse varianti cliniche del pemfigo foliaceo, tra cui:

- Pemfigo foliaceo endemico (fogo selvagem): una variante che presenta caratteristiche cliniche simili alla forma idiopatica della malattia, con un presunto fattore ambientale come causa scatenante.
- Pemfigo eritematoso (sindrome di Senear-Usher): una condizione che si manifesta con lesioni localizzate alla regione malare del viso. In passato, questo termine era usato per indicare pazienti con reperti di immunofluorescenza compatibili con il pemfigo, associati a caratteristiche di laboratorio del lupus eritematoso sistemico. [41]



*Figura 13 Lesione da pemfigo foliaceo (Per concessione della Clinica Dermatologica)*

#### *4.2.3 Altre forme più rare, tra cui: pemfigo a IgA, pemfigo paraneoplastico, pemfigo neonatale*

Sia la dermatosi pustolosa subcornea che la dermatosi IgA neutrofila intraepidermica, due tipi di pemfigo IgA, si caratterizzano per lo sviluppo subacuto di vescicole che poi si trasformano in pustole. Queste lesioni sono generalmente accompagnate da placche eritematose, sebbene non sempre, e possono presentarsi con un pattern erpetiforme, anulare o circolare.

Le sedi più colpite sono il tronco e le estremità prossimali, mentre meno comuni sono il cuoio capelluto, la pelle retro-auricolare e le zone intertriginose. Il prurito può essere presente o meno, mentre le mucose di solito risultano risparmiate.

Il tipo di dermatosi pustolosa subcornea nel pemfigo IgA è simile clinicamente alla classica dermatosi pustolosa subcornea (malattia di Sneddon-Wilkinson). Tuttavia, per distinguere tra queste condizioni, sono necessari studi di immunofluorescenza. [42]

Per quanto riguarda il pemfigo paraneoplastico, si tratta di una sindrome autoimmune multiorgano associata a neoplasie, caratterizzata da un coinvolgimento mucosale grave e acuto, spesso con stomatite estesa e difficile da trattare. Le manifestazioni cutanee, invece, possono variare e includere vescicole, erosioni e lesioni lichenoidi che possono essere confuse con altre malattie autoimmuni o infiammatorie della pelle. Talvolta, si osserva un coinvolgimento polmonare potenzialmente letale, noto come bronchiolite obliterante. [43]

Infine, il pemfigo neonatale è una condizione transitoria rara in cui i neonati sviluppano vescicole a causa della trasmissione placentare di autoanticorpi materni. Questa condizione si risolve solitamente entro poche settimane. [44]

## 5. DIAGNOSTICA

### 5.1 Gruppo del pemfigoide

Il primo step è rappresentato dal riconoscimento della clinica suggestiva:

- Manifestazioni cutanee con formazione di vesciche tese ed erosioni che si verificano senza una causa apparente
- Gengivite desquamativa o mucosite che coinvolge le mucose orali, oculari, nasali, genitali, anali, faringee, laringee e/o esofagee
- Prurito inspiegabile; eruzioni pruriginose ed eczematose; placche urticarioidi [45]

I principali test di laboratorio includono l'esame bioptico, la biopsia con immunofluorescenza, test sierici per rilevare gli anticorpi circolanti (immunofluorescenza indiretta e test ELISA) secondo il seguente algoritmo (v. figura 14):

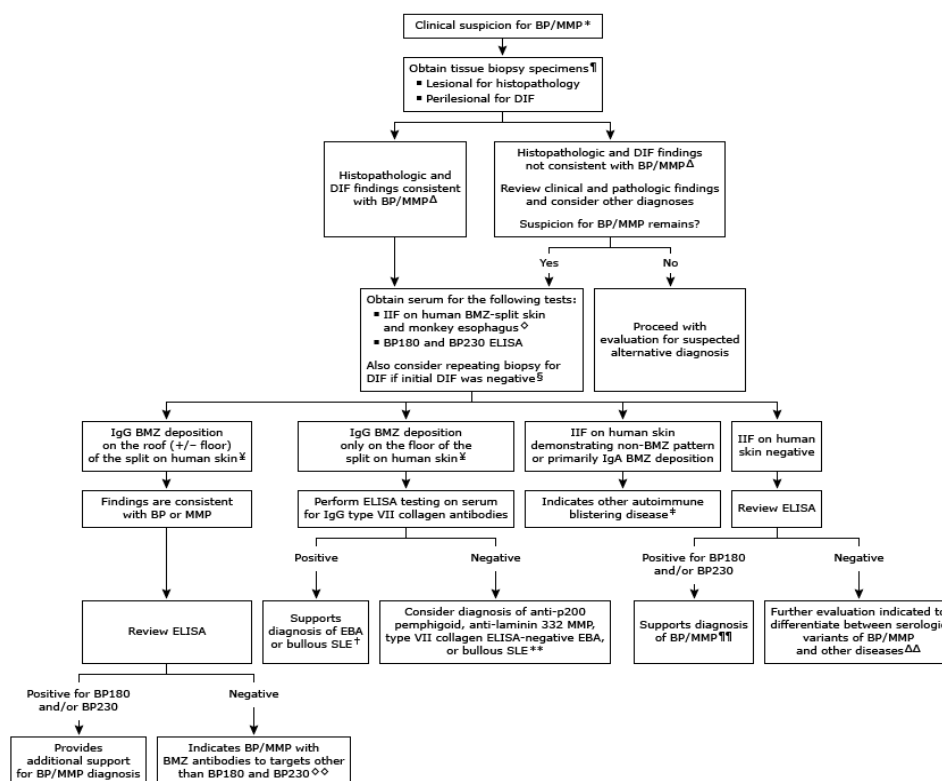


Figura 14 Flowchart per la diagnosi del pemfigoide bolloso e pemfigoide delle membrane mucose



Nei pazienti con reperti clinici suggestivi di pemfigoide bolloso o MMP, lo step successivo prevede:

- Istopatologia di routine su campione bioptico (tessuto fisso)
- DIF su campione di tessuto perilesionale

L'esame istopatologico di routine fornisce supporto diagnostico attraverso la rilevazione di reperti patologici che sono coerenti o non coerenti con pemfigoide bolloso o MMP. La DIF rileva il deposito caratteristico di immunoglobuline e complemento nella pelle o nella mucosa. [46]

Successivamente, in tutti i pazienti risultati positivi ai test sopracitati, o nei pazienti in cui il sospetto clinico è molto forte, nonostante siano risultati negativi, vi è l'esecuzione dei test sierici per rilevare gli anticorpi circolanti rivolti contro le proteine della membrana basale. Solitamente, si eseguono i seguenti tipi di test sierici:

- Test IIF su "salt split skin" della zona della membrana basale umana e substrati di esofago di scimmia
- ELISA per anticorpi immunoglobulina G (IgG) anti-BP180 e anti-BP230. [47]

La IIF svolge un ruolo importante nella diagnosi, poiché consente di differenziare il pemfigoide bolloso da altre malattie vescicolari autoimmuni e supporta la diagnosi quando la DIF è negativa o non eseguibile. Il test ELISA fornisce ulteriore supporto diagnostico e può essere utilizzato per valutare la risposta al trattamento perché fornisce un risultato di tipo quantitativo. ELISA può essere più sensibile della IIF per la diagnosi di pemfigoide bolloso e MMP, ma può dare un falso negativo in alcuni pazienti, a causa della limitata esposizione di epitopi bersaglio potenziali. [48]

Uno studio di accuratezza diagnostica supporta l'esecuzione di routine sia della DIF che della IIF per la valutazione diagnostica standard di cura del pemfigoide bolloso. In un'analisi di 1125 pazienti con sospetto pemfigoide bolloso, in cui 343 hanno effettivamente ricevuto una diagnosi di pemfigoide, la DIF è risultata il test diagnostico più sensibile (sensibilità del 88,3 %, CI al 95% 84,5-91,3 % e specificità

del 99,2 %, CI al 95% 98,3-99,7 %). La IIF era meno sensibile, ma altamente specifica (sensibilità del 77 %, CI al 95% 72,2-81,1 e specificità del 99,9 %, CI al 95% 99,3-100 %).

Pertanto, la IIF integra la DIF, mostrando positività nella maggior parte dei casi di pemfigoide bolloso con esiti DIF negativi. [49]

Sulla base dei risultati dello studio, gli autori hanno proposto la necessità di almeno due delle tre seguenti caratteristiche come criteri diagnostici minimi:

- Prurito e/o bolle cutanee predominanti
  - Depositi lineari di IgG e/o C3 mediante DIF su un campione di biopsia cutanea
  - Localizzazione positiva dell'anticorpo IgG della zona della membrana basale epidermica (tetto) su substrato di pelle splittata nella zona della membrana basale con un campione sierico
- [50]

## 5.2 Gruppo del pemfigo

La diagnosi di pemfigo si effettua attraverso la valutazione dei reperti clinici, istologici, immunopatologici e sierologici. Anche nei casi in cui i reperti clinici suggeriscono fortemente il pemfigo, sono indicati degli esami di laboratorio per confermare la diagnosi poiché altre patologie possono presentarsi con reperti clinici simili. [51]

Oltre a un esame completo delle superfici cutanee e mucose, la valutazione clinica dovrebbe includere una revisione dei farmaci assunti dal paziente poiché gli studi clinici e di laboratorio non possono distinguere in modo affidabile tra pemfigo idiopatico e pemfigo indotto da farmaci.

La normale indagine di laboratorio per i pazienti con reperti clinici suggestivi di pemfigo volgare o foliaceo include:

- Una biopsia cutanea o mucosa lesionale per colorazione routinaria con ematossilina ed eosina (H&E)

- Una biopsia cutanea o mucosa peri-lesionale per immunofluorescenza diretta (DIF)
- Raccolta di siero per dosaggio degli enzimi immunosorbenti legati all'enzima (ELISA) e immunofluorescenza indiretta (IIF). [33] (v.tabella III) [52]

Tabella III Principali esami diagnostici delle diverse forme di pemfigo

	Histopathology	Direct immunofluorescence	Indirect immunofluorescence	ELISA	Variants
<b>Pemphigus vulgaris</b>	Suprabasal acantholysis; "row of tombstones" pattern of basal keratinocytes	Intercellular deposition of IgG	Intercellular deposition of IgG; monkey esophagus is preferred substrate	Desmoglein 3 or both desmoglein 1 and desmoglein 3 autoantibodies	Pemphigus vegetans and pemphigus herpetiformis
<b>Pemphigus foliaceus</b>	Subcorneal or granular layer acantholysis	Intercellular deposition of IgG	Intercellular deposition of IgG; normal human skin or guinea pig esophagus is preferred substrate	Desmoglein 1 autoantibodies	Endemic pemphigus foliaceus (fogo sevalgem), pemphigus erythematosus, and pemphigus herpetiformis
<b>Paraneoplastic pemphigus</b>	Variable findings; suprabasal acantholysis, keratinocyte necrosis, and lichenoid interface dermatitis are most common	Intercellular and/or basement membrane zone deposition of IgG and/or C3	Intercellular deposition of IgG; rat bladder is preferred substrate	Envoplakin and periplakin autoantibodies	
<b>IgA pemphigus</b>					
Subcorneal pustular dermatosis-type IgA pemphigus	Subcorneal clefts and pustules; minimal acantholysis; mixed infiltrate in dermis	Intercellular deposition of IgA	Intercellular deposits of IgA on monkey esophagus*	Desmocollin 1 autoantibodies <sup>†</sup>	
Intraepidermal neutrophilic dermatosis	Intraepidermal pustules; minimal acantholysis; mixed infiltrate in dermis	Intercellular deposition of IgA	Intercellular deposits of IgA on monkey esophagus*	Desmoglein 1 and 3 autoantibodies have been reported in some patients	

La biopsia per esame istologico di routine dovrebbe essere prelevata da una lesione precoce. La biopsia dovrebbe essere posta sul bordo di una vescica o erosione (v. figura 15). Di solito, è sufficiente una biopsia a punta da 4 mm.

I reperti caratteristici nel pemfigo volgare includono:

- Separazione intraepiteliale con acantolisi (cheratinociti distaccati) localizzata principalmente nella regione soprabasale
- Mantenimento dei cheratinociti basali lungo la zona della membrana basale, risultando in un aspetto simile a una "fila di lapidi"
- Scarso infiltrato infiammatorio nel derma con eosinofili [53]

A differenza della biopsia per esame istologico di routine, la biopsia per DIF dovrebbe essere prelevata da pelle o mucosa peri-lesionali dall'aspetto normale. Consiste in un campione a fresco, che non viene posto in formalina. Sia il pemfigo volgare che quello foliaceo mostrano depositi intercellulari di IgG alla DIF. Anche

se alcuni casi di pemfigo foliaceo mostrano depositi di IgG distribuiti principalmente nei livelli superiori dell'epidermide, la DIF non può essere utilizzata per distinguere in modo affidabile tra queste malattie. Fondamentalmente, tutti i pazienti con pemfigo volgare o pemfigo foliaceo idiopatico presentano risultati positivi alla DIF. Pertanto, se la DIF è negativa, la diagnosi dovrebbe essere messa in discussione. Al contrario, studi DIF negativi possono verificarsi nei pazienti con pemfigo indotto da farmaci. [54]

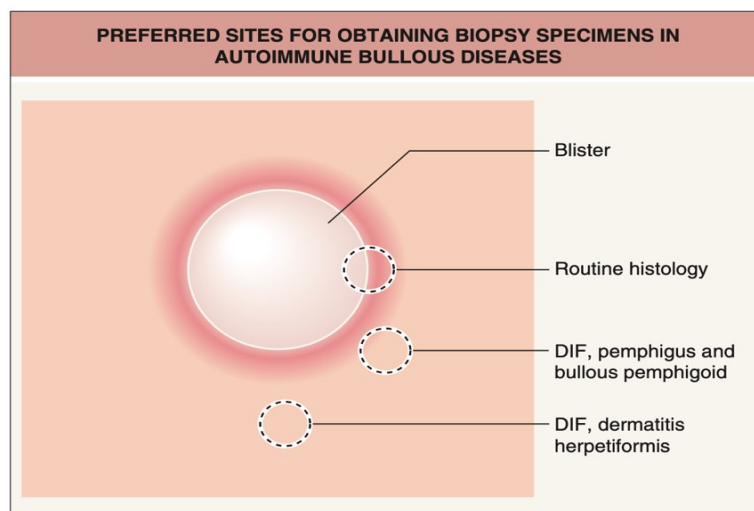


Figura 15 Siti preferenziali per il prelievo biotico nelle malattie bollose autoimmuni (Tratta da M. Amagai, *Pemphigus*, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.503)

IIF ed ELISA sono studi sierologici che possono rilevare autoanticorpi circolanti che si legano agli antigeni di superficie cellulare epiteliale. Nei pazienti con risultati positivi alla DIF, questi test vengono utilizzati per supportare ulteriormente la diagnosi di pemfigo.

L'ELISA per gli anticorpi IgG contro desmogleina 1 e desmogleina 3 è più sensibile e specifico dell'IIF per la diagnosi di pemfigo volgare e pemfigo foliaceo. La sensibilità dell'ELISA supera il 90%. [55]

Inoltre, poiché i livelli di anticorpi desmogleina spesso diminuiscono in caso di miglioramento clinico, l'ELISA può aiutare a monitorare l'attività della malattia e la risposta al trattamento. In uno studio retrospettivo, che ha valutato i valori predittivi degli autoanticorpi del pemfigo nei pazienti con pemfigo volgare e pemfigo foliaceo, gli autoanticorpi anti-desmogleina 1 erano più strettamente

correlati al decorso della malattia rispetto agli autoanticorpi anti-desmogleina 3. I livelli di anticorpi anti-desmogleina 3 sono rimasti elevati durante le remissioni della malattia in alcuni pazienti con pemfigo volgare mucoso. Nei pazienti con pemfigo volgare, i livelli di anticorpi IgE contro la desmogleina 3 possono anche correlarsi con l'attività della malattia. [56,57]

Altri test sierologici che possono essere utilizzati per la diagnosi di pemfigo volgare e pemfigo foliaceo sono l'immunoblot e l'immunoprecipitazione. Tuttavia, questi test sono più difficili da eseguire rispetto all'IIF e all'ELISA. Pertanto, vengono utilizzati raramente nell'ambito clinico. [58]

## 6. TERAPIA

### 6.1 Gruppo del pemfigoide

#### *6.1.1 Obiettivi del trattamento*

Il trattamento del pemfigoide bolloso è generalmente fortemente raccomandato, poiché questa malattia può causare notevole disagio al paziente, rappresenta un fattore di rischio significativo per le infezioni e compromette gravemente la qualità della vita dei pazienti.

Gli obiettivi principali del trattamento del pemfigoide bolloso includono:

- Ridurre la formazione di vesciche e alleviare il prurito
- Promuovere la guarigione delle vesciche e delle erosioni cutanee
- Migliorare complessivamente la qualità della vita dei pazienti

Per raggiungere questi obiettivi, si adotta un regime terapeutico mirato a ridurre la produzione di autoanticorpi e a contenere l'infiammazione mediata dagli stessi anticorpi, cercando al contempo di minimizzare il rischio di gravi effetti collaterali indotti dai farmaci. Inoltre, una cura attenta ed effettuata con costanza della pelle

del paziente può contribuire significativamente a gestire e ridurre al minimo la morbilità associata alla malattia. [59]

La gestione del pemfigoide bolloso richiede un approccio multidisciplinare e personalizzato, che può includere l'uso di corticosteroidi topici o sistemici, immunosoppressori e altre terapie mirate. L'obiettivo è non solo quello di controllare i sintomi acuti, ma anche di prevenire le recidive e mantenere una remissione a lungo termine, migliorando così significativamente la qualità della vita dei pazienti affetti da questa patologia. [60]

### *6.1.2 Panoramica dell'approccio terapeutico*

Il trattamento iniziale del pemfigoide bolloso tipicamente consiste in una delle seguenti opzioni come modalità iniziale di terapia:

- Corticosteroide topico ad alta potenza (es. clobetasolo propionato)
- Corticosteroide orale (es. prednisone o prednisolone)
- Doxiciiclina

Ciascuno di questi approcci è appropriato e supportato da dati di efficacia che dimostrano il controllo della malattia nella maggior parte dei pazienti. La scelta del trattamento si basa su fattori come la fattibilità del trattamento, il rischio di effetti avversi, l'efficacia relativa e la preferenza del paziente. [61]

### *6.1.3 Corticosteroidi topici ad alta potenza*

Sebbene la terapia con corticosteroide topico ad alta potenza (ad es. applicazione due volte al giorno di clobetasolo propionato) sia altamente efficace per il pemfigoide bolloso e associata a una minore mortalità e rischio di complicazioni severe rispetto al prednisone orale (1 mg/kg al giorno), nei pazienti con pemfigoide bolloso esteso, le difficoltà nell'amministrazione limitano l'uso di questo approccio. L'aderenza alla terapia con corticosteroide topico può essere impegnativa, con il

successo del trattamento completamente dipendente dalla capacità di un paziente anziano o del caregiver di applicare quotidianamente un corticosteroide topico su ampie aree di cute. La preferenza o la necessità di un trattamento facilmente somministrabile porta spesso alla selezione di un corticosteroide orale o della doxiciclina come terapia iniziale. [62,63]

#### *6.1.4 Prednisone e doxiciclina*

Per i pazienti per i quali la monoterapia con corticosteroidi topici non risulta la terapia di scelta, la scelta tra prednisone e doxiciclina spesso dipende dalla tolleranza al rischio di effetti avversi e dalla gravità della malattia. La doxiciclina potrebbe non indurre una remissione rapida come il prednisone orale, ma presenta un profilo di effetti collaterali più favorevole. Questo profilo favorevole spinge a selezionare la doxiciclina, piuttosto che il prednisone orale, per il trattamento iniziale delle presentazioni più lievi del pemfigoide bolloso (es. pemfigoide bolloso localizzato o sviluppo di poche nuove bolle al giorno). Tipicamente, si aggiunge l'uso di un corticosteroide topico sulle aree colpite nel tentativo di aumentare la risposta alla doxiciclina. Altre tetracicline, come la tetraciclina e la minociclina, possono essere usate in alternativa alla doxiciclina. La doxiciclina e altre tetracicline sono talvolta somministrate in combinazione con la nicotinamide (niacinamide), una forma attiva della vitamina B3 con proprietà antinfiammatorie. [64,65 ]

#### *6.1.5 Altre possibilità terapeutiche*

A causa della natura cronica del pemfigoide bolloso e dei molteplici effetti avversi dei corticosteroidi sistemici, gli agenti risparmiatori di corticosteroidi (doxiciclina, dapsona, metotrexato, micofenolato, azatioprina) vengono spesso aggiunti a un regime di corticosteroidi orali. Ciò si attua dopo aver ottenuto il controllo della malattia nel tentativo di agevolare la riduzione graduale dei corticosteroidi. In alternativa, data la frequente insorgenza ritardata degli effetti delle terapie risparmiatrici di corticosteroidi, l'agente risparmiatore di corticosteroidi e il corticosteroide orale vengono avviati simultaneamente. [66]

Tipicamente, gli agenti risparmiatori di corticosteroidi vengono spesso riservate ai pazienti che presentano un pemfigoide bolloso esteso. Ciò è dovuto al fatto che queste terapie sono fortemente immunosoppressive e possono causare gravi effetti avversi. In alcuni pazienti anziani, i rischi legati all'aggiunta di un immunosoppressore risparmiatore di corticosteroidi possono superare quelli del mantenimento della terapia con basso dosaggio di prednisone. [67]

#### *6.1.6 Malattia refrattaria*

Le opzioni terapeutiche per il pemfigoide bolloso refrattario ai trattamenti sopra descritti includono una varietà di terapie biologiche, come rituximab [68], omalizumab [69], dupilumab [70] e immunoglobuline intravenose (IVIG) [71]. Solitamente si ricorre a queste terapie quando i pazienti non rispondono alla terapia standard, si verificano forti effetti avversi dovuti alla terapia con corticosteroidi sistemici o la riduzione graduale del prednisone a meno di 10 mg al giorno non è fattibile nonostante l'uso di terapie con risparmiatori di corticosteroidi.

### 6.2 Gruppo del pemfigo

#### *6.2.1 Obiettivi del trattamento*

L'approccio al trattamento nel pemfigo è mirato innanzitutto a ottenere la remissione completa, riducendo al contempo al minimo gli effetti collaterali correlati della terapia. L'obiettivo finale nella gestione del paziente è raggiungere una remissione a lungo termine dopo la sospensione della terapia, anche se può richiedere del tempo per essere raggiunto. Data la potenziale gravità della morbilità e mortalità associate al pemfigo volgare e al pemfigo foliaceo, il trattamento è sempre indicato al momento dell'insorgenza della malattia, anche per i pazienti che presentano inizialmente una forma lieve della malattia. [72]



### *6.2.2 Panoramica dell'approccio terapeutico*

La scarsità di studi prospettici di ampie dimensioni e di alta qualità che confrontino i trattamenti per il pemfigo e la variabilità nei protocolli di studio, nei criteri di valutazione degli outcome e nei risultati hanno reso difficili conclusioni definitive sul miglior approccio al trattamento. L'aderenza alle definizioni per la valutazione del paziente delineate da un consenso di esperti del 2008 potrebbe facilitare l'interpretazione sistematica della letteratura pubblicata in futuro.

In generale, si adotta un approccio terapeutico simile per il pemfigo volgare e il pemfigo foliaceo. Molti studi che hanno valutato le terapie per il pemfigo hanno incluso pazienti con entrambi i disturbi.

La priorità per la gestione del paziente è ottenere un rapido controllo della malattia. Di solito questo viene raggiunto attraverso la somministrazione di glucocorticoidi sistemici o una combinazione di glucocorticoidi sistemici e rituximab. Anche se la terapia con glucocorticoidi sistemici è solitamente efficace, le alte dosi e i lunghi periodi di trattamento necessari per mantenere la risposta clinica possono causare effetti collaterali gravi o potenzialmente letali. Pertanto, per i pazienti che non stanno ricevendo rituximab, gli immunosoppressori aggiuntivi (micofenolato mofetile o azatioprina) vengono tipicamente aggiunti all'inizio della terapia con glucocorticoidi sistemici, con l'obiettivo di ridurre la dipendenza dalla terapia steroidea. Dopo il raggiungimento del controllo della malattia, la terapia viene ridotta lentamente alla dose più bassa necessaria per prevenire la comparsa di nuove lesioni.

Misure volte a gestire il dolore orale e le ferite cutanee sono aspetti aggiuntivi importanti della gestione del pemfigo. Tali misure possono contribuire a migliorare la qualità della vita del paziente e prevenire e gestire le infezioni secondarie. [73]

### 6.2.3 Glucocorticoidi sistemici

I glucocorticoidi sistemici giocano un ruolo centrale nel trattamento del pemfigo grazie all'alta efficacia di questi agenti nel raggiungere un rapido controllo della malattia. I principali approcci alla terapia iniziale sono:

- Terapia con rituximab e glucocorticoidi sistemici
- Terapia con glucocorticoidi sistemici con l'aggiunta concomitante o successiva di una terapia adiuvante (tipicamente micofenolato mofetile o azatioprina)
- La monoterapia con glucocorticoidi sistemici è un approccio alternativo che può essere efficace per alcuni pazienti. Tuttavia, a causa dei potenziali gravi effetti avversi del trattamento a lungo termine con alte dosi di glucocorticoidi sistemici, la terapia combinata con rituximab o terapia immunosoppressiva convenzionale adiuvante è generalmente preferita, in particolare per i pazienti con aumento del rischio di complicanze della terapia con glucocorticoidi prolungata (> 4 mesi). Inoltre, nei pazienti con pemfigo moderato-grave, la combinazione di rituximab e prednisone sembra essere più efficace rispetto alla monoterapia con prednisone. [74]

I glucocorticoidi sistemici vengono tipicamente somministrati per via orale. Il prednisone (o prednisolone) per os è il solitamente il trattamento di scelta per il pemfigo. Nella maggior parte dei pazienti, la terapia con corticosteroidi sistemici porta alla cessazione delle vesciche entro due-tre settimane e al pieno controllo della malattia entro 6-8 settimane. La dose iniziale per prednisone o prednisolone è generalmente di 0,5-1,5 mg/kg al giorno. Il nostro regime tipico è:

- Pemfigo lieve – 0,5-1 mg/kg al giorno
- Pemfigo moderato-severo – 1-1,5 mg/kg al giorno

Il supporto per l'uso dei glucocorticoidi sistemici come trattamento primario per il pemfigo deriva da studi randomizzati e altri studi che hanno documentato un miglioramento del pemfigo con la monoterapia con glucocorticoidi nella maggior parte dei pazienti e dall'ampia esperienza clinica con questo trattamento. Ad

esempio, in uno studio randomizzato, in cui 30 pazienti con pemfigo volgare sono stati trattati solo con prednisolone (2 mg/kg al giorno), 23 di questi pazienti (77 percento) hanno risposto al trattamento, e il tempo medio per la cessazione delle vesciche è stato di 18 giorni.

Il drammatico calo della mortalità da pemfigo osservato dopo l'introduzione della terapia con glucocorticoidi sistemici supporta anche il valore della terapia con glucocorticoidi sistemici per questa indicazione.

Gli effetti avversi, come ipertensione, iperlipidemia, diabete mellito, osteoporosi, aumentata suscettibilità alle infezioni, ulcere gastrointestinali e necrosi ossea asettica, possono causare significativa morbilità e mortalità tra i pazienti che ricevono una terapia con glucocorticoidi sistemici prolungata. Il follow-up frequente dei pazienti e l'attuazione di adeguate misure preventive e terapeutiche per gli effetti avversi correlati ai glucocorticoidi sono essenziali. [75]

#### *6.2.4 Rituximab*

I dati più solidi riguardanti l'uso del rituximab come trattamento iniziale per il pemfigo provengono da uno studio prospettico, in aperto, randomizzato. In questo studio, 90 pazienti con pemfigo volgare o pemfigo foliaceo di nuova diagnosi, moderato-gravi, sono stati assegnati in modo casuale alla somministrazione intravenosa di rituximab (1000 mg nei giorni 1 e 14, poi 500 mg nei mesi 12 e 18) più prednisone per os (0,5 mg/kg al giorno per malattia moderata e 1 mg/kg al giorno per malattia grave), ridotto progressivamente in tre-sei mesi, oppure solo prednisone (1 mg/kg al giorno per malattia moderata e 1,5 mg/kg al giorno per malattia grave), ridotto in 12-18 mesi. Al mese 24, 41 su 46 pazienti (89 percento) nel gruppo trattato con rituximab più prednisone erano in remissione completa senza terapia, rispetto a 15 su 44 pazienti (34 percento) nel gruppo trattato solo con prednisone (differenza assoluta 55 punti percentuali, IC 95% 38-72). Inoltre, il gruppo trattato con rituximab più prednisone ha avuto un tempo mediano più breve per raggiungere la remissione completa senza terapia (277 versus 677 giorni) e una minore frequenza di eventi avversi gravi rispetto al gruppo trattato solo con prednisone. [76]

Inoltre, uno studio randomizzato che ha confrontato il rituximab con il micofenolato mofetile (entrambi somministrati insieme a glucocorticoidi sistemici) supporta un maggiore beneficio del rituximab [77].

Il rituximab viene somministrato tramite infusione endovenosa. Per motivi pratici legati all'ottenimento e alla somministrazione del rituximab, la terapia con glucocorticoidi inizia spesso prima della terapia con rituximab. I primi segni di miglioramento clinico legati alla terapia con glucocorticoidi sistemici di solito diventano evidenti entro due o tre settimane. Gli effetti del rituximab potrebbero non manifestarsi fino a 8-12 settimane. Il regime terapeutico per il rituximab prevede due infusioni iniziali da 1000mg (a distanza di 2 settimane), seguite da dosi di mantenimento periodiche, se necessario. [78]

I risultati di uno studio di coorte retrospettivo basato su popolazione suggeriscono che la terapia con rituximab per il pemfigo potrebbe anche essere associata a un ridotto rischio di alcuni eventi avversi cardiovascolari e metabolici a lungo termine rispetto alla terapia immunosoppressiva convenzionale. Le spiegazioni proposte per il ridotto rischio includono una ridotta esposizione ai glucocorticoidi sistemici (non specificamente valutata in questo studio) e un potenziale effetto inibitorio del rituximab sulla malattia aterosclerotica e cardiovascolare. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nella mortalità per tutte le cause.

I rischi principali del rituximab includono reazioni durante l'infusione e infezioni. Va notato che la leucoencefalopatia multifocale progressiva è stata segnalata in pazienti trattati con rituximab per altre indicazioni (e.g. ambito oncologico). [79]

### *6.2.5 Immunosoppressori convenzionali*

Il trattamento con un corticosteroide sistemico e un agente immunosoppressore adiuvante rappresenta un'alternativa alla terapia con rituximab e corticosteroidi sistemici. La terapia con corticosteroidi sistemici viene tipicamente avviata immediatamente dopo la diagnosi. I farmaci immunosoppressori convenzionali adiuvanti (tipicamente micofenolato mofetile o azatioprina) vengono generalmente prescritti contemporaneamente o poco dopo l'inizio della terapia con corticosteroidi. [80]

La principale ragione per la terapia immunosoppressiva convenzionale aggiuntiva è un effetto risparmiatore di glucocorticoidi piuttosto che un effetto direttamente modificante la malattia. Azatioprina e micofenolato mofetile sono gli agenti immunosoppressivi convenzionali aggiuntivi principali per la gestione iniziale del pemfigo. Anche se ci sono più prove a supporto di un effetto risparmiatore di glucocorticoidi dell'azatioprina, il profilo degli effetti collaterali più favorevole e la facilità di somministrazione del micofenolato mofetile contribuiscono all'uso frequente di quest'ultimo. [81]

Sebbene azatioprina e micofenolato mofetile siano i pilastri della terapia adiuvante per il pemfigo, altre terapie vengono occasionalmente utilizzate. I dati sull'efficacia di queste terapie sono limitati.

Una delle possibilità è rappresentata dal dapstone. Sulla base di segnalazioni di efficacia in alcuni pazienti e dello status favorevole del dapstone come terapia non immunosoppressiva, alcuni medici scelgono di utilizzare il dapstone come terapia adiuvante nei pazienti con pemfigo, in particolare nei pazienti con pemfigo foliaceo o pemfigo IgA. Le dosi target di dapstone per il pemfigo vanno da 50 a 200 mg al giorno. Il trattamento di solito viene iniziato a basse dosi (ad esempio, 25 o 50 mg al giorno negli adulti) e aumentato gradualmente secondo il profilo di tollerabilità. La dose massima considerata è di 1,5 mg/kg o 250 mg al giorno. [82]

Altri farmaci utilizzati come terapie adiuvanti ai glucocorticoidi sistemici per il pemfigo sono il metotrexato [83], la ciclosporina [84] e la terapia combinata con un derivato della tetraciclina e la nicotinamide [85].

### *6.2.6 Valutazione della risposta alla terapia*

I pazienti affetti da pemfigo devono essere seguiti attentamente per valutare l'attività della malattia e la risposta al trattamento, nonché per valutare gli effetti avversi della terapia. Poiché il pemfigo è una malattia dinamica, la gestione richiede spesso aggiustamenti frequenti della terapia. La risposta al trattamento viene valutata principalmente attraverso l'osservazione clinica. Le caratteristiche che indicano il controllo dell'attività della malattia includono:

- Cessazione della formazione di nuove vesciche
- Guarigione delle lesioni stabilite
- Assenza del segno di Nikolsky [86]

La remissione completa (sotto terapia o fuori terapia) è considerata l'assenza di lesioni nuove o stabilite. La remissione completa fuori terapia è considerata l'assenza di lesioni nuove e/o stabilite per almeno due mesi dopo l'interruzione della terapia sistemica. I titoli dell'enzima-linked immunosorbent assay (ELISA) per gli autoanticorpi anti-Dsg1 e anti-Dsg3 possono essere utili come ausilio alla valutazione clinica, poiché i titoli possono correlare con l'attività della malattia. Tuttavia, la correlazione non è perfetta, e i risultati dell'ELISA devono essere interpretati attentamente. [87]

### *6.2.7 Malattia refrattaria*

I pazienti per i quali la terapia iniziale non porta al controllo della malattia entro un mese richiedono un'escalation terapeutico. Le opzioni includono:

- Aumentare la dose di prednisone fino a 1,5 mg/kg al giorno
- Aggiungere il rituximab (se non già ricevuto)
- Aggiungere azatioprina o micofenolato mofetile (se il rituximab non è fattibile e il paziente non è già sotto una di queste terapie) Quando queste misure non sono sufficienti, i pazienti possono beneficiare di terapie riservate alle malattie refrattarie. La gestione del pemfigo volgare e del pemfigo foliaceo refrattari alla terapia iniziale è trattata separatamente. [88]

Le principali alternative terapeutiche per la malattia refrattaria all'escalation del trattamento includono interventi che mirano direttamente alla patogenesi mediata dagli anticorpi del pemfigo. Tra queste, vi sono IVIG, immunoadsorbimento e plasmferesi. L'immunoglobulina intravenosa (IVIG) sembra essere efficace nel pemfigo refrattario. Tuttavia, non si comprende completamente il meccanismo attraverso il quale l'IVIG migliora il pemfigo. Alcuni autori hanno ipotizzato che l'infusione di IVIG possa contribuire a ridurre gli autoanticorpi del pemfigo circolanti stimolando un aumento del catabolismo delle immunoglobuline. [88]

L'immunoadsorbimento è un'opzione terapeutica per il pemfigo che funziona rimuovendo gli autoanticorpi circolanti. A differenza della plasmferesi, che rimuove non selettivamente le proteine plasmatiche dalla circolazione, l'immunoadsorbimento rimuove l'IgG circolante con una specificità molto elevata. [89]

Rispetto all'immunoadsorbimento, che rimuove specificamente l'IgG circolante, la plasmferesi (nota anche come scambio plasmatico) rimuove non selettivamente le proteine plasmatiche dalla circolazione. La plasmferesi è una terapia più ampiamente disponibile.[90]

Un'altra opzione è il ricorso alla ciclofosfamide, un farmaco che può essere utilizzato come immunosoppressore adiuvante alternativo. Queste terapie vengono tipicamente aggiunte a una terapia immunosoppressiva di base che consiste in glucocorticoidi sistemici con o senza un immunosoppressore convenzionale adiuvante. Tuttavia, il profilo sfavorevole degli effetti avversi della ciclofosfamide (ad esempio, sterilità, citopenia, cistite emorragica, cancro alla vescica) contribuiscono all'uso preferito di questi agenti per il pemfigo refrattario piuttosto che per la malattia di nuova insorgenza. [91]

Oltre alle principali opzioni terapeutiche per il trattamento iniziale del pemfigo volgare e del pemfigo foliaceo e alla gestione della malattia refrattaria, sono stati riportati benefici in piccoli numeri di pazienti con altri approcci terapeutici. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare l'efficacia di queste terapie.

Una delle terapie sopracitate è l'utilizzo del rituximab intralesionale. Alcuni dati limitati suggeriscono che l'iniezione intralesionale di rituximab possa essere un'efficace modalità di trattamento per il pemfigo orale. In uno studio aperto, tutti e tre i pazienti che hanno ricevuto rituximab intralesionale per il pemfigo volgare orale refrattario hanno avuto un marcato miglioramento. Gli effetti avversi si sono limitati al dolore dall'iniezione in un paziente. È da notare che si sono osservate marcate riduzioni nei conti delle cellule B CD19+ nel sangue periferico in tutti i pazienti due settimane dopo la sessione di trattamento iniziale. I pazienti sono stati seguiti fino a sei mesi; solo un paziente ha avuto una ricaduta cinque mesi dopo l'inizio della terapia. [92]

Un'altra opzione sembra essere l'efgartigimod. Uno studio di fase 2 in aperto suggerisce che l'efgartigimod endovenoso, un frammento Fc ingegnerizzato che riduce i livelli di IgG attraverso la sua affinità per il recettore Fc neonatale, potrebbe essere un trattamento ad azione rapida per il pemfigo lieve-moderato. Nello studio, 28 dei 31 pazienti (90 per cento) trattati con efgartigimod da solo o in combinazione con prednisone, che sono stati ritenuti idonei per l'analisi dell'efficacia del farmaco, hanno ottenuto il controllo della malattia, con un tempo mediano per il controllo della malattia di 17 giorni. [93]

Altri esempi includono pimecrolimus topico [94], tacrolimus topico [95], sulfasalazina con pentoxifillina [96], oro [97], tetracicline con o senza nicotinamide [98], clorambucile, mizoribina e veltuzumab sottocutaneo. [99]

Sebbene segnalazioni di casi abbiano suggerito il beneficio degli inibitori biologici del fattore di necrosi tumorale (TNF)-alfa, come infliximab ed etanercept, nel trattamento del pemfigo, un piccolo trial randomizzato che ha confrontato la terapia combinata con infliximab e prednisone con il trattamento con solo prednisone in 20 pazienti con pemfigo volgare ha riscontrato solo tendenze non statisticamente significative verso migliori risultati con l'aggiunta della terapia con infliximab. [100]



## 7. PROGNOSI

### 7.1 Gruppo del pemfigoide

Il decorso clinico del pemfigoide bolloso è variabile. In generale, la malattia segue un decorso cronico, con recidive. La remissione a lungo termine può verificarsi dopo mesi o anni. In un primo rapporto che precedeva l'uso di corticosteroidi sistemici, 8 su 30 pazienti entravano in remissione dopo 3-38 mesi di malattia attiva. Il pemfigoide bolloso indotto da farmaci ha spesso un decorso autolimitante dopo la cessazione del farmaco che lo ha causato. [101]

Elevati titoli di anticorpi contro l'antigene 180 del pemfigoide bolloso (BP180) al momento della cessazione della terapia possono indicare una maggiore probabilità di ricaduta della malattia. In uno studio prospettico condotto su 114 pazienti con pemfigoide bolloso, un alto titolo dell'anticorpo ELISA anti-BP180-NC16A al momento della cessazione della terapia con corticosteroidi orali o topici era un predittore indipendente di ricaduta della malattia entro un anno. [102]

In aggiunta all'aumento del titolo di BP180 al momento della cessazione della terapia, altri fattori possono indicare un aumentato rischio di ricaduta. Uno studio prospettico, multicentrico e osservazionale condotto su 120 pazienti con pemfigoide bolloso di recente diagnosi ha rilevato che la malattia estesa al basale (hazard ratio [HR] 2.37, 95% CI 1.2-4.8) e la demenza associata (HR 2.09, 95% CI 1.0-4.2) erano fattori di rischio indipendenti per la ricaduta della malattia entro il primo anno di trattamento. Inoltre, il cambiamento nei livelli di anticorpi del pemfigoide bolloso dopo l'inizio del trattamento sembrava correlare con il rischio di ricaduta. La diminuzione media dei livelli di anticorpi BP180 durante i primi 60 giorni di trattamento è stata minore tra i pazienti che hanno avuto una ricaduta rispetto a quelli che sono rimasti in remissione (-10,0 versus -45,2 percentuale). Un effetto simile ma meno significativo è stato osservato per gli anticorpi BP230. [103]

Il rischio di morte associato al pemfigoide bolloso a un anno è variato dall'11 al 48%, con la maggior parte degli studi che hanno riscontrato tassi di mortalità aumentati rispetto ai soggetti sani.

Le ragioni per l'aumento della mortalità tra i pazienti con pemfigoide bolloso possono essere multifattoriali. Le complicazioni secondarie agli agenti terapeutici sono probabilmente un fattore contributivo. In uno studio svizzero, le cause più comuni di morte erano malattie cardiache, infezioni e malattie neurologiche. [104]

## 7.2 Gruppo del pemfigo

Il pemfigo volgare è una malattia storicamente associata a un tasso di mortalità elevato. Prima dell'introduzione della terapia corticosteroidica, circa la metà dei pazienti affetti da questa condizione moriva entro due anni a causa di complicanze metaboliche o sovrainfezioni. In particolare, il coinvolgimento della mucosa orale, che si verifica in quasi tutti i pazienti affetti da pemfigo volgare, è generalmente accompagnato da dolore grave e può portare a una scarsa alimentazione, causando perdita di peso e malnutrizione. La perdita diffusa della barriera epidermica nel pemfigo volgare e nel pemfigo foliaceo può portare a perdita proteica, perdita di fluidi, squilibri elettrolitici, carenze alimentari, aumento del catabolismo e aumento del rischio di infezioni locali e sistemiche. [105]

Si stima che prima dell'uso di immunosoppressori sistemici, più del 70%, fino a quasi il 100% dei pazienti, moriva entro uno a cinque anni. Il pemfigo foliaceo, caratterizzato da vesciche superficiali e coinvolgimento limitato alla pelle, è considerato avere una prognosi migliore rispetto al pemfigo volgare. Tuttavia, la progressione del pemfigo foliaceo può portare a un coinvolgimento esteso e a complicazioni simili [106].

Tuttavia, con i progressi nella gestione della malattia, il tasso di mortalità è diminuito al 10% oggi, rappresentando comunque una percentuale significativa. Questo progresso evidenzia l'importanza dei trattamenti attuali nel migliorare la prognosi e la qualità della vita per i pazienti affetti da pemfigo volgare. [107]

## **II. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo del presente studio è indagare l'utilità e la fattibilità dell'immunofluorescenza diretta DIF su sezioni di tessuto conservate secondo le metodiche istologiche di routine nella diagnostica delle patologie bollose autoimmuni. Per raggiungere questo scopo è stato eseguito, su casi di pemfigo e pemfigoide dimostrati secondo l'attuale gold standard diagnostico, il confronto tra l'immunofluorescenza diretta su campione di cute congelato a fresco e l'immunofluorescenza diretta su biopsia fissata in formalina e inclusa in paraffina (DIF-P)

### **III. MATERIALI E METODI**

#### **1. POPOLAZIONE OGGETTO DI STUDIO**

In questo studio sono stati inclusi campioni provenienti da 2 pazienti con pemfigo volgare e 3 con pemfigoide bolloso. La diagnosi dei pazienti con PV e BP è stata confermata precedentemente, oltre che dalla clinica suggestiva, dai risultati dell'istopatologia, ELISA, IIF e DIF su campioni a fresco. Il campione di cute utilizzato è stato ottenuto dal tessuto sano circostante le lesioni prelevate durante un intervento chirurgico per esecuzione di biopsia diagnostica. Dal momento che il prelievo di un campione cutaneo per l'istologia e l'immunofluorescenza rientra nelle procedure diagnostiche standard per i casi di sospetta patologia immunobollosa, non è stata richiesta l'approvazione del Comitato Etico in questo specifico studio.

#### **2. ANALISI DI LABORATORIO**

I livelli di IgG anti-Dsg1, anti-Dsg3 e anti-BP180 sono stati misurati tramite ELISA eseguito secondo procedure standard (MBL, Nagoya, Giappone).

L'IIF è stata eseguita secondo protocolli standard (EUROIMMUN, Lubeca, Germania).

Il tessuto congelato istantaneamente è stato trasportato nel mezzo di Michel e tagliato in sezioni da 5 mm. Successivamente, le sezioni sono state essiccate all'aria e lavate 3 volte con soluzione tampone fosfato (PBS) a pH 7,4. Dopodiché, le sezioni sono state incubate con anticorpo anti-IgG umano coniugato con FITC di coniglio (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) per 30 minuti a temperatura ambiente, lavate 3 volte con PBS a pH 7,4 e montate con mezzo di montaggio prima di essere osservate con un microscopio a fluorescenza Olympus.

Il tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE) è stato tagliato in sottili sezioni e fissato su vetrini polarizzati, caricati positivamente. Le sezioni sono state immerse per 3 volte in xilene per 5 minuti e, successivamente, in etanolo anidro,

etanolo al 95%, etanolo all'85% e etanolo al 75% per 3 volte per 5 minuti ciascuna a turno. In seguito, le sezioni sono state risciacquate con acqua distillata.

L'HIAR è stato eseguito utilizzando un tampone di recupero dell'antigene (Abcam, Cambridge, Regno Unito) a 98°C per circa 20 minuti. Le sezioni sono state incubate con blocco proteico (Abcam, Cambridge, Regno Unito) per 1 ora a temperatura ambiente per il blocco del tessuto. Le sezioni sono state incubate durante la notte a 4°C con un anticorpo anti-IgG umano coniugato con FITC di coniglio (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) in un rapporto di 1:500, e quindi le sezioni sono state lavate 3 volte con PBS (tampone fosfato salino). Dopo il lavaggio, le sezioni sono state sigillate e osservate sotto un microscopio a fluorescenza Olympus.

### **3. ANALISI STATISTICA**

È stata eseguita un'analisi statistica di tipo descrittivo per quanto riguarda le variabili cliniche e demografiche dei pazienti coinvolti. In considerazione della natura esplorativa di questo studio pilota e, pertanto, della numerosità limitata, non è stata condotta un'analisi di tipo inferenziale. L'analisi è stata eseguita con Microsoft Excel.

## IV. RISULTATI

Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riassunte nella Tabella IV. Il campione oggetto di studio era composto da 5 soggetti, di età compresa tra 30 e 81 anni, di cui 4 di sesso femminile e 1 di sesso maschile.

Tabella IV: Dati dei pazienti inclusi nello studio

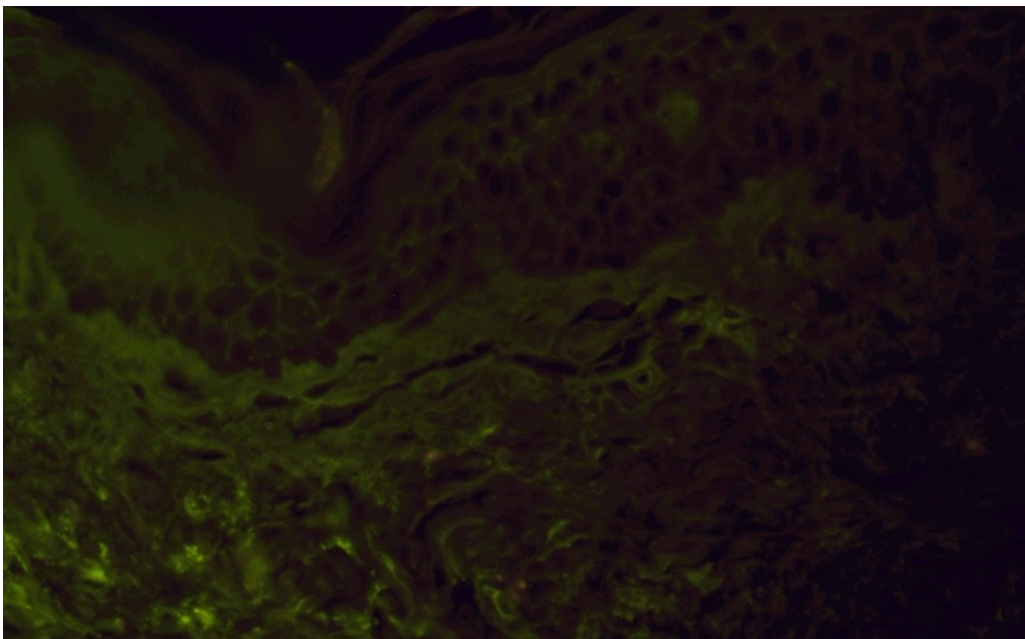
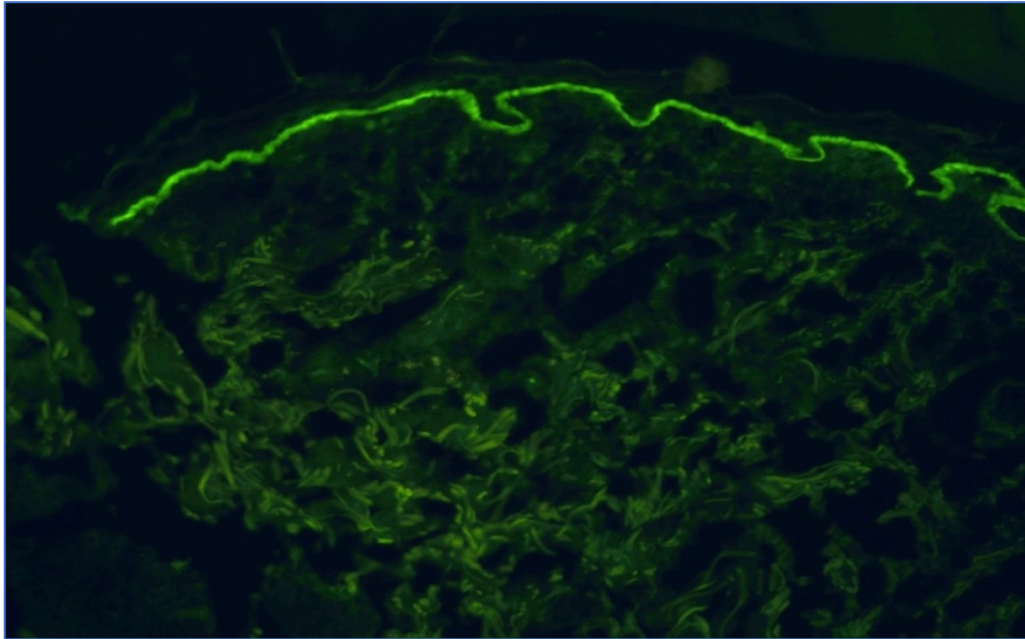
N° paziente	Età	Sesso	Diagnosi
1	81	F	Pemfigoide bolloso
2	70	F	Pemfigoide bolloso
3	71	F	Pemfigoide bolloso
4	57	F	Pemfigo volgare
5	30	M	Pemfigo volgare

In tutti i soggetti inclusi il sospetto diagnostico è stato confermato tramite ricerche sierologiche con test ELISA e immunofluorescenza diretta su campione congelato a fresco. I risultati di queste indagini insieme a quello dell'immunofluorescenza diretta su campione incluso in formalina è riassunto nella Tabella V.

Tabella V: Esami laboratoristici eseguiti nei pazienti oggetto di studio

N° paziente	Esito ricerca anticorpi	Risultato immunofluorescenza diretta	Risultato immunofluorescenza diretta inclusa in formalina
1	BP180=11,01	+	-
2	BP180= 132,87	+	-
3	BP180=101,90 DSG1=11,2	+	-
4	DSG1=206,7 DSG3=49,84	+	+
5	DSG1=184,4 DSG3=44,73	+	+

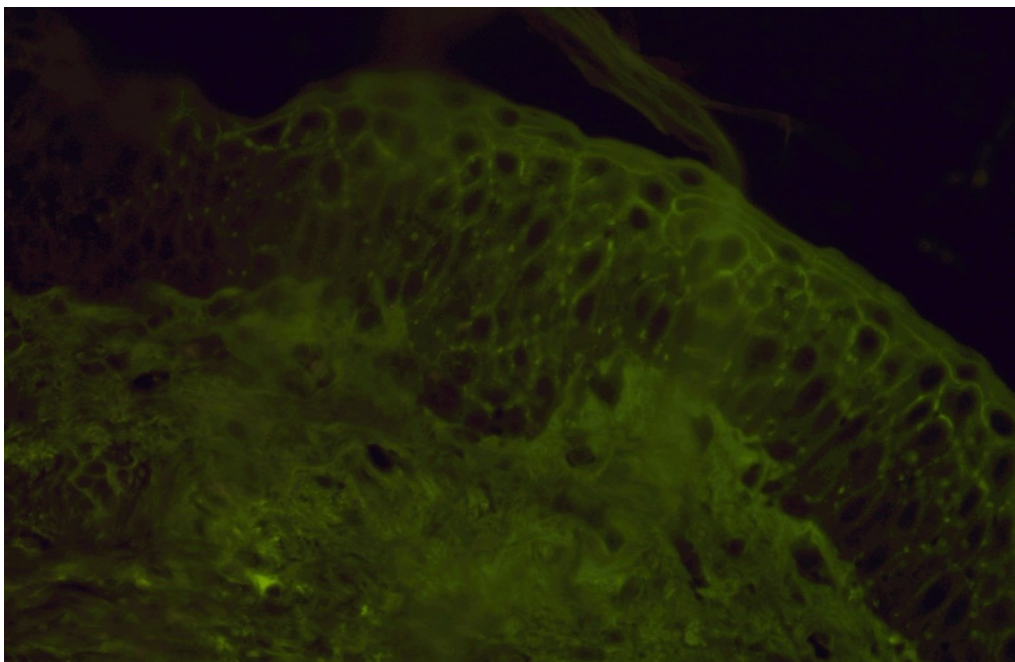
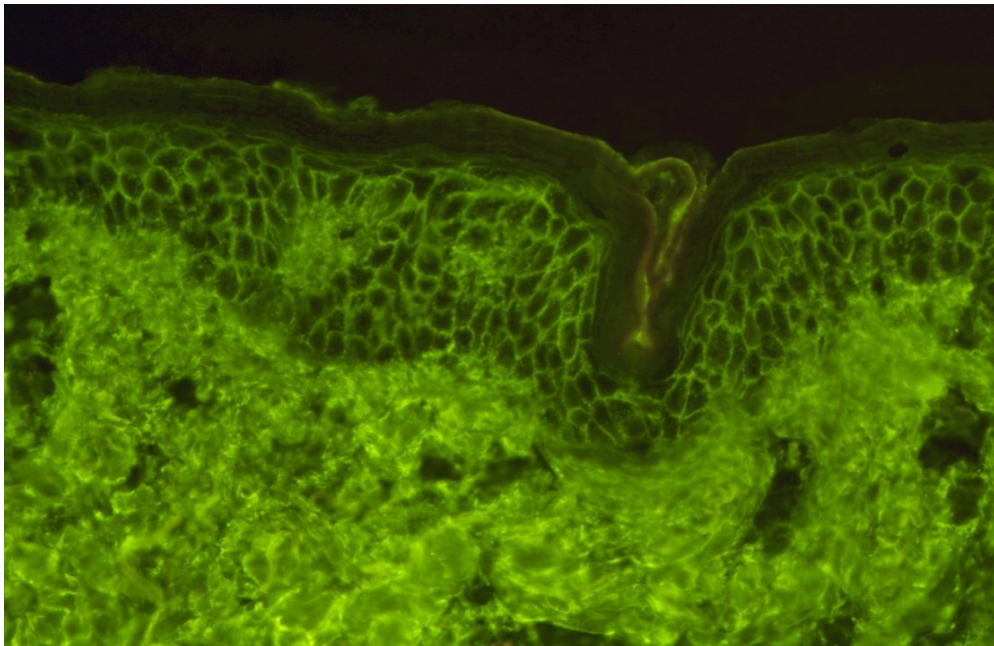
Si mettono a confronto le immagini dei risultati dell'immunofluorescenza diretta classica e la metodologia in esame, ovvero immunofluorescenza diretta su tessuto fissato in formalina, di un paziente affetto da pemfigoide bolloso. Si evidenzia una franca positività all'immunofluorescenza classica. Tuttavia, nel campione fissato non si nota positività alcuna. Pertanto, non vi è concordanza con il metodo gold standard. (v. figura 16)



*Figura 16 Pemfigoide bolloso: in alto - DIF su campione fresco congelato; in basso - DIF su campione fissato in formalina (Per concessione della Clinica Dermatologica)*



Ora, si mettono a confronto le immagini dei risultati dell'immunofluorescenza diretta classica e la metodologia in esame, ovvero immunofluorescenza diretta su tessuto fissato in formalina, di un paziente affetto da pemfigo volgare. Si evidenzia una franca positività all'immunofluorescenza classica. All'immunofluorescenza fissata in formalina si nota un deposito granulare di anticorpi. Pertanto, i risultati delle due metodologie sono concordi. (v. figura 17)



*Figura 17 Pemfigo volgare: in alto - DIF su campione fresco congelato; in basso - DIF su campione fissato in formalina (Per concessione della Clinica Dermatologica)*

Alla luce dei risultati ottenuti, si conclude che l'immunofluorescenza diretta fissata in formalina possa essere un valido supporto diagnostico alternativo e/o complementare per la diagnosi delle patologie del gruppo del pemfigo. Tuttavia, per quanto riguarda il gruppo del pemfigoide, non si è ottenuta una franca positività, per cui si ritiene che non possa attualmente essere utilizzata per questo gruppo di patologie. Infine, è stato osservato che la positività all'immunofluorescenza congelata a fresco si mantenga a lungo (>24 ore), mentre nell'immunofluorescenza fissata in formalina la fluorescenza si consuma molto più rapidamente. Infatti, già dopo 4 ore essa si attenua e risulta non rilevabile dopo 24 ore. Questo fatto potrebbe portare, infatti, a dei risultati falsi negativi.

## V. DISCUSSIONE

Approfondire le malattie bollose autoimmuni è di fondamentale importanza nel contesto clinico per una serie di ragioni cliniche e demografiche. Il pemfigoide, essendo una malattia che colpisce prevalentemente gli anziani, è particolarmente rilevante in un contesto di invecchiamento della popolazione. Con l'aumento dell'aspettativa di vita, il numero di individui affetti da pemfigoide è destinato a crescere, rendendo cruciale la capacità dei medici di riconoscere e trattare efficacemente questa condizione. Inoltre, il pemfigoide può essere indotto o aggravato da terapie specifiche, tra cui i checkpoint-inibitori e i dipeptidil peptidasi-4 inhibitors, (per es. vildagliptina, linagliptina e sitagliptina), sempre più utilizzate nella pratica clinica per il trattamento di varie malattie, inclusi tumori e altre condizioni croniche. Anche queste ultime condizioni sono in aumento, in parte, a causa del progressivo invecchiamento della popolazione. Trattandosi, dunque, di pazienti spesso fragili per una serie di ragioni, la necessità di avere una metodica di pronta ed agile esecuzione per diagnosticare correttamente tali patologie si rende ancora più stringente. [108]

D'altra parte, il pemfigo è una malattia particolarmente grave e debilitante, che richiede, anch'essa un intervento diagnostico rapido e preciso. I pazienti con pemfigo spesso presentano lesioni cutanee estese e dolorose, che possono comportare un significativo deterioramento della qualità della vita. Una diagnosi accurata permette di iniziare tempestivamente trattamenti specifici, fondamentali per prevenire complicanze severe e potenzialmente fatali. Inoltre, un'accurata differenziazione tra pemfigo e altre condizioni dermatologiche autoimmuni è essenziale per evitare trattamenti inappropriati che potrebbero addirittura aggravare la malattia. [109]

La capacità di distinguere chiaramente tra pemfigo e pemfigoide, e di comprendere le loro rispettive implicazioni cliniche, consente ai medici di personalizzare i piani terapeutici, ottimizzare l'efficacia dei trattamenti e ridurre al minimo gli effetti collaterali. Il monitoraggio continuo della risposta del paziente alle terapie, con possibilità di adattamenti tempestivi, è cruciale per la gestione di queste malattie

complesse. Inoltre, una diagnosi precisa è fondamentale per instaurare un miglior rapporto medico-paziente, migliorando l'aderenza al trattamento.

In sintesi, l'approfondimento diagnostico del pemfigo e del pemfigoide è essenziale non solo per migliorare gli esiti clinici, ma anche per affrontare le sfide demografiche legate all'invecchiamento della popolazione e all'uso crescente di specifiche terapie. Questo sottolinea l'importanza cruciale di un approccio diagnostico non solo sensibile e specifico, ma anche rapido e di agile esecuzione da parte del dermatologo, al fine di garantire una gestione ottimale di queste patologie così complesse. [110]

Attualmente, la diagnosi del pemfigoide si basa innanzitutto sul riconoscimento clinico. Le manifestazioni cutanee includono vesciche flaccide ed erosioni senza causa apparente, mentre le mucose possono presentare gengivite desquamativa o mucosite che coinvolge diverse aree corporee. Un prurito inspiegabile e placche urticarioidi possono essere segni indicativi. I principali test di laboratorio comprendono l'esame istologico, la biopsia con immunofluorescenza e test sierici per rilevare gli anticorpi circolanti (immunofluorescenza indiretta e test ELISA). L'istopatologia di routine si esegue su campione biotico, seguita dalla DIF su campione di tessuto perilesionale. L'istopatologia di routine identifica reperti patologici coerenti con il pemfigoide, mentre la DIF rileva il deposito di immunoglobuline e complemento. Per i pazienti positivi o con forte sospetto clinico, i test sierici, come la IIF su "salt split skin" e l'ELISA per anticorpi IgG anti-BP180 e anti-BP230, sono importanti per conferma e/o diagnosi differenziale in casi dubbi. La IIF è utile per differenziare il pemfigoide bolloso da altre malattie vescicolari autoimmuni e supporta la diagnosi quando la DIF è negativa. L'ELISA, fornendo risultati quantitativi, può essere più sensibile della IIF, ma può occasionalmente dare falsi negativi. [111]

Anche la diagnosi di pemfigo richiede una valutazione combinata dei reperti clinici, istologici, immunopatologici e sierologici. Quando i segni clinici indicano fortemente il pemfigo, è necessaria la conferma tramite esami di laboratorio, poiché altre patologie possono avere presentazioni simili. È fondamentale un esame completo delle superfici cutanee e mucose del paziente e una revisione dei farmaci

assunti, poiché non è sempre possibile distinguere clinicamente tra pemfigo idiopatico e pemfigo indotto da farmaci. [112]

La normale indagine di laboratorio include una biopsia cutanea o mucosa lesionale per colorazione con ematossilina ed eosina (H&E), una biopsia peri-lesionale per immunofluorescenza diretta (DIF), e test sierologici come ELISA e immunofluorescenza indiretta (IIF). La biopsia istologica prelevata dal bordo di una vescica precoce rivela caratteristiche come la separazione intraepiteliale con acantolisi, mantenimento dei cheratinociti basali e scarso infiltrato infiammatorio. La biopsia DIF deve essere prelevata da pelle o mucosa peri-lesionale dall'aspetto normale e mostra depositi intercellulari di IgG. Nei pazienti con pemfigo, la DIF è positiva nella maggior parte dei casi, mentre test negativi possono suggerire pemfigo indotto da farmaci. IIF ed ELISA rilevano autoanticorpi circolanti, con l'ELISA che risulta più sensibile e specifico, superando il 90% di sensibilità. Inoltre, l'ELISA può monitorare l'attività della malattia e la risposta al trattamento. [113]

Il gold standard per entrambi i gruppi di patologie è l'immunofluorescenza diretta sul campione congelato a fresco. Il campione di pelle o mucosa viene prelevato dalla zona peri-lesionale, quindi rapidamente immerso in un mezzo di trasporto ottimale, come la soluzione di Michel, o congelato immediatamente in azoto liquido per preservare gli antigeni. Una volta arrivato in laboratorio, il campione congelato viene sezionato utilizzando un criostato per ottenere sezioni sottili. Queste sezioni vengono poi fissate su vetrini da microscopio e incubate con anticorpi fluorescenti specifici per immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) e componenti del complemento (C3). Dopo l'incubazione, i vetrini vengono lavati per rimuovere l'eccesso di anticorpi e montati con un mezzo di montaggio specifico per l'immunofluorescenza. Le sezioni vengono poi esaminate al microscopio a fluorescenza, dove la presenza di depositi fluorescenti conferma il legame degli anticorpi agli antigeni target, consentendo la visualizzazione e la diagnosi della malattia autoimmune. [114]

Negli ultimi anni, la diagnostica delle malattie bollose autoimmuni è diventata più flessibile. Infatti, spesso per la diagnosi del pemfigoide si utilizza soltanto l'immunofluorescenza indiretta, unita ad una clinica particolarmente suggestiva. Tuttavia, prelevare un campione di sangue da pazienti anziani può essere complesso a causa di vari fattori, come la fragilità delle vene, la presenza di comorbidità e l'uso

di farmaci anticoagulanti che aumentano il rischio di sanguinamento. Queste difficoltà possono rendere il prelievo doloroso e stressante per il paziente, e a volte può essere necessario ricorrere a più tentativi per ottenere un campione adeguato, aumentando il disagio del paziente. Inoltre, la gestione di pazienti con condizioni cognitive compromesse, come demenza o altre forme di deterioramento mentale, può ulteriormente complicare il processo, poiché tali pazienti possono essere meno collaborativi o non comprendere la necessità del prelievo. Queste sfide logistiche e cliniche sottolineano la necessità di un trovare approccio diagnostico flessibile e adatto alle esigenze specifiche dei pazienti anziani, garantendo al contempo la qualità e l'accuratezza. [115]

Lo studio effettuato dal Department of Dermatology dell'Oxford Radcliffe Hospital, suggerisce che non vi sia alcuna differenza significativa tra il liquido delle vesciche e il siero per tutti i metodi di rilevamento del titolo degli anticorpi della zona della membrana basale (BMZ), dei sottotipi e dell'attività di fissazione del complemento nel BP e probabilmente nelle altre malattie immunobollose subepidermiche. Ciò dimostrerebbe che il liquido delle vesciche è paragonabile al siero per la rilevazione degli autoanticorpi della BMZ nelle malattie immunobollose subepidermiche e può sostituire il siero nella diagnosi [116].

Un'altra possibilità diagnostica è stata approfondita dallo studio Patavino del 2017, "Salivary Samples for the Diagnosis of Pemphigus vulgaris Using the BIOCHIP Approach: a Pilot Study". In questo studio pilota sono stati eseguiti ELISA e BIOCHIP, utilizzando campioni salivari e sierici provenienti dagli stessi pazienti, per indagare se il rilevamento degli autoanticorpi anti-desmogleina nei campioni salivari tramite BIOCHIP potesse essere utilizzato come test per la diagnosi di PV. È stata riscontrata una forte correlazione tra i risultati di ELISA e BIOCHIP sia per gli autoanticorpi sierici anti-DSG3 che anti-DSG1. Gli autoanticorpi anti-DSG3 sono stati rilevati in 8 campioni salivari su 8 tramite ELISA e in 6 campioni salivari su 8 tramite l'approccio BIOCHIP. Gli autoanticorpi anti-DSG1 sono risultati negativi in tutti i campioni salivari utilizzando sia ELISA che BIOCHIP. Non sono stati riscontrati risultati positivi nel gruppo di controllo negativo. In conclusione, i risultati di questo studio pilota indicano una mancanza di correlazione tra i risultati sierici e salivari utilizzando sia ELISA che BIOCHIP, suggerendo che la saliva

potrebbe non essere il substrato ideale per la diagnosi di laboratorio del PV utilizzando questi approcci [117].

Tuttavia, attualmente il gold standard attuale rimane la diagnostica con immunofluorescenza diretta su campione congelato a fresco (DIF-FF). Sebbene sia uno strumento diagnostico fondamentale, presenta anch'essa diverse limitazioni. Innanzitutto, la DIF-FF non è sempre possibile per diverse ragioni, come la mancanza di attrezzature o reagenti appropriati, requisiti tecnici più elevati per gli operatori, campioni congelati che non possono essere ottenuti retrospettivamente (perché, per esempio, le malattie bollose non sono state inizialmente considerate), o quando la pelle perilesionale è erroneamente inserita in una soluzione al 4% di formaldeide. Questo requisito di gestione a fresco impone vincoli significativi, poiché in laboratori non attrezzati con le necessarie infrastrutture di conservazione e trasporto, la procedura non può essere eseguita correttamente. La tempistica è critica: il campione deve essere analizzato rapidamente per evitare la degradazione degli antigeni necessari per una corretta visualizzazione dei depositi di immunoglobuline e complemento. Di conseguenza, le strutture diagnostiche che non possiedono i mezzi per eseguire immediatamente l'analisi o per trasportare il campione a un laboratorio specializzato si trovano a dover affrontare sfide significative. Questa necessità logistica complica l'accesso a una diagnosi precisa, soprattutto in contesti rurali o meno attrezzati. [118]

Attualmente, i tessuti Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) provenienti dall'istopatologia di routine sono più facilmente disponibili, hanno condizioni di conservazione più semplici e tempi di conservazione più lunghi, e possono essere utilizzati retrospettivamente per facilitare l'esame ausiliario clinico. Inoltre, ottenere un campione a fresco per la DIF può essere particolarmente difficoltoso nei pazienti anziani con pemfigoide, spesso a causa della fragilità cutanea e delle comorbidità che rendono più complesso il prelievo bioptico. [118]

Nel presente studio pilota, pertanto, si è indagata la possibilità di conservare il campione di cute già prelevato, al fine di poterlo recuperare, anche a distanza di tempo, per ricercare la positività all'immunofluorescenza diretta sul tessuto fissato secondo i metodi di istologia classica.

A partire dagli anni '90, il recupero antigenico indotto dal calore (HIAR) è diventato gradualmente una modifica importante nel recupero antigenico delle sezioni di tessuto FFPE. Il HIAR può essere impiegato in combinazione con metodi di rilevamento, tra cui il metodo degli anticorpi marcati con enzimi, come il perossidasi di rafano (HRP), e il metodo degli anticorpi marcati con fluorescenza, come la fosfatasi alcalina intestinale del vitello (AP), nella colorazione immunoistochimica. Diversi studi recenti che indagano i metodi diagnostici delle malattie bollose utilizzando l'immunoistochimica per colorare IgG, IgA e complemento hanno ottenuto risultati favorevoli. In alcuni di questi studi, il HIAR è stato utilizzato come metodo affidabile per il recupero antigenico nell'immunoistochimica e quest'ultima è stata inclusa in alcune linee guida per la diagnosi di BP come strumento diagnostico supplementare. Ora, il HIAR è stato ampiamente utilizzato anche nell'elaborazione dell'immunofluorescenza di campioni preparati da sezioni di tessuto FFPE, ad esempio, nella immunopatologia renale. Durante lo studio della funzione dei linfociti infiltranti della pelle nel pemfigo, è stato osservato che il HIAR, in combinazione con la fluorescenza, poteva mostrare chiaramente le plasmacellule positive all'IgG, i linfociti B e i linfociti T nel derma delle lesioni di pemfigo. Tuttavia, il HIAR non è ancora stato utilizzato nell'analisi dell'immunofluorescenza del deposito di IgG del tessuto FFPE dei pazienti con malattie bollose. [118]

In questo studio, è stata eseguita la DIF su sezioni di tessuto inclusi in paraffina (DIF-P) che rilevavano IgG utilizzando il HIAR in campioni di pazienti affetti da pemfigo volgare e pemfigoide bolloso per valutare l'efficacia di questo metodo nella diagnosi delle malattie bollose autoimmuni. [97]. Questo studio dimostra che la DIF-P mediante il metodo HIAR può essere utilizzata per confermare il deposito intercellulare di IgG nelle lesioni da pemfigo. Su un totale di 2 campioni di pemfigo, entrambi i campioni hanno mostrato un pattern di colorazione specifico della malattia, dimostrando che questo metodo è un mezzo affidabile di diagnosi. I risultati dei 3 campioni di pemfigoide sono stati negativi. Tali dati risultano attualmente concordi con i risultati presenti in letteratura.



I risultati negativi dei 3 campioni di pemfigoide in questo studio potrebbero essere correlati al metodo di recupero antigenico. Nel presente studio, è utilizzato l'HIAR, come da letteratura disponibile sull'argomento [98]. Solitamente, in questi casi si ricorre al metodo di digestione enzimatica. Entrambi i metodi HIAR e di digestione enzimatica si basano sul principio della rottura dei legami crociati tra le proteine che risultano dalla fissazione con formalina, esponendo così gli epitopi antigenici agli anticorpi. La differenza è che l'HIAR utilizza temperature elevate, invece della proteolisi, per interrompere i legami crociati delle proteine. Il meccanismo specifico del recupero antigenico non è ancora completamente compreso per entrambi i metodi. Sulla base del presente studio e degli studi precedenti, ipotizziamo che il metodo mediato dal calore potrebbe non esporre adeguatamente gli epitopi antigenici dell'IgG nei campioni di malattie bollose che coinvolgono la regione subepidermica potrebbe distruggere gli epitopi conformazionali riconosciuti dagli anticorpi durante il recupero antigenico, risultando in esiti negativi.

Inoltre, è stato osservato che la positività della fluorescenza nel campione fissato in formalina si consuma più rapidamente del campione a fresco: infatti, dopo 4 ore si attenua e risulta non rilevabile dopo 24 ore.

Infine, la mancata visualizzazione dei depositi di IgG nella zona della membrana basale (BMZ) nei campioni di malattie bollose subepidermiche tramite DIF-P potrebbe essere correlata anche alla natura stessa della BMZ. Ipotizziamo che gli epitopi antigenici dell'IgG esposti all'ipertermia possano interagire con qualche componente della BMZ, che quindi vengono mascherati, risultando in un risultato negativo dovuto all'incapacità dell'anticorpo di legarsi agli epitopi antigenici corrispondenti.

## VI. CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato, in concordanza con i dati presenti in letteratura, che l'utilizzo dell'immunofluorescenza diretta sul campione bioptico fissato in formalina ed incluso in paraffina rappresenta un valido ausilio diagnostico per il pemfigo e ha significato clinico come alternativa alla DIF sul campione fresco, quando questa non è possibile. Ciò non è, tuttavia, attualmente possibile, per il gruppo del pemfigoide.

Pertanto, la metodologia in esame può essere un valido supporto diagnostico, in particolare se affiancato ad altri tipi di indagine. La maggiore utilità del metodo consiste nella possibilità di ricercare la positività anticorpale su un campione conservato a distanza di tempo dal prelievo. Ciò sarebbe particolarmente utile in casi selezionati: per esempio, consentirebbe di eseguire il prelievo del campione di cute anche in strutture dove questo non può essere immediatamente analizzato. Inoltre, troverebbe utilità anche qualora in sede di prelievo bioptico non venisse considerata l'ipotesi di una patologia bollosa autoimmune e fosse ipotizzata solo in un secondo momento. In tal caso, avere un campione conservato da riesaminare consente di non sottoporre il paziente ad un ulteriore prelievo.

Le prospettive future nella diagnostica delle malattie bollose autoimmuni offrono un panorama ricco di potenzialità grazie all'impiego di nuove metodologie e campioni biologici alternativi. Una delle strategie più promettenti è l'uso dell'immunofluorescenza indiretta su campioni diversi dal sangue, che potrebbe essere eseguita anche in laboratori meno attrezzati e arrecare meno disagio ai pazienti fragili, aumentando l'accessibilità delle diagnosi. Il siero della lesione bollosa rappresenta un esempio di concordanza di risultati con il campione ematico, mentre la saliva è un'opzione ancora in fase di esplorazione che richiede ulteriori conferme. Un'altra possibilità consiste nell'evoluzione delle tecniche di recupero degli antigeni. Oltre al tradizionale recupero antigenico indotto dal calore (HIAR), si potrebbero valutare metodi a temperature più basse o protocolli combinati con la digestione enzimatica, che potrebbero preservare meglio i campioni [119].

Questi sviluppi promettono non solo di migliorare la diagnosi delle malattie bollose autoimmuni, ma anche di rendere le tecniche diagnostiche più accessibili ed eseguibili da centri meno attrezzati, nonché di garantire, al contempo, il minor disagio possibile per il paziente.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Bernard and L. Borradori, Pemphigoid Group, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.510 ss.
- [2] M. Amagai, Pemphigus, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di), *Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.494 ss.
- [3] Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, et al. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol* 2011; 131:637
- [4] Kridin K, Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5:220
- [5] Marazza G, Pham HC, Schärer L, et al. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 2009; 161:861
- [6] Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res* 2018; 66:255
- [7] Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol* 2007; 23:257
- [8] Montagnon CM, Tolkachjov SN, Murrell DF, et al. Subepithelial autoimmune blistering dermatoses: Clinical features and diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2021; 85:1
- [9] Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, et al. IgG autoantibody reactivity against bullous pemphigoid (BP) 180 and BP230 in elderly patients with pruritic dermatoses. *Br J Dermatol* 2009; 161:306
- [10] Messingham KA, Holahan HM, Fairley JA. Unraveling the significance of IgE autoantibodies in organ-specific autoimmunity: lessons learned from bullous pemphigoid. *Immunol Res* 2014; 59:273

- [11] Yancey KB, Egan CA. Pemphigoid: clinical, histologic, immunopathologic, and therapeutic considerations. *JAMA* 2000; 284:350
- [12] Büdinger L, Borradori L, Yee C, et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102:2082
- [13] Fang H, Zhang Y, Li N, et al. The Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid: The Role of Mast Cells in Autoantibody-Induced Tissue Injury. *Front Immunol* 2018; 9:407
- [14] Chan LS, Hammerberg C, Cooper KD. Significantly increased occurrence of HLA-DQB1\*0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997; 108:129
- [15] Sagi L, Baum S, Agmon-Levin N, et al. Autoimmune bullous diseases the spectrum of infectious agent antibodies and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2011; 10:527
- [16] de la Fuente S, Hernández-Martín Á, de Lucas R, et al. Postvaccination bullous pemphigoid in infancy: report of three new cases and literature review. *Pediatr Dermatol* 2013; 30:741
- [17] Stavropoulos PG, Soura E, Antoniou C. Drug-induced pemphigoid: a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28:1133
- [18] Siegel J, Totonchy M, Damsky W, et al. Bullous disorders associated with anti-PD-1 and anti-PD-L1 therapy: A retrospective analysis evaluating the clinical and histopathologic features, frequency, and impact on cancer therapy. *J Am Acad Dermatol* 2018; 79:1081
- [19] Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, et al. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol* 2011; 131:2271
- [20] Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:21

- [21] Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 2005; 14:861
- [22] Hudemann C, Maglie R, Llamazares-Prada M, et al. Human Desmocollin 3–Specific IgG Antibodies Are Pathogenic in a Humanized HLA Class II Transgenic Mouse Model of Pemphigus. *J Invest Dermatol* 2022; 142:915
- [23] Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006; 116:1159
- [24] Szafer F, Brautbar C, Tzfonl E, et al. Detection of disease-specific restriction fragment length polymorphisms in pemphigus vulgaris linked to the DQw1 and DQw3 alleles of the HLA-D region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:6542
- [25] Sinha AA, Brautbar C, Szafer F, et al. A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris. *Science* 1988; 239:102
- [26] Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 1998; 16:393
- [27] Aoki V, Millikan RC, Rivitti EA, et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004; 9:34
- [28] Inadomi T. A case of pemphigus foliaceus aggravated in an irradiated area by radiotherapy against breast cancer. *Indian J Dermatol* 2015; 60:93
- [29] Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, et al. Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31:374
- [30] Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 2011; 29:427
- [31] Kulthanan K, Chularojanamontri L, Tuchinda P, et al. Prevalence and clinical features of Thai patients with bullous pemphigoid. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011; 29:66

- [32] Foster CS. Cicatricial pemphigoid. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986; 84:527
- [33] Chan LS. Mucous membrane pemphigoid. *Clin Dermatol*. 2001;19(6):703- 11
- [34] C.M. Ambros-Rudolph, , Pregnancy Dermatoses, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di),*Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.472)
- [35] J-D. Fine and J.E. Mellerio, , Epidermolysis Bullosa, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di),*Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.541
- [36] C.M. Hull and J.J. Zone, , Dermatitis Herpetiformis and Linear IgA Bullous Dermatitis, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di),*Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.535)
- [37] C.M. Hull and J.J. Zone, Dermatitis Herpetiformis and Linear IgA Bullous Dermatitis, in J.L. Bologna, J.V. Schaffer, L. Cerroni (a cura di),*Dermatology (Fourth Edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2018, p.531)
- [38] Venugopal SS, Murrell DF. Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *Dermatol Clin* 2011; 29:373
- [39] Kavala M, Altıntaş S, Kocatürk E, et al. Ear, nose and throat involvement in patients with pemphigus vulgaris: correlation with severity, phenotype and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25:1324
- [40] Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol* 2011; 29:432
- [41] V. Melchionda, K. E. Harman, Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: an overview of the clinical presentation, investigations and management. *CED Clinical and Experimental Dermatology* 2019 44,pp740–746
- [42] Hashimoto T. Immunopathology of IgA pemphigus. *Clin Dermatol* 2001; 19:683

- [43] Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, et al. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323:1729
- [44] Gushi M, Yamamoto Y, Mine Y, et al. Neonatal pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 2008; 35:529
- [45] Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, et al. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol* 2002; 138:370
- [46] Sladden C, Kirchof MG, Crawford RI. Biopsy location for direct immunofluorescence in patients with suspected bullous pemphigoid impacts probability of a positive test result. *J Cutan Med Surg* 2014; 18:392
- [47] Chan YC, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:651
- [48] Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 2010; 10:84
- [49] Sárdy M, Kostaki D, Varga R, et al. Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2013; 69:748
- [50] Ruggiero A, Megna M, Villani A, Comune R, Fabbrocini G, di Vico F. Strategies to Improve Outcomes of Bullous Pemphigoid: A Comprehensive Review of Clinical Presentations, Diagnosis, and Patients' Assessment. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2022 Apr 14;15:661-673
- [51] Venugopal SS, Murrell DF. Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *Dermatol Clin* 2011; 29:373



- [52] Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med* 2007; 11:462
- [53] ZONE JJ. The value of desmoglein 1 and 3 antibody ELISA testing in patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 2009; 145:585
- [54] Murrell DF, Peña S, Joly P, et al. Diagnosis and management of pemphigus: Recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol* 2020; 82:575
- [55] Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol* 2009; 145:529
- [56] Nagel A, Lang A, Engel D, et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010; 134:320
- [57] Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, et al. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002; 147:261
- [58] Ishii K, Amagai M, Hall RP, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; 159:2010
- [59] Hammers CM, Stanley JR. Recent advances in understanding pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2020; 140: 733–741
- [60] Borradori, L., Van Beek, N., Feliciani, C., Tedbirt, B., Antiga, E., et al, Updated S2 K guidelines for the management of bullous pemphigoid initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020; 36: 1689-1704
- [61] Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, et al. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; :CD002292
- [62] Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2002; 346:321

- [63] Frew JW, Murrell DF. Corticosteroid use in autoimmune blistering diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012; 32:283
- [64] Morel P, Guillaume JC. [Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study]. *Ann Dermatol Venereol* 1984; 111:925.
- [65] Williams HC, Wojnarowska F, Kirtschig G, et al. Doxycycline versus prednisolone as an initial treatment strategy for bullous pemphigoid: a pragmatic, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 2017; 389:1630
- [66] Beissert S, Werfel T, Frieling U, et al. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2007; 143:1536
- [67] Sticherling M, Franke A, Aberer E, et al. An open, multicentre, randomized clinical study in patients with bullous pemphigoid comparing methylprednisolone and azathioprine with methylprednisolone and dapsone. *Br J Dermatol* 2017; 177:1299
- [68] Kremer N, Snast I, Cohen ES, et al. Rituximab and Omalizumab for the Treatment of Bullous Pemphigoid: A Systematic Review of the Literature. *Am J Clin Dermatol* 2019; 20:209
- [69] Fairley JA, Baum CL, Brandt DS, Messingham KA. Pathogenicity of IgE in autoimmunity: successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:704
- [70] Abdat R, Waldman RA, de Bedout V, et al. Dupilumab as a novel therapy for bullous pemphigoid: A multicenter case series. *J Am Acad Dermatol* 2020; 83:46
- [71] Czernik A, Toosi S, Bystryń JC, Grando SA. Intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune bullous dermatoses: an update. *Autoimmunity* 2012; 45:111

- [72] Harman KE, Albert S, Black MM, British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2003; 149:926
- [73] Joly P, Horvath B, Patsatsi A, et al. Updated S2K guidelines on the management of pemphigus vulgaris and foliaceus initiated by the european academy of dermatology and venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2020; 34:1900
- [74] Beissert S, Werfel T, Frieling U, et al. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2006; 142:1447
- [75] Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al. First-line rituximab combined with short- term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* 2017; 389:2031
- [76] Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, et al. First-line rituximab combined with short- term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial. *Lancet* 2017; 389:2031
- [77] Werth VP, Joly P, Mimouni D, et al. Rituximab versus Mycophenolate Mofetil in Patients with Pemphigus Vulgaris. *N Engl J Med* 2021; 384:2295
- [78] Craythorne EE, Mufti G, DuVivier AW. Rituximab used as a first-line single agent in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65:1064
- [79] Kridin K, Mruwat N, Ludwig RJ. Association of Rituximab With Risk of Long-term Cardiovascular and Metabolic Outcomes in Patients With Pemphigus. *JAMA Dermatol* 2023; 159:56
- [80] Chams-Davatchi C, Mortazavizadeh A, Daneshpazhooh M, et al. Randomized double blind trial of prednisolone and azathioprine, vs. prednisolone and placebo, in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27:1285

- [81] Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, et al. Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol* 2010; 130:2041
- [82] Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D. Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26:855
- [83] Baum S, Greenberger S, Samuelov L, et al. Methotrexate is an effective and safe adjuvant therapy for pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol* 2012; 22:83
- [84] Mobini N, Padilla T Jr, Ahmed AR. Long-term remission in selected patients with pemphigus vulgaris treated with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:264
- [85] McCarty M, Fivenson D. Two decades of using the combination of tetracycline derivatives and niacinamide as steroid-sparing agents in the management of pemphigus: defining a niche for these low toxicity agents. *J Am Acad Dermatol* 2014; 71:475
- [86] Carson PJ, Hameed A, Ahmed AR. Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:645
- [87] Pollmann R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018; 54:1
- [88] Czernik A, Beutner EH, Bystryrn JC. Intravenous immunoglobulin selectively decreases circulating autoantibodies in pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58:796
- [89] Eming R, Hertl M. Immunoabsorption in pemphigus. *Autoimmunity* 2006; 39:609
- [90] Cotterill JA, Barker DJ, Millard LG. Plasma exchange in the treatment of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1978; 98:243

- [91] Zhu LP, Cupps TR, Whalen G, Fauci AS. Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. *J Clin Invest* 1987; 79:1082
- [92] Vinay K, Kanwar AJ, Mittal A, et al. Intralesional Rituximab in the Treatment of Refractory Oral Pemphigus Vulgaris. *JAMA Dermatol* 2015; 151:878
- [93] Goebeler M, Bata-Csörgő Z, De Simone C, et al. Treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus with efgartigimod, a neonatal Fc receptor inhibitor: a phase II multicentre, open- label feasibility trial. *Br J Dermatol* 2022; 186:429
- [94] Iraj F, Asilian A, Siadat AH. Pimecrolimus 1% cream in the treatment of cutaneous lesions of pemphigus vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Drugs Dermatol* 2010; 9:684
- [95] Cohen SN, Lim RP, Paul CJ, Abdullah A. Equal efficacy of topical tacrolimus and clobetasone butyrate in pemphigus foliaceus. *Int J Dermatol* 2006; 45:1379
- [96] Navarro-Navarro I, Jiménez-Gallo D, Villegas-Romero I, Valenzuela-Ubiña S, Linares-Barrios M. Sulfasalazine treatment for persistent pemphigus vulgaris oral lesions after rituximab treatment. *Australas J Dermatol*. 2021 May;62(2):e303-e306. doi: 10.1111/ajd.13512. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33200820
- [97] Salomon D, Saurat JH. Oral gold therapy (Auranofin) in pemphigus vulgaris. *Dermatologica* 1986; 172:310
- [98] Chen S, Lu X, Zhou G. Mild pemphigus foliaceus responding to combination therapy with niacinamide and tetracycline. *Int J Dermatol* 2003; 42:981
- [99] Hashimoto T. Treatment strategies for pemphigus vulgaris in Japan. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9:1519
- [100] Jacobi A, Shuler G, Hertl M. Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab. *Br J Dermatol* 2005; 153:448

- [101] Fichel F, Barbe C, Joly P, et al. Clinical and immunologic factors associated with bullous pemphigoid relapse during the first year of treatment: a multicenter, prospective study. *JAMA Dermatol* 2014; 150:25
- [102] Bernard P, Reguiat Z, Tancredi-Bohin E, et al. Risk factors for relapse in patients with bullous pemphigoid in clinical remission: a multicenter, prospective, cohort study. *Arch Dermatol* 2009; 145:537
- [103] Joly P, Benichou J, Lok C, et al. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol* 2005; 141:691
- [104] Gual A, Mascaró JM Jr, Rojas-Farreras S, et al. Mortality of bullous pemphigoid in the first year after diagnosis: a retrospective study in a Spanish medical centre. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28:500
- [105] Scully C, Challacombe SJ. Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations, and management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(5):397-408
- [106] Almagairen N, et al. Assessment of the rate of long-term complete remission off therapy in patients with pemphigus treated with different regimens including medium- and high-dose corticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69:583–588
- [107] Atzmony L, Hodak E, Gdalevich M, Rosenbaum O, Mimouni D. Treatment of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Dermatol.* 2014;15:503–515
- [108] Langan SM, et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris — incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ.* 2008;337:a180
- [109] Alpsy E, Akman-Karakas A, Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res.* 2015;307:291–298
- [110] Tjokrowidjaja A, et al. The development and validation of the treatment of autoimmune bullous disease quality of life questionnaire, a tool to measure the

quality of life impacts of treatments used in patients with autoimmune blistering disease. *Br J Dermatol.* 2013;169:1000–1006

[111] K.T. Amber, D.F. Murrell, E. Schmidt, P. Joly, L. Borradori. Autoimmune subepidermal bullous diseases of the skin and mucosae: clinical features, diagnosis, and management. *Clin Rev Allergy Immunol*, 54 (2018), pp. 26- 51

[112] Yeh SW, Ahmed B, Sami N, Razzaque Ahmed A. Blistering disorders: diagnosis and treatment. *Dermatol Ther.* 2003;16(3):214-23

[113] Belloni-Fortina A, et al. Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Clin Dev Immunol.* 2009;2009:187864

[114] Haefliger S, Sitaru S, Cazzaniga S, et al. Diagnostic performance of direct immunofluorescence microscopy studies by biopsy sites in autoimmune subepidermal blistering dermatoses: a prospective study. *Br J Dermatol* 2020; 183:970

[115] Venugopal SS, Murrell DF. Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *Dermatol Clin* 2011; 29:373

[116] S.Zhou, S.H.Wakelin, J.Allen And F.Wojnarowska, Blister fluid for the diagnosis of subepidermal immunobullous diseases: a comparative study of basement membrane zone autoantibodies detected in blister fluid and serum, *British Journal of Dermatology* 1998; 139: 27–32.

[117] Irene Russo, Andrea Saponeri, Anna Michelotto and Mauro Alaibac Salivary Samples for the Diagnosis of Pemphigus vulgaris Using the BIOCHIP Approach: a Pilot Study, *Dermatology Unit, Department of Medicine, University of Padua, Padua, Italy*; 1: 97-100 (2017) doi:10.21873/invivo.11030

[118] Wenzhe Zhao 1, Haiqin Zhu 1, Xiaoqing Zhao1, Xinyi Wu1, Fei Sun1, Meng Pan1, Shengru Zhou 2, Direct Immunofluorescence of IgG on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue by Heat-Induced Antigen Retrieval as a Sensitive Method

for the Diagnosis of Pemphigus; D Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology 2023:16

[119] Cattoretti, G. “Application of the Antigen Retrieval Technique in Experimental Pathology: From Human to Mouse.” Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry and Molecular Morphology., 2000, pp. 165–79.