



Algoritmo diagnostico nell'epidermolisi bollosa acquisita: ruolo degli anticorpi anti-collagene VII

Federica Derlino, Adriana Piccolo, Camilla Vassallo, Giovanni Borroni

*Clinica Dermatologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS
Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Algoritmo diagnostico nell'epidermolisi bollosa acquisita: ruolo degli anticorpi anti-collagene VII

L'epidermolisi bollosa acquisita (EBA) è una rara malattia bollosa acquisita, a coinvolgimento cutaneo e/o mucoso, clinicamente polimorfa, caratterizzata da un andamento cronico con comparsa di bolle sottoepidermiche che guariscono con formazione di lesioni cicatriziali e milia. La patogenesi è autoimmune, con presenza di anticorpi circolanti diretti contro il collagene VII, principale costituente delle fibrille di ancoraggio della giunzione dermo-epidermica. La diagnosi differenziale con le altre malattie bollose sottoepidermiche è spesso ostacolata sia dal monomorfismo delle lesioni riscontrabili alla clinica, sia dalla scarsa sensibilità e specificità degli aspetti istopatologici ed immunopatologici attualmente in uso a fini diagnostici. Il presente lavoro considera l'utilità di un nuovo test ELISA per il dosaggio degli anticorpi anti-collagene VII circolanti nella finalità di effettuare una valutazione critica degli aspetti immunopatologici ed istopatologici attualmente in uso nel percorso diagnostico dell'EBA. Sono stati presi in esame 13 pazienti di difficile inquadramento diagnostico. Il nuovo test si è rivelato utile, in caso di positività, per confermare la diagnosi di EBA e per valutarne gli aspetti istopatologici più suggestivi. In caso di negatività, l'utilità del test si è esplicata consentendo un ricollocamento diagnostico ragionato.

Epidermolysis bullosa acquisita diagnostic algorithm: considerations on the role played by anti-type VII collagen antibodies

Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) is a rare, acquired, heterogeneous, chronic blistering disease of skin and mucous membranes, characterized by subepidermal blisters that usually heal with scarring and milia formation. The disease is due to circulating antibodies against type VII collagen, the main constituent of anchoring fibrils at the dermal-epidermal junction. Differential diagnosis with other subepidermal bullous diseases (bullous pemphigoid, mucous membrane pemphigoid) is often hindered by both the isomorphism of lesions and the low sensitivity and specificity of histopathological and immunopathological diagnostic features/criteria.

Our study evaluates the use of a new ELISA test for the detection of anti-type VII collagen antibodies with the aim to express a critical assessment of the current histopathological and immunopathological diagnostic criteria. Seventeen patients with misleading features were studied. If positive, the new test proved very useful in order both to confirm the diagnosis of EBA and to assess its histopathological aspects. If negative it played an important role in the differential diagnosis.

Introduzione

L'epidermolisi bollosa acquisita (EBA) è una dermatosi bollosa cronica della giunzione dermo-epidermica (GDE) di rara incidenza (0.2 casi/ milione di abitanti/ anno), clinicamente ed istologicamente polimorfa, con comparsa prevalentemente tra la quinta e la terza decade di età, senza predilezioni di sesso e razza [1-5]. La patogenesi è legata alla presenza di autoanticorpi circolanti diretti principalmente contro il gruppo amino-terminale NC1 del collagene VII, componente fondamentale delle fibrille di ancoraggio della GDE [6-10]. Clinicamente la malattia si caratterizza per la presenza di bolle e vescicole tese su base ipo-aflegmasica, a precipua comparsa in sedi, cutanee e/o mucose, esposte a traumatismi anche di lieve entità. La malattia ha poi decorso cronico cicatriziale e scarsa risposta terapeutica che, con il passare del tempo, possono condurre a temibili complicanze quali stenosi esofagee e cecità [11-12]. La grande difficoltà nel controllo terapeutico dell'EBA e la conseguente impossibilità di ottenere periodi liberi da malattia, oltre a condizionare la prognosi, differenzia la patologia dalle altre dermatosi bollose sottoepidermiche con cui entra solitamente in diagnosi differenziale (primi tra tutti il pemfigoide bolloso ed il pemfigoide cicatriziale) che si associano solitamente ad una maggiore risposta terapeutica con raggiungimento di periodi di remissione. Da ciò deriva la necessità di effettuare una precisa e corretta diagnostica differenziale, che si persegue, spesso con notevole difficoltà, attraverso un *iter* che prevede: esame obiettivo, esame istopatologico, che documenta la presenza di una bolla sottoepidermica in associazione ad un infiltrato infiammatorio neutrofilico-eosinofilo di entità variabile, immunofluorescenza diretta su cute, che rivela un deposito lineare di Ig e complemento alla GDE, ed immunofluorescenza indiretta *salt-split-skin* su siero, che documenta un deposito immunoglobulinico solo alla base del piano di clivaggio. Il percorso diagnostico differenziale è poi completato dal dosaggio, con metodica ELISA, degli auto-anticorpi circolanti anti-BP180 ed anti-BP230, nell'EBA attesi negativi vista la loro posizione più superficiale rispetto al collagene VII nella giunzione dermo-epidermica [13-14].

Scopo del lavoro

Sulla scorta di queste premesse lo studio si propone di valutare la specificità diagnostica nei confronti di EBA di un nuovo test ELISA, destinato dai protocolli al solo fine di ricerca, per il dosaggio di autoanticorpi circolanti anti-collagene VII in un gruppo di pazienti con difficile inquadramento diagnostico. L'obiettivo è effettuare una valutazione critica delle tecniche diagnostiche fino ad oggi in uso secondo i protocolli, riconsiderando anche, alla luce dei risultati, i quadri istopatologici in precedenza riferiti ad EBA o ad altre malattie bollose sottoepidermiche.

Materiali e metodi

Tra i 175 casi di affezioni bollose sottoepidermiche, afferiti tra il 2005 ed il 2010 presso la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, si è scelto di prender in esame 13 pazienti che, a seguito dell'*iter* diagnostico previsto, sono rimasti di difficile inquadramento diagnostico.

I 13 pazienti, 7 di sesso maschile e 6 di sesso femminile, avevano età compresa tra i 41 ed i 94 anni (età media 74.3) e presentavano un quadro clinico compatibile con EBA con, però, aspetti immunopatologici e sierologici dubbi quali: BP180 positivo a titolo elevato in associazione ad IFI-SSS positiva sia al tetto che alla base o solo alla base, oppure BP180 negativo o positivo a basso titolo associato ad IFI-SSS negativa o positiva solo alla base. Sui sieri di tutti i pazienti è stato dunque eseguito un dosaggio con metodica ELISA degli autoanticorpi anti-collagene VII. Il range di positività del test è tra le 5 U/ml e le 300 U/ml, mentre l'esecuzione del test in soggetti sani ha riportato valori medi pari a 0.94 U/ml con una deviazione standard di 1.04 U/ml.

Risultati

Nella valutazione dei risultati ottenuti è stato possibile suddividere, sulla base delle affinità dei reperti laboratoristici, degli aspetti clinici e dell'ipotesi diagnostica, la coorte dei 13 pazienti studiati in 3 gruppi (Tabella 1). Nel primo gruppo (pazienti 1, 2, 4, 10, 11, 13) i pazienti presentavano una positività a titolo elevato degli anticorpi anti-BP180, negatività o positività a basso titolo degli anticorpi anti-BP230, IFD positiva con deposito lineare alla GDE ed IFI positiva sia al tetto che al pavimento del piano di clivaggio in 4 pazienti, solo al pavimento in 2. In tale gruppo gli auto-anticorpi anti-collagene VII erano negativi e pertanto, in considerazione anche del dato clinico, è stata confermata diagnosi di pemfigoide bolloso. Nel secondo gruppo (pazienti 6, 7, 9, 12) gli anticorpi anti-BP180 erano negativi o solo debolmente positivi, gli anticorpi anti-BP230 erano sempre negativi, l'IFD era positiva con deposito lineare alla GDE e l'IFI era positiva solo al pavimento in 2 pazienti, negativa negli altri 2. Anche in questo sottogruppo della coorte gli auto-anticorpi anti-collagene VII erano negativi: a fronte di questi dati e della clinica è stata accostata a tali casi una diagnosi di pemfigoide cicatriziale. Nell'ultimo gruppo individuato (pazienti 3, 5, 8), gli anticorpi anti-BP180 erano negativi o positivi a basso titolo, gli anticorpi anti-BP230 erano negativi, l'IFD era positiva con deposito lineare alla GDE e l'IFI era positiva solo al pavimento del piano di clivaggio. La titolazione degli auto-anticorpi anti-collagene VII era risultata positiva, e per tali aspetti, sempre in considerazione anche della clinica, è stata confermata una diagnosi di EBA. Alla luce della positività degli/per gli auto-anticorpi anti-collagene VII è stato inoltre effettuato un riposizionamento dei parametri istopatologici normalmente considerati, cioè: entità dell'infiltrato infiammatorio, presenza di cheratinociti necrotici e cellule *ghost*, leucocitoclasia, spongiosi, sfrangiatura. È stato quindi osservato che i 3 casi di EBA erano accomunati dalla presenza di un infiltrato infiammatorio misto modesto e dall'assenza di sfrangiatura nella porzione inferiore dei cheratinociti basali, riscontrabile invece nel pemfigoide bolloso.

Discussione

Nel caso dell'epidermolisi bollosa acquisita l'importanza di un corretto inquadramento nosologico e di una puntuale diagnostica differenziale con le altre affezioni bollose sottoepidermiche è suffragata in maniera particolare dai risvolti terapeutici e prognostici della patologia. Si ha infatti a che fare con una malattia ad andamento cronico-cicatriziale capace, vista la scadente risposta terapeutica, di provocare al paziente grave disagio e menomazioni. L'*iter* diagnostico attualmente definito dai protocolli per le malattie bollose sottoepidermiche e comprendente l'esame clinico, istopatologico, IFD, IFI, IFI-SSS e dosaggio degli anticorpi anti-BP180 ed anti-BP230, non sempre garantisce una sicura individuazione della malattia. Ciò è quanto si è verificato per i 13 pazienti presi in esame, nei quali aspetti compatibili

con EBA (andamento clinico, IFI-SSS positiva solo alla base dello *split*) erano confusi da aspetti invece più suggestivi di pemfigoide bolloso (positività ad alto titolo degli anticorpi anti-BP180) o di pemfigoide cicatriziale (positività dell'IFI-SSS sia al tetto che alla base dello *split*).

L'introduzione di questo nuovo test ELISA che identifica nel siero dei pazienti anticorpi circolanti anti-collagene VII si è rivelato di grande utilità sia in caso di risultati positivi che di negativi. In caso di positività, infatti, è stato possibile individuare 3 pazienti effettivamente affetti da EBA. Il dato di 3 pazienti in cinque anni (1.7 % circa dei 175 pazienti iniziali) risulta in sintonia con i dati della letteratura che evidenziano come questa patologia sia estremamente rara (0.2 casi/1000000 abitanti/anno) [4-5]. L'individuazione di tre casi certi di EBA ha poi consentito anche una riconsiderazione degli aspetti istopatologici alla luce di tale risultato. Da ciò è emerso che, pur non esistendo aspetti patognomonici, se ne possono comunque individuare di suggestivi, quali la presenza di un infiltrato infiammatorio misto modesto e l'assenza della sfrangiatura tipicamente presente nel pemfigoide bolloso. Quando si parla di "sfrangiatura" si fa riferimento a delle sottilissime estroflessioni arboriformi individuabili a livello della lamina lucida come espressione della probabile avvenuta azione lesiva degli auto-anticorpi sulla porzione basale dei cheratinociti basali (soprastanti la lamina lucida stessa). Pertanto, l'assenza nell'EBA di tale aspetto è del tutto coerente con una patogenesi della malattia negli strati più bassi della giunzione dermo-epidermica, cioè nella lamina fibro-reticolare. In caso di negatività il test si è rivelato comunque di utilità per effettuare, escludendo con certezza l'EBA, un riposizionamento degli altri casi dubbi in un più preciso ambito diagnostico. Nella valutazione complessiva di tutti gli strumenti a nostra disposizione per poter porre diagnosi, abbiamo giudicato che la presenza di alti titoli di anticorpi anti-BP180 unitamente al dato clinico di coinvolgimento cutaneo prevalente rispetto a quello mucoso ed ad un quadro istologico con componente infiammatoria più marcata e "sfrangiatura" dell'epitelio della bolla, costituissero lo strumento per porre diagnosi di pemfigoide bolloso nonostante fossero presenti depositi all'IFI-SSS solo alla base della bolla o sia alla base che al tetto. Laddove, invece, erano presenti titoli di anticorpi anti-BP180 bassi o assenti, abbiamo riscontrato che l'interessamento mucoso era preponderante ed il quadro istologico con una minore componente infiammatoria, pertanto abbiamo posto diagnosi di pemfigoide cicatriziale, malgrado la positività dell'IFI-SSS solo alla base della bolla o la sua negatività. La negatività dell'IFI-SSS può essere giustificata dalla scarsa presenza di auto-anticorpi in circolo, associata ad una modesta sensibilità del test stesso. Gli altri aspetti inconsueti dell'IFI-SSS accostati a diagnosi di pemfigoide bolloso e cicatriziale possono essere motivati da un fenomeno di *spreading* antigenico. La condizione di infiammazione cronica su base autoimmune, infatti, fungerebbe da *trigger* capace di smascherare ed esporre agli auto-anticorpi epitopi antigenici non coinvolti in prima battuta, determinando pertanto anche la formazione di un vero e proprio pool anticorpale con affinità differenti. Quando tale fenomeno, più frequentemente, si sviluppa nei confronti di componenti antigeniche differenti ma sempre appartenenti alla struttura della proteina colpita in origine si parla di *spreading* intramolecolare; nei casi in cui, invece, si ha il coinvolgimento di epitopi antigenici appartenenti a proteine differenti e distanti dalla sede inizialmente colpita si parla di *spreading* intermolecolare. In riferimento a quest'ultimo alcuni dei principali target antigenici riconosciuti e riportati in letteratura sono rappresentati da un antigene di 400 kDa, appartenente alla famiglia delle pectine, da un antigene di 105 kDa ed uno di 200 kDa, localizzati entrambi nella porzione inferiore della lamina lucida. L'individuazione di tale fenomeno di *spreading*, rappresenta pertanto una valida ipotesi nell'interpretazione di quadri laboratoristici ed andamenti clinici poco caratteristici ed anche la possibile associazione, non presente nel nostro studio, di tali affezioni bollose autoimmuni con altre affezioni dermatologiche in cui sia coinvolta l'immunità [15-16].

Tabelle e figure

Tabella 1. Risultati sierologici ed immunopatologici.

Pz	Età	Sedi coinvolte	BP180	BP230	IFD	IFI-SSS	ANTI-TypeVII	Diagnosi
1	78	Cute, mucosa genitale	95,38.8	8.1,32.4	+ IgG lineare GDE	+/- base bolla	2.8	Pemfigoide bolloso
2	79	Cute, mucose	151.8	<1	++ IgG lineare GDE	+/- base bolla +/- tetto bolla	<1	Pemfigoide bolloso
3	81	Cute, mucose	37	<1	+ IgG e C' lineare GDE base bolla	+ base bolla	16.1	EBA
4.	79	Cute, mucose	121.6	32.8	+ IgG lineare GDE	+ tetto bolla + base bolla	2.8	Pemfigoide bolloso
5	94	Cute, mucosa orale, congiuntiva	1.1	<1	+ IgG lineare GDE	+ base bolla	24.3	EBA
6	41	Cute (cuoio capelluto)	5.35	<1	Rare IgG lineare	+/- base bolla	2.8	Pemfigoide cicatriziale
7	72	Cute, mucose	<1	3.3	+ IgG lineare GDE	negativo	2.6	Pemfigoide cicatriziale
8	68	Cute, mucose (orale e genitale)	15	3.4	+/- IgG lineare GDE	+ base bolla	45.9	EBA
9	52	Cute, mucosa orale	44.6,49.8,14.1	/, / <1	+/- IgG e C' lineare GDE base bolla (spontaneo clivaggio)	+ base bolla	2.3	Pemfigoide cicatriziale
10	80	Cute	104.6	2.3	+ IgG lineare GDE	++ tetto bolla + base bolla	<1	Pemfigoide bolloso
11	87	Cute, mucose	119.3	4	+/- IgG e C' lineare GDE	+ base bolla (corpi fluor.)	<1	Pemfigoide bolloso
12	84	Cute, mucose	6.2,19.5	/, 36.1	+ IgG lineare GDE	negativo	2.8	Pemfigoide cicatriziale
13	72	Cute, mucose (esofago)	189.5,42	/, 11.7	+/- IgG e C' lineare GDE	+ tetto bolla +/- base bolla	<1	Pemfigoide bolloso

Bibliografia

1. Hallel-Halevy D, Nadelman C, Chen M et al. Epidermolysis bullosa acquisita: update and review. *Clin Dermatol* 2001;19:712-718.
2. Wozniak K, Kowalewski C. Alteration of basement membrane zone in autoimmune subepidermal bullous diseases. *J Dermatol Sci* 2005;40(3):169-175.
3. Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita: a disease of autoimmunity to type VII collagen. *J Autoimmun* 1991;4(1):59-71.
4. Zillikens D. Acquired skin disease of hemidesmosomes. *Journal of Dermatological Science* 1999;20:134-154.
5. Bernard P, Vaillant L, Labeille B et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in the three French regions. Bullous diseases French study Group. *Archives of Dermatology* 1995;131(1):48-52.
6. Brittingham R, Uitto J, Fertala A. High affinity binding of the NC-1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:692-699.
7. Villone D, Fritsch A, Koch M et al. Supramolecular interactions of the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem* 2008;283:24506-24513.

8. Liu Z, Diaz LA, Troy JL et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *The Journal of Clinical Investigation* 1993;92(5):2480-2488.
9. Borradori L, Caldwell JB, Briggaman RA et al. Passive transfer of autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Archives of Dermatology* 1995;131(5):590-595.
10. Lazarova Z, Yee C, Darling T et al. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98(7):1509-1518.
11. Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita. *Seminars in Dermatology* 1988;7(3):218-224.
12. Briggaman RA, Gammon WR, Woodley DT. Epidermolysis bullosa acquisita. *London:Chapman and Hall Medical* 1990;1:127-138.
13. Roenigk HH, Ryan JG, Bergfeld WF. Epidermolysis bullosa acquisita: report of three cases and review of all published cases. *Arch Derm* 1971;3:1.
14. Lehman JS, Camilleri MJ, Lawrence E et al. Epidermolysis bullosa acquisita: concise review and practical considerations. *The International Society of Dermatology* 2009;48:227-236.
15. Fairley JA, Woodley DT, Chen M. A patient with both bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita: an example of intermolecular epitope spreading. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:118-122.
16. Kasperkiewicz M, Hoppe U, Zillikens D. Relapse-associated autoantibodies to BP180 in a patient with anti-p200 pemphigoid. *CED* 2009;35:614-617.