

IMUNOFLUORESCENȚA DIRECTĂ ÎN PEMFIGUSURI

DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE IN PEMPHIGUS

ADINA ALEXANDRU*

Rezumat

Diagnosticul pemfigusurilor se bazează pe aspectul clinic și examenul histopatologic al leziunilor și este confirmat prin teste de imunofluorescență. Imunofluorescența directă reprezintă un instrument de diagnostic esențial în pemfigusuri dar poate fi utilizată și ca metodă de monitorizare a remisiunii acestor afecțiuni, alături de imunofluorescența indirectă. Metoda directă presupune analizarea unui fragment de țesut prelevat de la pacient, în mod curent fiind utilizate biopsii cutanate sau mucoase. Studii recente sugerează posibilitatea utilizării firelor de păr ca substrat al efectuării imunofluorescenței directe în pemfigusuri pentru confirmare diagnostică și monitorizare a activității bolii.

Cuvinte cheie: pemfigus, diagnostic, imunofluorescență directă.

Summary

Pemphigus diagnosis is based on the clinical aspect and the histopathological examination of the lesions and confirmed by immunofluorescence tests. Direct immunofluorescence is a key instrument for pemphigus diagnosis, but can also be used, alongside indirect immunofluorescence, as a method to monitor remissions of this condition. The direct method consists in the analysis of a tissue fragment sampled from the patient; cutaneous or mucous biopsies are currently used.

Recent studies recommend the use of plucked hair as substrate in direct immunofluorescence in pemphigus for confirmation of diagnosis and management of the disease.

Key words: pemphigus, diagnosis, direct immunofluorescence.

DermatoVenerol. (Buc.), 56: 293-300

Introducere

Imunofluorescența este considerată standardul de aur în diagnosticul maladiilor buloase autoimune și reprezintă metoda de confirmare a unui diagnostic de etapă orientat de examinarea clinică și histologică. Imunofluorescența directă detectează prezența moleculelor de tip imunoglobuline, complement sau fibrinogen în fragmentul de țesut prelevat de la pacient.

Modele de fluorescență

Depunerea de imunoreactanți în spațiul intercelular epidermic rezultă din legarea

* U.M.F. „Carol Davila” Facultatea de Medicină, București.

Introduction

Immunofluorescence is considered the golden standard in the diagnosis of autoimmune bullous conditions and the confirmation method in a stage diagnosis established by clinical and histological examination. Direct immunofluorescence detects the presence of immunoglobulin-type molecules, a complement or fibrinogen in the fragment of tissue sampled from the patient.

Models of fluorescence

The deposition of immunoreactants in the epidermic intercellular space results from the

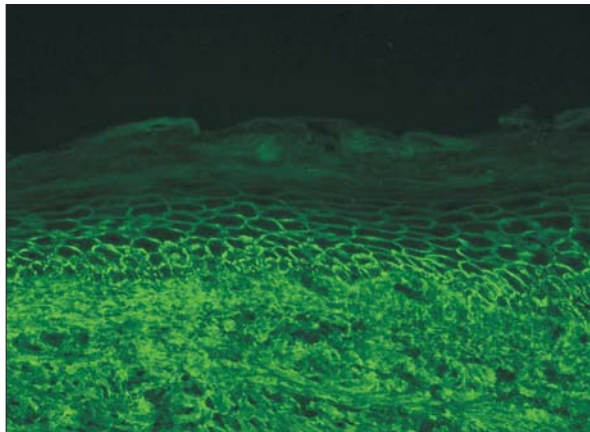


Figura 1. Depozite intercelulare de IgG cu aspect de rețea

Figure 1. Crop-like IgG intercellular deposits

anticorpilor de proteinele desmozomale keratinocitare și este specifică pemfigusurilor(1). Depunerea de IgG la nivel intercelular reprezintă marca pemfigusurilor (cu excepția pemfigusului cu IgA) și testarea este pozitivă în 90-100% din cazurile de boală activă(2) dacă fragmentul de țesut este prelevat corespunzător.

Subclasele de anticorpi implicate sunt IgG1 și IgG4. Patternul de fluorescență apare sub forma unor depozite liniare tipice pe suprafața keratinocitară descris clasic sub forma de „rețea” (fig. 1). Aspectele întâlnite în pemfigusul vulgar sau foliaceu și variantele lor pot fi identice, dar de obicei fluorescența este limitată la/predominantă în ariile suprabazale în pemfigusul vulgar pe când în formele superficiale de pemfigus intensitatea este maximă în straturile superioare ale epidermului(3). Este posibil ca această constatare să provină din diferențele cantitative ale antigenelor țintă principale incriminate în patogenia celor două afecțiuni, respectiv desmogleina 3 pentru pemfigusul vulgar și desmogleina 1 pentru pemfigusul foliaceu(4).

În pemfigusuri poate fi detectată și depunerea de complement (C3) cu un pattern similar celui al IgG dar cu o frecvență a apariției și o intensitate mai scăzută a fluorescenței(5). Depunerea exclusivă de C3 la nivel intercelular nu poate confirma diagnosticul de pemfigus. Uneori se identifică prezența de IgM și/sau IgA.

În cazul în care imunoreactanții depuși la nivel intercelular epidermic sunt exclusiv de tip IgA se stabilește diagnosticul de pemfigus cu IgA

binding of antibodies with keratinocitary desmosomal proteins and is specific to pemphiguses [1]. IgG settling at intercellular level is a sure sign of pemphiguses (with the exception of the IgA one) and testing is positive in 90 to 100 per cent of the active cases [2] if the tissue fragment is accurately sampled.

The antibody subclasses involved are IgG1 and IgG4. The fluorescence pattern consists of typical linear deposits on the keratinocitary area, which are classically defined as a “crop” (Fig. 1). The aspects encountered in pemphigus vulgaris or pemphigus foliaceus and their subvariants may be identical, but in most cases of pemphigus vulgaris the fluorescence is limited to or predominant in the suprabasal areas, while in the superficial forms of pemphigus the intensity reaches maximum level in the superior strata of the epidermis [3]. This may be due to the quantitative differences in the main target antigens that are incriminated in the pathogeny of the two conditions, namely desmoglein 3 in pemphigus vulgaris and desmoglein 1 in pemphigus foliaceus [4].

Sediments of complement C3 are also found in pemphiguses and their pattern resembles that of IgG, but with a lower fluorescence frequency and intensity [5]. Sole deposits of C3 at intercellular level cannot confirm the diagnosis of pemphigus. Sometimes, the presence of IgM and/or IgA is also identified.

In the cases where immunoreactants settled at epidermal level are exclusively of IgA type, the diagnosis is that of IgA pemphigus (subcorneal pustular dermatosis with IgA intercellular pustules or intraepidermal neutrophilic dermatosis with IgA intercellular vesicles). Fluorescence can be predominantly detected in the outer strata of the epidermis and constantly in all skin epidermal area.

The presence of IgG-type immunoreactants both in the basal membrane of the epidermis and in the intercellular space is identified in pemphigus erythematous and in paraneoplastic pemphigus.

Method efficacy

Direct immunofluorescence is an extremely valuable method in confirming suspicion differential diagnoses in immunobullous

(dermatoză pustuloasă subcornosă cu depozite intercelulare de IgA sau dermatoză neutrofilică intraepidermică cu depozite intercelulare de IgA). Fluorescența poate fi identificată predominant în straturile superioare ale epidermului sau constant în toate ariile epidermice.

Prezența imunoreactanților de tip IgG atât la nivelul membranei bazale a epidermului cât și în spațiul intercelular este identificată în pemfigusul eritematos și în pemfigusul paraneoplazic.

Valoarea metodei

Imunofluorescența directă este o metodă extrem de valoroasă pentru confirmarea unui diagnostic de suspiciune și pentru efectuarea diagnosticului diferențial între maladiile imunobuloase. Imunofluorescența indirectă este utilă în situațiile în care metoda directă este negativă sau nespecifică.

Valoarea predictivă a imunofluorescenței directe este importantă prin prisma evaluării validității acestei metode în confirmarea diagnosticului acestor afecțiuni. Conform datelor imunofluorescența directă efectuată pe fragment cutanat în pemfigusuri este pozitivă în 90 până la 100% din cazurile de boală activă(2). Rezultatele negative ale testării pot fi întâlnite în mod real în cazul pemfigusului postmedicamentos, în care sunt incriminate și mecanisme de alterare directă a legăturilor intercelulare de către substanța incriminată fără implicarea unor mecanisme imune. Rezultatele fals negative apar în circa 10% din cazuri(6) și sunt cel mai probabil rezultatul unor erori de recoltare sau de prelucrare a probelor, spre exemplu recoltarea unui fragment de țesut dintr-o zonă inflamată sau cu bula prezentă, ceea ce implică degradarea imunoreactanților și negativarea testării, cel mai frecvent aceste raportări fiind întâlnite în cazuri de pemfigus paraneoplazic.

Valoarea predictivă pozitivă a imunofluorescenței directe pentru diagnosticul pemfigusurilor este de aproximativ 100%, în sensul că în cazul pozitivării acestui test probabilitatea confirmării diagnosticului de pemfigus este de circa 100%(2). Valoarea predictivă negativă se referă la situația în care un pacient cu un rezultat negativ al testării nu prezintă boala. În cazul

disorders. Indirect immunofluorescence has proven useful in cases where the direct method was negative or non-specific.

The *predictive value* of direct immunofluorescence is important with regard to the evaluation of its validity in the confirmation of the diagnoses established for other diseases. According to data in literature, direct immunofluorescence performed on the tissue fragment in pemphiguses is positive in 90 up to 100 per cent of the active cases [2]. Negative results of the tests may actually occur in post-medication pemphigus, in which are also incriminated mechanisms of direct alteration of intercellular bonds by the substance involved, without the involvement of immune mechanisms. Fake negative results occur in about 10 per cent of the cases [6] and are most probably due to errors in samples collecting or processing, such as collecting a tissue fragment from an inflamed or bullous area, which results in immunoreactants compromise and test negation; most such reports occur in paraneoplastic pemphigus.

The predictive value of direct immunofluorescence in pemphigus diagnosis rises to approximately 100 per cent, in the sense that in positive testing the probability of diagnosis confirmation is about 100 per cent [2]. The negative predictive value occurs when a patient with negative testing result does not actually suffer from the disease. In the case of pemphiguses, this values ranges from 85 to 90 per cent [2], since occurrence of fake negative results is possible. In oral pemphigus, the sensitivity of direct immunofluorescence in mucous lesions rises to only 71 per cent [7]. When in a patient with negative direct immunofluorescence the suspicion diagnosis of pemphigus persists, it is recommended to repeat the test or to confirm diagnosis by means of indirect immunofluorescence.

The management of the evolution and of the therapeutic response in pemphiguses represents another useful application of both direct and indirect immunofluorescence. Studies have shown that these two methods can contribute to direct management of pemphigus therapy in accordance with the condition's activation degree.

pemfigusurilor această valoare se situează la circa 85-90% (2) deoarece există posibilitatea apariției unor rezultate fals negative. În pemfigusul oral sensibilitatea imunofluorescenței directe în leziunile mucoase este de numai 71% (7). În cazul în care la un pacient cu imunofluorescență directă negativă persistă suspiciunea diagnostică de pemfigus se recomandă repetarea testului sau confirmarea diagnosticului prin imunofluorescența indirectă.

Monitorizarea evoluției și răspunsului terapeutic în pemfigusuri reprezintă o altă aplicație utilă a imunofluorescenței, atât tehnica directă cât și cea indirectă fiind, conform studiilor efectuate, metode ce pot contribui la o conducere corectă a terapiei în pemfigusuri în concordanță cu gradul de activitate al bolii.

Introducerea corticosteroizilor a reprezentat un pas important în terapia acestor afecțiuni prin obținerea controlului activității bolii și inducerea remisiunii clinice sau imunologice transformând practic o boală invariabil fatală într-o afecțiune grevată de mortalitate de circa 5-10%(8).

Obiectivul tratamentului este reprezentat de reducerea răspunsului inflamator și a producției de autoanticorpi, respectiv controlul activității bolii, definit ca momentul în care nu mai apar leziuni noi și cele existente încep să prezinte vindecare(10). Remisiunea clinică este asociată cu scăderea titrului anticorpilor circulanți. După inducerea remisiunii clinice se impune introducerea unui regim terapeutic de întreținere utilizând doze terapeutice minime care să mențină răspunsul clinic. Administrarea de lungă durată și în doze mari a corticosteroizilor presupune apariția unor efecte secundare importante, decesul în cazurile de pemfigus survenind cel mai frecvent în urma complicațiilor determinate de terapie. Au fost introduse regimuri terapeutice ce folosesc doze mai mici de corticosteroizi în asociere cu așa-numitele terapii adjuvante (imunosupresoare-azatioprină, ciclofosamidă, ciclosporină, micofenolat mofetil, clorambucil, metotrexat, antiinflamatoare-săruri de aur, dapsonă, nicotinamidă, tetraciclină, imunomodulatoare-plasmaferenza, fotoforeza extracorporeală, imunoglobuline iv, terapii biologice-rituximab). Terapiile adjuvante pot să scadă necesarul de steroizi sistemici(7), deși există și opinii conform cărora prognosticul

The introduction of corticosteroids has represented an important step in the therapy of this affection, as it led to control of its activation and induction of clinical or immunological remission, turning a practically deadly disease into a condition with a mortality rate is of only 5 to 8 per cent [8].

Treatment objective is the decrease in the inflammatory response and in the production of antibodies, respectively the control of disease's activation, which is defined as the moment when new lesions appear while the old ones start to heal [10]. Clinical remission is associated with the decline in the volume of circulating antibodies. After induction of clinical remission, a maintenance therapy consisting of minimal doses should be started in order to preserve the clinical response. Long-term administration of high corticosteroids dosages leads to occurrence of significant side-effects, demise in pemphigus cases being mostly due to therapeutical complications. Newer therapies consist of lower corticosteroids doses associated with the so-called adjuvant therapies (immunosuppressants-azatioprine, cyclophosphamides, cyclosporin, mycophenolate mofetil, chlorambucil, methotrexate, anti-inflammatories-gold salts, dapsone, nicotinamide, tetracyclin, immunomodulators-plasmapheresis, extracorporeal photopheresis, iv immunoglobulins, rituximab-biological therapies). Adjuvant therapies can decrease the need for systemic corticosteroids [7], although some authors consider that pemphigus prognostic is not influenced by the association with these therapies [9].

As to complications arising in long-term corticosteroids administration, associated or not with adjuvant therapies, the present final objective in the management of these patients is considered to be the disconnection of treatment in cases with complete clinical remission (without new or stable lesions under maintenance therapy consisting of minimal doses) [10]. In 50 per cent of the patients in clinical remission in whom therapy is stopped, complete remission (absence of new or stable lesions occurring in the last two months) [10] without therapy can last for months or even years [11]. Relapse is defined, according to induced criteria [10], as the occurrence after one month of

pemfigusurilor nu este influențat de asocierea cu aceste terapii(9).

Prin prisma complicațiilor ce grevează terapiile de lungă durată corticosteroidiene, asociate sau nu cu terapiile adjuvante, se consideră la momentul actual ca obiectivul final în managementul acestor pacienți este întreruperea tratamentului la cazurile aflate în remisiune clinică completă (fără leziuni noi sau stabile aflați pe un regim de întreținere cu doze minime)(10). 50% dintre pacienții în remisiune clinică la care se întrerupe terapia pot avea perioade cu durată de luni până la ani(11) de remisiune complete fără terapie, adică absența unor leziuni nou apărute sau stabile după întreruperea terapiei sistemice în ultimele 2 luni(10). Recăderea este definită, conform criteriilor introduse (10) ca apariția de cel puțin 3 leziuni nou apărute într-o perioadă de o lună ce nu s-au vindecat spontan sau ca extinderea unor leziuni stabile la un pacient la care se obținuse în prealabil controlul activității bolii.

Este în general acceptat faptul că titrul autoanticorpilor circulanți, detectați prin imunofluorescență indirectă, se corelează cu gradul activității bolii, de obicei o creștere a titrului fiind corelată cu o recurență a activității pe când scăderea titrului semnifică un răspuns terapeutic adecvat. Efectuarea imunofluorescenței indirecte în acest scop prezintă însă anumite dezavantaje: necesită numeroase determinări seriate printr-o metodă costisitoare și greu accesibilă ce prezintă o sensibilitate de circa 80% -90% în cazul pemfigusului vulgar.

Prin metoda ELISA, mai sensibilă și specifică decât imunofluorescența indirectă, se pot efectua de asemenea determinări seriate ale nivelului anticorpilor antidesmogleine, relevanți pentru gradul de activitate al bolii, metoda fiind de obicei efectuată doar în centre specializate.

Imunofluorescența directă poate reprezenta o alternativă viabilă pentru monitorizarea activității bolii. Studiile publicate au demonstrat faptul că riscul recăderii la pacienții cu pemfigus aflați în remisiune clinică este de 13-27% dacă testarea este negativă și de 44-100% dacă rezultatul este pozitiv, pe când acest risc este de 24% în cazul imunofluorescenței indirecte negative și 57% în cazul imunofluorescenței indirecte pozitive (7), aceste date putând fi

at least three new lesions which did not heal spontaneously, or as the extension of stable lesions in a patient whose condition had been previously controlled.

It is generally accepted that the titre of circulating autoantibodies, detected by indirect immunofluorescence, is correlated with the degree of the condition activation, in the sense that an increase in titre signals a recurrence, while a decrease is the result of an adequate therapeutical response. Performing indirect immunofluorescence to this end is disadvantageous from several points of view: it implies a large number of serial determinations and the procedure is expensive and hardly accessible, and the sensitivity is 80-90 per cent in pemphigus vulgaris.

ELISA method, which is more sensible and specific than indirect immunofluorescence, is also used in serial determinations of the level of antidesmoglein antibodies, which is relevant in the evaluation of the disease activation. This method is usually used only in specialized clinics.

Direct immunofluorescence can represent a viable alternative for monitoring disease activation. Studies in literature have shown that the risk of relapse in pemphigus patients in clinical remission is of 13-27 per cent if testing was negative and of 44-100 per cent if the result is positive, as compared to 24 per cent in negative indirect immunofluorescence and 57 per cent in positive indirect immunofluorescence [7]. These data may favour direct immunofluorescence as the method of choice in the immunological remission of pemphigus.

The decision to cease treatment in patients in clinical remission is first and foremost to be taken considering their clinical evolution (a long complete remission period under treatment with minimal doses). The relapse risk is obviously lower if the clinical aspect is correlated with the studies of negative immunofluorescence [7]. Taking into account the advantages of the direct method's higher accessibility as well as the close statistic values quoted above in the risk of relapse for the direct and indirect methods, direct immunofluorescence may be considered as more valuable in monitoring disease activation in dermatological practice. Although its acces-

interpretate în favoarea efectuării imuno-fluorescenței directe ca metodă de monitorizare a remisiunii imunologice în cazurile de pemfigus.

Decizia de întrerupere a tratamentului la pacienții aflați în remisiune clinică trebuie luată în mare măsură în funcție de evoluția clinică (o perioadă lungă de remisiune completă sub tratament cu doze minime) însă riscul de recădere este evident scăzut dacă se corelează aspectul clinic cu studiile de imunofluorescență negative(7). Având în vedere avantajele unei accesibilități mai mari a metodei directe și valorile statistice apropiate legate de riscul de recădere pentru metoda directă și indirectă citate anterior, imunofluorescența directă poate reprezenta o metodă mai valoroasă pentru practica dermatologică în ceea ce privește monitorizarea activității bolii. Cu toate ca accesibilitatea acestei testări este mai mare din punct de vedere al posibilităților tehnice, există problema necesității determinărilor seriate, la anumite intervale de timp, ceea ce presupune recoltare repetată de biopsii cutanate sau mucoase, o procedură invazivă disconfortantă pentru pacient.

Aspecte tehnice particulare

În mod clasic se descriu două tipuri de probe ce pot fi examinate prin imunofluorescența directă, respectiv fragmente de tegument sau mucoase prelevate prin biopsie.

O altă perspectivă este cea propusă de Schaerer și Trueb(12) care studiază posibilitatea efectuării imunofluorescenței directe utilizând ca substrat firul de păr anagen prelevat de la pacienți cu pemfigus vulgar. Pornind de la premiza demonstrată că teaca epitelială externă a foliculului pilos este similară structural și exprimă similar keratinocitelor epidermice antigenele țintă ale pemfigusului- respectiv desmogleina 1 și 3 (13) s-a evidențiat astfel patternul specific "în rețea" al pemfigusului la examinarea prin imunofluorescența directă a firului de păr, obținându-se rezultate similare cu cele demonstrate la efectuarea imunofluorescenței directe cutanate în cazul pacienților astfel investigați.

Studii efectuate ulterior (14,15,16) au demonstrat pozitivitatea imunofluorescenței directe efectuate pe firul de păr și pe alte loturi de

sibilitate în punct de technical possibilities is higher, there still exists a problem, that of the necessity of serial determinations at certain periods of time, which implies repeated samplings of cutaneous or mucous biopsies, an invasive and disagreeable procedure.

Particular technical aspects

Studies describe two types of samples that can be tested by direct immunofluorescence – fragments of tegument and mucosa collected by biopsy.

Schaerer and Trueb [12] have suggested another approach. They studied the possibility of performing immunofluorescence using anagen hair drawn from patients with pemphigus vulgaris. Starting from a demonstrated prerequisite – that the outer root sheath of hair follicle is similarly structured as epidermal keratinocytes and similarly expresses the target antigens in pemphigus (desmogleins 1 and 3) [13] – , they have emphasized the „crop-like” specific pattern of pemphigus by performing direct immunofluorescence on the hair, results that are similar to those obtained by direct cutaneous immunofluorescence performed on the same patients.

Subsequent studies [14, 15, 16] have shown the positivity of direct immunofluorescence performed on the hair in other patients too. Positivity percentages ranged from 85 to 100. Reports vary in terms of patients under study – patients with only a pemphigus vulgaris condition or groups with different types of pemphiguses; patients with active lesions versus patients in clinical remission. The method was tested using both anagen and telogen hair – desmoglein 3 is the protein responsible for anchoring telogen hair to the follicle [17]. Variables are also to be found in the processing of the collected hair: cryopreserved hair, subsequently sectioned, or processing without hair sectioning. It is possible that differences in reported percentages have occurred as a result of variable criteria in choosing studied patients and of applying various sample processing techniques.

pacienți. Procentul acestei pozitivități este conform raportărilor, între 85-100% în loturile investigate. Raportările prezintă elemente de variabilitate legate de criteriile de includere a pacienților- pacienți cu pemfigus vulgar exclusiv sau loturi de pacienți cu diferite tipuri de pemfigus, pacienți cu leziuni active sau aflați în remisiune clinică la momentul investigării. De asemenea, se citează efectuarea acestei metode folosind atât fire de păr anagen cât și telogen, având în vedere că desmogleina 3 este proteina responsabilă pentru ancorarea firului de păr telogen la folicul (17). Variabilitatea raportărilor se regăsește și în tehnicile diferite de prelucrare a firelor de păr recoltate se citează folosirea de fire crioprezervate și ulterior secționare, respectiv prelucrarea fără secționare. Este probabil ca diferențele procentuale citate în rezultatele acestor studii să provină din această variabilitate a criteriilor de includere precum și a tehnicilor diferite de prelucrare a probelor.

Concluzii

Utilizarea firului de păr pentru efectuarea imunofluorescenței directe ar prezenta avantaje evidente comparativ cu metodele clasice ce presupun manevre invazive de recoltare a fragmentelor de țesut (tegument, mucoase) . Evident, prelevarea firelor de păr reprezintă o manevră neinvazivă, fără disconfort pentru pacient, mult mai ieftină, ușor de efectuat în cazul pacienților la care este dificil de recoltat biopsii de exemplu copii, adulți necooperanți, localizări mucoase. Monitorizarea remisiunii imunologice în pemfigus prin efectuarea de imunofluorescențe directe repetate folosind ca substrat firul de păr în locul biopsiilor cutanate sau mucoase ar reprezenta de asemenea un alt avantaj major al metodei.

Până la momentul actual literatura de specialitate este limitată în ceea ce privește informațiile legate de validarea acestei metode. Prin urmare este necesară efectuarea unor studii suplimentare în scopul obținerii unor date precise legate de sensibilitatea imunofluorescenței directe efectuate pe firul de păr comparativ cu pielea sau mucoasele în pemfigusuri.

Conclusions

The use of hair to perform direct immunofluorescence testing might have marked advantages as compared to classical methods that imply invasive manoeuvres of tissue (tegument, mucous) fragments collecting. Obviously, collecting hair is a non-invasive, much cheaper procedure, not uncomfortable for the patient and particularly recommended in cases where biopsies are hard to sample – for instance, in children, non-cooperant adults, mucous areas. Repeated direct immunofluorescence using hair as substrate instead of cutaneous or mucous biopsies in monitoring immunologic remission in pemphigus may also represent a major advantage. Up to now, data in literature are limited in point of information regarding validation of this method. Consequently, further studies need to be made in order to assess the sensitivity of direct immunofluorescence performed on hair as compared to the skin and mucosae in pemphigus cases.

Received: 7.08.2011

Intrat în redacție: 7.08.2011

Bibliografie/Bibliography

1. Jordon RE, Trifthauser CT, Schroeter AL. Direct immunofluorescence studies of pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1971;103:486-91.
2. Mutasim DF, Adams BB. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:803-22.
3. Bystryn JC, Abel FL, DeFeo D. Pemphigus foliaceus: subcorneal intercellular antibodies of unique specificity. *Arch Dermatol* 1974;110:857-61.
4. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-8.
5. Wojnarowska F, Eady RA, Burge SM. Bullous eruptions. In Champion RH, Burton JL, Burns DA eds. *Textbook of Dermatology* 6th edn. Oxford: Blackwell Science 1998 p.1817-98.
6. Krasny SA, Beutner EH, Chorzelski TP. Specificity and sensitivity of indirect and direct immunofluorescent findings in the diagnosis of pemphigus. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V, editors. *Immunopathology of the skin*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1987. p. 207-48.
7. Harman KE, Albert S, Black MM. Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br Journal of Dermatology* 2003; 149:926-937.
8. Ioannides D, Lazaridou E, Rigopoulos D. Pemphigus. *J Eur Acad Derm Venereol* 2008; 22:1478-1496.
9. Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2000; 136:868-872.
10. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR. Consensus statement on definitions of disease, endpoints, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:1043-6.
11. Bystryn J-C. Therapy of pemphigus. *Seminars Dermatol* 1988; 7: 186-194.
12. Schaerer L, Trueb RM. Direct immunofluorescence of plucked hair in pemphigus. *Arch Dermatol* 2003; 139: 228-9.
13. Wilson CL, Dean D, Wojnarowska F. Pemphigus and the terminal hair follicle. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 428-31.
14. Daneshpazhooh M, Asgari M, Naraghi ZS et al. A study on plucked hair as a substrate for direct immunofluorescence in pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 129-31.
15. Kumaresan M, Rai R, Sandhya V. Immunofluorescence of the outer root sheath: an aid to diagnosis in pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36(3): 298-301.
16. Daneshpazhooh M, Zahra S, Naraghi ZS et al. Direct immunofluorescence of plucked hair for evaluation of immunologic remission in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2011 June 21, ahead of print, doi:10.1016/j.jaad.2010.09.721.
17. Koch PJ, Mahoney MG, Cotsarelis G. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci* 1998;111: 2529-37.

Adresă de corespondență: Dr. Adina Alexandru
Corresponding address: Spitalul Clinic Colentina, Clinica II Dermatologie
Șos. Ștefan cel Mare 19-21, sector 2, București
Email: dr_adinaalexandru_ro@yahoo.com