

Diagnostyka choroby pęcherzowej psa przy wykorzystaniu cienkoigłowej biopsji skórnej

KATARZYNA PŁONECZKA, EWA ŚMIELEWSKA-ŁOŚ, PIOTR KUROPKA*, JAN KURYSZKO*

Katedra Epizootiologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

*Katedra Anatomii i Histologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Kożuchowska 1, 51-631 Wrocław

Płoneczka K., Śmiełewska-Łoś E., Kuropka P., Kuryszko J.

Diagnosing bullous disease in dog by using thin needle biopsy

Summary

A dog (male, 7 years old, German Shepard) was clinically confirmed to have a number of epidermal abrasions, crusts and erosions, which were remnants of blisters (data from interview), placed bilaterally on the mandible, nasal plane and on the external and internal surface of the auricles. Scrapes for bacteriological and mycological testing were taken from the altered sites and thin needle biopsy for histological examination was performed. Histological examination revealed acantholytic changes in the spinal zone of the epidermis. The direct immunofluorescence test revealed the presence of an IgG group of auto antibodies in the intercellular space of this zone. Bacteriological and mycological tests did not indicate the presence of pathogenic bacteria and fungi. The results of the study indicate that thin needle biopsy is a useful method for diagnosing bullous disease in dogs.

Keywords: bullous disease, dog, skin biopsy, histological examination, direct immunofluorescence

Choroby pęcherzowe należą do dermatoz o podłożu autoimmunologicznym, klinicznie charakteryzujących się występowaniem na skórze oraz rzadziej na błonach śluzowych wykwitów o charakterze pęcherzy oraz histologicznie utratą połączeń międzykomórkowych (akanтолiza). Najczęściej notowaną postacią kliniczną jest pęcherzyca liściasta (*pemphigus foliaceus*) oraz pęcherzyca rumieniowata (*pemphigus erythematosus*), opisywana jako stadium początkowe pęcherzycy liściastej o łagodniejszym przebiegu bądź postać mieszana pęcherzycy i tocznia rumieniowatego (*lupus erythematosus*). Ostry przebieg charakteryzuje powszechnie spotykaną u ludzi pęcherzycę zwykłą (*pemphigus vulgaris*), natomiast pęcherzyca bujająca (*pemphigus vegetans*) reprezentuje prawdopodobnie łagodną postać pęcherzycy liściastej. U psów opisywana jest głównie pęcherzyca liściasta. Znacznie rzadziej występuje pęcherzyca zwykła, zaś pęcherzyca bujająca nie jest praktycznie spotykana (4, 14).

Patogeneza chorób pęcherzowych i powiązanych z nimi mechanizmów autoimmunologicznych dotyczy antygenów zlokalizowanych na powierzchni keratynocytów, względnie w strukturach glikoproteinowych desmosomów, przeciwko którym wytwarzane są wykrywalne we krwi autoprzeciwciała, tzw. przeciwciała *pemphigus*. Zmiany kliniczne oraz ich nasilenie uwarunkowane są lokalizacją powstających kompleksów immunologicznych oraz budową molekularną antygeny. Choroby skóry o podłożu autoimmunologicznym, mimo że występują sporadycznie, stanowią istotny problem

z punktu widzenia praktycznego, w związku z koniecznością podjęcia w takich przypadkach zwykle długotrwałego leczenia środkami działającymi immunosupresyjnie. Specyfika terapii, odmiennej niż w powszechnie występujących schorzeniach skóry, narzuca konieczność dokładnego różnicowania chorób pęcherzowych z ropowicą (*pyoderma*) oraz zapaleniem mieszków włosowych (*folliculitis*) pochodzenia bakteryjnego, zmianami skórnymi wywołanymi przez dermatofity oraz martwicowym, powierzchniowym zapaleniem skóry (superficial necrolytic dermatitis) (13). Nawet typowe zmiany kliniczne mogą być mylące, stąd przy podejrzewaniu choroby pęcherzowej wskazane jest badanie histopatologiczne bioptatów skórnych, ewentualnie dodatkowo badania serologiczne (7). Biopsja skórna i badanie histologiczne bioptatu jest prostą i wysoce czułą metodą diagnostyczną, która nawet z pominięciem diagnostyki serologicznej pozwala na potwierdzenie wcześniejszego rozpoznania (11).

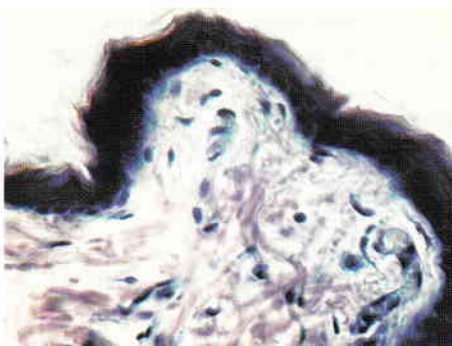
Celem badań było określenie przydatności biopsji skórnej w diagnostyce przyczynowej chorób pęcherzowych psów.

Materiał i metody

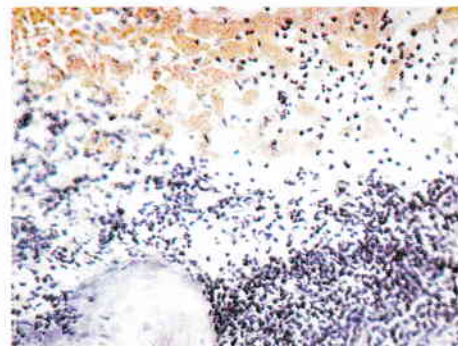
U psa (samiec, 7 lat, owczarek niemiecki) stwierdzono badaniem klinicznym rozległe zmiany skórne, umiejscowione obustronnie w okolicy żuchwy, na lusterku nosowym oraz zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni małżowin usznych. Zmiany miały charakter licznych ubytków naskórka, będących pozostałością po występujących wcześniej pęcherzach



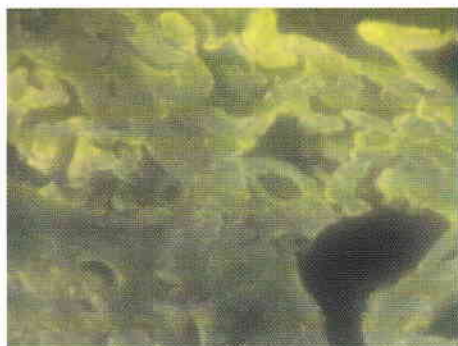
Ryc. 1. Zmiany akantolityczne w strefie kolczystej naskórka. Wyraźnie widoczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych. May-Grünwald-Giemza



Ryc. 2. Skóra zdrowa. May-Grünwald-Giemza



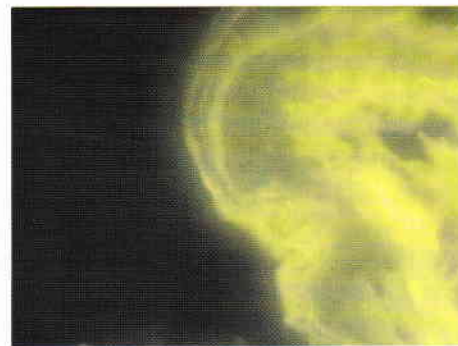
Ryc. 3. Naciek komórkowy w skórze właściwej; widoczne liczne naczynia krwionośne, wokół których obecne są pojedyncze leukocyty. H i E



Ryc. 4. Immunofluorescencja bezpośrednia – skóra zmieniona; słaba fluorescencja w poszerzonych przestrzeniach międzykomórkowych



Ryc. 5. Immunofluorescencja bezpośrednia – skóra zmieniona; świecenie w przestrzeniach pomiędzy komórkami warstwy kolczystej



Ryc. 6. Immunofluorescencja bezpośrednia – skóra zdrowa; brak świecenia w naskórku

(dane z wywiadu), miejscami przyjmując charakter wysiękowy. Nie zaobserwowano zmian na błonie śluzowej jamy ustnej ani zmian skórnych w innych miejscach. Do momentu zgłoszenia się na badania pies był leczony w kierunku grzybicy. Stosowano środki o działaniu miejscowym (Rivanol, Pyoktanina, Imaverol) oraz ogólnie Ketokonazol w dawce 0,2 g 1 × dziennie przez 3 tygodnie. Jednokrotnie podano w postaci iniekcji podskórnej Opticortenol w dawce 2 ml, celem zahamowania świądu. Mimo czterotygodniowej terapii nie uzyskano zadowalającej poprawy.

Charakter zmian skórnych oraz brak poprawy po leczeniu (ustąpił jedynie przejściowy świąd) nasunęły podejrzenie pęcherzycy. W terminie ok. 3 tygodni po odstawieniu środków terapeutycznych od psa pobrano materiał do badań bakteriologicznych, mikologicznych, histologicznych oraz w kierunku wykazania obecności związków *in vivo* autoprzeciwciał. Z miejsc zmienionych pobrano zeszkobiny, celem wykonania badań bakteriologicznych i mikologicznych. Materiał posiewano na podłoże Sabourauda, McConkeya oraz bulion odżywczy i agar z dodatkiem krwi.

Biopsjaty pobrano ze skóry psa zdrowego (kontrola) oraz bezpośrednio z miejsc zmienionych psa chorego, a następnie utrwalono w 4% zbuforowanej formalinie, odwodniono i zatopiono w parafinie. Do mikroskopii świetlnej skrawki o grubości 6 μm barwiono metodą May-Grünwald-Giemza oraz H i E. Do testu immunofluorescencji bezpośredniej skrawki po odparafinowaniu oraz nawodnieniu trawiono 0,1% trypsyną, wg metodyki podanej przez Olivry i wsp. (10). W celu wykazania obecności przeciwciał klasy IgG typu pemphigus, zastosowano koniugat zawierający przeciwciała poliklonalne

swoiste dla łańcucha ciężkiego i lekkiego psich IgG, znakowane FITC (Canine IgG FITC antiglobulin Conjugate, VMRD, Pullman, USA). Preparaty z koniugatem inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę, płukano w buforowanym roztworze soli z dodatkiem albuminy bydlęcej (PBS-1% BSA, pH 7,2), a następnie oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon E-400 przy długości fali 450-490 nm.

Wyniki i omówienie

Badania bakteriologiczne oraz mikologiczne nie wykazały obecności patogennej flory bakteryjnej ani grzybów chorobotwórczych.

Badaniem histologicznym zmiany morfologiczne stwierdzono w strefie przypodstawnej naskórka. W strefie tej komórki warstwy kolczystej były powiększone, miały kształt owalny, z relatywnie zwiększoną przestrzenią międzykomórkową. Stwierdzono brak widocznych połączeń pomiędzy komórkami, warunkujących spójność tej warstwy (ryc. 1). W preparatach barwionych metodą May-Grünwalda-Giemzy notowano specyficzne, ciemnoniebieskie wybarwienie cytoplazmy w obszarze przylegającym do błony komórkowej. Zjawiska tego nie odnotowano w preparatach ze skóry zdrowej (ryc. 2). W warstwie właściwej skóry stwierdzono nacieki komórek zapalnych, wśród których obserwowano limfocyty, granulocyty obojętnochłonne oraz nieliczne makrofagi. Skupiska tych komórek były zlokalizowane głównie w okolicy naczyń krwionośnych, prze-

biegających w warstwach głębszych skóry właściwej (ryc. 3). Nie notowano widocznego wzrostu liczby mastocytów w porównaniu ze skórą zdrową.

Badanie w mikroskopie fluorescencyjnym wykazało świecenie w obrębie przestrzeni międzykomórkowych warstwy kolczystej naskórka. Akantoliza wyrażała się poszerzeniem przestrzeni międzykomórkowych, w których świecenie uwarunkowane było obecnością kompleksów, utworzonych z autoprzeciwciał i struktur desmosomalnych (ryc. 4). Miejscami fluorescencja występowała w niezmiennych przestrzeniach międzykomórkowych, co sugerować mogło zapoczątkowanie w tych miejscach procesów akantolitycznych (ryc. 5). Nie wykazano świecenia w preparatach wykonanych ze skóry zdrowej (ryc. 6).

W praktyce weterynaryjnej diagnoza chorób pęcherzowych opiera się najczęściej o wywiad, badanie kliniczne oraz remisję objawów po zastosowanym leczeniu. Choroba pojawia się u psów zwykle około czwartego roku życia. Zwiększoną zapadalność stwierdzono u ras takich, jak: bearded collie, collie, akita, doberman pinscher, nowofundland i owczarek niemiecki. Zmiany kliniczne obejmują zwykle okolice uszu i pyska, rozszerzając się niekiedy na łapy i dalsze obszary ciała. Oprócz pęcherzy występować mogą owrzodzenia i wyprysk. Typowa dla chorób pęcherzowych jest również depigmentacja lusterka nosowego, choć towarzyszy ona też bielactwu i toczniowi rumieniowatemu w jego przebiegu ogniskowym. Podejrzenie pęcherzycy nasuwa także występowanie zależnego od stopnia rozluźnienia połączeń międzykomórkowych tzw. objawu Nikolskiego – spęlanie naskórka przy pocieraniu skóry (4, 13). Klinicznie zmiany występują zarówno na skórze, jak i błonach śluzowych, u psów jednak nadżerki na błonach śluzowych, poprzedzające zwykle zmiany skórne, mogą być przez właścicieli niezauważone. Notowano również pęcherzycę zwykłą, której nie towarzyszyły zmiany na błonach śluzowych (12). Zmiany skórne obserwowane u psa w niniejszym przypadku mogły sugerować pęcherzycę i korespondowały ze zmianami tła immunologicznego, co jednak nie uchroniło przed błędną wstępną diagnozą i podjęciem niewłaściwego leczenia. Nietypowy dla chorób skóry o podłożu immunologicznym objaw, jakim jest notowany w innych schorzeniach skóry świąd, miał u badanego psa charakter przejściowy i mógł być związany z powikłaniem dermatofitami, zlikwidowanym terapią przeciwgrzybiczą. Przeoczenie zmian wskazujących na pęcherzycę potwierdza konieczność uwzględniania tej choroby w diagnozie różnicowej chorób skóry oraz potwierdzenia diagnozy przy zastosowaniu dodatkowych metod (3).

Podstawę diagnozy chorób pęcherzowych ludzi stanowią badania histopatologiczne oraz serologiczne. Ograniczone możliwości zastosowania w praktyce lekarsko-weterynaryjnej proponowanej diagnostyki serologicznej sprawiają, że praktyczne i decydujące znaczenie w rozpoznawaniu chorób pęcherzowych psów

ma, jak się wydaje, cienkoigłowa biopsja aspiracyjna skóry i badanie histologiczne. Wspólną cechą chorób pęcherzowych jest występowanie akantolizy. W pęcherzycy zwykłej dotyczy ona głębokich warstw naskórka, ponad warstwą podstawną. W pęcherzycy liściastej zmiany występują w górnych warstwach naskórka, znajdujących się pod warstwą rogową. Widoczne w preparatach histologicznych okrągłe, duże komórki akantolityczne wybarwiają się charakterystycznie metodą May-Grünwalda-Giemzy, z ciemnoniebieskim pierścieniem obwodowej cytoplazmy (4). Według Wernera i wsp. (15) ocena histopatologiczna w chorobach autoimmunologicznych manifestujących się zmianami skórnymi w ok. 80% przypadków pozwala na potwierdzenie rozpoznania. Charakter zmian, jakie wykazano badaniem histologicznym w opisywanym przypadku ściśle odpowiada zmianom obserwowanym w chorobach pęcherzowych. Obraz histologiczny był typowy dla komórek podlegających procesom akantolitycznym. Konsekwencją tych procesów jest rozwarstwienie i oddzielanie się warstw naskórka, co prowadzi do powstania pęcherzy, jakie obserwowano klinicznie w opisywanym przypadku (dane z wywiadu). Lokalizacja zmian sugeruje pęcherzycę zwykłą, w której akantoliza tworzy się głęboko, ponad warstwą podstawną.

Mimo wielu badań dotyczących patogenezy chorób pęcherzowych nie udało się ustalić przyczyny uruchomienia mechanizmów immunologicznych w ich przebiegu. Przyjmuje się, iż struktura skóry wydaje się miejscami „starsza”, co może stymulować układ odpornościowy, odpowiedzialny za eliminację elementów rozpoznawanych jako obce. Pewną rolę mogą również odgrywać zakażenia wirusowe, bakteryjne oraz uszkodzenia skóry pod wpływem promieni słonecznych. Czynniki inicjującymi proces chorobowy mogą być niektóre leki (penicylamina i jej pochodne, kaptopryl, butapirazol) (4). Występowanie pęcherzyc polekowych u zwierząt nie zostało, jak dotąd, wyjaśnione. Sporadycznie notuje się u psów także zmiany o charakterze nowotworowym, w obrębie narządów jamy brzusznej, określane u ludzi jako pęcherzyca paraneoplastyczna (4, 13).

U ludzi w dermatozach pęcherzowych akantolitycznych autoprzeciwciała skierowane są przeciwko cząstkom adhezyjnym z rodziny kadheryn, stabilizującym warstwę kolczystą. Antygenem dla *pemphigus vulgaris* jest polipeptyd o m.c. 130 kDa, należący do podtypu kadheryn – Dsg 1, która produkowana jest jedynie w nabłonku kolczystym (4, 6). Amagai i wsp. (1) wykazali, że w przypadku pęcherzyc występujących u ludzi przeciwciała skierowane są przeciwko desmogleinie-3 (Dsg-3) lub równolegle, desmogleinie 3 (Dsg-3) i 1 (Dsg-1). Notowano także występowanie przeciwciał przeciwko desmoplakinie i desmokolinie (6, 9). Odzwierciedleniem powyższego powinowactwa jest rozprzestrzenienie procesu chorobowego na błony śluzowe (Dsg-3) lub śluzówki i skórę (Dsg-3 i 1), w zależności od występowania i ekspresji receptorów (1).

Receptorem dla pojawiających się w krążeniu przeciwciał typu *pemphigus* u psów jest desmogleina-3, antygen powierzchniowy keratynocytów o masie cząsteczkowej 130 kDa oraz odpowiednik ludzkiej Dsg-1 o masie cząsteczkowej 160 kDa (10). Utrata połączeń międzykomórkowych zachodzi w przypadkowych warstwach naskórka (2).

Obecność autoprzeciwciał pozwala na zastosowanie testów antyglobulinowych w diagnostyce chorób pęcherzowych. Najczęściej stosowane są metody immunohistochemiczne (test immunoperoksydazowy) oraz metoda fluorescencji bezpośredniej i pośredniej (6, 10). Autoprzeciwciała wykrywano również techniką blottingową z użyciem lizatu białkowego, otrzymanego z hodowli komórkowej keratynocytów nabłonka jamy ustnej (10). U ludzi testem pozwalającym na jednoczesne diagnozowanie chorób pęcherzowych i różnicowanie pomiędzy pęcherzycą liściastą a zwykłą jest test ELISA, opracowany w oparciu o rekombinanty desmogleiny typu 1 i 3 (Dsg 1 i 3) (5, 8).

Metoda immunofluorescencji bezpośredniej z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał znakowanych izotiocjanianem fluoresceiny (FITC), skierowanych przeciwko psim immunoglobulinom IgG, IgA oraz IgM, pozwala na wykrycie w biopsjach skórnych autoprzeciwciał związanych z błoną keratynocytów. Obecność tych przeciwciał stwierdzano pomiędzy keratynocytami warstwy podstawnej, kolczystej i ziarnistej, nie wykryto ich natomiast w warstwie komórek rogowaciejących (10). Autoprzeciwciała *pemphigus* krążące w surowicy, wiążące się ze strukturami powierzchniowymi hodowli komórkowych keratynocytów błony śluzowej jamy ustnej oraz dziąseł, wykazano metodą immunofluorescencji pośredniej. Miana przeciwciał klasy IgG wahały się od 1 : 50 do 1 : 1000. Najbardziej wyraźna fluorescencja, sugerująca lokalizację związanych antygenów, dotyczyła warstwy komórek kolczystych (*stratum spinosum*). W badaniach własnych metodą fluorescencji bezpośredniej również stwierdzono świecenie przestrzeni w warstwie kolczystej naskórka świadczące o obecności autoprzeciwciał. Badanie ograniczono do autoprzeciwciał klasy IgG, gdyż w porównaniu z klasą IgM oraz IgA ich wykrycie jest bardziej prawdopodobne (10).

Schmeitzel i wsp. (11) ocenili przydatność badania histologicznego jako wystarczającą w diagnostyce chorób autoimmunologicznych skóry bez konieczności stosowania innych metod. W stosowanej celem weryfikacji oceny histologicznej metodzie immunofluorescencji bezpośredniej należy liczyć się z możliwością wystąpienia wyników fałszywie ujemnych, m.in. w związku z lokalizacją procesu patologicznego (14, 15). Badania mające na celu wykrycie autoprzeciwciał należałoby traktować zatem raczej jako uzupełnienie badania histologicznego niż jako samodzielne i jedyne badanie w przypadku chorób pęcherzowych. W badaniach własnych uzyskanie wyniku dodatniego w badaniu fluorescencyjnym stanowiło dodatkowe potwierdzenie rozpo-

znania, jednak charakterystyczne zmiany histologiczne były wystarczające do postawienia diagnozy, w korelacji z obserwowanymi objawami i wykluczeniem innych schorzeń skórnych.

Wobec powszechnych w dermatologii psów schorzeń o podłożu alergicznym, zakaźnym, pasożytniczym czy nawet nowotworowym, choroby tła autoimmunologicznego, w tym pęcherzyce, mają znaczenie marginalne. Niemniej, nawet sporadyczne ich występowanie nie upoważnia do bagatelizowania niektórych mniej lub bardziej typowych zmian skórnych, zwłaszcza ze względu na specyficzną terapię chorób pęcherzowych. Wyniki badań własnych na przykładzie omawianego przypadku wskazują, że niektóre przypadki pęcherzyc psów pozostają nierozpoznane, a jednocześnie potwierdzają celowość i wysoką przydatność wykonania biopsji cienkoigłowej w diagnostyce dermatologicznej u psów.

Charakter chorób pęcherzowych narzuca konieczność zastosowania środków, które „wyciszają” układ immunologiczny. Lekiem z wyboru są kortykosteroidy. Niekiedy łączy się je z lekami immunosupresyjnymi. Terapię uzupełniającą stanowią stosowane miejscowo preparaty aerozolowe z kortykosteroidami i antybiotykami bądź środkami odkażającymi (4, 13). Problemem napotykanym w trakcie leczenia są dołączające się wtórne infekcje bakteryjne i grzybicze. Długotrwałe podawanie kortykosteroidów, wymaga również monitorowania pacjenta i okresowych badań hematologicznych.

Piśmiennictwo

1. Amagai M., Tsunoda K., Zillikens D., Nagai T., Nishikawa T.: The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1999, 40, 167-170.
2. Cotell S., Robinson N. D., Chan L. S.: Autoimmune blistering skin diseases. *Am. Emerg. Med.* 2000, 18, 288-299.
3. Halliwell R. E., Gorman N. T.: Autoimmune and other immune-mediated skin diseases. [w:] *Veterinary Clinical Immunology*, Saunders W. B., Philadelphia 1989.
4. Jabłońska S., Chorzeński T.: Choroby skóry dla studentów medycyny i lekarzy. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1994.
5. Lenz P., Amagai M., Volc-Platzer B., Stingl G., Kirnbauer R.: Desmoglein 3-ELISA; a pemphigus vulgaris – specific diagnostic tool. *Arch. Dermatol.* 1999, 135, 143-148.
6. Moll R., Moll I.: Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.* 1998, 432, 487-504.
7. Muller G. H., Kirk R. W., Scott D. W.: *Immunologic diseases*, [w:] *Small Animal Dermatology*. Saunders W. B., Philadelphia 1989.
8. Nishikawa T.: Desmoglein ELISAs: a novel diagnostic tool for pemphigus. *Arch. Dermatol.* 1999, 135, 195-196.
9. Olivry T., Alhaidari Z., Ghohestani R. F.: Anti-plakin and desmoglein auto-antibodies in a dog with pemphigus vulgaris. *Vet. Parasitol.* 2000, 37, 496-499.
10. Olivry T., Joubert S., Dunston S., Nishiyama T., Ghohestani R. F.: Desmoglein-3 is a target autoantigen in spontaneous canine pemphigus vulgaris. *Exp. Dermatol.* 2003, 12, 198-203.
11. Schmeitzel L. P.: Recognizing the cutaneous signs of immune-mediated diseases. *Vet. Med.* 1991, 86, 138-163.
12. Scott D. W., Manning T. O., Smith C. A., Lewis R. M.: Pemphigus vulgaris without mucosal or mucocutaneous involvement in two dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assn.* 1982, 18, 401-404.
13. Tilley L. P., Smith F. W. K.: [w:] *5 Minute Veterinary Consult: Canine and Feline*. Lippincott Williams & Wilkins, London 1999.
14. Tizard I.: *Autoimmunity: specific diseases*, [w:] *Veterinary Immunology*. Saunders W. B., Philadelphia 1987.
15. Werner L. L., Brown K. A., Halliwell R. E.: Diagnosis of autoimmune skin disease in dog: correlation between histopathologic, direct immunofluorescent and clinical findings. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1983, 5, 47-64.