БУЛЛЕЗНЫЕ ДЕРМАТОЗЫ: ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Колос Ю.В., Лукьянов А.М.

Белорусский государственный медицинский университет

Цель: оценить степень расхождения клинических и серологических диагнозов у пациентов с аутоиммунными буллезными дерматозами на основании результатов иммуноферментного анализа

Материал и методы: на основании клинических, цитологических, патоморфологических критериев были отобраны 56 пациентов с диагнозом аутоиммунного буллезного дерматоза (АБД). Иммуноферментный анализ проводили с сыворотками данных пациентов с использованием коммерческих тест-систем Euroimmun, содержащих рекомбинантные антигены к десмоглеину 1, десмоглеину 3, энвоплакину, BP180, BP230, тканевой трансглютаминазе, глиадину.

Степень тяжести течения акантолитической пузырчатки определяли с помощью индекса PDAI (индекса площади поражения при пузырчатке). Анализ ассоциации индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 и ДСГ1 у пациентов с пузырчаткой проводили с использованием непараметрического метода корреляционного анализа Спирмена.

Результаты: Был получен молекулярный спектр аутоантител у пациентов с акантолитической пузырчаткой, буллезным пемфигоидом, герпетиформным дерматозом Дюринга. Клинический диагноз акантолитической пузырчатки был подтвержден серологически только в 83,7% случаев, в том числе в 15,6% случаев диагностировалась паранеопластическая пузырчатка, в 12,5 % случаев наблюдалось сочетание вульгарной пузырчатки и буллезного пемфигоида. Клинический диагноз буллезного пемфигоида был подтвержден серологически в 80% случаев. Наибольшие противоречия между клиническим и серологическим диагнозом наблюдались у пациентов с герпетиформным дерматозом Дюринга: клинический диагноз был подтвержден результатами ИФА только в 42,9 % случаев, в 28,6% случаев был диагностирован буллезный пемфигоид, в 14,3 % случаев молекулярный спектр аутоантител свидетельствовал в пользу паранеопластической пузырчатки.

В 16% исследованных сывороток аутоантитела к таргетным для аутоиммунных буллезных дерматозов антигенам выявлены не были, что требовало дальнейшего диагностического поиска.

Анализ ассоциации индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 и ДСГ1 у пациентов с пузырчаткой выявил прямую сильную статистически значимую корреляционную связь индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 (ρ=0,78, p=0,000003), то есть при возрастании значений индекса PDAI наблюдалось возрастание концентраций аутоантител к ДСГ3, а также прямую средней силы статистически значимую корреляционную связь индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ1 (ρ=0,42, p=0,034124), то есть при возрастании значений индекса PDAI наблюдалось возрастание концентраций аутоантител к ДСГ1.

Выводы: По результатам ИФА гипердиагностика акантолитической пузырчатки составила 16,3%, буллезного пемфигоида - 20%, герпетиформного дерматоза Дюринга – 57,1%.

Иммунологические методики должны быть обязательным этапом верификации диагноза аутоиммунного буллезного дерматоза.

Метод ИФА с использованием рекомбинантных антигенов может быть рекомендован для практической медицины для диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов, так как является высокочувствительным (до 100%) и специфичным (до 99,6%), быстрым методом, а также исключает субъективный фактор, связанный с визуальной оценкой результатов, как в случае с нРИФ.

Концентрации аутоантител к ДСГ 3 и ДСГ1 у пациентов с акантолитической пузырчаткой достоверно коррелируют со степенью тяжести течения заболевания и могут использоваться как прогностический фактор.

Ключевые слова: аутоиммунные буллезные дерматозы, иммуноферментный анализ, расхождение диагнозов.

Abstract: Blood serum of 56 patients with autoimmune bullous dermatosis was tested by ELISA to assess the degree of divergence of clinical and serological diagnosis. Criteria for the clinical diagnosis were clinical data, anamnesis, the results of cytological examination for acantholytic cells (Tzank preparation), histological examination with hematoxilin-eosing staining (in 14 cases). Clinical diagnosis of acantholytic pemphigus was confirmed by ELISA in 83,7% cases, bullous pemphigoid – in 80% cases, dermatitis herpetiformis – in 42,9% cases. The diagnosis of autoimmune bullous dermatosis was not confirmed serologically in 16% cases.

In summary, overdiagnosis of pemphigus have reached 16,3%, bullous pemphigoid – 20%, dermatitis herpetiformis – 57,1%. Immunological techniques should be an obligatory stage in diagnosis of autoimmune bullous dermatosis. ELISA using recombinant antigens can be recommended for practical medicine for the diagnosis of autoimmune bullous dermatosis, because it is highly sensitive and specific method, and it eliminates the subjective factor associated with visual assessment of results as in case of indirect immunofluorescence.

Аутоиммунные буллезные дерматозы (АБД) характеризуются выработкой аутоантител к определенным молекулам адгезии кожи, что приводит к потере межклеточных контактов и появлению пузырного синдрома на коже и/или слизистых оболочках [1-11].

Основные антигены и аутоантитела при различных формах аутоиммунных буллезных дерматозов представлены в таблице 1 [2,3,7,12-14].

Таблица 1. Антигены и аутоантитела при различных формах аутоиммунных буллезных дерматозов

Заболевание	**Ауто-антитела**	**Антигены**	**Локализация антигенов**
Вульгарная пузырчатка	IgG	**Десмоглеин 3, Десмоглеин 1*** Десмоглеин 4, Плакоглобин Е-кадгерин, α9ацетилхолин-рецептор, пемфаксин	Десмосомы
Листовидная пузырчатка	IgG	**Десмоглеин 1** плакоглобин	Десмосомы
Паранеопластическая пузырчатка	IgG	**Десмоглеин 3**, **Энвоплакин Периплакин,** Десмоглеин 1, Десмоплакин 1 и 2, Плектин, 170кДа антиген, BP230 γ-катенин / плакоглобин	Десмосомы или полудесмосомы
IgA-пузырчатка	IgA	Десмоколлин 1 Десмоглеин 1 Десмоглеин 3	Десмосомы
Лекарственно-индуцированная пузырчатка	IgG	Десмоглеин 3 Десмоглеин 1	Десмосомы

Буллезный пемфигоид	IgG	**BPAG2 (BP180)** BPAG1 (BP230)	Полудесмосомы
Рубцующий пемфигоид	IgG IgA	**BPAG2 (BP180)** BPAG1 (BP230) **Ламинин 332** ламинин 311 ά6β4интегрин Коллаген VII типа	Полудесмосомы Светлая пластинка базальной мембраны Плотная пластинка базальной мембраны
Герпетиформный дерматоз Дюринга	IgA	Тканевая / эпидермальная трансглютаминаза	Верхние слои дермы
Герпес беременных	IgG	**BPAG2 (BP180)** BPAG1 (BP230)	Полудесмосомы
Приобретенный буллезный эпидермолиз	IgG	**Коллаген VII типа**	Плотная пластинка базальной мембраны
Линейный IgA-буллезный дерматоз	IgA	**LAD-1** BPAG1 (BP230) Коллаген VII типа	Полудесмосомы Плотная пластинка базальной мембраны
Буллезная форма системной красной волчанки	IgG IgA	**Коллаген VII типа**	Плотная пластинка базальной мембраны

Примечание. Выделены основные антигены.

Данные аутоантитела, фиксированные в определенных антигенных структурах кожи пациента могут быть обнаружены с помощью:

- Прямой реакции иммунофлюоресценции с криосрезами биоптатов кожи (является методом «золотого» стандарта диагностики АБД) [15,16];
- Прямой реакции иммунофлюоресценции с волосом пациента (в случае вульгарной пузырчатки) [17,18];

- Иммуногистохимической окраски парафиновых срезов биоптатов кожи [19].

Серологические методы, такие как непрямая реакция иммунофлюоресценции (нРИФ), иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA), иммуноблоттинг, реакция иммунопреципитации, выявляют аутоантитела к таргетным антигенам в сыворотке крове пациента [7, 12,13,20-25].

При постановке ИФА (непрямой метод) пластины с нанесенными антигенами инкубируют с исследуемой сывороткой, после чего добавляют антииммуноглобулиновую сыворотку, меченную ферментом, затем субстрат. Результаты учитывают по изменению цвета субстрата [26,27].

В случае акантолитической пузырчатки в качестве антигенного субстрата для ИФА возможно использование нормальной человеческой кожи (чувствительность – 83%) и пищевода обезьян (чувствительность – 90%). При совместном использовании двух субстратов чувствительность возрастает [28].

В настоящее время доступны коммерческие ИФА тест-системы, содержащие широкий набор рекомбинантных антигенов высокой степени очистки. Это обуславливает высокую чувствительность (до 96-100%) и специфичность (до 98-100%) данного теста. Также метод ИФА является достаточно быстрым и исключает субъективный фактор, связанный с визуальной оценкой результатов, как в случае с нРИФ [29-35].

Концентрации аутоантител к десмоглеину 1 (ДСГ1) и десмоглеину 3 (ДСГ3) в случае акантолитической пузырчатки и к антигену BP180 в случае буллезного пемфигоида коррелируют со степенью тяжести течения заболевания и могут использоваться как прогностический фактор, а также для мониторинга ответа на терапию [30-41].

Целью настоящего исследования явилась оценка степени расхождения клинических и серологических диагнозов у пациентов с аутоиммунными буллезными дерматозами на основании результатов ИФА.

Материал и методы: В качестве материала для исследования использовали 56 сывороток пациентов с аутоиммунными буллезными дерматозами со следующими клиническими диагнозами (по МКБ - 10):

- L10.0 Вульгарная пузырчатка (n=32);
- L10.1 Вегетирующая пузырчатка (n=3);
- L10.2 Листовидная пузырчатка (n=2);
- L12.0 Буллезный пемфигоид (n=5);
- L 13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга (n=14).

Контролем служили сыворотки здоровых доноров (n=15), а также сыворотки пациентов с хронической доброкачественной семейной пузырчаткой Хейли-Хейли (n=3).

Клинический диагноз выставляли на основании данных анамнеза, осмотра пациентов (в том числе определения симптомов Никольского и Асбо-Хансена), анализа содержимого пузырей и мазков-отпечатков на акантолитические клетки (метод Тцанка). В 14 случаях диагноз подтверждался гистологически.

Для оценки степени тяжести течения вульгарной пузырчатки использовали индекс PDAI (индекс площади поражения при пузырчатке).

Иммуноферментный анализ проводили с использованием тест-систем компании Euroimmun (Германия). Назначение данных тест-систем, а также чувствительность и специфичность (по данным производителя) представлена в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика тест - систем ИФА.

Название тест-системы	**Назначение**	**Чувствитель-ность**	**Специфич-ность**
Euroimmun Anti-Desmoglein 1 ELISA (Ig G)	Выявляет аутоантитела к десмоглеину 1	96,1%	99,1%
Euroimmun Anti-Desmoglein 3 ELISA (Ig G)	Выявляет аутоантитела к десмоглеину 3	100%	99,6%
Euroimmun Anti-Envoplakin ELISA (Ig G)	Выявляет аутоантитела к энвоплакину	85,7%	98%
Euroimmun Anti-BP 180 - 4X ELISA (Ig G)	Выявляет аутоантител к антигену буллезного пемфигоида 2 (BP180)	89,9%	97,9%
Euroimmun Anti-BP 230 ELISA (Ig G)	Выявляет аутоантитела к антигену буллезного пемфигоида 1 (BP230)	56,8%	97,4%
Euroimmun Anti-Tissue Transglutaminase ELISA (IgA)	Выявляет аутоантитела к тканевой трансглютаминазе	95,7%	98,0%

Euroimmun Anti-Gliadin (CAF-3X) ELISA (Ig A)	Выявляет аутоантитела к дезаминированным пептидам из глиадина	82,3%	95,9%

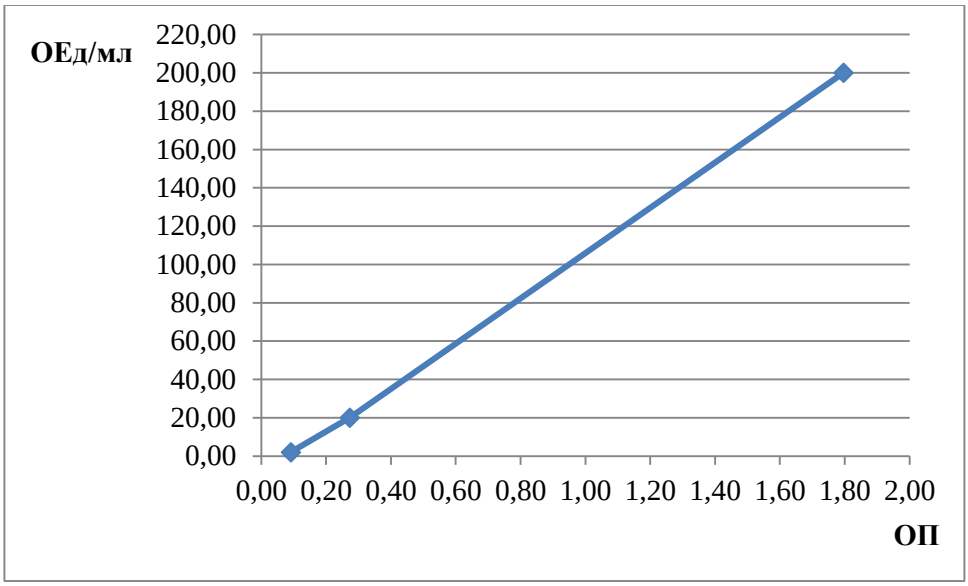
В состав данных тест-систем ИФА входили 12 (6) восьмилуночных стрипов, покрытых рекомбинантным антигенным субстратом, а также ряд вспомогательных компонентов, необходимых для постановки ИФА: положительный и отрицательный контроли, калибраторы (3 штуки), ферментативный конъюгат анти-IgA или анти-IgG, буфер для разведения образцов, промывочный буфер (10х концентрат), раствор хромоген/субстрат, стоп-реагент, инструкция по применению.

Для постановки ИФА в отдельные лунки планшета вносили в соответствии с инструкцией по 100 мкл калибраторов, положительного и отрицательного контролей, разведенных образцов сыворотки крови. Инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Удаляли содержимое лунок, затем последовательно промывали все лунки 3 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. Далее вносили в лунки планшета по 100 мкл конъюгата фермента (меченных пероксидазой антител к IgG или IgA человека). Инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Промывали, как описано выше. Вносили в лунки планшета по 100 мкл раствора хромоген/субстрат. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут (предохраняя от воздействия прямых солнечных лучей). Далее вносили в лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, как и раствор хромоген/субстрат.

С помощью планшетного спектрофотометра BioTek ELx800 измеряли интенсивность окрашивания (оптическую плотность) в лунках при длине волны 450 нм.

Концентрации аутоантител в сыворотках пациентов с АБД (в ОЕ/мл) определяли путем построения калибровочных графиков с использованием полученных значений оптической плотности калибраторов, входящих в состав тест-систем (пример – рисунок 1).

Рисунок 1. Калибровочный график зависимости концентрации аутоантител к десмоглеину 3 (ОЕд/мл) в сыворотках пациентов с АБД от оптической плотности



Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0 и Microsoft Office Excel 2010.

Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Анализ ассоциации индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 и ДСГ1 у пациентов с вульгарной пузырчаткой проводили с использованием непараметрического метода корреляционного анализа Спирмена.

Результаты и обсуждение: По результатам ИФА был получен молекулярный спектр аутоантител у пациентов с акантолитической пузырчаткой (таблица 3).

Таблица 3. Молекулярный спектр аутоантител у пациентов с диагнозом акантолитической пузырчатки.

Клинический диагноз	**Молекулярный спектр аутоантител**	**Серологический диагноз**	**% случаев**
Вульгарная пузырчатка (n=32)	ДСГ3	Вульгарная пузырчатка	28,1%
	ДСГ1 и ДСГ3	Вульгарная пузырчатка	25%
	Энвоплакин + ДСГ3 и/или ДСГ1 + BP 230 и/или BP180	Паранеопластическая пузырчатка	15,6%
	ДСГ3 и/или ДСГ1+	Вульгарная	12,5%

	BP180 и/или BP230	пузырчатка+Буллезный пемфигоид	
	АутоАт не обнаружены	?	18,8%
Вегетирующая пузырчатка (n=3)	ДСГ1 и ДСГ3	Вегетирующая пузырчатка	100%
Листовидная пузырчатка (n=2)	ДСГ1	Листовидная пузырчатка	100%

Аутоантитела к ДСГ3 были обнаружены в 28,1% случаев (n=9) пациентов с диагнозом вульгарной пузырчатки, чаще при изолированном поражении слизистых оболочек, что серологически подтверждало данный диагноз.

Аутоантитела к ДСГ1 и ДСГ3 были выявлены в 25% случаев (n=8), чаще при сочетанном поражении слизистых оболочек и кожи, что вновь указывало на наличие у пациента пузырчатки.

В 12,5% случаев (n=4) определялись аутоантитела как к ДСГ3 и/или ДСГ1, так и к BP180 и/или BP230, что свидетельствовало в пользу присутствия двух заболеваний - пузырчатки и буллезного пемфигоида [42-44].

В 15,6% случаев (n=5) были выявлены аутоантитела к энвоплакину и ДСГ3 и/или ДСГ1, а также к BP 230 и/или BP180, что свидетельствовало в пользу паранеопластической пузырчатки и необходимости онкопоиска у данных пациентов.

В 18,8% случаев (n=6) аутоантитела к таргетным при пузырчатке антигенам ДСГ1 и ДСГ3 в диагностически значимых концентрациях обнаружены не были, что ставило под сомнение диагноз вульгарной пузырчатки и требовало дальнейшего диагностического поиска.

Вегетирующая и листовидная пузырчатка у пациентов была подтверждена серологически в 100% случаев.

Таким образом, по результатам ИФА диагноз акантолитической пузырчатки был подтвержден серологически только в 83,7% случаев.

Значения концентрации аутоантител к таргетным антигенам (ДСГ1 и ДСГ3) в позитивных сыворотках (≥ 20 ОЕд/мл) у пациентов с пузырчаткой характеризовались ненормальным распределением ($p<0,05$), медиана (Me) составила 223,06 ОЕд/мл, квартили (25%-75%) – (146,61 - 248,66) ОЕд/мл для ДСГ1 и 278,84 (88,79 - 313,11) ОЕд/мл для ДСГ3 соответственно (таблица 4).

Таблица 4. Параметры распределения концентрации аутоантител в позитивных сыворотках (≥ 20 ОЕД/мл) у пациентов с акантолитической пузырчаткой.

Аутоантитела к: (количество пациентов)	**Min-Max, ОЕд/мл**	**Me (25%-75%), ОЕд/мл**
ДСГ1 (n=16)	31,18 - 320,96	223,06 (146,61 - 248,66)
ДСГ3(n=26)	22,6 - 393,96	278,84 (88,79 - 313,11)

Анализ ассоциации индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 и ДСГ1 у пациентов с пузырчаткой выявил прямую сильную статистически значимую корреляционную связь индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ3 (ρ=0,78, p=0,000003), то есть при возрастании значений индекса PDAI наблюдалось возрастание концентраций аутоантител к ДСГ3, а также прямую средней силы статистически значимую корреляционную связь индекса PDAI с концентрацией аутоантител к ДСГ1 (ρ=0,42, p=0,034124), то есть при возрастании значений индекса PDAI наблюдалось возрастание концентраций аутоантител к ДСГ1.

Молекулярный спектр аутоантител у пациентов с диагнозом L 12.0 буллезный пемфигоид представлен в таблице 5.

Таблица 5. Молекулярный спектр аутоантител у пациентов с клиническим диагнозом L 12.0 Буллезный пемфигоид.

Клинический диагноз	**Молекулярный спектр аутоантител**	**Серологический диагноз**	**% случаев**
Буллезный пемфигоид (n=5)	BP180	Буллезный пемфигоид	40%
	BP230	Буллезный пемфигоид	20%
	BP180 + BP230	Буллезный пемфигоид	20%
	АутоАт не обнаружены	?	20%

Аутоантитела к таргетным антигенам были выявлены в 80% случаев, в том числе к:

- Антигену BP 180 (BPAG2) в 40% случаев (n=2),

- Антигену BP 230 (BPAG1) в 20% случаев (n=1),
- Антигенам BP 180 и 230 в 20% случаев (n=1), что серологически подтверждало диагноз буллезного пемфигоида.

В 20 % сывороток (n=1) аутоантитела к таргетным антигенам в диагностически значимых концентрациях не были обнаружены, что ставило под сомнение клинический диагноз и требовало дальнейшего диагностического поиска.

Наибольшие противоречия между клиническим и серологическим диагнозом наблюдались у пациентов с диагнозом L 13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга (ГДД) - таблица 6.

Таблица 6. Молекулярный спектр аутоантител у пациентов с клиническими диагнозом L 13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга.

Клинический диагноз	**Молекулярный спектр аутоантител**	**Серологический диагноз**	**% случаев**
Герпетиформный дерматоз Дюринга (n=14)	Тканевая трансглютаминаза	Герпетиформный дерматоз Дюринга	14,3%
	Глиадин	Герпетиформный дерматоз Дюринга	28,6%
	Энвоплакин + ДСГ3 и/или ДСГ1 + BP 230 + глиадин	Паранеопластическая пузырчатка	14,3%
	BP180 и/или BP230	Буллезный пемфигоид	28,6%
	АутоАТ не обнаружены	?	14,3%

Аутоантитела к таргетным для ГДД тканевой трансглютаминазе и глиадину были обнаружены только в 14,3% (n=2) и 28,6% (n=4) случаев соответственно, что серологически подтверждало данный диагноз.

В 14,3% случаев (n=2) помимо таргетных аутоантител были выявлены аутоантитела к энвоплакину, ДСГ1 и ДСГ3, BP 230, что свидетельствовало в пользу паранеопластической пузырчатки.

В 28,6 % случаев (n=4) пациентов с клиническим диагнозом ГДД определялись аутоантитела к BP 180 и/или 230, что серологически подтверждало диагноз буллезного пемфигоида, а не ГДД.

В 14,3% случаев (n=2) аутоантитела к таргетным для аутоиммунных буллезных дерматозов антигенам выявлены не были, что ставило под сомнение диагноз АБД и требовало дальнейшего диагностического поиска.

В группе контрольных сывороток аутоантитела к таргетным антигенам в диагностически значимых концентрациях (≥ 20 ОЕД/мл) выявлены не были.

Таким образом, по результатам иммуноферментного анализа распределение диагнозов у пациентов с АБД изменилось следующим образом (рисунок 2 и 3):

- Доля вульгарной пузырчатки снизилась с 57% до 30%;
- В 13% случаев были выявлены молекулярные признаки паранеопластической пузырчатки;
- В 7% случаев были обнаружены молекулярные признаки как вульгарной пузырчатки, так и буллезного пемфигоида;
- Доля буллезного пемфигоида возросла с 9% до 14%;
- Доля ГДД снизилась с 25% до 11%;
- В 16% случаев диагноз АБД не был подтвержден серологически.

Рисунок 2.

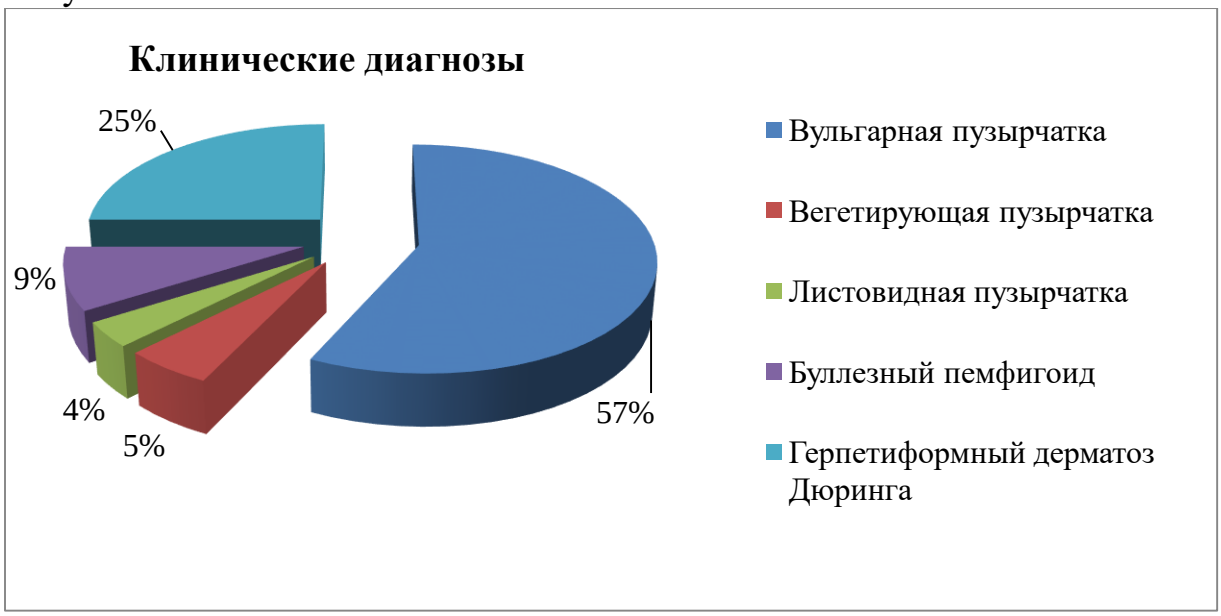
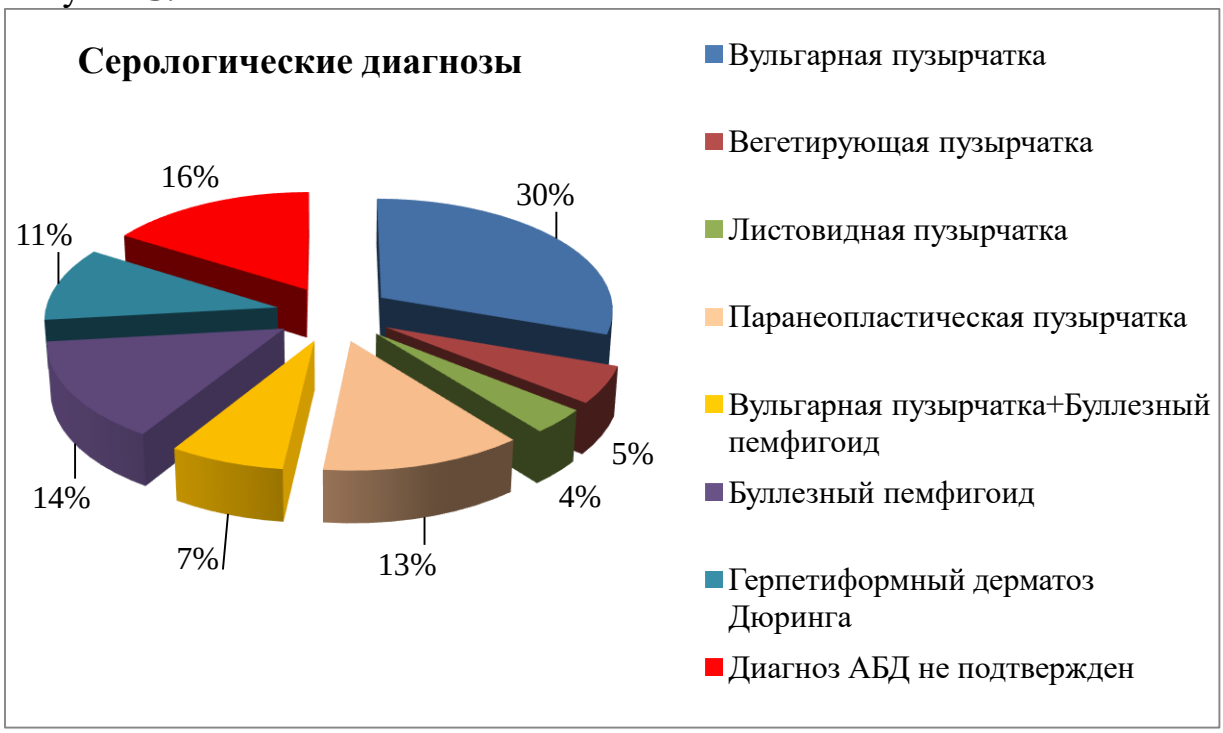


Рисунок 3.



То есть налицо тревожная ситуация гипердиагностики аутоиммунных буллезных дерматозов, когда пациенты получают иммуносупрессивную терапию с выраженными побочными эффектами, зачастую пожизненно, не по показаниям. Это требует более тщательного подхода к дифференциальной диагностике буллезных дерматозов, в том числе с использованием современных иммунологических методик.

Выводы:

1. По результатам ИФА гипердиагностика акантолитической пузырчатки составила 16,3%, буллезного пемфигоида - 20%, герпетиформного дерматоза Дюринга – 57,1%.
2. Иммунологические методики должны быть обязательным этапом верификации диагноза аутоиммунного буллезного дерматоза.
3. Метод ИФА с использованием рекомбинантных антигенов может быть рекомендован для практической медицины для диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов, так как является высокочувствительным (до 100%) и специфичным (до 99,6%), быстрым методом, а также исключает субъективный фактор, связанный с визуальной оценкой результатов, как в случае с нРИФ.
4. Концентрации аутоантител к ДСГ 3 и ДСГ1 у пациентов с вульгарной пузырчаткой достоверно коррелируют со степенью тяжести течения заболевания и могут использоваться как прогностический фактор.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лукьянов А.М. Дифференциальная диагностика пузырных дерматозов / А.М. Лукьянов, Ю.В. Колос, В.А. Малютин, М.В. Левченя, Л.П. Титов // Здравоохранение. 2011. №8. С.29-38.
2. Bolognia Dermatology 2 volume set / J.L. Bolognia [et al.]; editors: J.L. Bolognia, J.L. Jorizzo, R.P. Rapini. 2nd ed. Elsevier Limited, 2008. 2500p.
3. Rook's Textbook of Dermatology (2010) / T. Burns [et al.]; editors: T. Burns, S. Breathnach, N. Cox, C. Griffiths. 8nd ed. UK: WILEY-BLACKWELL, 2010. 4362p.
4. Fitzpatric's Dermatology in General Medicine 2 volume set. / K. Wolff [et al.]; editors: K. Wolff, R.A. Johnson, D. Suurmond. 7th ed. NY: McGraw-Hill Professional, 2007. 2402p.
5. Autoimmune Diseases of the Skin. Pathogenesis, Diagnosis, Management/ M. Hertl. 3rd ed. Springer, 2011. 469p.
6. Kneisei A., Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations / A. Kneisei, M. Hertl // JDDG. 2011. № 9. P. 844-857.
7. Kneisei A., Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy / A. Kneisei, M. Hertl // JDDG. 2011. № 9. P. 927-947.
8. Emedicine Dermatology: Pemphigus vulgaris [Electronic resource] / 2013. – Mode of access: http://emedicine.medscape.com/article/1064187-overview
9. Emedicine Dermatology: Bullous Pemphigoid [Electronic resource] / 2013. – Mode of access: http://emedicine.medscape.com/article/1062391-overview
10. Emedicine Dermatology: Dermatitis Herpetiformis [Electronic resource] / 2012. - Mode of access: http://emedicine.medscape.com/article/1062640-overview
11. Burge S.M., Wilson C.L., Dean D, Wojnarowska F. An immunohistological study of desmosomal components in pemphigus / S.M Burge, C.L. Wilson, D. Dean, F. Wojnarowska // Br. J. Dermatol. 1993. Vol. 128, P.363–370.
12. Schmidt E., Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases / E. Schmidt, D. Zillikens // Autoimmun. Rev. 2010. №10, P. 84-89.
13. Sidonia Mihai, Cassian Sitaru. Immunopatology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases / Mihai Sidonia, Sitaru Cassian // J. Cell. Mol. Med. 2007. № 3. Vol. 11, P. 462-481.
14. Tsuruta Daisuke, Teruki Dainichi, Takahiro Hamada. Molecular diagnosis of autoimmune blistering diseases / Daisuke Tsuruta, Dainichi Teruki, Hamada Takahiro [et. al.] // Methods Mol Biol. 2013. Vol. 961, P.17-32.
15. Direct immunofluorescence in cutaneous vesiculobullous lesions [Electronic resource] / 2012. – Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18306538.

16. Jukić I.L., Marinović B. Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses / I.L. Jukić, B. Marinović // Clin Dermatol. 2011. № 29(4), P. 389-397.
17. Raghavendra Rao, Kavitha Dasari, Shrutakirthi Shenoi. Demonstration of pemphigus-specific immunofluorescence pattern by direct immunofluorescence of plucked hair / Rao Raghavendra, Dasari Kavitha, Shenoi Shrutakirthi [et al.] // Int. J. Dermatol. 2009. Vol.48, №11. P.1187-1189.
18. Kumaresan M., Rai R., Sandhya V. Immunofluorescence of the outer root sheath: an aid to diagnosis in pemphigus / M. Kumaresan, R. Rai, V. Sandhya // Clin Exp Dermatol. 2010. № 130(9). P. 2286-94.
19. Zhang X., Hyjek E, Soltani K. Immunohistochemistry for Immunoglobulin G4 on Paraffin Sections for the Diagnosis of Pemphigus / X. Zhang, E. Hyjek, K. Soltani [et al.] // Arch Pathol Lab Med. 2012. Vol 136, P. 1402-1407.
20. Pas HH. Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases / HH. Pas // Clin. Dermatol. 2001. №19, P. 622-630.
21. Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3 [Electronic resource] 2012. – Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844505
22. Bhol K., Tyagi S., Natarajan K. Use of recombinant pemphigus vulgaris antigen in development of ELISA and IB assays to detect pemphigus vulgaris autoantibodies. / K. Bhol, S. Tyagi, K. Natarajan [et al.] // J Eur Acad Dermatol Venereol 1998. №10, P. 28–35.
23. Le Saché-de Peufeilhoux L., Ingen-Housz-Oro S., Hue S. The Value of BP230 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis and Immunological Follow-Up of Bullous Pemphigoid / L. Le Saché-de Peufeilhoux, S. Ingen-Housz-Oro, S. Hue [et al.] // Dermatology. 2012. №224, P.154–159.
24. Recombinant Human Tissue Transglutaminase ELISA for Diagnosis Of Gluten-sensitive Enteropathy [Electronic resource] / 2013. - Mode of access: http://www.clinchem.org/content/45/12/2142.long
25. Transglutaminases as diagnostically relevant autoantigens in patients with gluten sensitivity [Electronic resource] / 2013. - Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405713
26. Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice / A. Voller, D.E. Bidwell, A. Bartlett // Bull World Health Organ. 1976. № 53(1), P 55–65.
27. Essential Clinical Immunology/ J.B. Zabriskie. UK: Cambridge University Press, 2009. 373p.

28. Crispian S., Challacombe S.J. Pemphigus Vulgaris: Update on Etiopathogenesis, Oral Manifestations and Management / S. Crispian, S. J. Challacombe // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2002. Vol.13, №5. P.397-408.
29. Bracke, S., Speeckaert R., Van Geel N. Evaluation of commercially available ELISA assays as a tool for monitoring and managing pemphigus patients: a prospective study / S. Bracke, R. Speeckaert, N. Van Geel [et al.] // European Journal of Dermatology. 2013. Volume 23, № 1, P. 33-39.
30. Amagai M. Komai A., Hashimoto T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus / M. Amagai, A. Komai , T. Hashimoto [et al.] // Br J Dermatol. 1999.№140, P. 351-357.
31. Zhong S., Qiu Y.F., Han B.B. Detection of serum desmoglein antibody level using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring disease activity in patients with pemphigus vulgaris / S. Zhong, Y.F. Qiu, B.B. Han [et al.] // Beijing Da Xue Xue Bao. 2011. №43(3) P. 414-415.
32. Huang C.H., Chen C.C., Wang C.J. Using Desmoglein 1 and 3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay as an Adjunct Diagnostic Tool for Pemphigus / C.H. Huang, C.C. Chen, C.J. Wang [et al.] // J Chin Med Assoc. 2007. Vol 70. № 2, P. 65-70.
33. Abasq C., Mouquet H., Gilbert D. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus / C. Abasq, H. Mouquet, D. Gilbert [et al.] // Arch Dermatol. 2009. №145(5), P. 529-535.
34. Kobayashi M., Amagai M., Kuroda-Kinoshita K. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid / M. Kobayashi, M. Amagai, K. Kuroda-Kinoshita [et al.] // J Dermatol Sci. 2002. №30(3), P. 224-232.
35. Sitaru C., Dähnrich C., Probst C. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies / C. Sitaru, C. Dähnrich, C. Probst [et al.] // Exp Dermatol. 2007. №16(9), P.770-777.
36. Di Zenzo G., Della Torre R., Zambruno G., Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench / G. Di Zenzo, R. Della Torre, G. Zambruno, L.Borradori // Clin Dermatol. 2012. №30(1), P. 3-16.
37. Schmidt E., Della Torre R., Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid / E. Schmidt, R. Della Torre, L. Borradori // Immunol Allergy Clin North Am. 2012. №32(2), P. 217-232.
38. Roussel A. Benichou J., Randriamanantany Z.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid / A. Roussel, J. Benichou, Z.A. Randriamanantany [et al.] // Arch Dermatol. 2011. №147(3), P. 293-298.

39. Hofmann S.C., Bruckner-Tuderman L. Bullous pemphigoid: diagnostics and new therapeutic strategies / S.C. Hofmann, L. Bruckner-Tuderman // Dtsch Med Wochenschr. 2006. № 131(8), P. 389-392.
40. Tampoia M., Lattanzi V., Zucano A. Evaluation of a new ELISA assay for detection of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid / M. Tampoia, V. Lattanzi, A. Zucano // Ann NY Acad Sci. 2009. №1173, P.15-22.
41. Atzori L., Deidda S., Aste N. Enzyme-linked immunosorbent assay in autoimmune blistering diseases: preliminary experience of the Dermatology Department of Cagliari / L. Atzori, S. Deidda, N. Aste // G Ital Dermatol Venereol. 2008. №143(1). P.1-8.
42. Koreeda S., Horiguchi Y., Ohtoshi E. A case of autoimmune bullous dermatosis with features of pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid / S. Koreeda, Y. Horiguchi, E. Ohtoshi [et al] // Am J Dermatopathol. 1995. №17, P. 511–516.
43. Matasubara K., Kanauchi H., Tanaka T., Imamura S. Coexistence of pemphigus and bullous pemphigoid / K. Matasubara, H. Kanauchi, T. Tanaka, S. Imamura // J Dermatol. 1995. №22, P. 68–70.
44. Sami N., Bhol K.C., Beutner E.H. Diagnostic Features of Pemphigus vulgaris in Patients with Bullous Pemphigoid. Molecular Analysis of Autoantibody Profile / N. Sami, K.C. Bhol, E.H. Beutner [et al] // Dermatology. 2002. №204, P.108–117.