

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
11.07.2014
Регистрационный № 055-0614

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
АКАНТОЛИТИЧЕСКОЙ ПУЗЫРЧАТКИ, БУЛЛЕЗНОГО ПЕМФИГОИДА,
ГЕРПЕТИФОРМНОГО ДЕРМАТОЗА ДЮРИНГА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный медицинский университет

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. А.М. Лукьянов, Ю.В. Колос

Минск 2014

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-дерматовенерологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с аутоиммунными буллезными дерматозами.

В настоящей инструкции по применению изложен алгоритм дифференциальной диагностики заболеваний группы аутоиммунных буллезных дерматозов (акантолитическая пузырчатка, буллезный пемфигоид, герпетиформный дерматоз Дюринга) на основании клинических, цитологических, патоморфологических, иммунологических критериев.

Область применения: стационарные и амбулаторные отделения, диагностические лаборатории учреждений здравоохранения дерматовенерологического профиля, патоморфологические бюро.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Для цитологического исследования:

- простерилизованный ученический ластик;
- пинцет;
- стерильные обезжиренные предметные стекла;
- метиловый спирт;
- смесь красителей для окраски по Романовскому–Гимзе;
- световой оптический микроскоп.

Для панч-биопсии кожи:

- раствор антисептика для обеззараживания кожи;
- раствор лидокаина гидрохлорида 10 мг/мл (артикаина с эпинефрином 80 мг + 12 мкг/2 мл в случае непереносимости лидокаина гидрохлорида);
- шприц одноразовый (5 мл);
- цилиндрический трепан для панч-биопсии кожи диаметром 4–5 мм (для области лица или волосистой части головы допускается диаметр 2–3 мм);
- пинцет хирургический;
- ножницы хирургические глазные;
- пробирка или контейнер для транспортировки биопсийного материала;
- 10%-й нейтральный формалин;
- спиртовой раствор бриллиантового зеленого (1–2%);
- стерильные марлевые салфетки;
- перевязочный материал (лейкопластырь);
- раствор для дезинфекции отработанного биологического материала, лабораторного пластика и др.;
- контейнеры для дезинфекции;
- перчатки латексные.

Для патоморфологического исследования:

- 10%-й нейтральный формалин;
- парафин;
- ксилол;
- спирты возрастающей концентрации;
- микротом;

- предметные и покровные стекла;
- гематоксилин;
- эозин;
- канадский бальзам;
- световой оптический микроскоп;
- перчатки латексные;
- лабораторная посуда.

Для изготовления и хранения сыворотки крови:

- жгут;
- раствор антисептика для обеззараживания кожи;
- стерильные ватные шарики;
- шприцы одноразовые (10 мл);
- пробирки пластиковые объемом 10 мл;
- пробирки типа «эппендорф» (1,5 мл);
- лабораторные штативы;
- лабораторная центрифуга;
- дозатор пипеточный;
- наконечники для дозатора пипеточного;
- раствор для дезинфекции отработанного биологического материала, шприцев, пробирок и т. д.;
- контейнеры для дезинфекции;
- перчатки латексные;
- морозильная камера (до -70°).

Для иммуноферментного анализа:

- тест-системы для иммуноферментного исследования, содержащие рекомбинантные антигены: десмоглеин 1, десмоглеин 3, NC16A домен антигена ВР 180, антиген ВР 230, тканевую трансглутаминазу, дезаминированные пептиды глиаина;
- дозаторы пипеточные;
- наконечники для дозаторов пипеточных;
- лабораторные штативы;
- пробирки типа «эппендорф» на 1,5 мл;
- мерная лабораторная посуда;
- ИФА-анализатор (планшетный спектрофотометр);
- раствор для дезинфекции отработанного биологического материала и реактивов;
- контейнер для дезинфекции;
- перчатки латексные.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Пациенты с пузырьным синдромом на коже и/или слизистых оболочках с подозрением на наличие следующих нозологических форм по МКБ-10:

- L10.0 Вульгарная пузырчатка;
- L10.1 Вегетирующая пузырчатка;
- L10.2 Листовидная пузырчатка;
- L.10.8 Другие виды пузырчатки (паранеопластическая пузырчатка);

- L.12.0 Буллезный пемфигоид;
- L13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Диагностика акантолитической пузырьчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга должна базироваться на обязательном наборе клинико-anamnestических, цитологических, морфологических (по показаниям), иммунологических критериев. При этом решающую роль для верификации диагноза играет иммунологический критерий — обнаружение специфических аутоантител, направленных против определенных антигенных структур кожи.

Схематично алгоритм дифференциальной диагностики заболеваний группы акантолитической пузырьчатки (ее клинических вариантов — вульгарной (вегетирующей), листовидной, паранеопластической пузырьчатки), буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга представлен на рис. 1.

Данный алгоритм включает несколько последовательных этапов:

На 1-м этапе необходимо провести оценку клинико-anamnestических данных, что позволяет заподозрить определенную нозологическую форму АБД.

Наиболее характерные клинико-anamnestические критерии дифференцируемых нозологических форм АБД представлены в табл. 1.

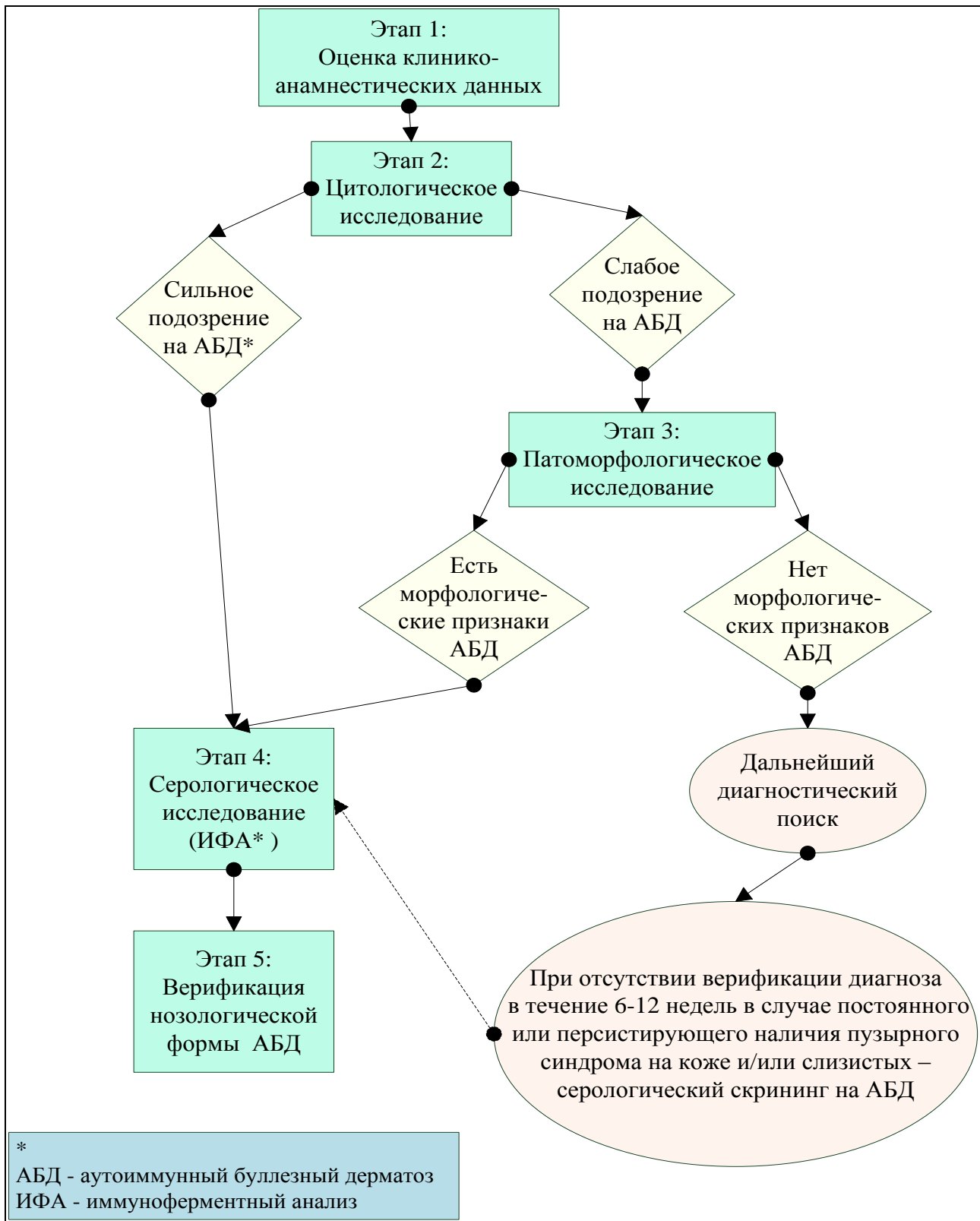


Рис. 1 — Алгоритм дифференциальной диагностики заболеваний группы акантолитической пузырчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга

Таблица 1 — Клинико-анамнестические критерии заболеваний группы акантолитической пузырчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга

Клинический или анамнестический критерий	Нозологическая форма АБД					
	Вульгарная пузырчатка	Вегетирующая пузырчатка	Листовидная пузырчатка	Паранео-пластическая пузырчатка	Буллезный пемфигоид	Герпетиформный дерматоз Дюринга
Манифестация заболевания	Чаще в возрасте 40–60 лет			Возникновение возможно в любом возрасте на фоне неоплазии (чаще лимфопролиферативной системы)	Чаще в возрасте 60–80 лет	Чаще в возрасте 25–55 лет, характерна непереносимость глютена
Характеристика элементов сыпи	Вялые пузыри с серозным или серозно-геморрагическим содержимым на фоне внешне неизменной кожи; на слизистых — эрозии без тенденции к заживлению	Покрытые сочными вегетациями эрозии с гнойным отделяемым и зловонным запахом	Поверхностные дряблые пузыри на коже, которые быстро вскрываются, и сыпь представлена в основном гиперемическими пятнами и эрозиями, покрытыми корками	Обширные эрозии, нередко язвы на слизистых оболочках, на коже — полиморфные высыпания	Пузырьки и напряженные пузыри чаще на фоне эритематозно измененной кожи, наряду с уртикарными, папулезными элементами	Симметричные сгруппированные полиморфные высыпания: пузырьки, реже пузыри, папулы, уртикарные и эритематозные элементы
Локализация высыпаний	Слизистая полости рта, волосистая часть головы, лицо, грудь, подмышечные впадины, паховая область	Кожные складки, около естественных отверстий, шея, волосистая часть головы	Лицо, волосистая часть головы, верхняя часть груди и спины (себорейные участки), слизистые поражаются крайне редко	Слизистые оболочки; на коже возможна различная локализация в зависимости от клинического варианта	Нижняя часть живота, внутренняя и передняя поверхность бедер, сгибательная поверхность предплечий; слизистые оболочки поражаются в 10–35% случаев	Разгибательная поверхность конечностей, особенно область локтевых и коленных суставов, плечи, ягодицы, крестцовая область, лицо; слизистые оболочки вовлекаются в процесс редко
Симптом Никольского	Положительный	Положительный	Положительный	Положительный	Отрицательный	Отрицательный
Субъективные ощущения	Болезненность	Болезненность	Легкая болезненность	Болезненность	Зуд	Зуд, жжение

На 2-м этапе дифференциальной диагностики необходимо выполнить цитологическое исследование содержимого пузырей или мазков отпечатков со дна эрозий с целью обнаружения акантолитических клеток (метод Тцанка).

Обнаружение данных клеток является цитологическим критерием заболеваний группы акантолитической пузырчатки, в то время как для буллезного пемфигоида и герпетиформного дерматоза Дюринга в большинстве случаев характерно их отсутствие.

На 3-м этапе осуществляют патоморфологическое исследование с окраской парафинового среза пораженной кожи гематоксилин-эозином (выполняется в случае отсутствия четких клиничко-анамнестических и цитологических критериев АБД, см. этапы 1 и 2), т. е. при слабом подозрении на АБД, как с целью выявления морфологических критериев АБД, так и обнаружения признаков других дерматозов.

Основные морфологические критерии заболеваний группы акантолитической пузырчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга представлены в табл. 2.

В случае обнаружения морфологических критериев АБД необходимо перейти к 4-му этапу дифференциальной диагностики — серологическому исследованию сывороток крови.

В случае отсутствия морфологических критериев АБД либо присутствия морфологических критериев другого дерматоза необходимо выполнить дальнейший диагностический поиск.

При отсутствии верификации диагноза в течение 6–12 недель в случае постоянного или персистирующего наличия пузырного синдрома на коже и/или слизистых оболочках необходимо выполнить серологическое исследование (см. этап 4).

Таблица 2 — Морфологические критерии заболеваний группы акантолитической пузырьчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга

Морфологический критерий	Нозологическая форма АБД					
	Вульгарная пузырьчатка	Вегетирующая пузырьчатка	Листовидная пузырьчатка	Паранеопластическая пузырьчатка	Буллезный пемфигоид	Герпетиформный дерматоз Дюринга
Акантолиз и образование межклеточных щелей в эпидермисе	Выражен, обычно в супрабазальных слоях, с частым вовлечением придатков кожи	Выражен в меньшей степени, обычно в супрабазальных слоях	Выражен, обычно в зернистом слое или под ним	Выражен, обычно в супрабазальных слоях	—	—
Пузырь	Внутриэпидермальный, преимущественно надбазальный	Внутриэпидермальный, преимущественно надбазальный	Внутриэпидермальный, субкорнеальный или корнеальный	Внутриэпидермальный, преимущественно надбазальный	Субэпидермальный, покрывка представлена базальным слоем клеток с неповрежденными межклеточными мостиками (свежие элементы); Внутриэпидермальный (иногда субкорнеальный), в результате регенерации (старые элементы)	Субэпидермальный, вначале многокамерный, затем однокамерный; внутриэпидермальный, в результате регенерации (старые элементы)
Содержимое пузыря	Акантолитические клетки, фибрин, эозинофилы	Акантолитические клетки, эозинофилы	Акантолитические клетки, немногочисленные нейтрофилы	Акантолитические клетки, дискератотические кератиноциты	Эозинофилы, нейтрофилы, фибрин	Нейтрофилы с примесью эозинофилов, фибрин
Папилломатоз, акантоз	—	Присутствуют в зоне вегетаций	—	—	—	—
Внутриэпидермальные абсцессы	—	Присутствуют, эозинофильные	—	—	—	—
Папиллярные	—	—	—	—	—	Располагаются по

микроабсцессы						периферии субэпидермальных пузырей
Дискератоз кератиноцитов	–	–	–	Присутствует	–	–
Базальная вакуолизация	–	–	–	Присутствует	–	–
Эпидермальный экзоцитоз воспалительных клеток	–	–	–	Присутствует	–	–
Воспалительная инфильтрация дермы	Периваскулярная лимфоплазмодитарная инфильтрация с большим количеством эозинофилов	Периваскулярная (реже диффузная) инфильтрация с большим количеством эозинофилов	Периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофилов и эозинофилов	Периваскулярная полиморфная инфильтрация	Интерстициальная и периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация с примесью преимущественно эозинофилов, в меньшей степени нейтрофилов	Интерстициальная и периваскулярная кругло-клеточная инфильтрация с примесью нейтрофилов и эозинофилов

На 4-м этапе осуществляют серологическое исследование сыворотки крови в целях обнаружения специфических аутоантител, направленных против определенных антигенных структур кожи пациента (иммунологический критерий АБД).

Из серологических методов диагностики наиболее приемлемым для практической медицины является иммуноферментный анализ с рекомбинантными антигенами.

Иммуноферментный анализ можно проводить непосредственно сразу после 2-го этапа дифференциальной диагностики в случае наличия четких клинико-анамнестических и цитологических критериев АБД (сильное подозрение АБД) либо после обнаружения морфологических критериев АБД (см. 3-й этап).

На 5-м этапе верифицируют конкретную нозологическую форму аутоиммунного буллезного дерматоза — проводится анализ результатов предыдущих этапов дифференциальной диагностики. При этом решающую роль в постановке диагноза играют результаты иммуноферментного анализа с рекомбинантными антигенами и полученный молекулярный спектр аутоантител. Характеристика молекулярного спектра аутоантител при дифференцируемых нозологических формах АБД представлена в табл. 3.

Таблица 3 – Характеристика молекулярного спектра аутоантител заболеваний группы акантолитической пузырчатки, буллезного пемфигоида, герпетиформного дерматоза Дюринга

Аутоантитела к	Нозологическая форма АБД				
	Вульгарная (вегетирующая) пузырчатка	Листовидная пузырчатка	Паранеопластическая пузырчатка	Буллезный пемфигоид	Герпетиформный дерматоз Дюринга
десмоглеину 3 (IgG)	+	–	+	–	–
десмоглеину 1 (IgG)	+	+	+	–	–
BP 180 (IgG)	–	–	–	+	–
BP 230 (IgG)	–	–	+	+	–
энвоплакину (IgG)	–	–	+	–	–
тканевой трансглутаминазе (IgA)	–	–	–	–	+
дезаминированным пептидам глиаина (IgA)	–	–	–	–	+

При этом в случае вульгарной пузырчатки (или ее клиническом варианте — вегетирующей пузырчатке) молекулярный спектр аутоантител представлен аутоантителами к десмоглеину 3 либо сочетанием аутоантител к десмоглеину 3 и 1.

Для листовидной пузырчатки характерны аутоантитела исключительно к десмоглеину 1.

Основным молекулярным признаком паранеопластической пузырчатки является обнаружение аутоантител к плакинам (в т. ч. к энвоплакину). Кроме того, при данной нозологической форме могут выявляться аутоантитела к десмоглеину 3 и/или 1, к антигену буллезного пемфигоида 1 (BP 230).

При буллезном пемфигоиде выявляются аутоантитела к NC16A домену антигена буллезного пемфигоида 2 (BP 180) и/или к антигену буллезного пемфигоида 1 (BP 230).

Для герпетиформного дерматоза Дюринга характерны аутоантитела к тканевой трансглутаминазе и/или дезаминированным пептидам глиаина.

Необходимо отметить возможность одновременного наличия у одного пациента нескольких нозологических форм АД. В этом случае при иммуноферментном анализе будут обнаруживаться аутоантитела, характерные для соответствующих нозологических форм АД (табл. 3).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные осложнения при выполнении инструкции, а также пути их профилактики и устранения представлены в табл. 4.

Таблица 4 — Возможные осложнения и пути их устранения

Возможные осложнения и ошибки	Пути профилактики и устранения
Инфекционные осложнения при выполнении панч-биопсии кожи, заборе крови	Строгое соблюдение правил асептики и антисептики, назначение антибактериальных мазей (до момента эпителизации кожи в области выполнения панч-биопсии)
Кровотечение при выполнении панч-биопсии кожи	Применение кровоостанавливающих растворов (железа хлорида гексагидрат и алюминия хлорида гексагидрат), кровоостанавливающих губок, наложение швов
Аллергические реакции	Тщательный сбор аллергологического анамнеза, выполнение накожной аллергической пробы с анестетиком; при возникновении аллергической реакции — купирование в соответствии с алгоритмом «купирование аллергической реакции»
Нарушение условий хранения биологических материалов (сыворотка крови, кожный биоптат)	Допускается хранение сыворотки крови в условиях холодильной камеры (при 2–4°C) до выполнения иммуноферментного анализа не более 24 ч. Длительное хранение сыворотки крови необходимо производить в условиях морозильной камеры (до -70°C). Допускается хранение зафиксированного в формалине кожного биоптата до заливки в парафин не более 24 ч
Грязная лабораторная посуда	Во избежание ложноположительных и ложноотрицательных результатов исследований необходимо использовать

	только чистую лабораторную посуду
Нарушение методики выполнения лабораторных тестов	Необходимо строгое соблюдение прилагаемых к тест-системам ИФА инструкций по применению, а также разработанных протоколов морфологического и цитологического исследования
Погрешности при работе ИФА-анализатора (планшетного спектрофотометра)	Необходимо дважды считывать показатели оптической плотности и учитывать среднее значение