

# Pemfiguslu Hastaların Sağlıklı Birinci Derece Akrabalarında Pemfigus Otoantiklorlarının Sıklığının Araştırılması

## Investigation of Frequency of Pemphigus Autoantibodies in Healthy First Degree Relatives of Pemphigus Patients

Dr. Suhan GÜNAŞTI,<sup>a</sup>  
Dr. Soner UZUN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dermatoloji AD,  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Adana

Geliş Tarihi/Received: 30.10.2008  
Kabul Tarihi/Accepted: 09.04.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Suhan GÜNAŞTI  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Dermatoloji AD, Adana,  
TÜRKİYE/TURKEY  
sugunasti@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Birçok gözlem ve araştırma, otoimmün bir hastalık olan pemfigusun etyopatogenezinde katılmun etkisini düşündürmektedir. Günümüze kadar birçok ailesele olgu bildirilmiştir. Çalışmamızın amacı bölgemizdeki pemfiguslu hastaların etkilenmemiş birinci derece akrabalarında otoantiklor testleri olan immünofloresan ve ELISA testlerini kullanarak dokuda depolanmış olan ve serumda dolanan otoantiklor düzeylerinin bakılması ve yine akrabalarındaki spesifik otoantiklor düzeylerinin varlığının ve sıklığının araştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmi dokuz pemfiguslu hastamızın pemfigus ve diğer kronik otoimmün hastalığı olmayan 68 birinci derece akrabası çalışmaya alındı. Tüm akraba ve kontrol grubundaki kişilerin serumlarında otoantiklor saptamak için sıçan ve maymun özefagusu substrat olarak kullanılarak indirekt immünofloresan test yapıldı. Akrabaların 32'sinde ELISA, sıçan özefagusu substrat olarak kullanıldığında pozitiflik elde edilen 13'ünde ise direkt immünofloresan test yapıldı. **Bulgular:** Sıçan özefagusu substrat olarak kullanıldığında akrabaların %28'inde (1/10-1/80 arasında), kontrol grubunun %16'sında; maymun özefagusu substrat olarak kullanıldığında ise akrabaların %10'unda (1/10), kontrol grubunun da %8'inde pozitiflik elde edildi. Serumları ELISA ile incelenmiş 32 akrabamın hiçbirinde anti-desmoglein-1'e karşı antiklor saptanmazken, sadece birinde anti-desmoglein-3'e karşı antiklor saptandı. Direkt immünofloresan test 13 akrabada da negatif idi. **Sonuç:** Dolaşımdaki antiklor seviyelerinin varlığı sağlıklı hasta yakınlarında ancak belirli substratlarda ve titrasyonlarda sağlıklı kontrol gruplarına oranla anlamlı farklılıklar gösterdi. Bu bulgularımıza göre sadece kanda dolaşan otoantiklorların varlığının hastalığı ortaya çıkarmaya yetmediği, bu otoantiklorların deriye çökmesinde bir engelin varlığının olabileceğini ileri sürebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Pemfigus; akraba; ELISA; flöresan antiklor tekniği,  
direkt; flöresan antiklor tekniği

**ABSTRACT Objective:** Many observation and investigations suggests that inheritance plays a role in the pathogenesis of pemphigus, which is an autoimmune disease. Many familial cases have been reported up to date. The purpose of our study is to evaluate the autoantibody levels that deposit in the tissue and circulate in the serum, in unaffected first degree relatives of pemphigus patients in our region by using indirect immunofluorescence test and ELISA. We also aim to detect the presence and frequency of specific antibody levels. **Material and Methods:** Sixty eight first degree relatives of 29 pemphigus patients, who had neither pemphigus nor another chronic autoimmune disease were included in our study. Indirect immunofluorescence test was done to detect autoantibodies in serum of the relatives and controls by using monkey and rat esophagus as a. ELISA was done in 32 relatives. Direct immunofluorescence examination was done in 13 relatives whose serum titration was positive when rat esophagus was used as a substrate. **Results:** Positive results were obtained in 28% of relatives (between 1/10-1/80) and 16 % of control groups when rat esophagus was used as a substrate and 10% of relatives (1/10) and 8% of control groups when monkey esophagus used as a substrate. None of the 32 relatives, whose serum examined by ELISA, had antibodies against the anti-desmoglein-1 whereas serum antibody against anti-desmoglein-3 was detected only in one. Direct immunofluorescence test was negative in all 13 relatives. **Conclusion:** Existence of circulating antibody levels was observed only in the presence of some substrates and at certain titrations in first degree relatives of our patients when compared to the healthy control group. According to our findings, we may suggest that only existence of circulating antibodies is not enough for the disease to appear, there may also be a barrier for these antibodies to precipitate into the skin.

**Key Words:** Pemphigus; family; enzyme-linked immunosorbent assay;  
fluorescent antibody technique, direct; fluorescent antibody technique

Turkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(2):571-6

**P**emfigus, epidermal hücre yüzey antijenlerine karşı gelişen otoantikörlerin etkisi ile deri ve müköz membranlarda epidermal ayrışma, yani klinik olarak büll ve/veya erozyonların oluşumu ile karakterize, hayatı tehdit eden otoimmün bir hastalıktır.<sup>1-3</sup> Pemfigusun dünyadaki insidansı 0.076-2.7/100.000 arasındadır.<sup>4-10</sup> Ülkemizde sadece bölgemizde yapılan bir çalışmada Akdeniz bölgesinde insidansının 0.24/100.000 olduğunu göstermektedir.<sup>11</sup> Birçok gözlem ve araştırma, otoimmün bir hastalık olan pemfigusun etyopatogenezinde kalıtımın etkisini düşündürmektedir. Pemfigusun, tüm dünyada dağılım göstermesine rağmen Yahudilerde, özellikle de Ashkenazi kökenli olanlarda daha yaygın olduğu bilinmektedir.<sup>12</sup> Ailesel olgular gözlenebilir.<sup>13-17</sup> Özellikle Yahudi hastalarda HLA-DR4 ve HLA-DR6 ile güçlü bir ilişki vardır.<sup>12</sup> Bunların yanı sıra son yıllardaki bazı araştırmalarda pemfiguslu hastaların bu hastalıktan etkilenmemiş birinci derece akrabalarının kanında pemfigus otoantikörleri saptanmıştır.<sup>18-23</sup> Ancak akrabalarındaki otoantikör sıklığı, %15'den %85'e kadar oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik, otoantikörlerin saptanması için kullanılan yöntemlerin değişik olmasına bağlı olabileceği gibi, araştırmaların yapıldığı toplumlardan da etkilenmiş olabilir. Bu nedenle bölgemizdeki pemfiguslu hastaların etkilenmemiş birinci derece akrabalarında indirekt ve direkt immüno Floresan testler ve ELISA kullanarak pemfigus otoantikörlerinin araştırılması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mayıs 2004-Ocak 2005 arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji polikliniğine başvuran ve direkt immüno Floresan test ile tanıları konmuş olan 53 pemfiguslu hastanın tümünden "birinci derece akrabalarını pemfigus otoantikörlerinin araştırılması için polikliniğimize getirmeleri" istendi. Bu çağrıya 29 (23 kadın, altı erkek; yaş ortalaması 45.9 ± 13.2 [Ortalama ± Standart Sapma]) hastadan olumlu yanıt geldi. Bu hastaların 28'i pemfigus vulgarisli ve biri paraneoplastik pemfiguslu idi.

Pemfiguslu hastalarımızın birinci derece akrabaları arasından araştırmaya katılmak için gönüllü

olmayanlar, uzak bir yerde yaşadıkları için polikliniğimize gelemeyenler ve kronik bir hastalık için düzenli ilaç kullananlar çalışma dışı kaldı. Çalışmaya alınan 68 (32 kadın, 36 erkek; yaş ortalaması 34.2 ± 15.9) birinci derece akrabasının hiç birinde, klinik değerlendirmeye göre, başta pemfigus ve diğer otoimmün hastalıklar olmak üzere, herhangi bir kronik hastalık yoktu. Bu akrabaların altısı (üç kadın, üç erkek) hastalarımızın ebeveyni, 27'si (11 kadın, 16 erkek) kardeşi ve 35'i (18 kadın, 17 erkek) çocuğu idi.

Kontrol grubu olarak birbiriyle akrabalık ilişkisi olmayan 38 (25 kadın, 13 erkek; yaş ortalaması 28.4 ± 5.2) sağlıklı hastane personeli çalışmaya alındı. Bu kişilerin hiçbirinin pemfigus ve diğer otoimmün hastalığı olan akrabası yoktu. Son bir hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmamışlardı. Çalışma kapsamındaki gerek akrabalarından gerekse kontrol grubundaki kişilerden yazılı aydınlatılmış onam alındı ve çalışmamıza başlamadan önce üniversitemiz etik kurulundan da onay alındı.

Tüm akraba ve kontrol grubundaki kişilerin serumlarında epidermal intersellüler aralığa karşı otoantikör olup olmadığını saptamak için, anti-human IgG (The Binding Site) ve substrat olarak Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlanan sıçan özofagusu ve ticari bir ürün olan maymun özofagusu (The Binding site limited Birmingham, UK) kullanılarak indirekt immüno Floresan test yapıldı.<sup>24</sup> Bu testte serumlar 1/10, 1/20, 1/40 ve 1/80 dilüsyonlarda kullanıldı. 1/80 dilüsyondaki serumda pozitiflik elde edilirse, 1/160 dilüsyon ile de test yapıldı.

Akrabaların 32'sinde ELISA ile (Mescup Desmoglein Test "Dsg1" ve "Dsg3") serumda anti-desmoglein 1 ve anti-desmoglein 3 antikörleri araştırıldı.

Sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında pozitiflik elde edilen akrabaların 13'ünde gövdeden lezyonsuz deri biyopsisi alındı ve anti-human IgG, IgA, IgM ve C3 (The Binding Site) kullanılarak direkt immüno Floresan test yapıldı.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Kesikli değişkenler (cinsiyet, akraba ve kontrol gruplarının otoantikör sıklığı

gibi ) sayı ve yüzde olarak, sürekli değişkenlerse (yaş gibi) ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Kesikli değişkenlerin karşılaştırılmasında kategori sayısının ve beklenen frekansların uygun olup olmamasına göre Fisher kesin ki kare testi (sadece 2x2 karşılaştırmalarda) veya ki kare test istatistiği kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

## BULGULAR

Sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında akrabaların %28'inde (19/68) 1/10 ile 1/80 arasında değişen dilüsyonlarda, kontrol grubundakilerin ise %16'sında (6/38) 1/10 ve 1/20 dilüsyonlarda pozitiflik elde edildi, ancak iki grup arasında önemli fark bulunmadı ( $p=0.232$ ). 1/20 ve üstü dilüsyonlardaki pozitiflik oranı ise akraba grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksek bulundu [sırasıyla %21 (14/68) ve %5 (2/38)  $p=0.046$  (Tablo 1)].

Maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında ne akrabalarda ne de kontrol grubunda 1/20 ve üstü dilüsyonlarda pozitiflik elde edilmedi. 1/10 dilüsyondaki pozitiflik ise akrabalarda ve kontrol grubunda benzer oranda idi [sırasıyla %10 (7/68) ve %8 (3/38)  $p=1.000$  (Tablo 1)].

Akrabaların %9'unda (6/68) sıçan özofagusu ve maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında her ikisinde de pozitiflik elde edildi. Kontrol grubunda ise böyle bir pozitiflik gösteren olgu yoktu. Arada önemli bir fark bulunmadı ( $p=0.085$ ) (Tablo 2).

Hastalarımızın ebeveynlerinde sıçan ve maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında sırasıyla %33 (2/6) ve %33 (2/6); kardeşlerinde %33

**TABLO 1:** Akraba ile kontrol grubunda sıçan ve maymun özofagusu kullanılarak elde edilen titrasyonlarının karşılaştırılması.

Titrasyon (1/)	Sıçan özofagusu		Maymun özofagusu	
	Akraba n=68	Kontrol n=38	Akraba n=68	Kontrol n=38
0	49 (%72)	32 (%84)	61 (%90)	35 (%92)
10	5 (%7)	4(%11)	7 (%10)	3 (%8)
20	9 (%13)	2 (%5)	-	-
40	3 (%5)	-	-	-
80	2 (%3)	-	-	-
Toplam	19 (%28)	6(%16)	7 (%10)	3 (%8)

**TABLO 2:** Sıçan ve maymun özofagusu substratlarında akraba ve kontrol gruplarında elde edilen sonuçların değerlendirilmesi.

Sıçan- maymun özofagusu	Akraba (n=68)	Kontrol (n=38)
İkisi de negatif	48 (%70)	30 (%79)
En az biri pozitif	20 (%29)	8 (%21)
İkisi de pozitif	6 (%9)	-

**TABLO 3:** Hastalarımızın akrabalarında sıçan ve maymun özofagusu kullanılarak elde edilen pozitiflikler.

Titrasyon	Anne-baba n= 6		Kardeş n=27		Çocuk n=35	
	Sıçan	Maymun	Sıçan	Maymun	Sıçan	Maymun
0	4 (%67)	4 (%67)	18 (%67)	25 (%93)	27 (%77)	32 (%91)
Pozitif	2 (%33)	2 (%33)	9 (%33)	2 (%7)	8 (%23)	3 (%9)

(9/27) ve %7 (2/27); çocuklarında ise %23 (8/35) ve %9 (3/35) oranlarında pozitiflik elde edildi (Tablo 3).

Paraneoplastik pemfiguslu bir hastamızın bir kardeşi ve bir çocuğu çalışmaya alınmıştı. Kardeşinde sadece sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında 1/20 dilüsyonda pozitiflik elde edildi.

Serumları ELISA ile incelenmiş olan 32 akrabasının hiçbirinde anti-desmoglein 1 antikoruna yoktu. Anti-desmoglein 3 antikoruna ise yalnız bir akrabada saptandı. Bu akrabada sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında 1/20 dilüsyonda pozitiflik elde edilmişti. Maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında ise pozitiflik elde edilmedi.

Biyopsi alınmış olan 13 akrabasının hiçbirinde direkt immüno Floresan test ile deride otoantikor birikimi saptanmadı. Oysa bu 13 akrabasının tümünde sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında serumda interselüler aralığa karşı otoantikor saptandığı gibi, maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında %38'inde (5/13) otoantikor saptanmıştı. Üstelik anti-desmoglein 3 otoantikoruna olan akraba da bu 13 kişilik gruptaydı.

## TARTIŞMA

Pemfiguslu hastaların bu hastalıktan etkilenmemiş birinci derece akrabalarında pemfigus otoantikorlarını araştıran çalışmalarda; indirekt immünoflo-

resan test, ELISA, *immunoblotting* ve direkt immüno floresan test gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin ELISA dışında tümünü kullanan bir çalışmada değişik yöntemler ile değişik otoantikor sıklıkları saptanmıştır.<sup>19</sup> Örneğin indirekt immüno floresan test için maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında akrabaların %85'inde, karsinoma A431 hücreleri substrat olarak kullanıldığında ise %71'inde pozitiflik elde edilmiştir. Çalışmamızda da sıçan özofagusu ve maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında değişik oranlar elde edilmiştir (sırasıyla %28 ve %10).

Pemfiguslu hastaların akrabalarında otoantikörleri araştıran değişik çalışmalarda aynı yöntem kullanılsa bile değişik sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin indirekt immüno floresan test için maymun özofagusunun substrat olarak kullanıldığı üç ayrı çalışmada otoantikor sıklığı, %15-85 arasında değişmektedir.<sup>18,19,21</sup> Çalışmamızda ise aynı substrat kullanıldığında pemfiguslu hastalarımızın akrabalarının yalnız %10'unda serumda otoantikor saptandı. Çalışmamız ve diğer çalışmalar arasında, çalışmaya alınan pemfiguslu hastaların hastalık tipleri açısından, önemli bir fark bulunmamaktadır. Çünkü çalışmamızın 29 hastasının biri dışında tümü, diğer çalışmaların ise tüm hastaları pemfigus vulgarislidir. Otoantikor sıklığı açısından bu değişkenlik, çalışmanın yapıldığı toplumun değişik olması ile de açıklanamaz. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada insan derisi substrat olarak kullanılmış ve akrabalarının %26.7'sinde kontrol grubunun ise %4'ünde serumda otoantikor saptanmıştır.<sup>22</sup> Yahudi hastaların akrabalarında yapılan iki ayrı çalışmada da<sup>19,21</sup> çok değişik sıklıklar elde edilmiştir (sırasıyla %85 ve %15). Akrabalardaki otoantikor sıklığındaki değişkenliğin en olası nedeni, çalışmamızda olduğu gibi, söz konusu çalışmalarda da bir hastanın tüm birinci derece akrabalarının çalışma kapsamına alınamamış olmasıdır.

İndirekt immüno floresan test ile pemfiguslu hastaların akrabalarında otoantikor sıklığını araştıran diğer çalışmaların<sup>18-21</sup> tümünde kontrol gruplarında hiç otoantikor saptanmamışken, çalışmamızda sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında kontrol grubunun %16'sında, maymun özo-

fagusu substrat olarak kullanıldığında %8'inde otoantikor saptanmıştır. Bu durum, bu olgularda intersellüler aralıkta floresans olmamasına karşın, göz yanılmasıyla "var" biçiminde bir değerlendirme yapmış olduğumuz kuşkusunu uyandıracaktır. Ancak böyle "yanlış" bir değerlendirme yerine, "daha duyarlı" bir değerlendirme yapmış olmamız daha büyük bir olasılıktır. Çünkü 1/10 dilüsyonlarda saptamış olduğumuz pozitiflikleri daha ileri dilüsyonlarda saptamamış olmamız, söz konusu serumlarda intersellüler aralıkta birikebilen ve floresans ışık çıkışına neden olabilen bir maddenin gerçekten var olduğunu ve bu maddenin serumun daha ileri sulandırılması ile bu özelliklerini kaybettiğini düşündürür.

Çalışmamızda indirekt immüno floresan test için sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında elde edilen 1/20 ve üstü dilüsyonlardaki pozitiflikler, pemfiguslu hastalarımızın akrabalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Yine sıçan özofagusu ve maymun özofagusu substrat olarak kullanıldığında her ikisinde de pozitiflik gösteren akraba varken, kontrol grubunda böyle bir kişi yoktu. Bu iki bulgumuz ve iki substrattan yalnız biriyle bile olsa kontrol grubumuzun küçümsenmeyecek bir bölümünde otoantikor saptamamız birlikte değerlendirildiğinde; pemfiguslu bir hastanın bir akrabasında "otoantikor var" diyebilmek için indirekt immüno floresan testteki pozitiflik ya yüksek dilüsyonlarda ya da birden çok substratın kullanılmasıyla elde edilmiş olmalıdır diyebiliriz. Benzer bir koşul pemfigus tanısı için de aranabilir. Bu öneri pemfigus tanısı için indirekt immüno floresan testte birden çok substrat kullanılması gerektiğini vurgulayan yazarların görüşünü destekler.<sup>25,26</sup> Bununla birlikte tek başına insan normal derisi veya maymun özofagusunun sıçan özofagusuna göre daha sensitif olduğunu bildiren çalışmalar da vardır.<sup>27,28</sup> Farklı varyantlar için farklı substratların, örneğin paraneoplastik pemfigus için sıçan mesanesinin, daha sensitif olduğu bilinmektedir.<sup>29</sup> Çalışmamızda sıçan özofagusu maymun özofagusuna göre daha sensitif saptanmıştır. Ancak amacımız farklı substratların sensitivitelerini ortaya koymak olmadığından ve dolayısıyla bu amaca yönelik yeterli sayıda denek kullanmadığı-

mız için substratların sensitivitelere konusunda kesin bir yargı bildirmemiz olası görünmemektedir.

Çalışmamızda ve bir başka çalışmada<sup>20</sup> pemfiguslu hastaların akrabalarında direkt immüno Floresan test ile deride otoantikor birikimi saptanmıştır. Üstelik, yukarıda daha değerli olduğunu ileri sürdüğümüz gibi, çalışmamızda deri biyopsisi alınan 13 akrabanın 10'unda sıçan özofagusu substrat olarak kullanıldığında 1/20 ve üstü dilüsyonlarda pozitiflik ve beşinde her iki substratın kullanılmasında da pozitiflik elde edilmiştir. Pemfiguslu hastaların 20 akrabasının beşinde direkt immüno Floresan test ile deride otoantikor birikimi saptayan bir çalışma sırasında, bu beş akraba-

nın biri klinik olarak pemfigus tanısı almıştır.<sup>19</sup> Bu bulgulara göre pemfigusu otoantikorlarının kanda dolaşmasının klinik olarak hastalığı ortaya çıkarmaya yetmeyeceği ve kandan deriye antikorların çökmesine karşı bir engelin olabileceği ileri sürülebilir. Bundan sonraki çalışmaların akrabalarda pemfigus otoantikorlarının sıklığını araştırmak yerine, böyle bir engelin olup olmadığını ve varsa ne olduğunu amaç edinmesi daha doğru olacaktır. Çünkü böyle bir engel varsa ve bu engelin bozulmasıyla otoantikorlar deriye çöküp lezyonları başlatıyorsa, bu engeli yeniden oluşturacak ilaçlar veya diğer yöntemler, pemfigus tedavisinde yeni ufuklar açacaktır.

## KAYNAKLAR

- Stanley JR. Pemphigus. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Company; 2003. p.558-67.
- Günaştı S, Uzun S. [Pemphigus vulgaris and complications due to chemotherapeutic agents]. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2006;2(3):45-51.
- Baz K, İkizoğlu G. [Diagnostic laboratory features of autoimmune bullous skin diseases]. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2003;23(3):255-60.
- Micali G, Musumeci ML, Nasca MR. Epidemiologic analysis and clinical course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily. Int J Dermatol 1998;37(3):197-200.
- Kyriakis KP, Varelzidis AG, Tosca AD. Environmental factors influencing the biologic behavior of patterns of pemphigus vulgaris: epidemiologic approach. Int J Dermatol 1995; 34(3):181-5.
- Tsankov N, Vassileva S, Kamarashev J, Kazandjeva J, Kuzeva V. Epidemiology of pemphigus in Sofia, Bulgaria. A 16-year retrospective study (1980-1995). Int J Dermatol 2000;39(2):104-8.
- Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Bröcker EB, Zillikens D. Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. J Eur Acad Dermatol Venereol 2002;16(1):68-71.
- Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Nouira R, Jomaa B, et al. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. J Invest Dermatol 1995;104(2):302-5.
- Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R. Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. Arch Dermatol 1980; 116(9):1035-7.
- Tallab T, Joharji H, Bahamdan K, Karkashan E, Mourad M, Ibrahim K. The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia. Int J Dermatol 2001;40(9):570-2.
- Uzun S, Durdu M, Akman A, Gunasti S, Usular C, Memisoglu HR, et al. Pemphigus in the Mediterranean region of Turkey: a study of 148 cases. Int J Dermatol 2006;45(5):523-8.
- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC. Dermatology. 2nd ed. Chapter 15. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2000. p.659-91.
- Feinstein A, Yorav S, Movshovitz M, Schevach-Millet M. Pemphigus in families. Int J Dermatol 1991;30(5):347-51.
- Spinowitz AL, Fiedler-Weiss VC, Fu T, Solomon LM. Pemphigus vulgaris in sisters. J Am Acad Dermatol 1986;15(1):115-6.
- Brenner S, Dorfman B, Himelfarb M. Familial pemphigus vulgaris. Dermatologica 1985;171 (1):38-40.
- Graham-Brown RA, Lister DM. Pemphigus in an Indian mother and daughter. Br J Dermatol 1987;116(2):253-8.
- Katzenelson V, David M, Zamir R, Mellibovsky J, Idises C, Sandbank M. Familial pemphigus vulgaris. Dermatologica 1990;181(1):48-50.
- Mohimen A, Narula M, Ruocco V, Pisani M, Ahmed AR. Presence of the autoantibody in healthy relatives of Italian patients with pemphigus vulgaris. Arch Dermatol Res 1993;285 (3):176-7.
- Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, et al. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. J Am Acad Dermatol 1997;36 (1):44-52.
- Torzecka JD, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Waszczykowska E, Lukamowicz J, Pas HH. Detection of pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. Med Sci Monit 2003;9(12):CR528-33.
- Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. Br J Dermatol 2000;143(2) :337-42.
- Kavala M, Kocaturk OE, Demirkesen C, Can B, Zindanci I, Turkoglu Z. Detection of pemphigus autoantibodies in healthy relatives of Turkish patients with pemphigus. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2007;73(4):240-2.
- Torzecka JD, Woźniak K, Kowalewski C, Waszczykowska E, Sysa-Jedrzejowska A, Pas HH, et al. Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development? Arch Dermatol Res 2007;299(5-6):239-43.

24. Uzun S. [Laboratory Diagnosis in Autoimmune Bullous Diseases]. *Dermatose* 2002; 2(1):42-6.
25. Jarzabek-Chorzelska M, Strasz-Kolacińska Z, Sulej J, Jablonska S. The use of two substrates for indirect immunofluorescence in the diagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 2001; 145(1):178-82.
26. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The use of two substrates to improve the sensitivity of indirect immunofluorescence in the diagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 2000;142(6):1135-9.
27. Ng PP, Thng ST, Mohamed K, Tan SH. Comparison of desmoglein ELISA and indirect immunofluorescence using two substrates (monkey oesophagus and normal human skin) in the diagnosis of pemphigus. *Australas J Dermatol* 2005;46(4):239-41.
28. Feibelman C, Stolzner G, Provost TT. Pemphigus vulgaris. Superior sensitivity of monkey esophagus in the determination of pemphigus antibody. *Arch Dermatol* 1981; 117(9):561-2.
29. Joly P, Richard C, Gilbert D, Courville P, Chosidow O, Roujeau JC, et al. Sensitivity and specificity of clinical, histologic, and immunologic features in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43(4):619-26.