

## VALOAREA ȘI UTILITATEA MICROSCOPIEI CONFOCALE DE REFLECTANȚĂ ÎN DERMATOLOGIE

## THE VALUE AND UTILITY OF REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY IN DERMATOLOGY

DANIELA ȘERBAN\*, MARIA MAGDALENA CONSTANTIN\*\*,\*\*

### Rezumat

În sfera dermatologiei, diagnosticul prezumtiv se bazează pe examenul clinic al leziunilor și eventual examenul dermatoscopic, însă confirmarea se realizează doar prin examen histopatologic. Provocarea este stabilirea unui diagnostic cât mai coerent într-un mod cât mai puțin invaziv. Din acest motiv, în ultimii ani, atenția s-a îndreptat asupra tehnicilor non-invazive, iar dintre acestea, microscopia confocală de reflectanță a demonstrat cele mai promițătoare rezultate.

La nivel mondial, melanomul înregistrează o creștere atât în incidență, cât și în mortalitate. În ciuda studiilor continue, melanomul în stadii avansate rămâne în continuare incurabil, soluția cea mai adecvată în acest caz reprezintă detecția precoce cu excizia chirurgicală completă în timp util. Microscopia confocală, efectuată competent, reprezintă astăzi o alternativă valoroasă pentru obținerea unui diagnostic rapid și corect.

**Cuvinte cheie:** microscopie confocală, dermatoscopie, leziuni pigmentare, melanom.

Intrat în redacție: 1.07.2014

Acceptat: 2.09.2014

### Summary

In dermatology, the presumptive diagnosis is based on the clinical examination of lesions and possibly the dermatoscopy examination but the confirmation is only obtained through histopathological examination. The challenge consists of determining a diagnosis as coherent as possible in a manner as non-invasive as possible. For this reason, during the past years, focus has been oriented towards non-invasive techniques and among these, reflectance confocal microscopy has shown the most promising results.

Globally, the melanoma occurrence rate is increasing both as incidence and mortality. Despite ongoing studies, melanoma in advanced stages remains incurable, and the most appropriate solution in this case is the early detection with full surgical excision in due time. Nowadays, appropriately performed confocal microscopy is a valuable alternative for obtaining a rapid and accurate diagnosis.

**Key words:** confocal microscopy, dermatoscopy, pigmented lesions, melanoma.

Received: 1.07.2014

Accepted: 2.09.2014

### 1. Considerații generale

În sfera dermatologiei, diagnosticul prezumtiv se bazează pe examenul clinic al leziunilor și eventual examenul dermatoscopic, însă confirmarea se realizează doar prin examen histo-

\* Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila.  
Carol Davila Medicine and Pharmacy University.

\*\* Clinica II Dermatologie, Spitalul Clinic Colentina – București.  
Dermatology II Clinic, Colentina Hospital - Bucharest.

### 1. General considerations

In dermatology, the presumptive diagnosis is based on the clinical examination of lesions and possibly the dermatoscopy examination but the confirmation is only obtained through

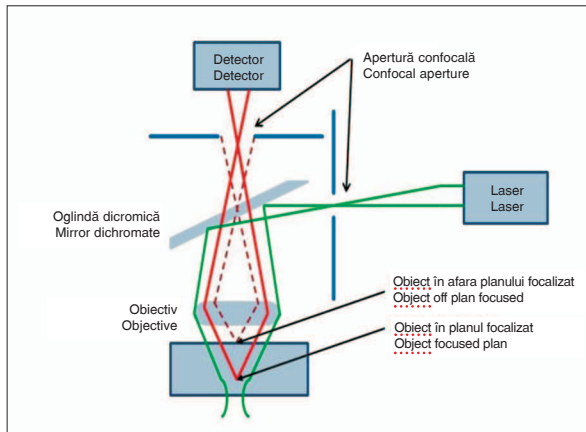


Fig. 1. Principiul microscopiei confocale de reflectanță (Reprodus după: \*Extended Topic\* Microscopy Enhanced by the Wave Characteristics of Light. OpenStax College. [Accesat 15 octombrie 2014]; Disponibil pe: URL: [http://cnx.org/contents/0cc2b3c8-487e-49ea-925f-ff51cb2a0591@2/\\*Extended\\_Topic\\*\\_Microscopy\\_En](http://cnx.org/contents/0cc2b3c8-487e-49ea-925f-ff51cb2a0591@2/*Extended_Topic*_Microscopy_En))

Fig. 1. The principle of reflectance confocal microscopy (Adapted from: \*Extended Topic\* Microscopy Enhanced by the Wave Characteristics of Light. OpenStax College. [Accessed on 15 October 2014]; Available on: URL: [http://cnx.org/contents/0cc2b3c8-487e-49ea-925f-ff51cb2a0591@2/\\*Extended\\_Topic\\*\\_Microscopy\\_En](http://cnx.org/contents/0cc2b3c8-487e-49ea-925f-ff51cb2a0591@2/*Extended_Topic*_Microscopy_En))

patologic. Provocarea este stabilirea unui diagnostic cât mai coerent într-un mod cât mai puțin invaziv. Din acest motiv, în ultimii ani, atenția s-a îndreptat asupra tehnicilor non-invazive, iar dintre acestea, microscopia confocală de reflectanță a demonstrat cele mai promițătoare rezultate.

La nivel mondial, melanomul prezintă o creștere a incidenței și a mortalității. Întrucât melanomul în stadii avansate rămâne în continuare incurabil, soluția cea mai adecvată în acest caz reprezintă detecția precoce cu excizia chirurgicală completă în timp util, însă protocolul diagnosticării leziunilor suspecte de malignitate lasă de cele mai multe ori cicatrici nedorite în urma biopsierii leziunilor benigne.

## 2. Principiul microscopiei confocale de reflectanță

Microscopia confocală de reflectanță este o tehnică de imagistică optică ce utilizează o diodă laser ca și sursă de lumină monocromatică și coerentă care penetrează țesutul și iluminează un punct unic la nivelul acestuia. Lumina de la nivelul secțiunii stimulate luminos se reflectă și trece printr-un filtru, formând astfel imaginea la nivelul detectorului. Acest filtru permite excitația selectivă a unui anumit punct asupra căruia se realizează focusarea și respectiv rejecția luminii reflectate din afara planului focusat. Aceasta permite, spre deosebire de microscopia optică convențională, analiza unor secțiuni obținute în plan bi- sau tri-dimensional și controlul adâncimii de câmp, precum și posibilitatea eliminării artefactelor de focalizare. Contrastul este rezultatul diferențelor indicilor de refracție ai

histopathological examination. The challenge consists of determining a diagnosis as coherent as possible in a manner as non-invasive as possible. For this reason, during the past years, focus has been oriented towards non-invasive techniques and among these, reflectance confocal microscopy has shown the most promising results.

Globally, the melanoma occurrence rate is increasing both as incidence and mortality. As melanoma in advanced stages remains incurable, the most appropriate solution in this case is the early detection with full surgical excision in due time but the diagnosis protocol for lesions suspicious for malignancy often causes undesired scars following the biopsy of benign lesions.

## 2. The principle of reflectance confocal microscopy

The reflectance confocal microscopy is an optical imaging technique that uses a laser diode as monochromatic and coherent source of light which penetrates the tissue and lightens a single point. The light reflected from the stimulated section passes through a filter, thus forming the image in the detector. This filter enables the selective excitation of a certain point in focus and the rejection of light reflected from outside the focal plane. As opposed to traditional optical microscopy, this enables the analysis of sections obtained in bidimensional plane or three dimensions and the control of depth of field, as well as the possibility to remove focus artefacts. Contrast results from the differences in refraction

organitelor celulare și ai microstructurilor ce apar a fi luminoși pe un fond negru (Fig. 1).

### 3. Utilitatea în dermatologie

Microscopia confocală de reflectanță reprezintă unica tehnică ce permite vizualizarea în plan orizontal a pielii până la nivelul dermului superficial (aproximativ 300 μm, la o rezoluție de nivel celular (0,5-1 μm în dimensiunea laterală și 4-5 μm în cea axială)).<sup>1</sup>

În dermatologie, această tehnică are utilitate în diagnostic *in vivo* (VivaScope® 1500, VivaScope® 1500 Multilaser și VivaScope® 3000, Lucid Inc) cât și *ex vivo* (VivaScope® 2500 Multilaser).<sup>2</sup>

Utilizările *in vivo* sunt următoarele:

- Leziuni pigmentare
- Leziuni melanocitare
- Leziuni non-melanocitare
- Controlul marginilor țesuturilor excizate
- Monitorizarea în dinamică a leziunilor

Utilizările *ex vivo* sunt:

- Chirurgie Mohs
- Efectele radiațiilor UV asupra pielii
- Leziuni pigmentare
- Măsurarea grosimii epidermului
- Diagnostic diferențial dermatită alergică vs. dermatită de contact
- Cicatrici și procese asociate vindecării
- Efectele celulitei
- Examinarea firelor de păr

Microscopia confocală de reflectanță are o valoare deosebită în special în diagnosticul leziunilor melanocitare, întrucât melanina și melanosomii reprezintă o sursă puternică de contrast, evidențiind prin această tehnică celulele melanocitare (Fig. 2).<sup>3</sup>

### 4. Protocolul de examinare

Procedura de examinare a unei leziuni cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță este ușoară, rapidă și nedureroasă pentru pacient. Totodată trebuie menționat și faptul că artefactele sunt minime întrucât pielea nu este modificată de această procedură.<sup>1</sup>

Protocolul de examinare cuprinde următorii pași:

indices of cell organelles and of microstructures, as they appear as lightened on a black background (Fig. 1).

### 3. Utility in dermatology

Reflectance confocal microscopy is the only technique enabling horizontal viewing of skin up to the superficial dermis (about 300 μm, with a resolution equal to the cell dimensions (0.5-1 μm in lateral dimension and 4-5 μm in the axial dimension)).<sup>1</sup>

In dermatology, this technique is useful for *in vivo* diagnosis (VivaScope® 1500, VivaScope® 1500 Multilaser and VivaScope® 3000, Lucid Inc) as well as *ex vivo* diagnosis (VivaScope® 2500 Multilaser).<sup>2</sup>

*In vivo* use consists of:

- Pigmented lesions
- Melanocytic lesions
- Non-melanocytic lesions
- Control of excised tissue edges
- Dynamic monitoring of lesions

*Ex vivo* uses are:

- Mohs surgery
- The effects of UV radiations on skin
- Pigmented lesions
- Measurement of epidermis thickness
- Differential diagnosis allergic dermatitis vs. contact dermatitis
- Scars and healing-related processes
- Cellulitis effects
- Hair examination

Reflectance confocal microscopy is very important mainly in the diagnosis of melanocytic lesions because melanin and melanosomes are a powerful contrast source, thus highlighting melanocytic cells (Fig. 2).<sup>3</sup>

### 4. Examination protocol

The examination procedure of a lesion by reflectance confocal microscopy is easy, rapid and painless for the patient. It is also important to mention that artefacts are minimum as skin is not modified by this procedure.<sup>1</sup>

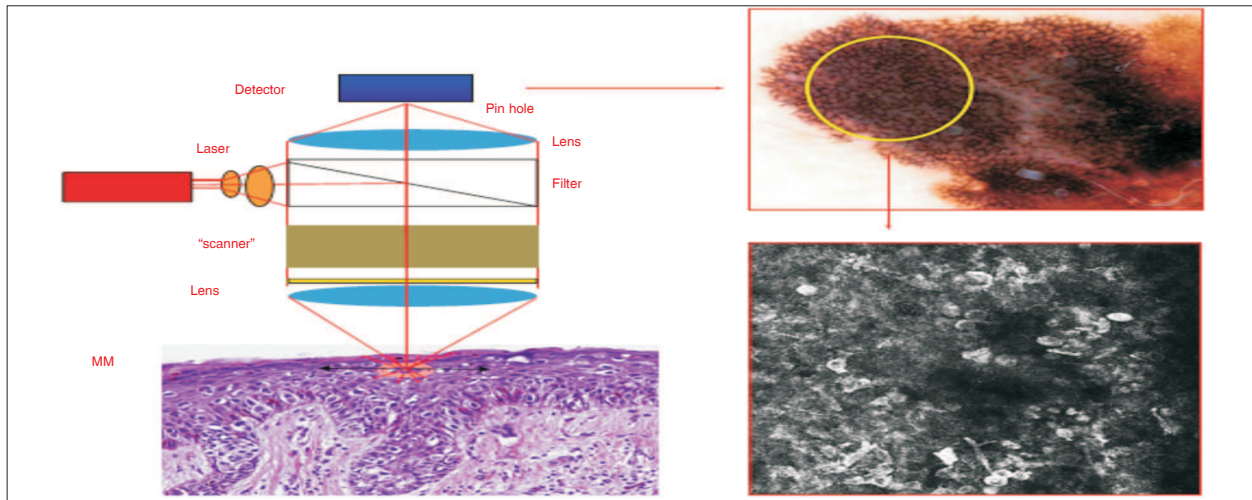


Fig. 2. Examinarea leziunilor melanocitare cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță (Reprodus după: Kolm I. How Reflectance Confocal Microscopy Works. În Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malvehy J, Soyer HP. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 7-10)

Fig. 2. The examination of melanocytic lesions by means of reflectance confocal microscopy (Adapted from: Kolm I. How Reflectance Confocal Microscopy Works. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 7-10)

1. Se introduc principalele date ale pacientului: nume și prenume, vârstă și sediul leziunii
2. Se aplică pe suprafața leziunii un mediu de imersie (ulei sau gel ecografic), cu scopul de a cupla optic fereastra de sticlă sau polimer la piele (indicele de refracție al uleiului = 1,50, o valoare apropiată de cea a stratului cornos = 1,55);
3. Se atașează fereastra de sticlă sau polimer la un inel metalic, după care întreg ansamblul se atașează pielii prin intermediul unei benzi adezive speciale aplicate ferestrei de sticlă sau polimer (împiedică mișcarea imaginii), cu mențiunea că leziunea trebuie să fie centrată de inelul metalic;
4. Se atașează dispozitivului dermatoscopic (VivaCam®) la inelul metalic pentru a obține o imagine dermatoscopică care va putea fi folosită ca și o mapă care va ghida obținerea imaginilor cu ajutorul microscopiei confocale la nivelul subregiunilor leziunii;
5. Se aplică un mediu de imersie lichid (apă sau gel ecografic care are un indice de refracție de 1,3) în interiorul inelului, astfel încât acest mediu de imersie lichid va avea un indice de refracție apropiat de cel al epidermului, reducând astfel aberațiile sferice produse de trecerea razei de lumină prin aer și permițând

The examination protocol comprises the following steps:

1. The main information of the patient are entered: full name, age and the lesion site.
2. An immersion medium (ultrasound oil or gel) is applied on the lesion surface for the purpose of optically coupling the glass or polymer window to the skin (the oil refraction index = 1.50, a value similar to stratum corneum = 1.55);
3. The glass or polymer window is attached to a metal ring and afterwards the entire assembly is attached to skin by means of a special adhesive tape applied on the glass or polymer glass (it prevents image movement), provided that the lesion is centred by the metal ring;
4. The dermatoscopy device (VivaCam®) is attached to the metal ring in order to obtain a dermatoscopy image that can be used as a map to guide the capture of images through confocal microscopy on lesion subregions;
5. A liquid immersion medium (water or ultrasound gel with a refraction index of 1.3) inside the ring, so that this liquid immersion medium will have a refraction index closed to that of the epidermis, thus reducing the



- formarea unei imagini cât mai complete a epidermului și a dermului;
6. Se conectează inelul metalic la obiectivul aparatului de microscopie confocală, cu apariția imaginii real-time de  $500 \times 500 \mu\text{m}$  la nivelul monitorului aparatului de microscopie confocală;
  7. Se inițiază protocolul de obținere a imaginii:
    - 7.1. Prin intermediul funcției de navigare în plan orizontal (x/y) și respectiv vertical (z) se setează punctul de referință  $z = 0$  la nivelul stratului cornos (stratul cu cea mai puternică reflexie luminoasă);
    - 7.2. Se activează funcția automată de obținere a mozaicurilor la trei nivele: stratul granular/spinos ( $z = 30 \mu\text{m}$ ), stratul joncțiunii dermoepidermice ( $z = 60-90 \mu\text{m}$ ) și stratul dermului papilar ( $z = 90-120 \mu\text{m}$ );
    - 7.3. Se recomandă obținerea a patru stack-uri la nivelul centrului leziunii și respectiv alte două sau mai multe la nivelul ariei ce prezintă un interes special.
  8. Prin intermediul funcției *Video capture* se pot obține filmări real-time de tip AVI cu scopul de a înregistra procese dinamice precum curgerea sângelui la nivelul vaselor;
  9. După obținerea înregistrărilor se detașează inelul metalic de piele, se îndepărtează fereastra de sticlă sau de polimer de unică folosință și se îndepărtează gelul ecografic de la nivelul inelului metalic și respectiv de la nivelul pielii (Fig. 3).

O mențiune specială trebuie adusă asupra noțiunilor utilizate în obținerea imaginilor. Prin intermediul VivaScope® 1500 se obțin imagini (*basic image*) de dimensiuni prestabilite într-un plan orizontal (coordonate x,y) de  $500 \times 500 \mu\text{m}$  la o adâncime preselectată (coordonata z). Acestea pot fi vizualizate real-time pe ecranul aparatului, putând fi înregistrate ca și imagini de tip .BMP. Cu ajutorul acestor imagini de bază se pot construi ulterior 3 tipuri înregistrări: *stack*, *mosaic/block* și respectiv *cube*.

Un *stack* reprezintă o secvență de *basic images* obținută la același nivel orizontal (x, y) preselectat, dar la adâncimi diferite(z) selectate de către utilizator (de la  $5 \mu\text{m}$  la  $120 \mu\text{m}$ ).

- spherical aberrations caused by the passage of the light beam through air and enabling to obtain an image as complete as possible of the epidermis and dermis.
6. The metal ring is connected to the lens of the confocal microscopy device, with the real time  $500 \times 500 \mu\text{m}$  image capture on the confocal microscopy device;
  7. The image-capture protocol is initiated:
    - 7.1. By means of the horizontal (x/y) and vertical (z) navigation function, the set point  $z = 0$  is set on the stratum corneum (the layer with the most powerful light reflection);
    - 7.2. The automatic function for obtaining three-level matrix is enabled: the granular/spike layer ( $z = 30 \mu\text{m}$ ), the dermoepidermal junction layer ( $z = 60-90 \mu\text{m}$ ) and the papillary dermis layer ( $z = 90-120 \mu\text{m}$ );
    - 7.3. It is recommended to obtain four stacks in the centre of the lesion and other two or more in the area of special interest.
  8. By means of the *Video capture* function, AVI real time videos can be obtained for to purpose of recording dynamic processes such as blood flow within vessels;
  9. After the records are obtained, the metal ring is detached from the skin, the disposable glass or polymer window is removed and the ultrasound gel is removed from the metal ring and from the skin, respectively (Fig. 3).

Special remarks have to be made on the notions used for obtaining the images. VivaScope® 1500 enables the capture of *basic images* with preset size in an horizontal section (x,y coordinates) of  $500 \times 500 \mu\text{m}$ , at a preset depth (z coordinate). These can be viewed in real time on the device screen and can be recorded as .BMP images. These basic images enable further creation of 3 types of records: *stack*, *mosaic/block* and *cube* respectively.

A *stack* is a sequence of *basic images* obtained on the same preset horizontal level (x, y) but on different depths (z) selected by the user (from  $5 \mu\text{m}$  to  $120 \mu\text{m}$ ).



Fig. 3. Protocolul de obținere a imaginii cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță. (Reprodus după: Wurm E.M.T. A hands-on guide to confocal imaging. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 12)



Fig. 3. The protocol for capturing the image by means of reflectance confocal microscopy. (Adapted from: Wurm E.M.T. A hands-on guide to confocal imaging. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 12)

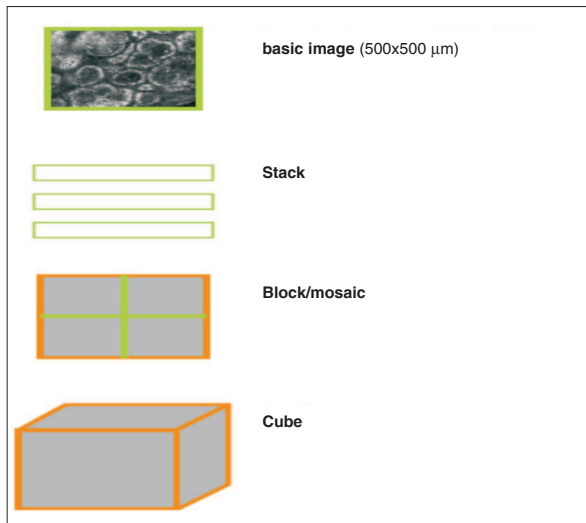


Fig. 4. Tipuri de înregistrări obținute cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță. (Reprodus după: Wurm E.M.T. *A hands-on guide to confocal imaging*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 16)

Fig. 4. Types of records obtained by means of reflectance confocal microscopy. (Adapted from: Wurm E.M.T. *A hands-on guide to confocal imaging*. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 16)

Un *block/mosaic* reprezintă o secvență de rezoluție înaltă de până la 256 de *basic images* obținute la același nivel vertical (z) preselectat, dar la nivelele orizontale diferite (x, y) selectate automat de către programul aparatului. Utilizatorul poate alege în schimb mărimea acestora, care variază de la 1 x 1 mm până la 8 x 8 mm (echivalentul a 2 x 2 până la 16 x 16 de *basic images*).

Un *cube* reprezintă o secvență de *blocks* obținute la diferite adâncimi (z) selectate automat de către programul aparatului (Fig. 4).<sup>1</sup>

## 5. Examinarea leziunilor melanocitare cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță

În fața unei leziuni melanocitare examinarea este aceeași ca pentru orice arie cutanată, respectiv examinarea celor trei straturi: epidermul, joncțiunea dermoepidermică, dermul papilar, având în vedere totodată și caracteristicile tipice ale leziunilor melanocitare. Acestea sunt tipice fiecărui strat examinat după cum urmează:<sup>1</sup>

**5.1 Epidermul superficial:** În ceea ce privește arhitectura generală, la nivelul leziunilor melanocitare pot fi prezente următoarele tipuri de pattern: *cobblestone pattern*, *broadened honeycombed pattern*, *irregular-shaped keratinocytes pattern* sau *disarranged pattern*.

*Cobblestone pattern* poate fi tipic atunci când este alcătuit din celule poligonale de dimensiuni

A *block/mosaic* is a sequence of high resolution up to 256 of *basic images* obtained on the same preset vertical (z) level, but on different horizontal levels (x, y) automatically selected by the device software. But the user can select their size, ranging from 1 x 1 mm up to 8 x 8 mm (the equivalent of 2 x 2 up to 16 x 16 of *basic images*).

A *cube* is a sequence of *blocks* obtained at different depths (z) automatically selected by the device software (Fig. 4).<sup>1</sup>

## 5. The examination of melanocytic lesions by means of reflectance confocal microscopy

The examination of a melanocytic lesion is the same as for any skin area, i.e. the examination of the three layers: epidermis, dermoepidermal junction, papillary dermis, having at the same time the typical features of melanocytic lesions. These are specific to each examined layer, as follows:<sup>1</sup>

**5.1 The superficial epidermis:** Regarding the overall architecture, the following types of patterns on melanocytic lesions can occur: *cobblestone pattern*, *broadened honeycombed pattern*, *irregular-shaped keratinocytes pattern* or *disarranged pattern*.

*Cobblestone pattern* can be typical when it consists of small size polygonal cells, with



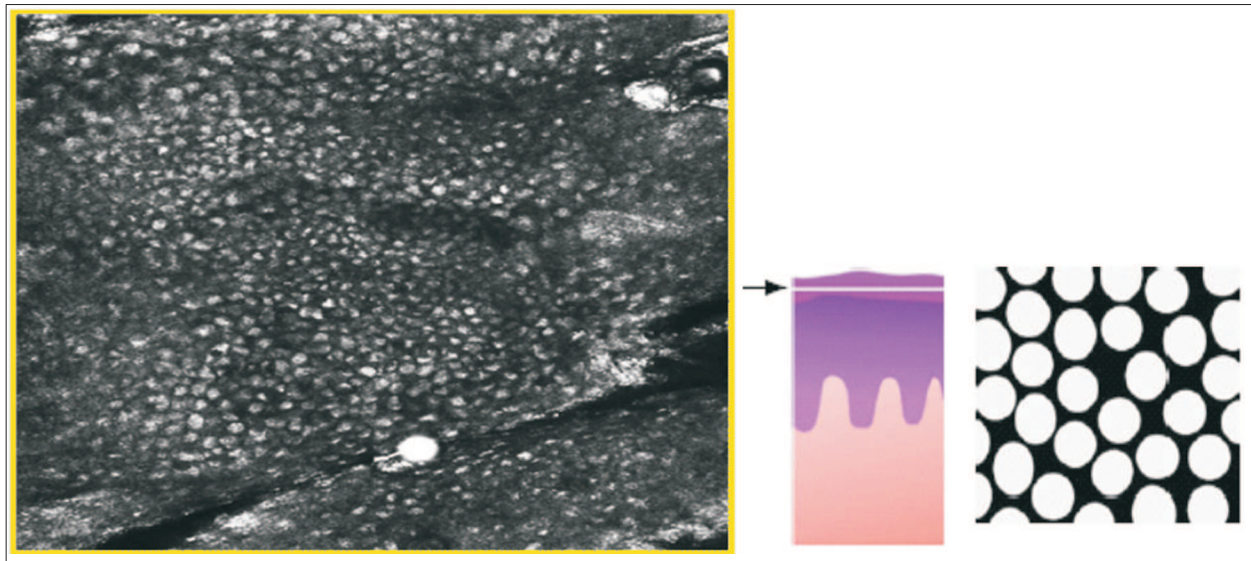


Fig. 5. Epiderm superficial, aspect în microscopia confocală de reflectanță: Cobblestone pattern (Reprodus după Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 42)

Fig. 5. Superficial epidermis, appearance in reflectance confocal microscopy: Cobblestone pattern (Adapted from Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 42)

mici, cu o citoplasmă refractivă, care sunt separate de margini mai puțin refractile și *atipic* atunci când există iregularitate în mărimea și/sau refractilitatea celulelor (Fig. 5).<sup>4</sup>

*Honeycombed pattern* este de două tipuri: *tipic* fiind alcătuit din celule poligonale de dimensiuni reduse, având nuclei nerefractili și citoplasmă refractivă în cantități reduse care delimitează celulele sau *atipic* atunci când se descriu neregularități în mărimea celulelor și în grosimea conturilor. O formă specială este *broadened honeycombed pattern* care este asemănător formei tipice, cu deosebirea că spațiile intercelulare refractive sunt de dimensiuni mai mari.

*Irregular-shaped keratinocytes pattern* descrie o structură alcătuită din keratinocite cu neregularități atât în mărime cât și în formă.

Absența patternului honeycombed sau cobblestone cu o dezorganizare a arhitecturii straturilor superficiale epidermice, alcătuite din particule și celule refractive cu o distribuție asimetrică este definită sub forma *patternului disarranged*.

*Celulele pagetoide* sunt o entitate caracteristică a leziunilor maligne, însă pot fi întâlnite într-o

refractive cytoplasm and *atypical* when cell size and/or refractivity are irregular (figure 5).<sup>4</sup>

*Honeycombed pattern* has two types: *typical* consisting of small size polygonal cells, with non-refractory nuclei and refractory cytoplasm in low quantities which confines cells, and *atypical* when irregularities occur in cell size and contour thickness. A special form is the *broadened honeycombed pattern* which is similar to the typical form except that the refractory intercellular spaces are larger.

*Irregular-shaped keratinocytes pattern* describes a structure consisting of keratinocytes both size and shape irregular.

The absence of the honeycombed or cobblestone pattern with a dislocation of epidermal superficial layer architecture, consisting of refractory particles and cells with an asymmetrical distribution is defined as *disarranged pattern*.

*Pagetoid cells* are a specific entity of malignant lesions but they can also be found less frequently in some benign lesions. These are large cells, with highly refractory cytoplasm and non-refractory



mai mică măsură și la nivelul unor leziuni benigne. Acestea sunt celule de dimensiuni mari, cu o citoplasmă intens refractivă și cu un nucleu excentric nefractil ce se întâlnesc tipic la nivelul epidermului superficial. Din punct de vedere morfologic se descriu două tipuri de astfel de celule: rotunde și dendritice. *Celule pagetoide rotunde* sunt întâlnite în special la nivelul melanomului, deși un procent redus se întâlnesc și la nivelul nevilor Spitz/Reed. *Celulele pagetoide dendritice* au o valoare diagnostică mai redusă deoarece pot fi fie melanocite ce se răspândesc superficial într-un tipar pagetoid, fie celule Langerhans. *Pleomorfismul* reprezintă variabilitatea în morfologia celulelor pagetoide, acestea fiind prezente atât în forma rotundă, cât și în cea dendritică și/sau acestea pot avea o formă bizară. Un alt aspect important este densitatea celulară care poate fi „mică” atunci când sunt prezente < 5 celule/mm<sup>3</sup>, „medie” atunci când sunt 5-10 celule/mm<sup>3</sup> sau „mare” atunci când sunt mai mult de >10 celule/mm<sup>3</sup>. În ceea ce privește distribuția acestor celule, se definește a fi „localized” atunci când sunt concentrate într-o porțiune limitată a leziunii, „sparse” atunci când acestea sunt distribuite sub forma unor foci la nivelul leziunii și respectiv „widespread” atunci când sunt răspândite la nivelul întregii leziuni. Distribuția de tip „localized” poate fi întâlnită și la nivelul unor nevi Spitz sau a unor nevi atipici, în timp ce „widespread” denotă prezența unui melanom.

**5.2 Joncțiunea dermoepidermică și dermul papilar:** Analiza unei leziuni melanocitare începe cu descrierea arhitecturii generale. La nivelul acesteia se descriu următoarele patternuri:

*Ringed pattern* descrie o structură alcătuită din inele refractive ce corespund papilelor înconjurate de celulele bazale refractive, cu mențiunea că spațiile interpapilare sunt subțiri.

*Meshwork pattern* descrie o structură asemănătoare celei de mai sus cu deosebirea că papilele au dimensiuni mai mici și nu sunt delimitate de inele refractive, iar spațiul interpapilar este îngroșat.

*Clod pattern* este alcătuit din structuri ovalare dense, constituite din cuiburi de melanocite situate la nivelul dermului papilar.

*Non-specific pattern* descrie o structură care nu corespunde niciuneia de mai sus. Fig. 7

eccentric nucleus that are typically found on the superficial epidermis. From a morphological point of view, two types of cells are described: round and dendritic. *Round pagetoid cells* are mainly found in the melanoma, although a few of them are also found in Spitz/Reed naevi. *Dendritic pagetoid cells* have a lower diagnosis value as they can be either melanocytes superficially distributed in a pagetoid pattern or in Langerhans cells. *Pleomorphism* is variability in pagetoid cell morphology, and they are either round or dendritic and/or they can have a strange shape. Another important issue is the cell density that can be “low” when < 5 cells/mm<sup>3</sup> are present, “average” when 5-10 cells/mm<sup>3</sup> are present or “high” when >10 cells/mm<sup>3</sup> are present. Regarding the distribution of these cells, they are defined as “localized” when they are concentrated in a limited area of the lesion, “sparse” when they are distributed as foci in the lesion and “widespread” when they are distributed on the entire lesion. “Localized” distribution can also be found on Spitz or atypical naevi, while “widespread” distribution indicates the presence of a melanoma.

**5.2 Dermoepidermal junction and papillary dermis:** The analysis of a melanocytic lesion starts with the description of the general architecture. The following patterns are found on this:

*Ringed pattern* describes a structure consisting of refractory rings corresponding to papillae surrounded by refractory basic cells, mentioning that interpapillary spaces are thin.

*Meshwork pattern* describes a structure similar to the above structure with the difference that the papillae are smaller and are not confined by refractory rings and the interpapillary area is thickened.

*Clod pattern* consists of dense oval structures comprising melanocyte nests located in the papillary dermis.

*Non-specific pattern* describes a structure not corresponding to any of the above. Fig. 7

Based on the description of the general architecture, the features of dermal papillae contours are described below. There are two

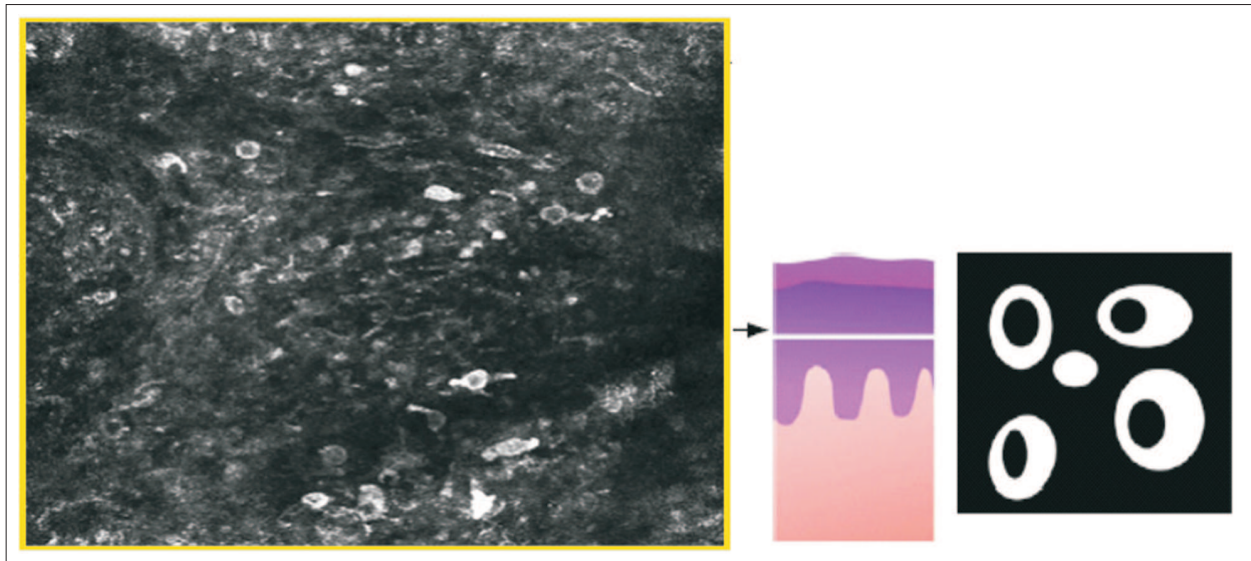


Fig. 6. Epiderm superficial, aspect în microscopia confocală de reflectanță: Celule pagetoide rotunde (Reprodus după Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 44)

Fig. 6. Superficial epidermis, appearance in reflectance confocal microscopy: Round pagetoid cells (Adapted from Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 44)

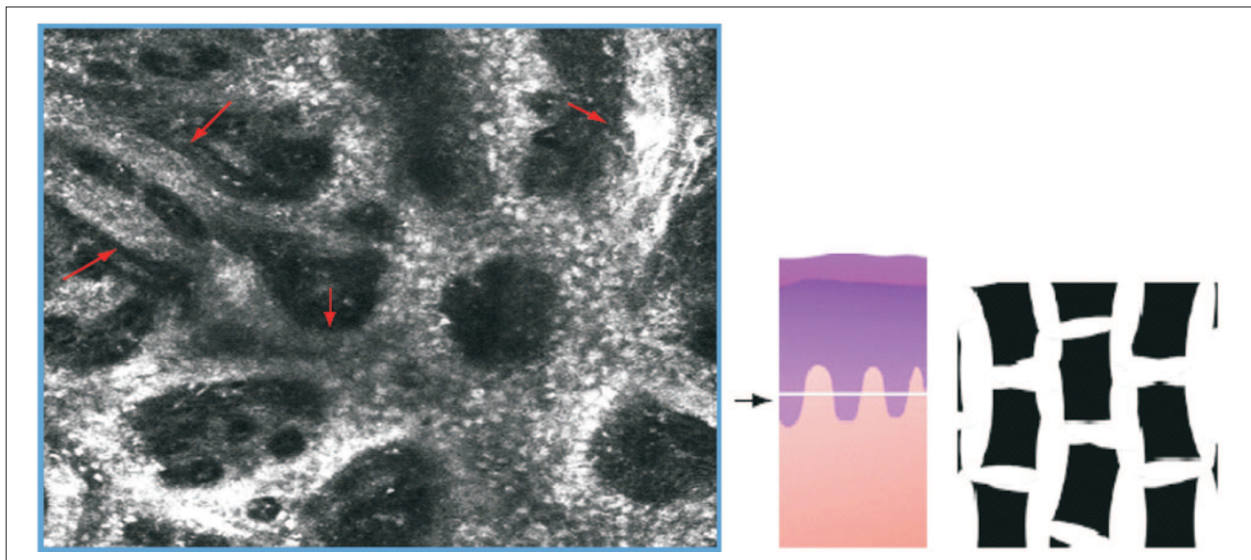


Fig. 7. Jonctiune dermoepidermică, aspect în microscopia confocală de reflectanță: Meshwork pattern (Reprodus după Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 47)

Fig. 7. Dermoepidermal junction, appearance in reflectance confocal microscopy: Meshwork pattern (Adapted from Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 47)

După descrierea arhitecturii generale, în continuare se descriu caracteristicile contururilor papilelor dermice. Acestea pot fi de două tipuri: *edged papillae*, care descriu papilele dermice cu un contur clar alcătuit dintr-un șir de celule refractive și respectiv *non-edged papillae*, atunci când papilele dermice nu sunt însoțite de același contur complet, acesta fiind alcătuit din celule solitare sau din agregate de celule. Atunci când papilele dermice nu sunt vizibile, termenul de *non-visible papillae* este folosit. De menționat existența celor două forme la nivelul aceleiași leziuni, în acest caz denumirea fiind *edged & non-edged papillae*.

*Junctional nests* este o altă caracteristică utilizată în descrierea structurilor întâlnite la nivelul joncțiunii dermoepidermice. Acestea reprezintă agregate celulare ovalare compacte, fiind alcătuite din celule care se află în conexiune directă cu stratul bazal, care bombează la nivelul papilelor dermice sau măresc spațiul interpapilar. Se descriu două tipuri de *junctional nests*: *homogenous junctional nests*, care nu conțin celule atipice, fiind caracteristice leziunilor benigne și respectiv *non-homogeneous junctional nests* ce conțin celule atipice, fiind întâlnite la nivelul nevilor atipici și a melanomului.

Agregatele celulare refractive rotund-ovalare alcătuite din cuiburi melanocitare în microscopia confocală de reflectanță poartă numele de *dermal nests*. În funcție de aspectul acestora se descriu trei tipuri: *dense nests*, *dense & sparse nests* și *cerebriform nests*. *Dense nests* descrie agregate compacte cu margini bine definite și cu celule omogene în morfologie și în gradul de refractivitate. *Dense & sparse nests* corespund agregatelor cu margini mai prost definite, alcătuite din celule care nu aderă la cuibul celular. Acestea se pot întâlni atât la nivelul nevilor congenitali, când sunt de dimensiuni mari și alcătuite din celule mari rotunde monomorfe, cât și la nivelul melanomului, atunci când mărimea cuiburilor este variabilă, fiind alcătuite predominant din celule pleomorfe. *Cerebriform nests* sunt alcătuite din agregate celulare cu un aspect asemănător creierului, cu „fisuri” tipice hiporefective. Celulele de la nivelul acestor agregate au margini prost definite și o refractivitate scăzută, cu o citoplasmă granulară, fără nuclei evidenți. Sunt rar întâlnite, fiind

tipuri: *edged papillae*, descriind dermal papillae with a clear contour consisting of a row of refractory cells and *non-edged papillae* respectively, when dermal papillae do not have the same complete contour, consisting of solitary cells or cell aggregates. When dermal papillae are not visible, the *non-visible papillae* term is used. It is important to mention that two forms are found in the same lesions, called *edged & non-edged papillae*.

*Junctional nests* is another feature used to describe the structures found in the dermoepidermal junction. These are compact oval cell aggregates as they consist of cells directly connected to the basic layer protruding at the level of dermal papillae or they increase the interpapillary space. There are two types of *junctional nests*: *homogenous junctional nests*, not containing atypical cells, specific to benign lesions and *non-homogeneous junctional nests* respectively, containing atypical cells and found in atypical naevi and in the melanoma.

Round-oval refractory cell aggregates consisting of melanocyte nests in reflectance confocal microscopy are called *dermal nests*. Depending on their appearance, there are three types: *dense nests*, *dense & sparse nests* and *cerebriform nests*. The term *Dense nests* describes compact aggregates with clearly defined edges and homogenous cells in the morphology and in the refractoriness degree. *Dense & sparse nests* correspond to aggregates with poorer edges, consisting of cells outside the cell nest. These can be found in the congenital naevi when they are large sized and consisting of monomorphic round large cells, as well as in the melanoma, when the nest size varies, as they predominantly consist of pleomorphic cells. *Cerebriform nests* consist of cell aggregates with an appearance similar to the brain, with hyporefective typical “cracks”. Cells in these aggregates have poorly defined edges and a low refractivity, with a granular cytoplasm, no obvious nuclei. These are rarely found as they are mainly located in the nodular component of the melanoma. Fig. 8

Cells found in the epidermal-dermal passage and associated in the same plan but not forming nests form the structure called *cells in sheet-like*.



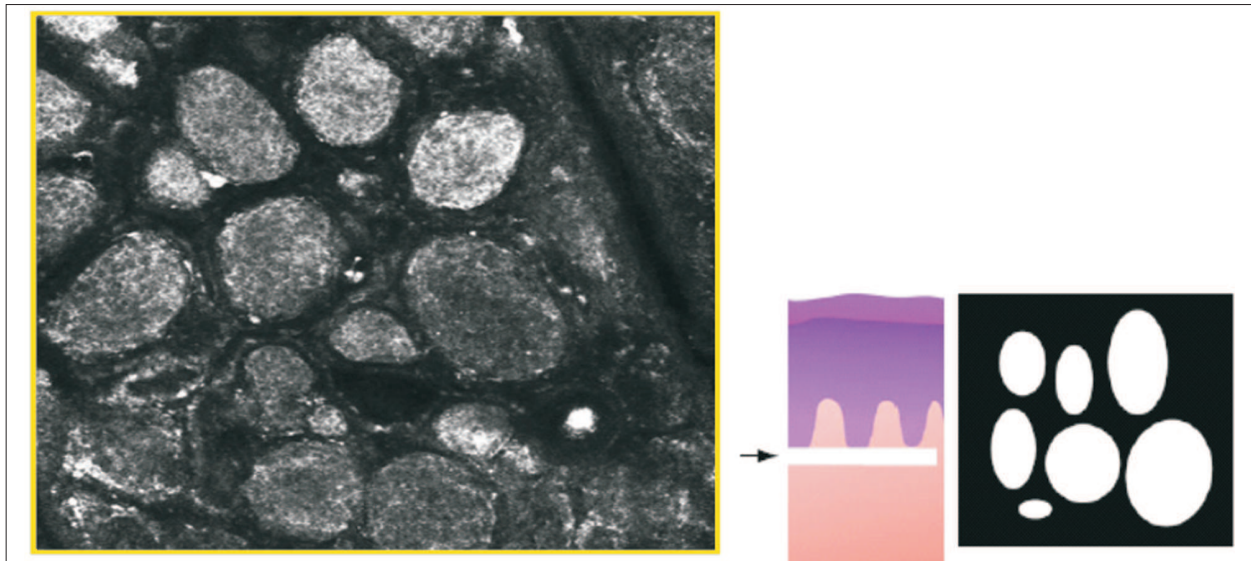


Fig. 8. Dermul papilar, aspect în microscopia confocală de reflectanță: Dense nests. (Reprodus după Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 53)

Fig. 8. Papillary dermis, appearance in reflectance confocal microscopy: Dense nests. (Adapted from Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 53)

localizate în special la nivelul componentei nodulare a melanomului. Fig. 8

Celulele care se găsesc la nivelul tranziției epidermo-dermice și se asociază în același plan, dar nu formează cuiburi alcătuiesc structura numită *cells in sheet-like*. Aceste celule sunt de obicei pleomorfe, având o citoplasmă intens refractivă.

*Celulele atipice* au dimensiuni mari, cu o formă rotund-ovalară sau dendritică, bine delimitate, cu o citoplasmă refractivă și cu un nucleu evident nerefractiv care se găsesc la nivelul joncțiunii dermoepidermice. Acestea reprezintă echivalentul melanocitelor atipice întâlnite mai frecvent la nivelul leziunilor maligne, deși prezența acestora la nivelul leziunilor benigne nu este complet exclusă, în acest caz numărul acestora este redus, cu o morfologie monoformă. În descrierea acestora, următorii parametri sunt importanți: aspectul, numărul și distribuția. În ceea ce privește aspectul, se notează existența a două tipuri de morfologii: "roundish-polygonal" sau "dendritic-spindled". Pleomorfismul se definește ca fiind variabilitatea în morfologia acestor celule, fiind caracterizată de prezența ambelor tipuri de morfologii și/sau prezența

These cells are usually pleomorphic, with a highly refractory cytoplasm.

*Atypical cells* are large, round-oval or dendritic shape, well confined, with refractory cytoplasm and a non-refractory obvious nucleus, found in the dermoepidermal junction. They are the equivalent of atypical melanocytes more frequently found in malignant lesions, although their presence in benign lesions is not entirely excluded, in this case their number is reduced, with a monofom morphology. The following parameters are important in their description: appearance, number and distribution. Regarding the appearance, there are two types of morphologies: "roundish-polygonal" or "dendritic-spindled". Pleomorphism is defined as the variability in the morphology of these cells, being characterized by the presence of both types of morphologies and/or the presence of cells with strange shapes. Another important issue is the cell density that can be "low", when  $< 5$  cells/mm<sup>3</sup> are present, "average" when 5-10 cells/mm<sup>3</sup> are present or "high" when  $> 10$  cells/mm are present<sup>3</sup>. Regarding the distribution of



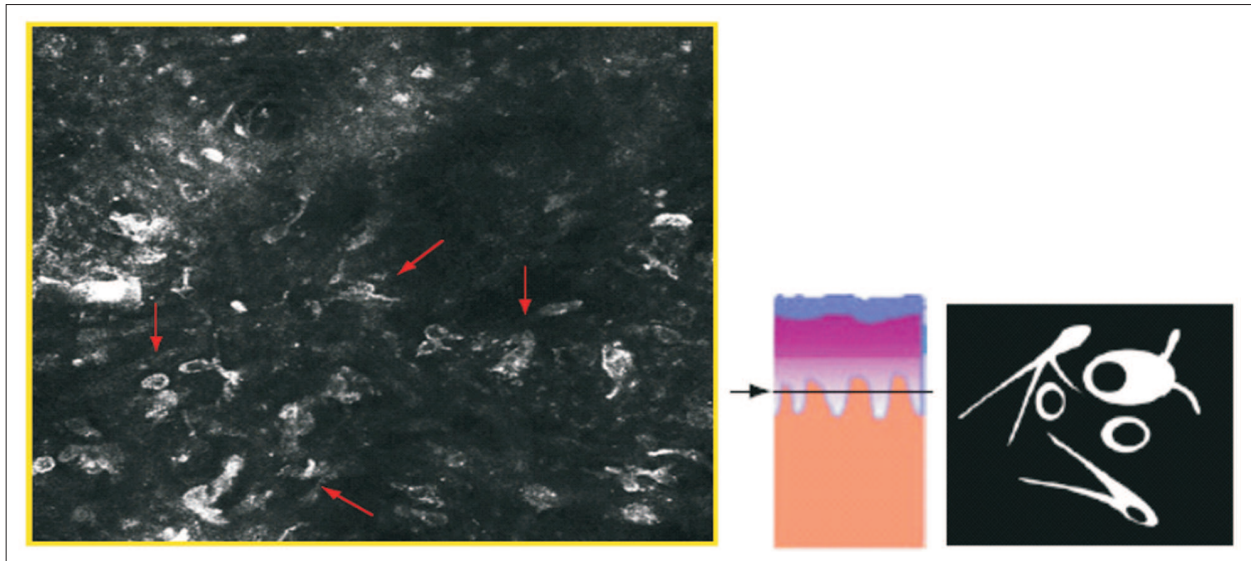


Fig. 9. Dermul papilar, aspect în microscopia confocală de reflectanță: Celule atipice pleomorifice (Reprodus după Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 56)

Fig. 9. Papillary dermis, appearance in reflectance confocal microscopy: Pleomorphic atypical cells (Adapted from Ferrari B. *Semiology and pattern analysis in melanocytic lesions*. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Springer; 2012. p. 56)

unor celule cu forme bizare. Un alt aspect important este densitatea celulară care poate fi „mică” atunci când sunt prezente  $< 5$  celule/ $\text{mm}^3$ , „medie” atunci când sunt 5-10 celule/ $\text{mm}^3$  sau „mare” atunci când sunt mai mult de  $> 10$  celule/ $\text{mm}^3$ . În ceea ce privește distribuția acestor celule, se definește a fi „localized” atunci când sunt concentrate într-o porțiune limitată a leziunii, „sparse” atunci când acestea sunt distribuite sub forma unor foci la nivelul leziunii și respectiv „widespread” atunci când sunt răspândite la nivelul întregii leziuni. În plus, un alt parametru important este și organizarea acestor celule la nivelul joncțiunii dermoepidermice, acestea putând fi întâlnite fie individual fie în agregate celulare, cu sau fără infiltrarea papilelor dermice. Fig. 9

Infiltrarea leucocitară este tradusă în microscopia confocală de reflectanță prin prezența fie a *plump bright cells*, care se descriu a fi celule refractive cu formă neregulată și margini prost definite, fără un nucleu vizibil, fie *small bright particles* care sunt celule mici cu o citoplasmă intens refractivă și cu nuclei vizibili.

Fibrele de collagen de la nivelul dermului papilar sunt denumite *coarse collagen structures* și

these cells, they are defined as “localized” when they are concentrated in a limited area of the lesion, “sparse” when they are distributed as foci in the lesion and “widespread” when they are distributed on the entire lesion. Moreover, another important parameters is the organization of these cells in the dermoepidermal junction, as they can be found in cell aggregates, with or without infiltration of dermal papillae. Fig. 9

Leukocyte infiltration is translated in reflectance confocal microscopy through the presence of either *plump bright cells*, which are refractory cells with irregular shape and poor confined edges, without a visible nucleus, or *small bright particles* which are cells with highly refractory cytoplasm and with visible nuclei.

Collagen fibres in the papillary dermis are called *coarse collagen structures* and they occur as fibrillary amorphous material with distribution either reticular or fascicular.

It is also possible to see in the papillary dermis the presence of *vessels* and their relationship with the melanocytic lesion with malignancy suspicion is very important.

apar sub forma unui material amorf fibrilar cu o distribuție fie reticulată, fie fasciculată.

Tot la nivelul dermului papilar se poate observa prezența *vaselor*, iar relația acestora cu leziunea melanocitară suspectă a fi malignă este foarte importantă.

## 6. Aspectele melanomului în cadrul analizei cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță

Fiecare subtip de melanom are propriile caracteristici epidemiologice, clinice, dermoscopice și histopatologice. În urma cercetărilor științifice s-au identificat și caracteristicile specifice microscopiei confocale de reflectanță, astfel încât specificitatea diagnosticului pre-biopsie este în creștere. Leziunile maligne diferă de cele maligne în principal prin următoarele caracteristici: infiltrare pagetoidă, arhitectură generală dezorganizată la nivelul joncțiunii dermo epidermice, prezența celulelor melanocitare atipice la nivelul stratului bazal și dermului papilar, prezența agregatelor celulare dermice sub formă de cerebriform nests. S-a propus un model de diagnostic ce necesită identificarea a 6 parametri, independent corelați cu diagnosticul de melanom. Astfel prezența a cel puțin doi parametri, unul major și unul minor (**scor  $\geq 3$** ) susține diagnosticul de melanom.

**Criteriile majore** sunt valorificate cu câte 2 puncte fiecare și sunt următoarele: prezența celulelor atipice la nivelul joncțiunii dermoepidermice și respectiv conturul papilar de tip non-edged papillae.

**Criteriile minore** sunt valorificate în schimb cu câte un punct fiecare, acestea fiind: prezența celulelor pagetoide rotunde, infiltrare pagetoidă de tip „widespread”, agregate dermice de tip cerebriform nests și respectiv prezența celulelor atipice nucleate la nivelul dermului superficial.<sup>5</sup> Fig. 10

## 7. Concluzii

Stabilirea unui diagnostic cât mai coerent într-un mod cât mai puțin invaziv, este foarte necesară, în acest caz microscopia confocală de reflectanță demonstrând cele mai promițătoare rezultate. Microscopia confocală de reflectanță poate contribui la confirmarea diagnosticului

## 6. The aspects of melanoma within the analysis performed by means of reflectance confocal microscopy

Each subtype of melanoma has its own epidemiological, clinical, dermoscopic and histopathological features. The scientific research enabled the identification of features specific of reflectance confocal microscopy, so that the pre-biopsy diagnosis specificity is increasing. Benign lesions differ from malignant lesions mainly regarding the following characteristics: pagetoid infiltration, disordered general architecture on the dermoepidermal junction, presence of atypical melanocytic cells in the basic layer and in the papillary dermis, the presence of dermal cell aggregates as cerebriform nests. A diagnosis model was proposed requiring the identification of 6 parameters, independently correlated with the melanoma diagnosis. Thus, the presence of at least two parameters, a major and a minor one (**score  $\geq 3$** ) supports the melanoma diagnosis.

**Major criteria** are scored with 2 points each and are as follows: the presence of atypical cells in the dermoepidermal junction and the non-edged papillae papillary contour, respectively.

**Minor criteria** are scored with 1 point each and they are: the presence of round pagetoid cells, “widespread” pagetoid infiltration, cerebriform nests dermal aggregates and the presence of atypical nucleated cells in the superficial dermis.<sup>5</sup> Fig. 10

## 7. Conclusions

Determining a diagnosis as coherent as possible in a manner as non-invasive as possible is very necessary and reflectance confocal microscopy demonstrates the most promising results in this case. Reflectance confocal microscopy can contribute to confirmation of the clinical-dermatoscopic diagnosis, **the increase of confidence** and the reduction of the number of useless surgical excisions in these patients and **the increase of specificity**. Thus, according to the information in literature, it was determined that reflectance confocal microscopy enhances the accuracy of diagnosis both in pigmented

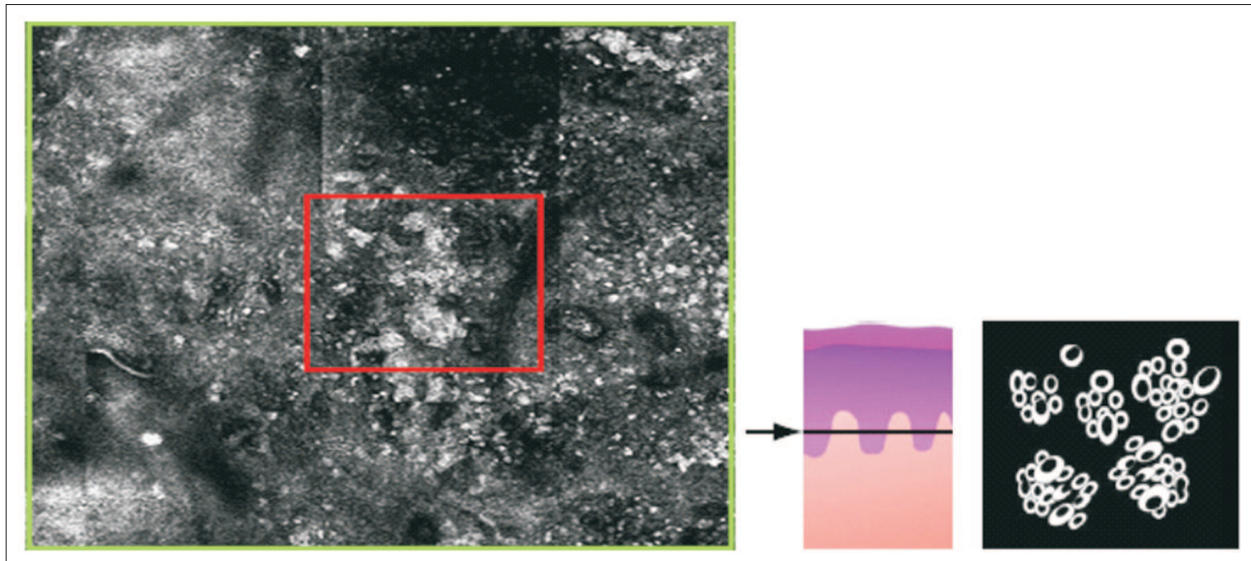


Fig. 10. Melanom nodular: săgețile proliferare celulară cu formarea structurilor de tip sheet-like, asociată cu formarea agregatelor celulare neomogene, cu o neovascularizație crescută (Reprodus după Malvehy J. Nodular melanoma. În Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 201)  
 Fig. 10. Nodular melanoma: cell proliferation arrows with the formation of sheet-like structures, connected with the formation of non-homogenous cell aggregates, with increased neovascularization (Adapted from Malvehy J. Nodular melanoma. In Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012. p. 201)

clinico-dermatoscopic (**creșterea confidenței**) și la reducerea numărului de excizii chirurgicale inutile la acești pacienți (**creșterea specificității**). Astfel conform datelor din literatură s-a stabilit că microscopia confocală de reflectanță crește acuratețea diagnosticului atât în cazul leziunilor melanocitare pigmentare, cât și în cazul celor hipopigmentare/apigmentare. În cazul leziunilor melanocitare pigmentate, specificitatea oferită de microscopia confocală de reflectanță față de dermoscopie este semnificativ superioară ( $p < 0,001$ ), însă sensibilitatea nu prezintă diferențe semnificative ( $p = 0,81$ ), dermoscopia prezentând astfel o sensibilitate de 91% și o specificitate de 31%, în timp ce microscopia confocală de reflectanță prezintă o sensibilitate de 92% și o specificitate de 65%. În ceea ce privește diagnosticul leziunilor melanocitare hipopigmentare/apigmentare s-a constatat că microscopia confocală de reflectanță prezintă o creștere semnificativă în specificitate în raport față de leziunile pigmentare ( $p < 0,05$ ); de asemenea s-a constatat o creștere semnificativă ( $p < 0,001$ ) a specificității diagnosticului de melanom pentru

melanocytic lesions and in hypopigmented/nonpigmented lesions. Regarding pigmented melanocytic lesions, the specificity provided by reflectance confocal microscopy against dermoscopy is highly superior ( $p < 0.001$ ), but sensitivity has no significant differences ( $p = 0.81$ ), and thus dermoscopy has a 91% sensitivity and a 31% specificity while reflectance confocal microscopy has a 92% sensitivity and a 65% specificity. Regarding the diagnosis of hypopigmented/nonpigmented melanocytic lesions, it was noticed that reflectance confocal microscopy has a significant increase in terms of specificity against pigmented lesions ( $p < 0.05$ ); it was also observed a significant increase ( $p < 0.001$ ) of specificity of melanoma diagnosis for these lesions provided by reflectance confocal melanoma compared with dermoscopy, without any significant changes on sensitivity ( $p = 0.09$ ) so that dermoscopy provides a 61.5% sensitivity and a 39% specificity while reflectance confocal microscopy provides a 85% sensitivity and a 84% specificity.<sup>6</sup>

aceste leziuni conferită de microscopia confocală de reflectanță comparativ cu dermoscopia, fără modificări semnificative asupra sensibilității ( $p = 0,09$ ), astfel încât dermoscopia asigură o sensibilitate de 61,5% și o specificitate de 39%, în timp ce microscopia confocală de reflectanță asigură o sensibilitate de 85% și o specificitate de 84%.<sup>6</sup>

La nivel mondial, melanomul înregistrează o creștere atât în incidență, cât și în mortalitate. În ciuda studiilor continue, melanomul în stadii avansate rămâne în continuare incurabil, soluția cea mai adecvată în acest caz reprezintă detecția precoce cu excizia chirurgicală completă în timp util.

Globally, the melanoma occurrence rate is increasing both as incidence and mortality. Despite ongoing studies, melanoma in advanced stages remains incurable, and the most appropriate solution in this case is the early detection with full surgical excision in due time.

## Bibliografie/Bibliography

1. Hofmann-Wellenhof R., Pellacani G., Malvehy J., Soyer, H.P. Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases. Springer; 2012.
2. MAVIG VivaScope [online]. [Accesat 15 octombrie 2014]; Disponibil pe: URL:<http://www.vivascope.de/en/confocal-laser-scanning-microscopy.html>
3. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R. H., Anderson R. R. (1995). In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(6), 946–52.
4. In vivo reflectance confocal microscopy [online]. [Accesat 1 februarie 2015]; Disponibil pe: <http://www.skinconfocalmicroscopy.org/tutorial.php>
5. Pellacani G., Cesinaro A. M., Seidenari S. (2005). Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions—improvement in melanoma diagnostic specificity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(6), 979–85. doi:10.1016/j.jaad.2005.08.022.
6. Guitera P., Pellacani G., Longo C., Seidenari S., Avramidis M., & Menzies S. W. (2009). In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), 131–8. doi:10.1038/jid.2008.193.