



## Confocale microscopie met toepassing voor de kliniek

P.E.J van Erp<sup>1</sup>, R.J.B. Driessen<sup>2</sup>, S.F.K. Lubeek<sup>2</sup>

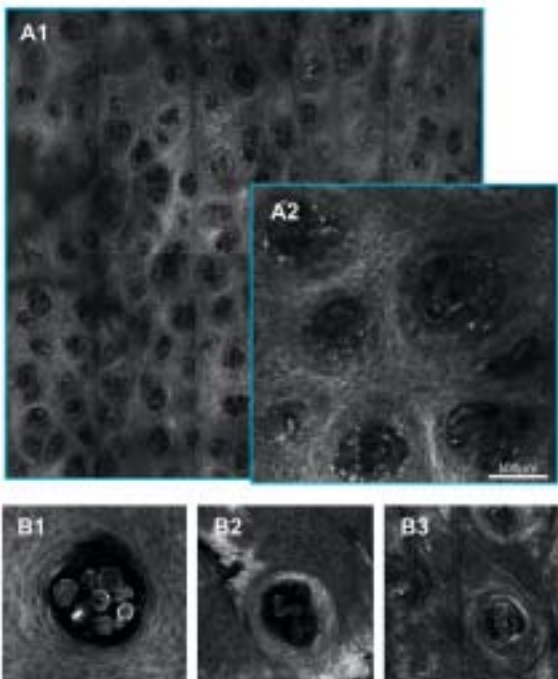
Morfologische karakterisering van de huid speelt een belangrijke rol in de klinische dermatologie voor diagnose en ook voor monitoring van behandelingseffecten. In de afgelopen jaren zijn niet-invasieve beeldvormingstechnieken ontwikkeld die morfologische kenmerken van de huid onthullen die niet met het blote oog zichtbaar zijn, wat de diagnostische nauwkeurigheid kan verbeteren. Onder deze nieuwe niet-invasieve huidbeeldvormingsinstrumenten (bijvoorbeeld optische coherente tomografie, hoogfrequente echografie) valt *in vivo* reflectie confocale microscopie (RCM) op door de hoge, bijna-histologische resolutie. Hoewel oorspronkelijk ontwikkeld om de diagnose van melanocytaire huidlaesies te verbeteren [1,2], ging de interesse in Nijmegen uit naar twee andere dermatologische deelgebieden, non-melanoma huidkanker en inflammatoire huidziekten. [3] Om deze reden beperkt deze publicatie zich tot RCM-toepassingen voor deze twee onderwerpen (figuur 1 en 2).

### RCM TECHNOLOGIE

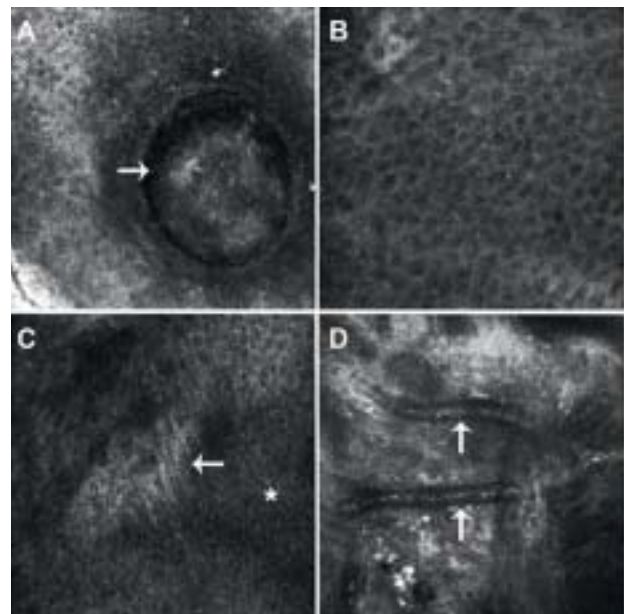
RCM is een methode, waarmee optisch de micromorfologie van de huid kan worden onderzocht. Met deze techniek is het mogelijk om non-invasief, real-time, de huid tot in het bovenste gedeelte van de reticulair dermis te bekijken. [4]

De beelden worden *en face* gepresenteerd met een resolutie

die vergelijkbaar is met conventionele lichtmicroscopie (resolutie 0,5  $\mu\text{m}$ ). RCM heeft echter voordelen boven conventionele microscopie. Door het niet-invasieve karakter is RCM patiëntvriendelijk. Daarnaast kan de gehele laesie worden gescand, zodat de kans op een sampling error kleiner is. Tevens is de uitslag direct bekend, waardoor de therapie meteen kan worden gestart. De niet-invasieve werkwijze maakt RCM ook geschikt voor de follow up. [5,6]



*Figuur 1. Kenmerken van inflammatoire huidaandoeningen zichtbaar gemaakt met RCM. Psoriasis wordt onder andere gekenmerkt door een toename van het aantal papillen (A1) en infiltrerende witte bloedcellen (A2). Kenmerkend voor rosacea zijn de demodex mijten in en rondom de haarfollikels (B1-B3).*



*Figuur 2. Typische kenmerken van het (nodulaire) BCC kunnen duidelijk worden waargenomen met behulp van RCM. Tumornesten, met aan de randen een spleting ('cleft', pijl) (A); spongiose en cellulaire atypie (B); Streaming van de keratinocyten (pijl) naast normale epidermis (ster) (C); Toegenomen vascularisatie (pijlen) (D).*

<sup>1</sup> Onderzoeker, afdeling Dermatologie, Radboud universitair medisch centrum, Nijmegen

<sup>2</sup> Dermatoloog, afdeling Dermatologie, Radboud universitair medisch centrum, Nijmegen

## RCM EN PSORIASIS

Vanwege de klinische ervaring en morfologische kennis in Nijmegen was psoriasis de eerste huidaandoening die in Nijmegen via RCM werd onderzocht. [7] Na een aantal observationele studies werd een klinische implementatiestrategie ontwikkeld, gefocust op psoriasis. [8,9] Via een praktisch RCM-protocol werd psoriasis gediagnosticeerd en stabiele en instabiele plaques gedifferentieerd. Het vier-fase-model dat werd gebruikt, bestond uit een exploratieve fase, een systematische literatuurstudie, een klinische benadering en uiteindelijk een integratiefase voor de ontwikkeling van een klinische richtlijn voor RCM toegepast bij psoriasis. Het praktische protocol was gebaseerd op verschillende stappen. Allereerst werd de psoriasis laesie geselecteerd met daarbij een goede positionering van de patiënt. Daarna werd de locatie binnen de plaque bepaald en de metalen ring geplaatst. Vervolgens werd met de geïntegreerde macroscopische camera (VivaCam) een dermatoscopische foto gemaakt en uiteindelijk werd de RCM-probe vastgemaakt aan de metalen ring voor een gestandaardiseerde beeldopname. Deze strategie is niet alleen bruikbaar voor psoriasis, maar zou als een algemeen RCM-model voor andere dermatologische entiteiten kunnen fungeren. [10]

## RCM EN ROSACEA

Rosacea is een andere inflammatoire huidziekte waarbij RCM toegevoegde waarde kan hebben, omdat laesies in het gezicht voorkomen. We onderzochten de waarde van RCM voor de monitoring van rosacea tijdens een behandelingskuur van 16 weken met ivermectine. [11] Behandeling resulteerde in klinische vermindering van inflammatoire laesies, enige verbetering van erytheem, terwijl teleangiëctasieën voornamelijk onaangetast bleven. Een duidelijke afname van het aantal mijten, het aantal geïnfecteerde follikels en het aantal mijten per follikel werd berekend met behulp van RCM-evaluatie. De meeste follikels bevatten echter nul mijten en het percentage follikels met een onduidelijk gehalte was hoger dan de follikels met duidelijk zichtbare mijten. Er werden geen duidelijke veranderingen in ontstekingscellen, epidermale dikte, vaatdiameter en vaatdichtheid waargenomen. Bovendien was de correlatie tussen het aantal inflammatoire laesies en mijten laag en geen van de RCM-variabelen waren significante voorspellers voor klinisch succes. Daarom lijkt de RCM in zijn huidige vorm helaas niet geschikt voor het snel monitoren van rosaceapatiënten in de dagelijkse praktijk.

## RCM EN NON-MELANOMA HUIDKANKER

Ook voor de diagnostiek van non-melanoma huidkanker en met name het basaalcelcarcinoom werd de mogelijk toepassing van RCM onderzocht. Het vermogen om een BCC te subtyperen via biopsie is beperkt omdat deze tumor relatief vaak van het mixed type is, waardoor de kans op sampling error groot is. Initieel onderzoek toonde aan dat het mogelijk is om met RCM het BCC-subtype te bepalen. [12] De typische kenmerken zoals perifere palissadering en tumornesten bestaande uit basaloïde cellen waren duidelijk waarneembaar. De eerste observationele onderzoeken suggereerden dat RCM bij BCC een duidelijke meerwaarde zou kunnen hebben, vooral bij het diagnosticeren van mixed type-tumoren omdat de gehele tumor

kan worden afgescand. Dat kan een sampling error voorkomen.

Deze initiële veelbelovende resultaten vormden de basis voor een multicenter random gecontroleerde trial [13,14] waarin werd onderzocht of de juiste diagnose en subtype non-invasief zou kunnen worden bepaald met RCM bij patiënten met een klinisch vermoeden op een primaire BCC, in een klinische setting (academisch en perifeer), waarbij RCM werd vergeleken met het stansbiopt.

- 1) Hierbij is niet alleen de diagnose basaalcelcarcinoom, maar ook de groeiwijze van de tumor van belang.
- 2) Daarnaast was de vraag wat de invloed van gebruik van de techniek was op de kwaliteit van leven en tevredenheid van patiënten.
- 3) En tot slot wat de financiële consequenties van eventuele implementatie zouden zijn.

Het beoogde doel (bij positieve uitkomst van de klinische studie) was implementatie van de techniek in de kliniek. Patiënten met een klinisch vermoeden van een primair BCC werden gerandomiseerd (RCM of biopsie). Chirurgische excisie of follow-up waren de referentiestandaarden. Sensitiviteit en specificiteit voor BCC-diagnose en subtypering werden berekend voor beide groepen. BCC subtype werd ingedeeld op basis van klinische relevantie: agressief (infiltratief / micronodulair) versus niet-agressief (oppervlakkig / nodulair) histopathologisch subtype en oppervlakkig versus niet-oppervlakkige BCC. Gegevens over patiënttevredenheid en voorkeuren werden verzameld met behulp van een vragenlijst en een 'contingent valuation method'. De sensitiviteit voor BCC-diagnose was hoog en vergelijkbaar voor beide methoden. Specificiteit voor BCC-diagnose en de sensitiviteit voor agressieve BCC-subtypes waren allebei lager voor de RCM-groep. De sensitiviteit voor niet-oppervlakkige BCC was niet significant verschillend tussen biopsie- en RCM-groep. Patiënttevredenheid en voorkeuren waren goed en zeer vergelijkbaar voor beide methoden. Deze resultaten geven duidelijk aan dat de standaardbiopsie beter presteert dan RCM bij het diagnosticeren en subtyperen van het primaire BCC. Dit resultaat ondersteunt niet de routinematige klinische implementatie van RCM, als vervanging van het stansbiopt, in deze patiëntengroep en op dit moment. In sommige subsets patiënten (veel oppervlakkige BCC) of grote lastig af te grenzen laesies kan RCM wellicht wel een zinvolle techniek zijn. Daarnaast zullen we door verbeteringen of aanpassingen van de techniek in de toekomst, implementatie opnieuw moeten overwegen.

## CONCLUSIE

Het niet-invasieve karakter, de potentieel lage kans op een sampling error, de snelheid van diagnostiek en de mogelijkheid van follow-up van huidaandoeningen en therapieën zullen wellicht in de toekomst bepalend zijn voor een duidelijke positiestelling van RCM als diagnostische techniek binnen de dermatologie voor huidkanker en inflammatoire dermatosen, naast het conventionele pathologisch onderzoek. Recent onderzoek laat zien dat implementatie van RCM in de klinische praktijk voor de diagnostiek van het basaalcelcarcinoom nog te prematuur is.

## SAMENVATTING

In vivo confocale reflectie microscopie is een optische beeldverwerkingstechniek met veel potentie voor morfologische karakterisering van de huid. Doordat RCM niet invasief is en dezelfde locatie meerdere keren gescand kan worden, maakt dat de techniek erg geschikt voor monitoring van huidveranderingen in normale en pathologische huid in vivo. In een recente multicenter random gecontroleerde trial werd onderzocht of de juiste diagnose en subtype zou kunnen worden bepaald met RCM bij patiënten met een klinisch vermoeden op een primair BCC, in een klinische setting (academisch en perifeer), waarbij RCM werd vergeleken met het stansbiopt. Het stansbiopt blijft de voorkeur houden, omdat het een superieure nauwkeurigheid biedt voor diagnose en subtypering. De beperkte dieptepenetratie van RCM en relatief lange leercurve voor de interpretatie van de beelden, maakt dat implementatie van deze techniek voor de diagnostiek van non-melanoma huidkanker in de klinische praktijk op dit moment wordt afgeraden.

## TREFWOORDEN

in vivo Reflectie Confocale Microscopie – beeldvorming – huid morfologie – psoriasis – rosacea – non-melanoma huidkanker

## SUMMARY

In vivo confocal reflection microscopy is an optical imaging technique with great potential for morphological character-

ization of the skin. Because RCM is not invasive and the same location can be scanned multiple times, this makes the technique very suitable for monitoring skin changes in normal and pathological skin in vivo. A recent multicenter randomized controlled trial investigated whether the correct diagnosis and subtype could be determined with RCM in patients with a clinically suspected primary BCC, in a clinical setting (academic and peripheral), comparing RCM with the punch biopsy. The punch biopsy remains preferred as it provides superior accuracy for diagnosis and sub-typing. The limited penetration depth of RCM and relatively long learning curve for the interpretation of the images makes implementation of this technique for the diagnosis of non-melanoma skin cancer in clinical practice too premature.

## KEYWORDS

in vivo Reflection Confocal Microscopy – imaging – skin morphology – psoriasis – rosacea, non-melanoma skin cancer

## Financieringsbronnen

De multicenter random gecontroleerde trial werd gefinancierd door ZonMw, de Nederlandse Organisatie voor Gezondheidsonderzoek en Ontwikkeling. Mavig GmbH ondersteunde het project door de beeldvormingsapparatuur te leveren. Beide partijen hadden geen invloed op het verzamelen van gegevens, analyse, voorbereiding van manuscripten en publicatiebesluiten.

## LITERATUUR

1. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. In vivo confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology. *Br J Dermatol*. 2005;152(2):384-6.
2. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions—improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(6):979-85.
3. Wolberink E. Noninvasive diagnostics and therapy monitoring using in vivo reflectance confocal microscopy. D: Thesis Radboudumc, Nijmegen; 2016.
4. Peppelman M. Non-invasive in vivo imaging of the skin by reflectance confocal microscopy: applications in skin pathology and skin-material interactions: Thesis Radboudumc, Nijmegen; 2015.
5. Peppelman M, van den Eijnde WAJ, Jaspers EJ, Gerritsen M-JP, van Erp PEJ. Combining tape stripping and non-invasive reflectance confocal microscopy: an in vivo model to study skin damage. *Skin Res Technol*. 2015;21(4):474-84.
6. Peppelman M, Wolberink EAW, Gerritsen M-JP, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ. Application of leukotriene B<sub>4</sub> and reflectance confocal microscopy as a noninvasive in vivo model to study the dynamics of skin inflammation. *Skin Res Technol*. 2015;21(2):232-40.
7. Wolberink EAW, van Erp PEJ, Teussink MM, van de Kerkhof PCM, Gerritsen MJP. Cellular Features of Psoriatic Skin: Imaging and Quantification Using In Vivo Reflectance Confocal Microscopy. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2011;80B(3):141-9.
8. Wolberink EAW, van Erp PEJ, de Boer-van Huizen RT, van de Kerkhof PCM, Gerritsen MJP. Reflectance confocal microscopy: an effective tool for monitoring ultraviolet B phototherapy in psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 2012;167(2):396-403.
9. Hoogedoorn L, Gerritsen MJP, Wolberink EAW, Peppelman M, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ. A four-phase strategy for the implementation of reflectance confocal microscopy in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2016;30(8):1308-14.
10. Hoogedoorn L. Implementation of in vivo reflectance confocal microscopy in routine Dutch patient care: Radboudumc, Nijmegen; 2016.
11. Logger JGM, Peppelman M, van Erp PEJ, de Jong E, Nguyen KP, Driessen RJB. Value of reflectance confocal microscopy for the monitoring of rosacea during treatment with topical ivermectin. *J Dermatolog Treat*. 2020;1-9.
12. Peppelman M, Wolberink EAW, Blokk WAM, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ, Gerritsen MJP. In vivo diagnosis of basal cell carcinoma subtype by reflectance confocal microscopy. *Dermatology*. 2013;227(3):255-62.
13. Peppelman M, Nguyen KP, Alkemade HAC, Maessen-Visch B, Hendriks JCM, van Erp PEJ, et al. Diagnosis of basal cell carcinoma by reflectance confocal microscopy: study design and protocol of a randomized controlled multicenter trial. *Jmir Res Protoc*. 2016;5(2).
14. Woliner-van der Weg W, Peppelman M, Elshot Y, Visch M, Crijns M, Alkemade H, et al. Biopsy outperforms reflectance confocal microscopy in diagnosing and subtyping basal cell carcinoma: results and experiences from a randomized controlled multicenter trial. *Br J of Dermat*. 2020; accepted for publication.

## CORRESPONDENTIEADRES

Piet E.J. van Erp

E-mail: piet.vanerp@radboudumc.nl