

Application of reflectance confocal microscopy in the diagnosis of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus

Zastosowanie refleksyjnej mikroskopii konfokalnej w diagnostyce pęcherzycy zwykłej i pęcherzycy liściastej

Marta Kurzeja

Department of Dermatology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Katedra i Klinika Dermatologiczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

Dermatol Rev/Przegl Dermatol 2022, 109, 122–129

DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2022.117982>

ABSTRACT

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE/
ADRES DO KORESPONDENCJI:

Marta Kurzeja
Katedra i Klinika Dermatologiczna
Warszawski Uniwersytet
Medyczny
Warszawa, Polska
e-mail: mkurzejaderm@gmail.com

Reflectance confocal microscopy is a non-invasive diagnostic method that enables real-time visualization of tissues in near-histological resolution. Pemphigus is a chronic autoimmune skin disease in which intra-epidermal blisters are formed as a result of acantholysis, i.e., loss of connection between epidermal cells. A systematic review of the literature on the use of reflectance confocal microscopy in the diagnosis of pemphigus has been carried out in this paper. Reflectance confocal microscopy enables identification of intra-epidermal acantholytic blisters in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. The method also enables to identify the localization of blisters – the spinous layer in pemphigus vulgaris, and in the granular layer in pemphigus foliaceus. Thus, reflectance confocal microscopy may allow establishing non-invasively an initial diagnosis of pemphigus and differentiating pemphigus vulgaris from pemphigus foliaceus.

Key words: pemphigus foliaceus, pemphigus vulgaris, reflectance confocal microscopy.

STRESZCZENIE

Refleksyjna mikroskopia konfokalna jest nieinwazyjną metodą diagnostyczną umożliwiającą wizualizację tkanek w czasie rzeczywistym. Pęcherzyca jest przewlekłą autoimmunizacyjną chorobą skóry przebiegającą z tworzeniem się śródskórkowych pęcherzy w wyniku akantolizy, czyli utraty łączności pomiędzy komórkami naskórka. W niniejszej pracy został dokonany systematyczny przegląd piśmiennictwa dotyczącego zastosowania refleksyjnej mikroskopii konfokalnej w diagnostyce pęcherzyc. Refleksyjna mikroskopia konfokalna umożliwia identyfikację śródskórkowych, akantolitycznych pęcherzy u pacjentów z pęcherzycą zwykłą i liściastą. Metoda ta pozwala także na ustalenie dokładnej lokalizacji pęcherzy: w pęcherzycy zwykłej w warstwie kolczystej, a w pęcherzycy liściastej w warstwie ziarnistej. Na tej podstawie można nieinwazyjnie ustalić wstępne rozpoznanie pęcherzycy i odróżnić pęcherzycę zwykłą od liściastej.

Słowa kluczowe: pęcherzyca liściasta, pęcherzyca zwykła, refleksyjna mikroskopia konfokalna.

INTRODUCTION

Reflectance confocal microscopy (RCM) is a modern, non-invasive diagnostic method that allows visualization of tissues in real time [1–3]. At present, reflectance confocal microscopy is used primarily in the diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin neoplasms [4–7]. In addition, there are also more and more publications on the use of RCM in the diagnosis of inflammatory diseases such as allergic contact dermatitis, psoriasis [8], chronic cutaneous lupus erythematosus [9], and subacute lupus erythematosus [10]. In recent years, numerous studies have also been published on the possibility of using RCM in the diagnosis of pemphigus [11, 12].

REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY

Reflectance confocal microscopy is a non-invasive diagnostic method that enables visualization of single cells within the epidermis and upper dermis with near-histological resolution and high contrast [1–3]. The assumption of confocal microscopy is to eliminate light coming from outside the focal plane. Achieving this effect is possible thanks to the use of a diaphragm with a small hole placed in front of the detector [13]. As a consequence, light reflected from structures above and below the examined tissue fragment is cut off and does not participate in the image formation, which significantly increases its contrast and sharpness (fig. 1). The confocal microscope allows obtaining an image of thin layers of the examined tissue fragment at a specific depth, i.e., the so-called optical sections of the preparation [14]. In the confocal microscope, the point light source, the illuminated specimen point, and aperture the diaphragm lie in the focal length of the lens (in confocal planes), hence the name of this method [13, 14].

In a RCM, a laser is used as a point source of light. The light beam is focused on a fragment of the examined object the size of a few micrometers [15, 16]. Then the light is reflected and, through the optical system, returns to the detector recording the intensity of laser radiation. Signal from the detector is sent to a computer and converted into two-dimensional black and white images [17, 18]. In RCM, image is created due to the difference in the value of refractive indexes of individual cell structures, as the laser beam is reflected at the border of cell structures with different refractive index [19–21].

Reflectance confocal microscopy enables visualization of single cells within the skin with near-histological resolution and high contrast. Contrary to the histopathological examination, RCM examination is non-invasive and does not require prior tissue preparation or staining [15]. RCM offers the possibility

WPROWADZENIE

Refleksyjna mikroskopia konfokalna (*reflectance confocal microscopy* – RCM) jest nowoczesną, nieinwazyjną metodą badawczą pozwalającą na wizualizację tkanek w czasie rzeczywistym [1–3]. Obecnie refleksyjna mikroskopia konfokalna wykorzystywana jest przede wszystkim w diagnostyce melanocytowych i niemelanocytowych nowotworów skóry [4–7]. Ponadto istnieją również coraz liczniejsze publikacje dotyczące zastosowania RCM w diagnostyce chorób zapalnych, takich jak alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, łuszczyca [8], ogniskowy toczeń rumieniowaty [9] oraz podostry toczeń rumieniowaty [10]. Ostatnio opublikowano także liczne artykuły na temat możliwości zastosowania RCM w diagnostyce pęcherzycy [11, 12].

REFLEKSYJNA MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Refleksyjna mikroskopia konfokalna jest nieinwazyjną metodą diagnostyczną umożliwiającą wizualizację pojedynczych komórek w obrębie naskórka i górnej części skóry właściwej z prawie histologiczną rozdzielczością oraz wysokim kontrastem [1–3]. Założeniem mikroskopii konfokalnej jest wyeliminowanie światła pochodzącego spoza płaszczyzny ogniskowania, uzyskanie tego efektu jest możliwe dzięki zastosowaniu przesłony z małym otworem umieszczonej przed detektorem [13]. W konsekwencji światło odbite od struktur leżących powyżej oraz poniżej badanego fragmentu tkanki jest odcinane i nie bierze udziału w tworzeniu obrazu, co znacznie zwiększa jego kontrast i ostrość (ryc. 1). Mikroskop konfokalny umożliwia uzyskanie obrazu cienkich warstw badanego fragmentu tkanki na określonej głębokości, czyli tzw. przekrojów optycznych preparatu [14]. W mikroskopie konfokalnym punktowe źródło światła, oświetlony punkt preparatu oraz przesłona z otworkiem leżą w ogniskowych soczewki (w płaszczyznach konfokalnych), stąd wywodzi się nazwa tej metody [13, 14].

W RCM punktowym źródłem światła jest laser. Wiązka światła jest skupiana na fragmencie badanego obiektu wielkości kilku mikrometrów [15, 16]. Następnie światło ulega odbiciu i poprzez system optyczny powraca do detektora rejestrującego natężenie promieniowania laserowego. Z detektora sygnał przekazywany jest do komputera i przetwarzany na dwuwymiarowe czarno-białe obrazy [17, 18]. W RCM obraz powstaje dzięki różnicy w wysokości wskaźników refrakcji poszczególnych struktur komórkowych, wiązka promieniowania laserowego zostaje bowiem odbita na granicy struktur komórkowych o różnym wskaźniku refrakcji [19–21].

Refleksyjna mikroskopia konfokalna umożliwia wizualizację pojedynczych komórek w obrębie skóry z prawie histologiczną rozdzielczością oraz wy-

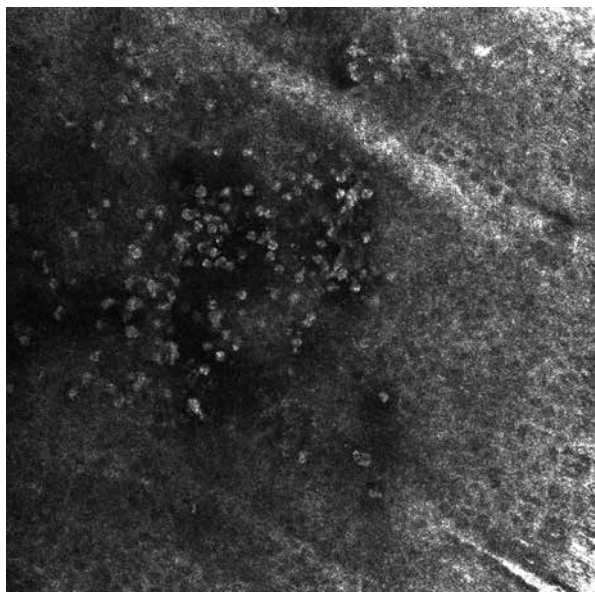


Figure 1. Bright, round acantholytic cells 14 to 17 μm in size in the intraepidermal blister localized in the spinous layer of the epidermis of the patient with PV

Rycina 1. Jasne, okrągłe komórki akantolityczne wielkości od 14 do 17 μm w obrębie śródskórnego pęcherza zlokalizowanego w warstwie kolczystej naskórka u pacjenta z PV

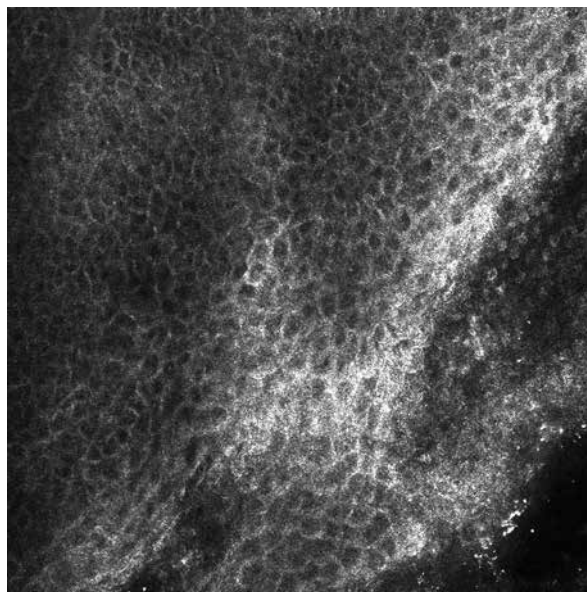


Figure 2. Intraepidermal blister containing acantholytic cells in the granular layer of the epidermis in a patient with PF

Rycina 2. Śródskórnego pęcherza zawierający komórki akantolityczne w warstwie ziarnistej naskórka u pacjenta z PF

of both real-time *in vivo* and *ex vivo* imaging of the skin. Optical cross-sections of the skin obtained by RCM correspond to horizontal cross-sections of individual layers of the epidermis or dermis at a specific depth [22].

In the reflectance confocal microscope Vivascope 1500 and Vivascope 3000 (Lucid Rochester, New York) a diode laser with a wavelength of 830 nm and a maximum power of 35 mW was used, and a 30 times magnification lens with a numerical aperture of 0.9 [1–3]. Penetration depth ranges from 200 to 350 μm , which enables visualization of the epidermis and of upper layers of the dermis. The microscope resolution is from 0.5 to 1 μm in the transverse plane and from 3 to 5 μm in the axial plane [15, 16].

PEMPHIGUS VULGARIS AND PEMPHIGUS FOLIACEUS

Pemphigus is a chronic autoimmune skin disease, in which intra-epidermal blisters are formed as a result of acantholysis, i.e., loss of connection between epidermal cells. Antibodies in pemphigus are directed against keratinocyte antigens – desmogleins (Dsg) and are present both in the serum as so-called circulating antibodies, as well as in tissues as bound antibodies [23, 24]. There are two classic types of pemphigus: pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus, which differ in clinical symptoms, histopathological presentation and immune profile [25, 26].

sokim kontrastem. W przeciwieństwie do badania histopatologicznego badanie wykonywane RCM jest nieinwazyjne i nie wymaga wcześniejszego przygotowania lub barwienia tkanek [15]. RCM umożliwia obrazowanie skóry zarówno w czasie rzeczywistym *in vivo*, jak i *ex vivo*. Przekroje optyczne skóry uzyskane metodą RCM odpowiadają horyzontalnym przekrojom poszczególnych warstw naskórka lub skóry właściwej na określonej głębokości [22].

W refleksyjnym mikroskopie konfokalnym Vivascope 1500 i Vivascope 3000 (Lucid Rochester, Nowy Jork) został zastosowany laser diodowy o długości fali 830 nm i maksymalnej mocy 35 mW oraz obiektyw powiększający 30 razy o aperturze numerycznej 0,9 [1–3]. Głębokość penetracji wynosi od 200 do 350 μm , co umożliwia wizualizację naskórka i górnych warstw skóry właściwej. Rozdzielczość mikroskopu wynosi od 0,5 do 1 μm w płaszczyźnie poprzecznej oraz od 3 do 5 μm w płaszczyźnie osiowej [15, 16].

PĘCHERZYCA ZWYKŁA I LIŚCIASTA

Pęcherzyca jest przewlekłą autoimmunizacyjną chorobą skóry przebiegającą z powstawaniem śródskórnymi pęcherzy w wyniku akantolizy, czyli utraty łączności pomiędzy komórkami naskórka. Przeciwciała w pęcherzycy są skierowane przeciw antygenom keratynocytów – desmogleinom (Dsg) – i występują zarówno w surowicy jako tzw. przeciwciała krążące, jak i w tkankach jako przeciwciała

APPLICATION OF REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY

Reflectance confocal microscopy is a new diagnostic method that allows non-invasive imaging of the epidermis and upper dermis with near-histological accuracy [2]. Therefore, analysis of RCM presentation of skin diseases focus on features known from histopathological data. A characteristic histopathological feature of pemphigus is the presence of intra-epidermal acantholytic blisters [24]. In PV, acantholysis is located in the spinous layer of the epidermis, while in the foliaceus variety, acantholysis is present within the granular layer [27, 28]. Therefore, in pemphigus features of acantholysis and intra-epidermal vesicles are sought by RCM.

One of the first studies on the presentation of pemphigus in RCM was the work of Angelova-Fischer *et al.*, in which, on the example of two patients with pemphigus foliaceus, RCM features of pemphigus was described in existing skin lesions, as well as in the skin lesions induced mechanically by rubbing the skin around blister. In all cases, the authors found intra-epidermal blisters located in the granular layer of the epidermis *in vivo*. No abnormalities in the spinous layer and in the basal layer were observed. There were also bright acantholytic cells present inside blisters, but no inflammatory cells [29].

Another publication was the work of Levi *et al.*, in which pictures of skin lesions obtained by RCM in 2 patients with pemphigus foliaceus and 3 patients with pemphigus vulgaris were presented [30]. The authors found that intra-epidermal blisters appeared in RCM cross-sections as dark structures, color of which was caused by lower laser light reflection by the blister fluid than by the surrounding tissue. They also showed that in 2 patients with pemphigus foliaceus, there were blisters the cover of which was located in the stratum corneum and the bottom in the spinous layer. According to these authors, in the case of the PV, blister cover was located in the granular or spinous layer, while the bottom was located near the papillary layer of the dermis. However, this study did not report presence of any acantholytic cells in optical sections of skin lesions examined by RCM in any of pemphigus vulgaris patients [30].

Koehler *et al.* described 1 patient with pemphigus vulgaris who was examined with a RCM [31]. In RCM optical sections, the authors observed intra-epidermal blisters located in the upper part of the spinous layer and just above the basal layer. Location of these blisters was determined on the basis of the morphology of the epidermis in the vicinity of the skin lesion. This study also described presence of clear, oval cells inside blisters in a pemphigus vulgaris patient, but the

związane [23, 24]. Istnieją dwie klasyczne odmiany pęcherzycy: pęcherzyca zwykła oraz pęcherzyca liściasta, które różnią się objawami klinicznymi, obrazem histopatologicznym oraz profilem immunologicznym [25, 26].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

Refleksyjna mikroskopia konfokalna jest nową metodą diagnostyczną, która pozwala na nieinwazyjne obrazowanie naskórka i górnej części skóry właściwej z prawie histologiczną dokładnością [2]. W związku z tym badania nad obrazem RCM chorób skóry skupiają się na cechach znanych z danych histopatologicznych. Charakterystyczną cechą histopatologiczną pęcherzycy jest obecność śródskórkowych, akantolitycznych pęcherzy [24]. W pęcherzycy zwykłej akantoliza jest zlokalizowana w warstwie kolczystej naskórka, natomiast w odmianie liściastej akantoliza jest obecna w obrębie warstwy ziarnistej [27, 28]. Dlatego w badaniach nad obrazem RCM w pęcherzycy koncentrowano się nad poszukiwaniem akantolizy i pęcherzy śródskórkowych.

Jedną z pierwszych prac dotyczącą obrazu pęcherzycy w RCM była praca Angelovej-Fischer i wsp., w której na przykładzie 2 pacjentów z pęcherzycą liściastą opisano obraz RCM istniejących już zmian skórnych, jak również wywołanych mechanicznie poprzez potarcie skóry w otoczeniu pęcherza. Autorzy we wszystkich przypadkach stwierdzili obecne *in vivo* śródskórkowe pęcherze zlokalizowane w warstwie ziarnistej naskórka. Nie obserwowano natomiast żadnych nieprawidłowości w warstwie kolczystej oraz w warstwie podstawnej. Wewnątrz pęcherzy były widoczne także jasne komórki akantolityczne, nie uwidoczniono natomiast komórek stanu zapalnego [29].

Kolejną publikacją była praca Leviego i wsp., w której przedstawiono obraz zmian skórnych uzyskanych metodą RCM u 2 pacjentów z pęcherzycą liściastą oraz 3 pacjentów z pęcherzycą zwykłą [30]. Autorzy stwierdzili, że śródskórkowe pęcherze widoczne są na przekrojach RCM jako ciemne struktury, ponieważ światło lasera ulega odbiciu z mniejszą siłą od płynu w obrębie pęcherza niż od otaczających tkanek. Wykazali oni także, że u 2 pacjentów z postacią liściastą pęcherzycy widoczne były pęcherze, których pokrywa była zlokalizowana w warstwie rogowej naskórka, natomiast dno w warstwie kolczystej. Według autorów w przypadku pęcherzycy zwykłej pokrywa pęcherza była zlokalizowana w warstwie ziarnistej lub kolczystej, natomiast dno w pobliżu warstwy brodawkowatej skóry właściwej. W pracy tej nie opisano natomiast komórek akantolitycznych w przekrojach optycznych

authors did not conclusively state whether they are acantholytic cells or inflammatory cells [31].

In 2012, Kurzeja *et al.* published a paper in which criteria for the diagnosis of pemphigus with a RCM were proposed [11]. In this study, RCM examination in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus were done. The comparative group consisted of patients with other vesiculo-bullous disorders, including allergic contact dermatitis, blisters after UV exposure and trauma, Hailey-Hailey disease, erysipelas, herpes simplex, herpes zoster, porphyria cutanea tarda, pemphigoid, dermatitis herpetiformis, erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome and Lyell's syndrome. The study found that the RCM examination allowed identification of intra-epidermal acantholytic blisters located within the spinous layer in 47.2% of patients with pemphigus vulgaris. Among patients with pemphigus foliaceus acantholysis was found in the granular layer of the epidermis in 58.6% of them. Moreover, for the first time intraepidermal acantholytic blisters not only in the skin lesions, but also in the clinically healthy skin directly adjacent to the skin lesion were described. Acantholysis in apparently healthy skin was less frequent than in clinically skin lesions. It was found in 29.6% of examined lesions in patients with pemphigus vulgaris (at the level of the spinous layer) and in 20.0% of patients with pemphigus foliaceus (at the level of the granular layer). This study also defined the morphology of acantholytic cells, which were visible on RCM optical sections as light gray, round or oval cells, 14 to 17 μm in diameter, forming irregular, polygonal structures. While inflammatory cells were visible as bright, round or multi-shaped structures ranging from 8 to 12 μm in diameter. They were visualized in 77.8% of lesions in patients with pemphigus vulgaris in the epidermis and only in 5.6% of cases in the dermis. In pemphigus foliaceus, this percentage was 79.3% and 44.8%, respectively. Dilated blood vessels in the dermis were also found in pemphigus patients in reflectance confocal microscopy. They were present in 61.1% of patients with pemphigus vulgaris, while in patients with pemphigus foliaceus in 86.2% of cases [11].

In the study also RCM criteria for diagnosis of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus was established: 1. acantholysis within skin lesions, 2. acantholysis in clinically healthy skin adjacent to skin lesions, 3. presence of dilated blood vessels within the lesion. Fulfillment of two of the three above criteria allowed for the diagnosis in pemphigus vulgaris with the sensitivity of 100.0% in pemphigus vulgaris patients, 85.7% in pemphigus foliaceus patients, and 93.3% in all pemphigus patients, regardless of the form. The diagnostic specificity of this study was 100.0% for both forms of pemphigus [11].

zmian skórnych badanych metodą RCM u żadnego z pacjentów z pęcherzycą zwykłą [30].

W pracy Koehlera i wsp. opisano 1 pacjenta z pęcherzycą zwykłą, u którego wykonano badanie refleksyjnym mikroskopem konfokalnym [31]. W przekrojach optycznych RCM autorzy obserwowali śródskórkowe pęcherze zlokalizowane w górnej części warstwy kolczystej oraz tuż ponad warstwą podstawną. Lokalizację pęcherzy ustalano na podstawie morfologii naskórka w otoczeniu zmiany skórnej. W pracy tej opisano także jasne, owalne komórki wewnątrz pęcherzy u pacjenta z PV, jednak autorzy nie stwierdzili jednoznacznie, czy są to komórki akantolityczne czy komórki nacieku zapalnego [31].

W 2012 roku Kurzeja i wsp. opublikowali artykuł, w którym zaproponowano kryteria rozpoznania pęcherzycy w refleksyjnym mikroskopie konfokalnym [11]. W niniejszej pracy wykonano badania metodą RCM u pacjentów z pęcherzycą zwykłą oraz pęcherzycą liściastą. Grupą porównawczą byli pacjenci z innymi chorobami przebiegającymi z tworzeniem się pęcherzy lub pęcherzyków, w tym z alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry, pęcherzami powstałymi po ekspozycji na UV i po urazie, chorobą Haileya-Haileya, różą pęcherzową, opryszczką zwykłą, półpaścem, porfirią skórną późną, pemfigoidem, opryszczkowatym zapaleniem skóry, rumieniem wielopostaciowym, zespołem Stevensa-Johnsona i zespołem Lyella. W pracy stwierdzono, że badanie metodą RCM pozwala na identyfikację śródskórkowych, akantolitycznych pęcherzy zlokalizowanych w obrębie warstwy kolczystej u 47,2% pacjentów z pęcherzycą zwykłą. Wśród chorych z pęcherzycą liściastą akantolizę stwierdzano w 58,6% w obrębie warstwy ziarnistej naskórka. Ponadto opisano po raz pierwszy śródskórkowe, akantolityczne pęcherze zlokalizowane nie tylko w obrębie badanych zmian skórnych, lecz także w skórze klinicznie zdrowej bezpośrednio graniczącej ze zmianą skórną. Akantoliza w skórze zdrowej występowała rzadziej niż w skórze zmienionej klinicznie. Stwierdzono ją w 29,6% badanych zmian u pacjentów z pęcherzycą zwykłą (na poziomie warstwy kolczystej) oraz u 20,0% z pęcherzycą liściastą (na poziomie warstwy ziarnistej). W niniejszej pracy zdefiniowano także morfologię komórek akantolitycznych, które były widoczne na przekrojach optycznych RCM jako jasnoszare, okrągłe lub owalne komórki, o średnicy od 14 do 17 μm tworzące nieregularne, wielokątne struktury. W badaniu RCM stwierdzono również obecność komórek nacieku zapalnego, które były widoczne jako jasne, okrągłe lub wielokształtne struktury o średnicy od 8 μm do 12 μm . Uwidoczniono je w 77,8% zmian u pacjentów z pęcherzycą zwykłą w naskórku i jedynie w 5,6% przypadków w skórze właściwej. W pęcherzycy liściastej odsetek ten wynosił odpowiednio

In 2012, Alessi *et al.* published a paper on the use of RCM in the diagnosis of exfoliative gingivitis. The study involved 8 patients with mucosal pemphigoid, 12 with pemphigus vulgaris and 5 with lichen planus [32]. In patients with pemphigus vulgaris, intraepithelial blisters filled with acantholytic cells located in the spinous layer, with a preserved basal layer of cells were found. In the blister cavity, pale gray, round or oval acantholytic cells ranging from 14 μm to 17 μm in diameter, with a centrally or peripherally located nucleus were visible. In some cases, acantholytic cells were clustered into larger groups and formed irregular, polygonal structures. In the dermis, the inflammatory infiltrate and dilated blood vessels arranged horizontally were visible. Apart from mucosal lesions in pemphigus vulgaris, Alessi *et al.* also studied clinically healthy epithelium around erosive and bullous lesions. The authors described presence of acantholytic cells within the clinically unchanged epithelium of patients with exfoliative gingivitis in the course of pemphigus vulgaris [32].

In 2018, Mandel *et al.* published a paper on the use of RCM in the diagnosis of bullous pemphigoid and pemphigus [33]. Twenty-four patients with pemphigus and 48 patients with pemphigoid were enrolled in the study. In 50.0% (12/24) of pemphigus patients, presence of intra-epidermal blisters was found. However, in another 50.0% of patients with PV, location of blisters within the skin was not identified, in these cases the authors could not assess with RCM whether these blisters were intra-epidermal or sub-epidermal (no basal layer visible below the blister). In the lumen of blisters, acantholytic cells were visible in 62.5% (15/24), and inflammatory cells in 25.0% (6/24). In the dermis, inflammatory cells were present in 62.5% (15/24) of pemphigus patients. In contrast, dilated blood vessels were found in 75.0% (18/24) of patients [33].

CONCLUSIONS

Reflectance confocal microscopy enables identification of intra-epidermal acantholytic blisters in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. According to mot's authors, RCM also enables precise localization of blisters – in the spinous layer in pemphigus vulgaris, and in the granular layer in pemphigus foliaceus. Therefore, we can initially differentiate between pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus *in vivo* on that basis. Still, until studies on larger groups of patients are carried out, direct and indirect immunopathological tests and histopathological tests will remain a basis for the diagnosis of pemphigus.

79,3% i 44,8%. W badaniu metodą RCM u pacjentów z pęcherzycą stwierdzano również obecność poszerzonych naczyń krwionośnych w skórze właściwej. Występowały one w 61,1% przypadków, natomiast u pacjentów z pęcherzycą liściastą w 86,2% przypadków [11].

W pracy tej ustalono także kryteria rozpoznania pęcherzycy zwykłej i liściastej w badaniu RCM: 1) akantoliza w obrębie zmian skórnych, 2) akantoliza w skórze klinicznie zdrowej przylegającej do zmian skórnych, 3) obecność poszerzonych naczyń krwionośnych w obrębie zmiany. Spełnienie dwóch z trzech powyższych kryteriów pozwalało na rozpoznanie pęcherzycy zwykłej z czułością 100,0% pacjentów z pęcherzycą zwykłą, 85,7% z pęcherzycą liściastą oraz 93,3% pacjentów z pęcherzycą, niezależnie od postaci. Swoistość diagnostyczna tego badania wynosiła 100,0% dla obydwu postaci pęcherzycy [11].

W 2012 roku Alessi i wsp. opublikowali pracę dotyczącą zastosowania RCM w diagnostyce złuszczonego zapalenia dziąseł. Do pracy włączono 8 pacjentów z pemfigoidem błon śluzowych, 12 z pęcherzycą zwykłą i 5 z liszajem płaskim [32]. U pacjentów z pęcherzycą zwykłą stwierdzono śródnabłonkowe pęcherze wypełnione komórkami akantolitycznymi zlokalizowane w warstwie kolczystej z zachowaną warstwą podstawną komórek. W świetle pęcherzy widoczne były jasnoszare, okrągłe lub owalne komórki akantolityczne o średnicy od 14 μm do 17 μm z centralnie lub odśrodkowo położonym jądrem komórkowym. W części przypadków komórki akantolityczne były skupione w większe grupy i tworzyły nieregularne, wielokątne struktury. W skórze właściwej były widoczne natomiast komórki nacieku zapalnego i poszerzone naczynia krwionośne ułożone horyzontalnie. Alessi i wsp. badali także obok zmian śluzówkowych w przebiegu pęcherzycy zwykłej również klinicznie zdrowy nabłonek w otoczeniu zmian nadżerkowych i pęcherzowych. Autorzy opisali obecność komórek akantolitycznych w obrębie klinicznie niezmiennego nabłonka pacjentów ze złuszcżającym zapaleniem dziąseł w przebiegu pęcherzycy zwykłej [32].

W 2018 roku Mandel i wsp. opublikowali pracę dotyczącą zastosowania RCM w diagnostyce pemfigoidu pęcherzowego i pęcherzycy [33]. Do badania zakwalifikowano 24 pacjentów z pęcherzycą i 48 pacjentów z pemfigoidem. U 50,0% (12/24) pacjentów z pęcherzycą stwierdzono obecność śródnaskórkowych pęcherzy. U kolejnych 50,0% pacjentów z pęcherzycą zwykłą nie zidentyfikowano położenia pęcherzy w obrębie skóry, w tych przypadkach autorzy nie mogli ocenić, czy pęcherz położony jest śródnaskórkowo czy podnaskórkowo na podstawie badania RCM (brak widocznej warstwy podstawnej poniżej pęcherza). W świetle pęcherzy w 62,5% (15/24) uwi-

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

doczniono komórki akantolityczne, a w 25,0% (6/24) przypadków komórki zapalne. W skórze właściwej komórki nacieku zapalnego były obecne u 62,5% (15/24) pacjentów z pęcherzycą. U 75,0% (18/24) pacjentów widoczne były poszerzone naczynia krwionośne [33].

PODSUMOWANIE

Refleksyjna mikroskopia konfokalna umożliwiła identyfikację śródskórkowych, akantolitycznych pęcherzy u pacjentów z pęcherzycą zwykłą i liściastą. Refleksyjna mikroskopia konfokalna pozwala także według większości autorów na dokładną lokalizację pęcherzy, w pęcherzycy zwykłej w warstwie kolczystej, a w pęcherzycy liściastej w warstwie ziarnistej. Na tej podstawie można wstępnie zróżnicować pęcherzycę zwykłą i liściastą *in vivo*. Nadal jednak, do czasu przeprowadzenia badań w większych grupach pacjentów, podstawą rozpoznania pęcherzycy pozostaną badania immunopatologiczne pośrednie i bezpośrednie oraz badanie histopatologiczne.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorka nie zgłasza konfliktu interesów.

References**Piśmiennictwo**

1. **González S., Gilaberte-Calzada Y.:** In vivo reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. *Int J Cosmet Sci* 2008, 30, 1-17.
2. **Ulrich M., Lange-Asschenfeldt S., Gonzalez S.:** Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy in dermatology. *G Ital Dermatol Venereol* 2012, 147, 171-178.
3. **Shahriari N., Grant-Kels J.M., Rabinovitz H., Oliviero M., Scope A.:** Reflectance confocal microscopy: principles, basic terminology, clinical indications, limitations, and practical considerations. *J Am Acad Dermatol* 2021, 84, 1-14.
4. **Ulrich M., Stockfleth E., Roewert-Huber J., Astner S.:** Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007, 157 Suppl 2, 56-58.
5. **Hofmann-Wellenhof R., Wurm E.M., Ahlgrim-Siess V., Richtig E., Koller S., Smolle J., et al.:** Reflectance confocal microscopy-state-of-art and research overview. *Semin Cutan Med Surg* 2009, 28, 172-179.
6. **Segura S., Puig S., Carrera C., Palou J., Malvehy J.:** Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2009, 61, 216-229.
7. **Shahriari N., Rabinovitz H., Oliviero M., Grant-Kels J.M.:** Reflectance confocal microscopy: melanocytic and nonmelanocytic. *Clin Dermatol* 2021, 39, 643-656.
8. **Ardigo M., Cota C., Berardesca E.:** Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009, 23, 660-667.
9. **Koller S., Gerger A., Ahlgrim-Siess V., Weger W., Smolle J., Hofmann-Wellenhof R.:** In vivo reflectance confocal microscopy of erythematous skin diseases. *Exp Dermatol* 2009, 18, 536-540.
10. **Mazzilli S., Vollono L., Diluvio L., Botti E., Costanza G., Campione E., et al.:** The combined role of clinical, reflectance confocal microscopy and dermoscopy applied to chronic discoid cutaneous lupus and subacute lupus erythematosus: a case series and literature review. *Lupus* 2021, 30, 125-133.
11. **Kurzeja M., Rakowska A., Rudnicka L., Olszewska M.:** Criteria for diagnosing pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus by reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol* 2012, 18, 339-346.
12. **Gonzalez S., Gilaberte-Calzada J., Gonzalez-Rodriguez A., Torres A., Mihm C.M.:** In vivo reflectance mode confocal scanning microscopy in dermatology. [In:] *Advances in Dermatology*. W.M. James (ed.). Elsevier 2004.
13. **Inoue S.:** Foundation of confocal scanned skin imaging in light microscopy. [In:] *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. J.B. Pawley (ed.). Springer Science, New York, 2006, 1-20.
14. **Paddock S.W.:** Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol Biotechnol* 2000, 16, 127-149.

15. **Branzan A.L., Landthaler M., Szeimies R.M.:** In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med Sci* 2007, 22, 73-82.
16. **Calzavara-Pinton P., Longo C., Venturini M., Sala R., Pellacani G.:** Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008, 84, 1421-1430.
17. **Ulrich M., Stockfleth E., Roewert-Huber J., Astner S.:** Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007, 157 Suppl 2, 56-58.
18. **Misri R., Pande S., Khopkar U.:** Confocal laser microscope. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006, 72, 394-397.
19. **Calzavara-Pinton P., Longo C., Venturini M., Sala R., Pellacani G.:** Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008, 84, 1421-1430.
20. **Marghoob A.A., Swindle L.D., Moricz C.Z., Sanchez Negron F.A., Slue B., Halpern A.C., et al.:** Instruments and new technologies for the in vivo diagnosis of melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003, 49, 777-497.
21. **Rajadhyaksha M., Anderson R.R., Webb R.H.:** Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo. *Appl Opt* 1999, 38, 2105-2015.
22. **Gonzalez S., Swindelles K., Rajadhyaksha M., Torres A.:** Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol* 2003, 21, 359-369.
23. **Ioannides D., Lazaridou E., Rigopoulos D.:** Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008, 22, 1478-1496.
24. **Bystryn J.C., Rudolph J.L.:** Pemphigus. *Lancet* 2005, 366, 61-73.
25. **Sticherling M., Erfurt-Berge C.:** Autoimmune blistering diseases of the skin. *Autoimmun Rev* 2012, 11, 226-230.
26. **Joly P., Litrowski N.:** Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol* 2011, 29, 432-436.
27. **Wu H., Brandling-Bennett H.A., Harrist T.J.:** Noninfectious vesiculobullous and vesiculopustular diseases. [In:] *Lever's histopathology of the skin*. Tenth edition. D.E. Elder, R. Elenitsas, B.L. Johnson, G.F. Murphy, X. Xu (ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009, 235-279.
28. **Whitney A.H.:** Blistering diseases. In: *Dermatopathology*. 1st ed. D.M. Elston, T. Ferringer (eds.). Saunders Elsevier, 2008, 161-172.
29. **Angelova-Fischer I., Pfeuti T., Zillikens D., Rose C.:** In vivo confocal laser scanning microscopy for non-invasive diagnosis of pemphigus foliaceus. *Skin Res Technol* 2009, 15, 40-44.
30. **Levi A., Ophir I., Lemster N., Maly A., Ruzicka T., Ingber A., et al.:** Noninvasive visualization of intraepidermal and subepidermal blisters in vesiculobullous skin disorders by in vivo reflectance confocal microscopy. *Lasers Med Sci* 2012, 27, 261-266.
31. **Koehler M.J., Speicher M., Lange-Asschenfeldt S., Stockfleth E., Metz S.:** Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for in vivo evaluation of skin diseases. *Exp Dermatol* 2011, 20, 589-594.
32. **Alessi S.S., Nico M.M., Fernandes J.D., Lourenço S.V.:** Reflectance confocal microscopy as a new tool in the in vivo evaluation of desquamative gingivitis: patterns in mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and oral lichen planus. *Br J Dermatol* 2013, 168, 257-264.
33. **Mandel V.D., Cinotti E., Benati E., Labeille B., Ciardo S., Vaschieri C., et al.:** Reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography for the diagnosis of bullous pemphigoid and pemphigus and surrounding subclinical lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018, 32, 1562-1569.

Received: 5.04.2022

Accepted: 25.04.2022

Otrzymano: 5.04.2022 r.

Zaakceptowano: 25.04.2022 r.

How to cite this article

Kurzeja M.: Application of reflectance confocal microscopy in the diagnosis of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Dermatol Rev/Przegl Dermatol* 2022, 109, 122-129. DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2022.117982>.