



AWMF-Register Nr.	013/076	Klasse:	S1
-------------------	---------	---------	----

Leitlinie: Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie

Aktualisierung der Leitlinie vom Stand: 01.07.2011

Datum der Fertigstellung: 28.07.2017

Entwicklungsstufe: S1

Federführende Fachgesellschaft(en): Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG)

Art der Konsensbildung: Die Konsensbildung innerhalb der repräsentativ zusammengesetzten Expertengruppe fand per Email und in persönlichen Treffen mit mehrfacher Abstimmung der beteiligten Experten statt.

Gültigkeit: 5 Jahre

Die vorliegende Leitlinie wurde von der 2+2 Kommission der Kommission für Qualitätssicherung in der Dermatologie begutachtet und von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft verabschiedet.

Julia Welzel, Martina Ulrich, Susanne Lange-Asschenfeldt, Wilhelm Stolz, Elke Sattler

Ziel und Adressaten: Dermatologen, die einen Überblick über die Einsatzmöglichkeiten der konfokalen Lasermikroskopie gewinnen möchten, weil sie überlegen, diese Technik zur Diagnostik einzusetzen. Dermatologen, die bereits mit der konfokalen Lasermikroskopie arbeiten und eine Anleitung für den Einsatz sowie eine Übersicht über Indikationen und Grenzen der Methode bekommen möchten.

1. Einleitung
2. Geräte
3. Indikationen
4. In vivo konfokale Lasermikroskopie
 - 4.1. Untersuchungstechnik

- 4.2. Darstellung gesunder Haut
- 4.3. Tumoren
 - 4.3.1 Malignes Melanom
 - 4.3.2 Aktinische Keratosen
 - 4.3.3 Basalzellkarzinom
 - 4.3.4 Andere
- 4.4. Entzündliche Dermatosen
- 4.5. Weitere Indikationen
- 4.6. Fluoreszenzdiagnostik in vivo
- 5. Ex vivo konfokale Lasermikroskopie
 - 5.1. Untersuchungstechnik
 - 5.1.1 Reflexionsmodus
 - 5.1.2 Fluoreszenzmodus
 - 5.2. Indikationen
- 6. Limitationen
- 7. Vergleich mit anderen Methoden
- 8. Literatur

1. Einleitung

Die konfokale Lasermikroskopie (KLM) ist eine nichtinvasive Methode zur hochauflösenden Diagnostik von Gewebe. Während konventionelle Mikroskope mit Durchlichttechnik arbeiten, bei der dünne Gewebeschichten von unten beleuchtet werden, arbeiten die für die Dermatologie konzipierten konfokalen Lasermikroskopie mit einer Auflichttechnik. Hierbei wird jeweils Laserlicht einer ausgewählten Wellenlänge zur Ausleuchtung des zu untersuchenden Hautabschnittes herangezogen. Der Laserstrahl wird zunächst auf eine Ebene innerhalb der Haut fokussiert, wo das Licht an Grenzflächen mit hohem Brechungsindex reflektiert und dann auf einen Detektor geleitet wird. Eine vorgeschaltete Lochblende ermöglicht, dass ausschließlich Signale aus der vorab definierten horizontalen Ebene zur Bildgebung herangezogen werden. Strukturen mit hoher Reflexion in der Haut sind vor allem Keratin, Melanin und Kollagen beziehungsweise Grenzflächen mit sehr unterschiedlichem Brechungsindex. Dadurch ist die Methode vor allem zur

Diagnostik melanozytärer und epithelialer Hauttumoren geeignet⁸⁸. Während diese Vorgehensweise einerseits die hochauflösende Darstellung oberflächennaher Veränderungen mit mikroskopischer Auflösung von 1 bis 3 µm in horizontaler Schnittführung erlaubt, bedingt sie gleicherweise die Limitierung der Eindringtiefe in die Haut.

Die konfokale Lasermikroskopie erlaubt so neue Möglichkeiten zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung in der Dermatologie. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung dynamischer Veränderungen. Die Technik lässt sich jedoch auch ex vivo an frisch exzidiertem Gewebe im Sinne einer Schnellschnittdiagnostik einsetzen. Letzteres ist insbesondere für den Bereich der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie von Hauttumoren interessant.

Bei Einsatz monochromatischen Laserlichts und geeigneter Filter kann neben der Reflexion auch eine Fluoreszenz zur Bildgebung genutzt werden. Hierfür muss die Haut von außen oder durch eine intradermale Injektion mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden.

2. Geräte

Für die konfokale Lasermikroskopie werden Geräte mit einem oder mehreren Lasern als Lichtquelle eingesetzt, die sowohl zur in vivo als auch ex vivo Untersuchung der Haut herangezogen werden können. Die Laserenergie auf Gewebsebene beträgt weniger als 30 mW, daher besteht keine Gefahr für das zu untersuchende Gewebe oder das menschliche Auge (Laserklasse I).

Es gibt derzeit nur einen Anbieter für konfokale Lasermikroskope zur Diagnostik der Haut, die Fa. Mavig GmbH (München, Deutschland).

Folgende Geräte sind im klinischen Einsatz für die in vivo Diagnostik: das VivaScope® 1500, das VivaScope® 1500 Multilaser und das VivaScope® 3000⁴⁹. Die Ausstattung wird durch eine anzuschließende videodermatoskopische Einheit (VivaCam®, Firma Visiomed AG, Bielefeld) komplettiert. Das VivaScope® 1500 ist das Standardgerät für die in vivo Diagnostik im Reflexionsmodus. Im VivaScope® 1500 Multilaser sind drei Laser unterschiedlicher Wellenlängen für die Untersuchung im Reflexions- und Fluoreszenzmodus eingebaut. Das VivaScope® 3000 ist ein mobiles Handgerät für die Diagnostik anatomisch schwer zu erreichender Hautveränderungen.

Die ex vivo konfokale Lasermikroskopie ermöglicht die Untersuchung nativer Gewebeschnitte. Das VivaScope® 2500 ist ein Multilaser KLM mit den Wellenlängen 830 nm für die Reflexionsdiagnostik sowie 488 nm und 658 nm für die Fluoreszenzdiagnostik. Der Geräteaufbau differiert von den in vivo Geräten, weil hier das Frischgewebe auf einen Messtisch gelegt und von unten beleuchtet wird. Um das Gewebe möglichst plan auf den Messtisch aufzubringen, muss es mittels Objektträgern oder Einbettmedien fixiert werden. Eine Übersicht über die Geräte und Konfigurationen zeigt Tabelle 1.

Tab. 1:

Name	Laser	Bildgröße	Bildgebung	Einsatzgebiet
VivaScope® 1500	830 nm	Einzelbild 500 µm x 500 µm, Mosaik bis 8 mm x 8 mm	Reflexion	in vivo Diagnostik
VivaScope® 1500 Multiwave	488 nm, 658 nm, 785 nm	Einzelbild 500 µm x 500 µm, Mosaik bis 8 mm x 8 mm	Reflexion und Fluoreszenz	in vivo, experimentelle Fragestellungen
VivaScope® 3000	830 nm	Einzelbild 1000 µm x 1000 µm, keine Mosaikfunktion	Reflexion	in vivo für schwer zugängliche Areale, für schnelle, flexible Messungen
VivaScope® 2500	488 nm, 658 nm, 830 nm,	750 µm x 750 µm, Mosaik bis 20 mm x 20 mm	Reflexion und Fluoreszenz	ex vivo für mikrophische Chirurgie, Randkontrollen

Tabelle 1: Gerätekonfigurationen für die konfokale Lasermikroskopie

3. Indikationen

In der Dermatologie eignet sich die konfokale Lasermikroskopie zur nichtinvasiven Diagnostik oberflächennaher Hautveränderungen. Im Bereich der Hauttumoren ist es insbesondere von Interesse, melanozytäre Läsionen hinsichtlich ihrer Dignität einzuschätzen, um eine Melanomfrüherkennung zu ermöglichen und auf der anderen Seite unnötige Exzisionen benigner Nävi zu vermeiden. Auch bei epithelialen Hauttumoren ist eine nichtinvasive Früherkennung wichtig, dazu auch eine Verlaufsbeobachtung und Therapiekontrolle, insbesondere wenn nichtchirurgische, topische Therapien zum Einsatz kommen, bei denen keine Histologien entnommen werden.

Auch oberflächliche entzündliche Hauterkrankungen können mittels der konfokalen Lasermikroskopie untersucht werden. Hier steht meist nicht so sehr die Diagnostik im Vordergrund, sondern die Verlaufsbeobachtung und Quantifizierung von Therapieeffekten.

Einschränkungen der Methodik gibt es, wenn tiefere Tumoranteile oder Entzündungen vorliegen, die sich aufgrund der geringen optischen Eindringtiefe dieser Technik der Darstellung entziehen. Die horizontale Darstellung der Gewebeschichten erfordert ein Umdenken bei der Interpretation der Bilder, auch für einen an Tiefenschnitten erfahrenen Histologen.

Ex vivo eignet sich die konfokale Lasermikroskopie zur Schnellschnittdiagnostik und zur mikroskopischen Schnittrandkontrolle. Ein großer Vorteil gegenüber der konventionellen Histologie besteht darin, dass keine zeitaufwändige Gewebepreparation erforderlich ist, so dass die Ergebnisse innerhalb von wenigen Minuten vorliegen.

4. In vivo konfokale Lasermikroskopie

4.1 Untersuchungstechnik

Da Bewegungsartefakte aufgrund der hohen Auflösung der Methode möglichst minimiert werden müssen und die Messung einige Minuten dauert, sollte die Untersuchung am liegenden Patienten in entspannter Position durchgeführt werden. Zunächst wird ein Magnetring mit einem transparenten Fenster auf die zu

untersuchende Läsion geklebt, die vorher mit einem Tropfen Immersionsöl benetzt wird, um die Reflexion der Hautoberfläche zu minimieren. Dann wird ein dermatoskopisches Bild mit der VivaCam® aufgenommen. Der große Messkopf wird an dem Magnetring, der vorher mit Ultraschallgel zur Ankoppelung der Linse befüllt wurde, fixiert und die Hautoberfläche mit dem Linsensystem fokussiert. Es folgen standardisierte Aufnahmen der Läsion in mindestens drei Ebenen (sogenannten Mosaiken oder Blocks) in Höhe der oberen Dermis, der dermoepidermalen Junktion und der oberen Dermis in x-y-Richtung. Die Fläche der Ebenen kann bis zu einer Größe von 8 mm x 8 mm frei gewählt werden. Dann werden an mindestens drei ausgesuchten Einzelbildern aus dem Zentrum der Läsion konsekutive Scans in der Größe von 500 µm x 500 µm in engen Schichten in die Tiefe in z-Richtung gefahren (sogenannte Stacks). Es empfiehlt sich, auch die benachbarte gesunde Haut als Vergleich aufzunehmen. Die exakte Position der Stacks und der Ebenen wird in dem Dermatoskopiebild angezeigt, in dem man auch navigieren kann. Die Messung geschieht in Echtzeit, so dass man beispielsweise in den Blutgefäßen die Blutzellen fließen sieht. Zur Dokumentation dynamischer Vorgänge kann auch eine kleine Videosequenz aufgenommen werden. Die gesamte Aufnahme-prozedur dauert etwa acht bis zehn Minuten. Im Anschluss werden der Messkopf abgekoppelt, der Magnetring entfernt, die Haut vom Öl gereinigt und die Bilder ausgewertet.

Das VivaScope® 3000 ist ein flexibles Handstück, mit dem man lediglich Einzelbilder in der Größe von 1000 µm x 1000 µm und keine Mosaiken aufnehmen kann. Eine Aufnahme eines Stacks bis in 200 µm Tiefe ist allerdings ebenfalls möglich. Es eignet sich für die mobile Aufnahme von Läsionen in Hautfalten und an gewölbten Oberflächen. Das kleine, leichte Handstück wird lediglich mit den Händen fixiert, die Messung dauert nur wenige Sekunden. Eine Übersichtsaufnahme einer gesamten Läsion ist hiermit nicht möglich, so dass die Zuordnung der Einzelbilder schwerer fällt.

4.2 Darstellung gesunder Haut

Bei der Untersuchung gesunder Hautareale kommt zuoberst das Stratum corneum zur Darstellung⁵⁰. Die polygonalen kernlosen Korneozyten bilden einen kohäsiven, stark refraktilen Zellverband mit der für normale Haut typischen Felderung, Fältelung und Furchung, die als dunkle Linien zwischen den aggregierten Korneozyten

erscheinen. Individuelle Korneozyten stellen sich in der KLM mit einer Größe von 20 bis 30 µm dar^{25,50}.

Darunter kommt das Stratum granulosum zur Darstellung, bestehend aus 2 bis 4 Zelllagen mit einer Einzelzellgröße zwischen 20 und 25 µm. Die Zellkerne zeigen sich zentral als dunkle, oval-rundliche Strukturen, umgeben von einem schmalen Ring hellen Zytoplasmas mit granulärem Erscheinungsbild. Die nächste Schicht ist das Stratum spinosum mit polygonalen Zellen mit einer Größe von 15 bis 20 µm. Diese sind in einem charakteristischen Honigwabemuster angeordnet, welches an einigen Stellen die ersten pigmentierten Basalzellen über den Papillenspitzen erahnen lässt, wodurch sich ein pflastersteinartiges Muster ergeben kann. Die Basalzellschicht selbst besteht aus mehr oder weniger stark refraktilen Zellen, entsprechend dem unterschiedlichen Melaningehalt der Lichttypen nach Fitzpatrick. Hierbei korreliert der Melaningehalt mit der entsprechenden Reflektivität und somit der Bildhelligkeit^{8,72,120}. Die Zellgröße liegt zwischen 10 und 12 µm. In der dermoepidermalen Junktionszone bilden die Basalzellen helle Ringe um die zentral stehenden, dunklen Papillen. Innerhalb der Papillenspitzen kann meist der Blutfluss oberflächlicher Kapillargefäße dargestellt werden.

Unterhalb der Junktionszone zeigen sich die retikulären Bündel des dermalen Bindegewebes, wobei hier topographische und altersabhängige Unterschiede in der Anordnung, Dichte und Reflektivität bestehen.

Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Ausführungsgänge ekkriner Drüsen können ebenfalls mit Hilfe der KLM dargestellt werden. Hierbei erscheinen ekkrine Ausführungsgänge als spiralartige helle Struktur in der Epidermis; Talgdrüsen erscheinen als rundliche, spulenartige Formation, mit einem zentral stehenden Haar, welches sich als lineare, hell reflektierende Struktur darstellt und eine charakteristische Schichtung aufweist.

Weitere topographische Unterschiede bestehen zwischen der Felderhaut und der Leistenhaut von Handflächen und Fußsohlen. Letztere weist nicht zuletzt eine wesentlich dickere Hornschicht auf, welche mit Hilfe eines Mikrometers messbar ist, und zeigt die regelhafte Verteilung von porenartigen Öffnungen der ekkrinen Drüsen, die in der KLM dunkel erscheinen⁵⁰.

4.3 Tumoren

Die konfokale Lasermikroskopie wurde bereits während der ersten Entwicklungsphasen zur Untersuchung neoplastischer Hautveränderungen herangezogen, wobei das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung des malignen Melanoms sowie dessen Unterscheidung von benignen melanozytären Proliferationen lag. Ein weiterer Schwerpunkt lag bei der Untersuchung des hellen Hautkrebses, mit Definition der KLM-Kriterien von aktinischen Keratosen, des Basalzellkarzinoms sowie verwandter Erkrankungsbilder wie z.B. dem Morbus Bowen^{2,4,5,6,24,27,29,32,33,40,44,47,48,55,60,65,70,74,76-81,86,91,96,108-110,118,119}.

4.3.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom ist in der konfokalen Lasermikroskopie schon früh Gegenstand systematischer Studien gewesen, da melanozytäre Läsionen sich aufgrund des starken endogenen Kontrastes von Melanin sehr gut darstellen lassen. In den letzten Jahren konnte die klinische Anwendbarkeit der KLM zur Melanomdiagnostik in zahlreichen Studien gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurden definierte, bildmorphologische Charakteristika von Melanomen sowie benignen melanozytären Läsionen erarbeitet. In diesem Zusammenhang gelten Aufhebung der normalen Epidermisarchitektur, fehlende Abgrenzbarkeit der Papillen (sog. non-edged papillae), irreguläre Nester atypischer Melanozyten sowie das Vorhandensein von großen, hochrefraktilen Zellen mit prominenten Nukleus in höheren Epidermislagen als wichtigste Melanomkriterien. Studien zeigen, dass die Anwendung der KLM zu einer Verbesserung der Spezifität in der Melanomdiagnostik führt. Zudem kann durch die KLM die sog. „number needed to excise“ (NNE), d.h. die Anzahl von Exzisionen benigner Naevi, um ein Melanom zu finden, signifikant verringert werden^{5,7,30,32,44,60,76-83,85,98,100,101}.

4.3.2 Aktinische Keratosen

In der KLM sind aktinische Keratosen durch einen Verlust der normalen Honigwabenstruktur mit Atypien und Pleomorphismus epidermaler Keratinozyten, Parakeratose, losgelöste Korneozyten im Stratum corneum und solarer Elastose

sowie Blutgefäßdilatation gekennzeichnet. In horizontalen Übersichtskarten zeigen sich häufig aufliegende kompakte Hyperkeratosen, die die Visualisierung tiefer liegender Strukturen in einigen Fällen deutlich erschweren können. Dies bedingt auch die Einschränkung der KLM in der Diagnostik invasiver Plattenepithelkarzinome, da hier häufig eine starke Hyperkeratose die Evaluation der Läsionen limitiert^{4,6,47,48,69,84,87,99,106,108-111,113-115,121}.

4.3.3 Basalzellkarzinom

Basalzellkarzinome zeigen in der KLM charakteristische Veränderungen, wobei in frühen Studien folgende 5 Hauptkriterien beschrieben wurden: elongierte, monomorphe Zellkerne, Polarisierung dieser Zellen entlang einer Achse, ausgeprägtes Entzündungsinfiltrat, vermehrte sowie dilatierte Gefäße und Verlust der epidermalen Honigwabenstruktur⁷⁴. Als charakteristisch gelten zudem Inseln von Tumorzellen mit peripherer Palisadenstellung in der Dermis, die sich von der Dermis durch einen dunklen Spalt abgrenzen. Diese optische Spaltbildung entspricht histologisch der Ansammlung von Muzin. In einer Multicenterstudie konnte eine hohe Sensitivität der KLM von 100% und Spezifität von 88,5% in der Diagnostik des Basalkarzinoms gezeigt werden^{1,24,27,34,40,43,65,70,74,75,86,91,96,97,99,117-119}.

4.3.4 Andere Tumore

Unter anderem konnten bisher in einer Pilotstudie einige Kriterien für die KLM Diagnostik der Mycosis fungoides beschrieben werden. Hierzu zählen hyporefraktile Papillen, atypische Lymphozyten in der Epidermis sowie an der Junktionszone und in der Dermis, Pautrier'sche Mikroabszesse, Blutgefäßdilatation und Fibrose. Jedoch fehlen derzeit noch systematische Studien, die die Anwendbarkeit dieser Kriterien insbesondere in Hinblick auf die klinische Differentialdiagnose von Ekzemerkrankungen untersuchen^{2,57}.

Weitere Untersuchungen stellen die Beschreibung weiterer Tumoren und benigner Proliferationen als Einzelfallbeschreibungen oder kleinerer Pilotstudien dar, wie z.B. die KLM-Darstellung des Trichoepithelioms⁹, des ekkrinen Poroms¹⁰⁵, der disseminierten, superfiziellen aktinischen Porokeratose¹¹⁰, der Talgdrüsenhyperplasie³⁸, des Hydrokystoms¹¹⁷, sowie der seborrhoischen Keratose⁶.

Andere Studien untersuchten vaskuläre Läsionen und Fehlbildungen mit Hilfe der KLM^{4,20,41,42,73}, wobei im Einzelfall charakteristische KLM Merkmale definiert werden konnten. All diesen Studien ist gemein, dass eine systematische Aufarbeitung der jeweiligen Daten in größer angelegten Studien und verblindeten Analysen derzeit noch fehlt.

4.4 Entzündliche Dermatosen

Unter den entzündlichen Dermatosen stellen das akute Kontaktekzem sowie die Psoriasis die mit Hilfe der KLM am besten untersuchten Hauterkrankungen dar^{12,17-19,36,37,46,57,95,103}. Hierbei wurden die charakteristischen Merkmale der Spongiose sowie Vesikelbildung beschrieben. Erstere erscheint als heller akzentuierte Interzellularräume im Bereich der Epidermis, während sich letztere als scharf begrenzte, zum Teil gekammerte, klein oder großlumig erscheinende, dunkle Hohlräume darstellen. Des Weiteren wurden reaktive oder begleitende entzündliche Prozesse im Rahmen der Wundheilung, Tumoren bzw. im Rahmen von Infektionen^{33,39,40,57,62,71,112} oder auch Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen untersucht^{10,13-15}.

Das entzündliche Infiltrat an sich zeigt sich als mehr oder weniger stark refraktile, rundliche bis ovale Zellen von 8-10 µm, die je nach Krankheitsprozess in der Epidermis, junctional, peripapillär, perivaskulär bzw. diffus in der oberflächlichen Dermis liegen können. Begleitende Veränderungen, z.B. des Bindegewebes bei Autoimmunprozessen, konnten mit Hilfe der KLM ebenfalls dargestellt werden^{10,16}. Auch hier ist die Beurteilung durch die optische Eindringtiefe eingeschränkt und eine genaue Differenzierung unterschiedlicher Immunzellen derzeit noch nicht möglich. Schließlich gibt es mehrere Berichte zur Untersuchung sowie dem therapeutischen Follow-up kutaner Pigmentstörungen wie zum Beispiel Vitiligo oder Melasma^{11,31,52-54,58, 64}.

4.5 Weitere Indikationen

Die konfokale Lasermikroskopie eignet sich ebenfalls zur Erregerdiagnostik. Pilzinfektionen der Haut oder der Nagelplatte lassen sich direkt am Patienten ohne Gewebeaufbereitung diagnostizieren. Hyphen und Sporen stellen sich als hell

reflektierende Strukturen mit typischer Morphologie dar⁹⁰.

Auch Milben wie *Sarcoptes scabiei* oder *Demodex folliculorum* sind eindeutig identifizierbar, womit sich die Methode zur schnellen Diagnostik einer Scabies oder zum Nachweis und zur Quantifizierung einer Demodexbesiedelung bei Rosacea eignet^{61,62,92,94}.

Bakterielle und virale Infektionen lassen sich nur indirekt durch die Morphologie der Entzündungsreaktion nachweisen. Die Auflösung reicht zur Darstellung der Erreger nicht aus. Bei Herpesvirusinfektionen zeigen sich typische akantholytische intraepidermale Bläschen. Bakterielle Infektionen gehen mit Ansammlungen neutrophiler Granulozyten einher^{33,35}.

Im Bereich der kosmetologischen Forschung wird die konfokale Lasermikroskopie zur Objektivierung und Quantifizierung von Ausgangsbefunden und Therapieeffekten eingesetzt. Hautalterung geht unter anderem mit einer Abflachung der dermoepidermalen Verzahnung einher. Diese lässt sich im konfokalen Lasermikroskop anhand der Dichte der Papillenspitzen im horizontalen Schnitt quantifizieren. Somit lassen sich beispielsweise Effekte von UV-Bestrahlung und Antioxidantien untersuchen^{56,66,68,72,89,95,106,112,120}. Darüber hinaus gibt es einige Berichte zum Thema Photo-aging, Akne sowie Aknenarben und deren Verlaufskontrolle unter dermatologischer Therapie^{21,26,67}.

4.6 Fluoreszenzdiagnostik in vivo

Mit dem VivaScope® Multilaser ist neben der Reflexionsbildgebung eine Fluoreszenzdiagnostik möglich. Hierfür sind nur wenige Fluoreszenzfarbstoffe zugelassen, die insbesondere in der ophthalmologischen Diagnostik zur i.v. Applikation Anwendung finden. Natriumfluoreszein zeigt nach Anregung mit der Wellenlänge 488 nm eine kräftige grüne Fluoreszenz. Indocyangrün wird bei 785 nm angeregt und fluoresziert im nahen Infrarotbereich. Methylenblau und Patentblau werden zur in vivo Markierung von Fistelgängen und zur Sentinel-Diagnostik eingesetzt. Es handelt sich um durch 658 nm angeregte rot fluoreszierende Farbstoffe. Die Farbstoffe lassen sich topisch auf die Hautoberfläche aufbringen und sind teilweise über viele Stunden und Tage noch in den Hautfalten und Adnexen nachweisbar. Sie lassen sich mit Externa vermischen und liefern Aussagen über Penetrationswege und Schutzfunktionen von topisch applizierten

Substanzen^{59,93,102,104,107}. Natriumfluoreszein kann auch intrakutan gespritzt werden, wofür Indocyangrün und die Blaufarben wegen toxischer Effekte und des Risikos einer Tätowierung nur bedingt geeignet sind¹¹⁶. Systematische Studien zur in vivo Fluoreszenzdiagnostik stehen noch aus.

5. Ex vivo konfokale Lasermikroskopie

Die ex vivo KLM erfolgt an frischen Gewebeexzidaten. Die Auflösung und Schichtdicke der ex vivo konfokalen Lasermikroskopie entspricht der bei der in vivo Technik. Die maximale Eindringtiefe ins Gewebe beträgt hierbei ca. 50 µm, so dass die jeweiligen Außenseiten der auf dem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte untersucht werden können. Im Gegensatz zur in vivo Untersuchung besteht jedoch keine Limitation zur Tiefe, da das Gewebe auf der Schnittfläche platziert wird, so dass auch dermale und subkutane Strukturen mit der gewohnt hohen Auflösung dargestellt werden können. Die derzeitige Hauptanwendung der ex vivo konfokalen Lasermikroskopie ist die Untersuchung von Schnittträgern bei Tumoroperationen mittels mikrophotographisch kontrollierter Chirurgie^{22,28,51,63,75,97,121}.

5.1 Untersuchungstechnik

Die Untersuchung kann sowohl im Reflexionsmodus bei 830 nm als auch im Fluoreszenzmodus bei 488 und 658 nm stattfinden (s.u.). Beim VivaScope® 2500 werden die vorbereiteten Gewebeschnitte mit etwas NaCl-Lösung 0,9 % auf einen Objektträger aufgelegt und mittels einer Klemmvorrichtung fixiert. Nach Einstellen der besten Fokustiefe für eine klare Bildgebung kann dann die Untersuchung erfolgen; analog zum in vivo Verfahren werden hier Scanfelder der Größe 630 µm x 630 µm verwendet, welche über die im Gerät verwendete Software zu Feldern wählbarer Größe (maximal 20 mm x 20 mm) zusammengesetzt werden können. Größere Gewebeschnitte können derzeit nur über die manuelle Verschiebung des Gewebes auf dem Objektträger untersucht werden.

Die gespeicherten Felder können dann am Monitor entweder in der Übersicht oder mit einem Zoomwerkzeug beurteilt werden, auch die Einzeldarstellung einzelner Scanfelder mit hoher Auflösung ist möglich.

5.1.1 Reflexionsmodus

Wie bei der Untersuchung in vivo dienen die Strukturen in der Haut als „endogene“ Kontrastgeber. Dies sind im ex vivo Modus insbesondere Melanin, zelluläre Strukturen, hier insbesondere die Zellkerne, aber auch kollagene und elastische Fasern. Zur Kontrastverstärkung durch eine Proteinfällung (bessere Reflexion) wird das native Gewebe für etwa 1 Minute in 10%ige Essigsäure oder Zitronensäure eingelegt und anschließend mit NaCl-Lösung abgewaschen. Für den Reflexionsmodus erfolgt keine weitere Vorbereitung des Gewebes, dieses wird anschließend wie beschrieben nativ untersucht.

5.1.2 Fluoreszenzmodus

Im Fluoreszenzmodus stehen die Wellenlängen 488 nm und 658 nm zur Anregung von ins Gewebe eingebrachten Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung; durch ein Filtersystem wird die Anregungswellenlänge im Gerät automatisch ausgeblendet, so dass nur das Fluoreszenzlicht zur Bildgebung verwendet wird. Ziel ist es, durch möglichst spezifische Bindung der Farbstoffe an einzelne Strukturen (zur Tumordiagnostik z.B. die Zellkerne) diese selektiv darzustellen.

Bei der Fluoreszenztechnik wird nach vorausgehender Kontrastverstärkung durch Proteinfällung, wie oben beschrieben, das Gewebe in die Fluoreszenzfarbstoffe eingelegt, so dass die Fluorophore in die obersten Gewebeschichten diffundieren und anschließend für die Fluoreszenzbildgebung verwendet werden können.

5.1.2.1 Fluoreszenzfarbstoffe für die Anwendung ex vivo

Da bei der ex vivo Fluoreszenztechnik die Gewebetoxizität und das Risiko der permanenten Tätowierung durch die Fluorophore außer Acht gelassen werden können, stehen zusätzliche Farbstoffe im Vergleich zur in vivo Untersuchung zur Verfügung. Für die Anregung bei 488 nm sind Natriumfluoreszein und Acridinorange geeignet, für den 658 nm Laser Methylenblau, Toluidinblau, Patentblau sowie Nilblau.

Die Konzentrationen der Fluorophore sind für optimale Ergebnisse entscheidend, da bei zu niedrigen Konzentrationen das Fluoreszenzsignal zu gering wird, bei zu hohen

Konzentrationen ein sog. Quenching auftreten kann, was in zu dunklen Bildern resultiert. Außerdem kann es zum Photobleichen kommen, ein Effekt der insbesondere bei Methylenblau auftritt – zur Vermeidung sollten möglichst schnelle Scan- und Messzeiten angestrebt werden. Manche Farbstoffe – wie beispielsweise Nilblau – zeigen eine ausgeprägte pH-Wert-Abhängigkeit, die zu einer Verschiebung der Exzitations- und Emissionswellenlängen führen kann. Aufgrund von diversen Dilutionsmessreihen wurden Empfehlungen zu den Konzentrationen bei den verschiedenen Farbstoffen für die ex vivo Anwendung ermittelt¹¹⁶. Einen Überblick gibt Tabelle 2.

Tab. 2

Fluoreszenzfarbstoff	Empfohlene Konzentration	Herausforderungen	Vorteile
Fluoreszein	0.2% - 0.4%	Quenching, spektrale Absorption stark pH-abhängig	Keine Gewebetoxizität
Methylenblau	2 mg/ml	Photobleichen, bleibende Tätowierung möglich	Keine Gewebetoxizität
Patentblau	< 6 mg/ml (0.4 mg/ml)	Blaufärbung bis zu 48 h möglich	Keine Gewebetoxizität
Acridinorange	1.2 mg/ml	Nur für ex vivo wegen potentieller Karzinogenität/ Gewebetoxizität	Gute Kontrastierung Epithel gegen Stroma
Nilblau	0.2 mg/ml in Eth. 70%	pH-Wert-abhängig und Lösungsmittel abhängig	Gute Kontrastierung Epithel gegen Stroma
Indocyaningrün	0.5 % (i.c.)	Gewebetoxizität	Lang anhaltende Fluoreszenz bis zu 48 h

Tab. 2 Fluorophore für die Fluoreszenzdiagnostik mit empfohlener Konzentration und spezifischen Besonderheiten (nach Welzel et al, 2016).

5.2 Indikationen

Die Hauptindikation für die ex vivo Konfokalmikroskopie stellt derzeit die Untersuchung von Randschnitten im Rahmen einer mikrographisch kontrollierten Chirurgie bei Tumorexzisionen und die Schnellschnittdiagnostik dar. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist eine im Vergleich zu den bisherigen

schnitttrandkontrollierten Verfahren extrem kurze Untersuchungszeit (ca. 5 Minuten pro Bild).

Vorläufige Untersuchungen zur Evaluierung der Schnitttrandkontrolle mit dem Konfokalmikroskop erfolgten zunächst nur im Reflexionsmodus. Schüle et al. beschrieben 2009 an knapp 250 Schnitttrandbildern eine Sensitivität der Untersuchungstechnik zwischen 0 % und 94 % und eine Spezifität zwischen 30 % und 100 %, je nach Schnitttechnik (Mittelschnitte, Randschnitte oder "Muffins"). In einer zweiten Serie von 312 Bildern gelangten Ziefler et al. 2010 zu einer Sensitivität zwischen 73 % und 94 % und einer Spezifität zwischen 36 % und 78 %¹²¹. Käß et al. kamen an 134 untersuchten Rand- und Tiefenpräparaten auf eine Spezifität von 90 % und einer Sensitivität von 82 %⁵¹.

Die genannten Daten zeigen, dass die Methode derzeit die HE-Histologie in der mikrophotographisch kontrollierten Chirurgie sicher nicht vollständig ersetzen kann. Bei in der konfokalen Untersuchung eindeutig tumorpositiven Schnittträndern könnte jedoch die Indikation zu einer Nachexzision zeitnah gestellt und damit die Therapie deutlich beschleunigt werden.

Einen weiterführenden Ansatz stellt die Fluoreszenzdiagnostik dar. Mit dem Einsatz der oben genannten Farbstoffe, vor allem Acridinorange, welche die Tumorzellen kontrastreich hervortreten lassen, konnten Karen et al. 2009 an 149 konfokalen Bildern zu einer Spezifität von 89,2 % und einer Sensitivität von 96,6 % gelangen, was diese Methodik für den klinischen Einsatz interessant macht⁵⁵. In weiteren Studien konnte die hohe Korrelation zwischen Histopathologie und FCM gezeigt werden⁴⁵ und die Tauglichkeit der Methode bei 64 bzw. 69 Basalzellkarzinomen evaluiert und bestätigt werden^{22,63}. Einen weiteren Ansatz könnte die Kopplung fluoreszierender Farbstoffe mit spezifischen Antikörpern (für das Basalzellkarzinom z.B. BerEp4) darstellen.

Digitale Färbung

Durch eine Kombination der Reflexions- und Fluoreszenzmodus-Aufnahmen und durch die Transformation der verschiedenen Graustufen mittels einer Falschfarbencodierung anhand einer speziellen Software ist es möglich eine digitale Färbung an den ex vivo Bildern vorzunehmen, die eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) täuschend ähnlich imitiert²³. Eine Evaluierung, ob dieses Verfahren

die Sensitivität und Spezifität vor allem bei der Suche nach kleinen Tumornestern oder -inseln erhöht, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

6. Limitationen

Generell erfordert die KLM detaillierte histologische Kenntnisse der Histologie und Pathologie der Haut zur korrekten Interpretation der Bilder, so dass diese Technik unbedingt in Form von Trainingskursen erlernt werden sollte. Es gibt zudem die Möglichkeit einer Vernetzung mit Experten in der KLM, die für eine Zweitbegutachtung zur Verfügung stehen. Die horizontalen Bilder erschweren vor allem für Histopathologen, die Tiefenschnittbilder gewöhnt sind, die Diagnostik. Die Fusion mit der Dermatoskopie erleichtert allerdings wiederum die Zuordnung von pathologischen Veränderungen in der KLM.

Die in vivo KLM zeigt zwar eine nahezu mikroskopische Auflösung einzelner Zellen. Diese sind allerdings nur aufgrund ihres Reflexionsverhaltens und ihrer Form zuzuordnen. Melanozyten und Langerhanszellen sind beide stark reflektierend und haben lange Dendriten, so dass diese beiden Zelltypen meist lediglich anhand ihrer Position innerhalb der Epidermis zu unterscheiden sind. Hierdurch können allerdings Fehlinterpretierungen geschehen, da bei Melanomen pagetoid aufsteigende Melanozyten auch in höheren Lagen der Epidermis zu finden sind. Bei Tumoren und Entzündungen ist oft die dermoepidermale Junktionszone verwaschen und schlecht zu definieren, so dass die Zuordnung der Veränderungen zu einer bestimmten anatomischen Schicht schwer fällt. Hier ist die Tiefenangabe der Ebenen in Bezug auf den zuvor definierten Nullpunkt an der Hautoberfläche hilfreich. Eine vertikale Dickenmessung von Tumoren ist in den horizontalen Bildern nicht möglich und kann allenfalls an den Stacks versucht werden.

Die größte Limitation der KLM ist ihre geringe Eindringtiefe bis in das Stratum papillare der Dermis. So entgehen alle tieferen dermalen Veränderungen wie bei nodulären Melanomen, knotigen Basalzellkarzinomen oder Pannikulitiden der konfokalen Diagnostik. Sie eignet sich nur für die Diagnostik von Erkrankungen und Tumoren, die in der Epidermis und oberen Dermis ihre charakteristischen Veränderungen zeigen.

Ebenso können die relativ lange Messdauer und das kleine Messfeld zu Limitationen führen. Patienten müssen in der Lage sein, einige Minuten still zu halten. Stark

gewölbte, eingesunkene, keratotische oder nässende Hautveränderungen sind schwierig zu messen, weil die Oberfläche nicht plan in eine Ebene zu bringen ist oder Oberflächenveränderungen zu Artefakten und Signalschatten führen. Eine Aufnahme mehrerer Läsionen oder gar die Untersuchung eines ganzen Hautfeldes ist allenfalls punktuell mit dem Handstück des VivaScope® 3000 möglich.

7. Vergleich mit anderen Methoden

Die hochfrequente 20 MHz-Sonographie ermöglicht eine Darstellung von Tiefenschnittbildern mit einer Auflösung von 80 bis 200 µm und einer Eindringtiefe von bis zu 6 mm. Sie zeigt also auch dermale und subkutane Veränderungen, ermöglicht aber keine zelluläre Auflösung und somit keine Differentialdiagnostik von Tumoren. Ihre Domäne ist die Dickenvermessung von Tumoren und die Verlaufsbeobachtung von Kollagenosen.

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ähnlich wie die KLM ein optisches Verfahren. Die Auflösung von OCT liegt etwas unter der der KLM bei 7 µm, was zumeist zur zellulären Diagnostik nicht ausreicht. Es werden Tiefenschnittbilder mit einer Eindringtiefe von 1,5 mm und parallel Horizontalbilder dargestellt. Die OCT wird zur Diagnostik von Basalzellkarzinomen und aktinischen Keratosen eingesetzt und ist hierbei der KLM aufgrund der größeren Bildausschnitte und deutlich kürzeren Messzeiten überlegen, während sie sich zur Differenzialdiagnostik pigmentierter Läsionen bisher nicht eignet.

Die Multiphotonentomographie ist ähnlich der KLM eine Technik, die horizontale oberflächennahe Bilder darstellt, allerdings mit einer noch besseren Auflösung im subzellulären Bereich. Bisher ist der Messablauf aber noch komplizierter und das Gerät deutlich teurer, so dass die Technik noch nicht in der Routine eingesetzt wird.