



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

Konfokale Lasermikroskopie in der Dermatologie

1. Einleitung
2. Geräte
3. Indikationen
4. In vivo konfokale Lasermikroskopie
 - 4.1. Untersuchungstechnik
 - 4.2. Befundbeschreibung
 - 4.3. Darstellung gesunder Haut
 - 4.4. Tumoren
 - 4.4.1 Malignes Melanom
 - 4.4.2 Aktinische Keratosen
 - 4.4.3 Basalzellkarzinom
 - 4.4.4 Andere
 - 4.5. Entzündliche Dermatosen
 - 4.6. Weitere Indikationen
 - 4.7. Fluoreszenzdiagnostik in vivo
5. Ex vivo konfokale Lasermikroskopie
 - 5.1. Untersuchungstechnik
 - 5.1.1 Reflexionsmodus
 - 5.1.2 Fluoreszenzmodus
 - 5.2. Indikationen
6. Literatur

1. Einleitung

Die konfokale Lasermikroskopie 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. Die Haut wird von oben fokussiert mit einem Laser beleuchtet. Das reflektierte Licht wird über eine Lochblende auf einen Detektor geleitet, so dass ausschließlich Signale aus einer definierten horizontalen Ebene hochauflösend zur Bildgebung herangezogen werden. Durch diese Technik ist die Eindringtiefe in die Haut limitiert. Dafür ist die Untersuchung nichtinvasiv in vivo und Echtzeit möglich. Die konfokale Lasermikroskopie erlaubt eine mikroskopische Darstellung oberflächennaher Hautschichten in vivo und eröffnet für die Dermatologie neue Möglichkeiten zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung, insbesondere bei dynamischen Veränderungen. Sie lässt sich auch ex vivo an frisch exzidiertem Gewebe im Sinne einer Schnellschnittdiagnostik einsetzen, was insbesondere für den Bereich der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie von Hauttumoren interessant ist.

Zur Bildgebung werden die reflektierten Lichtsignale aus einer horizontalen Ebene detektiert. Das Licht wird an Grenzflächen reflektiert, an denen sich der Brechungsindex ändert. Stark reflektierende Strukturen der Haut sind Keratin, Melanin und Kollagen. Bei Einsatz monochromatischen Laserlichts und geeigneter Filter kann neben der Reflektion 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 Spezifizierung der Gerätemerkmale ist in der Medizingeräteverordnung bzw. dem Medizinproduktegesetz geregelt. Die VivaScope® Geräte sind CE-zertifiziert nach ISO 13485:2003, ISO 9001:2008 sowie

nach CE 0459. Die Laserenergie auf Gewebesebene beträgt weniger als 30 mW, daher besteht keine Gefahr für das zu untersuchende Gewebe oder das menschliche Auge (Laserklasse I). (<http://www.vivascope.de>, Rajadhyaksha et al JID 1995, Rajadhyaksha et al Applied Optics 1999)

Ein konfokales Laserscanmikroskop für die in vivo Diagnostik besteht aus verschiedenen Elementen und beinhaltet in der Regel einen Gerätewagen sowie einen PC mit Monitor, Schwenkarm und Lasereinheit. Fakultativ kann die Ausstattung durch eine anzuschließende Makrokamera ergänzt werden. Kommerziell erhältliche Geräte weisen eine variable Eindringtiefe auf, bei der sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Wellenlänge oberflächliche dermale und epidermal gelegene Strukturen in hoher Auflösung darstellen lassen. Hierbei werden mit einem Magnetring auf die Haut lokal fixierbare Geräte von sog. Hand-held devices unterschieden, die auch Untersuchungen an schwer zugänglichen Hautarealen wie zum Beispiel an der Nase oder in Körperbeugen ermöglichen. Derzeit sind das VivaScope 1500®, VivaScope 1500 Multiwave sowie das VivaScope 3000® im klinischen Einsatz bzw. in wissenschaftlicher Erprobung. (<http://www.vivascope.de>)

Im VivaScope 1500 Multiwave können bis zu drei Laser gleichzeitig eingebaut werden. Neben der Lichtquelle bei 830 nm, die ausschließlich für die Reflektionsdiagnostik eingesetzt wird, kommen Laser bei 445 nm, 488 nm, 658 nm und 785 nm für die Fluoreszenz- und Reflektionsdiagnostik zum Einsatz. Die Filter ermöglichen hierbei die Darstellung der Reflektion alleine, der Fluoreszenz alleine sowie von Reflektion und Fluoreszenz in einem Bild. Die Reflektionsbilder zeigen bei den kürzeren Wellenlängen in oberflächennahen Schnitten eine höhere Auflösung bei geringerer Eindringtiefe. Zur Fluoreszenzdiagnostik können in vivo Natriumfluoreszein bei den Wellenlängen 445 nm und 488 nm, Methyl- und Patentblau bei 658 nm und Indocyanrön bei 785 nm als Farbstoffe eingesetzt werden. Diese können entweder topisch auf die Hautoberfläche aufgebracht oder intrakutan gespritzt werden.

Die ex vivo konfokale Lasermikroskopie auf der anderen Seite ermöglicht die Untersuchung nativer Gewebeschnitte. Hierfür sind die Geräte etwas anders konfiguriert: In einem Gerätewagen mit PC und Monitor ist das konfokale Lasermikroskop unter einem Kreuztisch mit Objektträger montiert, auf den die zu untersuchenden Gewebeschnitte gelegt werden. Im Vergleich zu den in vivo Systemen ist das ex vivo System also sozusagen invers aufgebaut. Das auf den

Objektträger aufgelegte Gewebe kann mittels des Kreuztisches in zwei horizontalen Achsen verschoben werden, so dass auch die Untersuchung größerer Gewebeschnitte möglich ist. Die Gewebeproben werden auf die Schnittkanten gelegt, so dass anders als bei der in vivo Diagnostik nun Tiefschnitte des gesamten Gewebes untersucht werden können.

Als Gerät steht derzeit nur das VivaScope 2500 Multiwave System (ex vivo) zur Verfügung, das neben der Standardwellenlänge von 830 nm für die Reflektion auch über Wellenlängen von 445 nm und 658 nm (blau und rot) verfügt, um hiermit exogene Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen. (<http://www.vivascope.de>)

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 zu vermeiden. Auch bei epithelialen Huttumoren ist eine nichtinvasive Früherkennung wichtig, dazu auch eine Verlaufsbeobachtung und Therapiekontrolle, insbesondere wenn nichtchirurgische topische Therapien zum Einsatz kommen, bei denen keine Histologien anfallen.

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 Eindringtiefe der Darstellung entziehen. Die horizontale Darstellung der Gewebeschichten erfordert ein Umdenken bei der Interpretation der Bilder, auch für einen an Tiefschnitten erfahrenen Histologen.

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

Minuten vorliegen.

4. In vivo konfokale Lasermikroskopie

4.1 Untersuchungstechnik

Das optische Grundprinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie, (LSM) ist dem des Ultraschalls vergleichbar, wobei eine Punktlichtquelle dazu verwendet wird, Hautstrukturen in virtuellen, horizontalen Schichtaufnahmen darzustellen. Das kommerziell erhältliche LSM (VivaScope 1500) ist mit einem 830 nm Diodenlaser ausgestattet, der auf eine vom Untersucher frei wählbare Ebene innerhalb des Gewebes fokussiert wird. Hierbei wird das Gewebe mit Hilfe eines Raster-scanners untersucht. Die Bildgebung des LSM beruht auf der Reflektion und Streuung von Licht aus dem untersuchten Gewebeabschnitt. Unterschiede in den Refraktionsindices der einzelnen Zellstrukturen und Hautschichten führen zu differenzierten Reflektionsmustern, und diese Abschnitte kommen in unterschiedlichen Graustufen zur Darstellung. (Rajadhyaksha et al 1995, Rajadhyaksha et al JID 1999, Rajadhyaksha et al Applied Optics 1999, Huzaira et al 2001, Calzavara-Pinton et al 2008)

Als "endogene" Kontrastmittel dienen Melanin, Hämoglobin, zelluläre Mikrostrukturen sowie Kollagen. Daher lassen sich insbesondere melanozytäre Läsionen mit Hilfe der LSM gut darstellen. Reflektiertes Licht jenseits der fokalen Ebene wird durch eine sehr kleine Apertur herausgefiltert, daher ergibt sich die hohe Auflösung der LSM. Die laterale Auflösung liegt im Bereich von 0,5 bis 1 µm im zellulären Bereich, die axiale Auflösung (Schichtdicke) entspricht mit 3 bis 5 µm der Schichtdicke normaler histologischer Untersuchungen. (Rajadhyaksha et al 1995, Rajadhyaksha et al JID 1999, Rajadhyaksha et al Applied Optics 1999)

Um die Lichtbrechung an der Hautoberfläche durch den hohen Refraktionsindex des Stratum corneum zu reduzieren, werden bei der Untersuchung Wasser- oder Ölimmersionslinsen eingesetzt. Vor dem Aufsetzen des Ringes auf die Haut sollte die Läsion mit Isopropylalkohol gereinigt werden und ein Tröpfchen Öl (z.B. Crodamol-Öl) auf das Klebefenster gegeben werden. Alternativ können auch

Wasser-basierte Gele zum Einsatz kommen, insbesondere wenn es sich um schräge Oberflächen oder stark hyperkeratotische Areale handelt, da diese ein rasches Abrinnen verhindern bzw. sich gut zwischen die abgelösten Korneozyten einlagern. (Rajadhyaksha et al 1995, Rajadhyaksha et al JID 1999, Rajadhyaksha et al Applied Optics 1999)

Der Einsatz eines abnehmbaren Metallrings hält das Immersionsmedium sowie das Objektiv während des Untersuchungsvorganges stabil und minimiert somit das Auftreten von Bewegungsartefakten. Nach Aufbringen des Immersionsmediums wird dieser Ring mit Hilfe von beidseitig adhäsiven Klebplättchen an der Patientenhaut fixiert und das Objektiv mit dem dazugehörigen Gehäuse darin magnetisch angeschlossen. Durch die Bewegung des Objektivs in der Z- (vertikale) Achse in Bezug auf die Hautoberfläche kann man unterschiedliche Ebenen innerhalb des Gewebes untersuchen. Gleichzeitig kann man das Gewebe innerhalb einer ausgesuchten Ebene in der X-Y-(horizontalen) Achse in unterschiedlicher Ausdehnung untersuchen; individuelle Bilder sind 500 µm x 500 µm groß, individuelle Übersichtsmappen zwischen 1 mm x 1 mm bis 8 mm x 8 mm. Die Bildinterpretation beruht dabei im Gegensatz zur Routinehistologie auf virtuellen horizontalen Schnitten des Gewebes. Die Aufnahme von kleineren Videosequenzen erlaubt die Dokumentation dynamischer Vorgänge wie Blutfluss oder die Migration von Entzündungszellen. (Rajadhyaksha et al 1995, Rajadhyaksha et al JID 1999, Rajadhyaksha et al Applied Optics 1999, González et al JID 2001, Astner et al 2010, Astner et al Dermatitis 2006, Ahlgrimm-Siess et al 2010)

Der Einsatz einer digitalen Makrokamera mit dermatoskopischer Qualität („VivaCam“) ermöglicht die makroskopische Beurteilung der zu untersuchenden Hautareale. Die VivaCam wird über den Standardring des VivaScope 1500 auf die Haut aufgelegt und erlaubt dadurch die Korrelation zwischen dem makroskopischen Bild und den durch das VivaScope erzeugten konfokalen Aufnahmen. Die Einzelbilder haben eine Größe von 5 Megapixel sowie eine Bildfläche von 10 mm. Die elektronische Kopplung beider Geräte ermöglicht eine Navigation im makroskopischen Bild zur Spezifizierung von Bereichen für die anschließende mikroskopische Betrachtung mit dem VivaScope. (Ref <http://www.vivascope.de>, Pellacani et al, BJD 2005))

Mit Hilfe einer integrierten Software wird eine systematische Bilddokumentation ermöglicht. Im System kann für jeden Patienten eine Patientenakte angelegt werden,

in der die Patientendaten sowie Angaben zur untersuchten Hautveränderung gespeichert werden können. Alternativ ist es auch möglich, die Daten in anonymisierter Form zu speichern. Aufgrund der limitierten Speicherkapazität der lokalen Festplatte ist es notwendig, ein zusätzliches Speichermedium in Form externer Festplattensysteme oder Server zur Verfügung zu haben. Somit wird auch sichergestellt, dass Sicherheitskopien der Bilddateien angelegt werden. Die individuelle Speicherung der Einzelbilder bzw. X-Y Karten (Vivablock®) oder Z-Blöcken (Vivastack®) ermöglicht eine Reevaluation der Bilder zu einem späteren Zeitpunkt bzw. die Mitbeurteilung durch Zweituntersucher. (<http://www.vivascope.de>)

4.2 Befundbeschreibung

Die Befundbeschreibung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie erfolgt in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Hautregion. In der Regel beginnt die Untersuchung in obersten Hautschichten mit der Darstellung des Stratum corneum, gefolgt von den weiteren Schichten der Epidermis (Stratum granulosum, Stratum spinosum, Suprapapillarregion, Junktionszone, Dermis)

Gleichzeitig kann man das Gewebe innerhalb einer ausgesuchten Ebene in der horizontalen (XY-) Achse in unterschiedlicher Ausdehnung untersuchen. Hierbei werden individuelle Übersichtskarten zwischen 1 mm x 1 mm bis 8 mm x 8 mm angefertigt, die jeweils aus 2 x 2 bzw. aus bis zu 16 x 16 Einzelaufnahmen bestehen, welche wiederum als Übersicht und Einzelbilder gespeichert werden. Dynamische Prozesse innerhalb des untersuchten Gewebsabschnittes lassen sich durch die Aufnahme kleinerer Videosequenzen dokumentieren.

4.3 Darstellung gesunder Haut

Bei der Untersuchung gesunder Hautareale kommt zuoberst das Stratum corneum zur Darstellung (Huzaira et al 2001). 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 im LSM mit einer Größe von 20 bis 30 µm dar. (Huzaira et al 2001, Calzavara-Pinton et al 2008)

Darunter kommt das Stratum granulosum zur Darstellung, bestehend aus 2 bis 4 Zellschichten 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 Honigwabennmuster angeordnet, welches an einigen Stellen die ersten pigmentierten Basalzellen der 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 (Middelkamp-Hup et al 2006, Yamashita et al 2007, Antoniou et al Laser Phys Lett 2009) Die Zellgröße liegt zwischen 10 und 12 μm . In der dermoepidermalen Junctionszone bilden die Basalzellen helle Ringe um die zentral stehenden, dunklen Papillen. Innerhalb der Papillenspitzen kann meist der Blutfluss oberflächlicher Kapillargefäße dargestellt werden. (Middelkamp-Hup et al 2006; Yamashita T et al 2007, Antoniou C et al Laser Phys Lett 2009)

Unterhalb der Junctionszone 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 LSM dargestellt werden. Hierbei erscheinen ekkrine Ausführungsgänge als spiralartige helle Struktur in der Epidermis; Talgdrüsen erscheinen als rundliche, spulenartige Formation, mit einem zentral stehendem Haar, welches sich als lineare, hoch refraktile Struktur darstellt und eine sichtbare 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 LSM dunkel erscheinen. (Huzaira et al 2001)

4.4 Tumoren

Die konfokale Laserscanmikroskopie 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 LSM Kriterien von aktinischen Keratosen, des Basalzellkarzinoms sowie verwandter Erkrankungsbilder wie z.B. dem Morbus Bowen.

(Ahlgrimm-Siess et al 2008, Ahlgrimm-Siess et al 2010, Agero et al 2006, Aghassi et al 2000, Gerger et al JID 2005, Goldgeier et al 2003, González and Tannous 2002, Horn et al 2007, Horn et al 2008, Karen JK et al,2009, Langley and Rajadhyaksha 2001, Marra DE et al 2005, Nori et al JAAD 2004, Ruocco et al Dermatol Surg 2004, Pellacani et al BJD 2005, Pellacani et al Mod Pathol 2005, Pellacani et al Arch Dermatol 2005, Pellacani et al JAAD 2005, Pellacani et al JID 2007, Pellacani et al Arch Dermatol 2008, Sauermann et al Skin Res Technol 2002, Ulrich et al BJD 2007, Ulrich et al BJD 2007, Ulrich et al BJD 2008)

4.4.1 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 LSM 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. .
(Pellacani et al BJD 2005, Pellacani et al Mod Pathol 2005, Pellacani et al Arch Dermatol 2005, Pellacani et al JAAD 2005, Pellacani et al JID 2007, Pellacani et al

Arch Dermatol 2008, Gerger et al 2005, Ahlgrimm-Siess et al 2008, Langley and Rajadhyaksha 2001, Scope et al JAAD 2007)

4.4.2 Aktinische Keratosen

In der LSM 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 LSM in der Diagnostik invasiver Plattenepithelkarzinome, da hier häufig eine starke Hyperkeratose die Evaluation der Läsionen limitiert. (Aghassi et al 2000, Ulrich et al 2007, Ulrich et al 2007, Ulrich et al JEADV 2011, Ulrich et al Dermatology 2010, Horn M et al 2007, Horn M et al 2008; Ahlgrimm-Siess et al Arch Dermatol 2010, Segura et al 2007, Ziefle et al 2010)

4.4.3 Basalzellkarzinom

Basalzellkarzinome zeigen in der LSM charakteristische Veränderungen, wobei folgende 5 Hauptkriterien beschrieben wurden: elongierte, monomorphe Zellkerne, Polarisierung dieser Zellen entlang einer Achse, ausgeprägtes Entzündungsinfiltrat, vermehrte sowie dilatierte Gefäße und Verlust der epidermalen Honigwabenstruktur (Nori et al 2004). Zudem können meist in der Dermis Inseln von Tumorzellen mit peripherer Palisadenstellung identifiziert werden, die sich von der Dermis durch einen dunklen Spalt abgrenzen. Diese optische Spaltbildung entspricht histologisch der Ansammlung von Muzin. (González et al 2002, Goldgeier et al 2003, Willard et al 2011, Schüle et al BJD 2009, Sauermann et al 2002, Patel et al 2007, Agero et al 2006, Segura et al 2007, Nori et al 2004, Ruocco et al 2004, Marra et al 2005)

4.4.4 Andere

Unter anderem konnten bisher in einer Pilotstudie einige Kriterien für die LSM Diagnostik der Mycosis fungoides beschrieben werden. Hierzu zählen hyporefraktile

Papillen, atypische Lymphozyten in der Epidermis sowie an der Junktionszone und in der Dermis, Pautriersche Mikroabzesse, Blutgefäßdilataion und Fibrose. Jedoch fehlen derzeit noch systematische Studien, die die Anwendbarkeit dieser Kriterien insbesondere in Hinblick auf die klinische Differentialdiagnose von Ekzemerkrankungen untersuchen. (Agero et al 2007, Koller S et al 2009)

Weitere Untersuchungen stellen die Beschreibung weiterer Tumoren und benigner Proliferationen als Einzelfallbeschreibungen oder kleinerer Pilotstudien dar, wie z.B. die LSM Darstellung des Trichoepithelioms (Ardigo et al 2007), des ekkrinen Poroms (Tachihara et al 2002), der disseminierten, superfiziellen aktinischen Porokeratose (Ulrich et al BJD 2007), der Talgdrüsenhyperplasie (González et al Lasers Surg Med 1999) des Hydrokystoms (Willard et al Dermatol Surg 2011), sowie der seborrhoischen Keratosen (Ahlgriem-Siess et al Arch Dermatol 2010). Andere Studien untersuchten vaskulärer Läsionen und Fehlbildungen mit Hilfe der LSM (Aghassi D et al JAAD 2000, Astner et al Dermatol Surg 2009), wobei im Einzelfall charakteristische LSM 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.

4.5 Entzündliche Dermatosen

Unter den entzündlichen Dermatosen stellen das akute Kontaktekzem sowie die Psoriasis die mit Hilfe der LSM am besten untersuchten Hauterkrankungen dar. (Swindells et al 2004, Hicks et al 2003, Astner et al JAAD 2006, Astner et al Dermatitis 2006, Ardigo et al 2009, Koller et al 2009, Sauermann et al 2002) 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 (Meyer et al 2005, Ulrich et al 2008, González et al 2002, Goldgeier et al 1999, Koller et al 2009, Longo et al Arch Dermatol. 2005) oder auch Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen untersucht. (Ardigo et al BJD 2007).

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, junktional, peripapillär, perivaskulär bzw. diffus in der oberflächlichen Dermis liegen können. Begleitende Veränderungen z.B. des Bindegewebes bei Autoimmunprozessen konnte mit Hilfe der LSM ebenfalls dargestellt werden. (Ardigo et al BJD 2007). 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 kutaner Pigmentstörungen wie zum Beispiel Vitiligo oder Melasma. (Ardigo et al 2007, Kang HY et al Exp Dermatol 2010, Kang et al JAAD 2010, Lai et al Skin Res Technol 2011)

4.6 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 dar. (Meyer et al 2005)

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. (Longo et al Arch Dermatol 2005, Levi et al Lasers Med Sci 2011)

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. (Goldgeier et al 2002, González et al J Cutan Pathol 1999)

Im Bereich der kosmetologischen Forschung wird die konfokale Lasermikroskopie zur Objektivierung und Quantifizierung von Therapieeffekten eingesetzt. Hautalterung geht 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.

(Sauermann et al BMC Dermatol 2002, Yamashita et al Exp Dermatol 2007, Ulrich et al BJD2009, Middelkamp-Hup et al JID 2006)

4.7 Fluoreszenzdiagnostik in vivo

Mit den Multiwave-Mikroskopen ist eine Fluoreszenzdiagnostik möglich. Für die in vivo Fluoreszenzdiagnostik sind nur wenige Fluoreszenzfarbstoffe zugelassen, die insbesondere in der ophthalmologischen Diagnostik zur i.v. Applikation Anwendung finden. Natriumfluoreszein zeigt nach Anregung mit den Wellenlängen 445 oder 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 Sentineldiagnostik 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 (Suihko et al 2005, Swindle Let al JID 2003, Teichmann et al 2007, Lange-Asschenfeldt et al J Biomed Opt 2009). Natriumfluoreszein kann auch intrakutan gespritzt werden, wofür Indocyangrün und die Blaufarben wegen toxischer Effekte und des Risikos einer Tätowierung nur bedingt geeignet sind. Systematische Studien zur in vivo Fluoreszenzdiagnostik stehen noch aus.

5 Ex vivo konfokale Lasermikroskopie

Die Auflösung und Schichtdicke der ex vivo konfokalen Lasermikroskopie entspricht der bei der in vivo Technik (s. 4.1). Die maximale Eindringtiefe ins Gewebe beträgt hierbei ca. 0,05 mm, so dass nur die jeweiligen Außenseiten der auf dem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte untersucht werden können. Entsprechend ist die derzeitige Hauptanwendung der ex vivo konfokalen Lasermikroskopie die Untersuchung von Schnitträndern bei Tumoroperationen mittels mikrographisch kontrollierter Chirurgie. (Käb et al 2009, Patel et al 2007, Schüle et al 2009, Ziefle et al 2010)

5.1 Untersuchungstechnik

Die Untersuchung kann sowohl im Reflexionsmodus bei 830 nm als auch im Fluoreszenzmodus bei 445 und 658 nm stattfinden (s.u.). Beim derzeitig verfügbaren VivaScope 2500 System 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 750 µm x 750 µm verwendet, welche über die im Gerät verwendete Software zu Feldern wählbarer Größe (maximal 14 mm x 14 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. Für besondere Fragestellungen kann auch eine höhere Auflösung mit Scanfeldern von dann 500 µm x 500 µm eingestellt werden.

5.1.1 Reflexionsmodus

Wie im in vivo Modus dienen die Strukturen in der Haut als 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 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 445 nm und 658 nm zur Anregung von ins Gewebe eingebrachten Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung; die Anregungswellenlänge wird hierbei durch ein Filtersystem im Gerät automatisch

ausgeblendet, so dass nur das Fluoreszenzlicht zur Bildgebung verwendet wird. Ziel ist es, durch möglichst selektive Bindung der Farbstoffe an spezifische Strukturen (zur Tumordiagnostik z.B. die Zellkerne) die Kontrastierung und so die Auswertbarkeit zu erhöhen.

Für die blaue Wellenlänge von 445 nm kommt zum Beispiel Acridinorange (Karen et al 2009) in Frage, das die Zellkerne deutlicher hervortreten lässt.

Im Rotmodus bei 658 nm werden als Fluoreszenzfarbstoffe derzeit insbesondere Toluidinblau oder Methylenblau verwendet, wobei es sich derzeit noch um eine weitgehend experimentelle Untersuchungstechnik handelt, die noch nicht standardisiert ist.

Prinzipiell wird bei der Fluoreszenztechnik nach vorausgehender Kontrastverstärkung durch Proteinfällung, wie oben beschrieben, das Gewebe in die Fluoreszenzfarbstoffe eingelegt, so dass die Farbe in die obersten Gewebeschichten diffundieren kann und anschließend für die Fluoreszenzbildgebung verwendet wird.

Derzeit existieren diesbezüglich keine standardisierten Untersuchungstechniken, welche in der Leitlinie angegeben werden könnten. Die Untersuchung und Evaluierung weiterer Farbstoffe ist für die nahe Zukunft zu erwarten.

5.2 Indikationen

Als einzige Indikationen für die ex vivo Konfokalmikroskopie können derzeit die Untersuchung von Randschnitten im Rahmen einer mikrographisch kontrollierten Chirurgie bei Tumorexzisionen und die Schnellschnittdiagnostik angeführt werden. Der größte Vorteil dieses Verfahrens wäre eine im Vergleich zu den bisherigen schnittrandkontrollierten Verfahren extrem kurze Untersuchungszeit (ca. 5 Minuten pro Bild).

Vorläufige Untersuchungen zur Evaluierung der Schnittrandkontrolle mit dem Konfokalmikroskop liegen bisher nur für den Reflexionsmodus vor. Schüle et al beschrieben 2009 an knapp 250 Schnittrandbildern 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 %. In eigenen

Untersuchungen (Käb et al 2009) kamen wir an 134 untersuchten Rand- und Tiefenpräparaten auf eine Spezifität von 90 % und einer Sensitivität von 82 %.

Die genannten Daten zeigen, dass die Methode derzeit die HE-Histologie in der mikrographisch kontrollierten Chirurgie sicher nicht vollständig ersetzen kann. Bei in der konfokalen Untersuchung eindeutig tumorpositiven Schnitträndern 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 von Acridinorange als Farbstoff, welcher die Tumorzellen kontrastreich hervortreten lässt, 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 hochinteressant macht. Einen weiteren Ansatz könnte die Kopplung fluoreszierender Farbstoffe mit spezifischen Antikörpern (für das Basalzellkarzinom z.B. BerEp4) darstellen.

6 Literatur

1. Ahlgrim-Siess V, Massone C, Koller S, Fink-Puches R, Richtig E, Wolf I, Gerger A, Hofmann-Wellenhof R. In vivo confocal scanning laser microscopy of common naevi with globular, homogeneous and reticular pattern in dermoscopy. *Br J Dermatol* 2008;158(5):1000-7
2. Ahlgrim-Siess V, Cao T, Oliviero M, Hofmann-Wellenhof R, Rabinovitz HS, Scope A. The vasculature of nonmelanocytic skin tumors in reflectance confocal microscopy, II: Vascular features of seborrheic keratosis. *Arch Dermatol* 2010 Jun;146(6):694-5
3. Antoniou C, Lademann J, Richter H, Astner S, Patzelt A, Zastrow L, Sterry W, Koch S. Analysis of the melanin distribution in different ethnic groups by in vivo laser scanning microscopy. *Laser Phys Lett* 2009; 6(5):393-398
4. Agero AL, Busam KJ, Benvenuto-Andrade C, Scope A, Gill M, Marghoob AA, González S, Halpern AC. "Reflectance Confocal Microscopy of Pigmented Basal Cell Carcinoma". *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(4):638-43.
5. Agero AL, Gill M, Ardigo M, Myskowski P, Halpern AC, González S. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: A preliminary study. *J Am Acad Dermatol* 2007;57(3):435-41
6. Aghassi D, Anderson RR, Gonzalez S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(1 Pt 1):42-8
7. Aghassi D, Anderson RR, González S. Time-sequence histologic imaging of laser-treated cherry angiomas with in vivo confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000 Jul;43(1 Pt 1):37-41
8. Ardigo M, Zieff J, Scope A, Gill M, Spencer P, Deng L, Marghoob AA. Dermoscopic and reflectance confocal microscope findings of trichoepithelioma. *Dermatology* 2007;215(4):354-8
9. Ardigo M, Cota C, Berardesca E, González S. "Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis." *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(6):660-7
10. Ardigo M, Maliszewski I, Cota C, Scope A, Sacerdoti G, Gonzalez S, Berardesca E. "Preliminary Evaluation of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy Features of Discoid Erythematosus". *Br J Dermatol* 2007; 156(6):1196-203
11. Ardigo M, Malizewsky I, Dell'anna ML, Berardesca E, Picardo M. Preliminary evaluation of vitiligo using in vivo reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007 Nov;21(10):1344-50;
12. Astner S, González S, Gonzalez E. Non-Invasive evaluation of Allergic and Irritant Contact Dermatitis by in-vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17(4):182-91
13. Astner S, Burnett N, Cheung AC, Rius- Díaz F, Doukas AG, González S and González E. The impact of skin color on the susceptibility to irritant contact dermatitis: a non-invasive evaluation. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:458-65

14. Astner S, Gonzalez E, Cheung AC, Rius-Diaz F, González S. Pilot Study on the Sensitivity and Specificity of in-vivo Reflectance Confocal Microscopy in the diagnosis of Allergic Contact Dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(6):986-92
15. Astner S, González S, Cuevas J, Röwert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Ulrich M. Preliminary evaluation of benign vascular lesions using in vivo reflectance confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2010 Jul;36(7):1099-110
16. Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008 Nov-Dec;84(6):1421-30
17. Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, Rajadhyaksha M, Menaker GM, Charles C, Jiang SB. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004;30(12 Pt 1):1470-8
18. Gerger, A et al. Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol* 2005;124(3):493-8
19. Goldgeier M, Alessi-Fox C, Zavislan JM, Harris D, González S. "Noninvasive Imaging, Treatment and microscopic Confirmation of Clearance of Basal Cell Carcinoma". *Dermatol Surg* 2003; 29(3):205-10
20. Goldgeier M, Alessi C, Muhlbauer JE: Immediate noninvasive diagnosis of herpesvirus by confocal scanning laser microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2002, 46(5):783-785
21. González S, Rajadhyaksha M, Gonzalez-Serva A, White WM, Anderson RR: Confocal reflectance imaging of folliculitis in vivo: correlation with routine histology. *J Cutan Pathol* 1999, 26(4):201-205
22. González S. "Characterization of Psoriasis In Vivo by Confocal Reflectance Microscopy". *J Med* 1999; 30(5-6):337-356
23. González S, González E, White WM, Rajadhyaksha M, Anderson, RR. "Allergic Contact Dermatitis: Correlation of In Vivo Confocal Imaging to Routine Histology". *J Am Acad Dermatol* 1999; 40(5 Pt 1):708-13
24. González S, White WM, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González E. Confocal imaging of sebaceous gland hyperplasia in vivo to assess efficacy and mechanism of pulsed dye laser treatment. *Lasers Surg Med* 1999;25(1):8-12
25. González S, Sackstein R, Anderson RR, Rajadhyaksha M. Real-time evidence of in vivo leukocyte trafficking in human skin by reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001;117(2):384-386
26. González S, Tannous Z. "Real-time, In Vivo Confocal Reflectance Microscopy of Basal Cell Carcinoma". *J Am Acad Dermatol* 2002; 47(6):869-74
27. Hicks SP, Swindells KJ, Middelkamp-Hup MA, Sifakis MA, Gonzalez E, Gonzalez S: Confocal histopathology of irritant contact dermatitis in vivo and the impact of skin color (black vs white). *J Am Acad Dermatol* 2003, 48(5):727-734
28. Horn M, Gerger A, Koller S, Weger W, Langsenlehner U, Krippel P, Kerl H, Samonigg H, Smolle J. The use of confocal laser-scanning microscopy in microsurgery for invasive squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007;156(1):81-4

29. Horn M, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Koller S, Kerl H, Samonigg H, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2008;34(5):620-5
30. <http://www.vivascope.de>
31. Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González S. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001;116(6):846-852
32. Karen JK, Gareau DS, Dusza SW, Tudisco M, Rajadhyaksha M, Nehal KS. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol*. 2009;160(6):1242-50
33. Käß S, Landthaler M, Hohenleutner U. Confocal laser scanning microscopy – evaluation of native tissue sections in micrographic surgery. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 819-823
34. Kang HY, Bahadoran P, Ortonne JP. Reflectance confocal microscopy for pigmentary disorders. *Exp Dermatol* 2010 Mar;19(3):233-9
35. Kang HY, le Duff F, Passeron T, Lacour JP, Ortonne JP, Bahadoran P. A noninvasive technique, reflectance confocal microscopy, for the characterization of melanocyte loss in untreated and treated vitiligo lesions. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Nov;63(5):e97-100
36. Koller S, Gerger A, Ahlgrimm –Siess V, Weger W, Smolle J, Hoffmann-Wellenhof R. In vivo reflectance confocal microscopy of erythro squamous skin diseases. *Exp Dermatol* 2009;18(6):536-40
37. Lai LG, Xu AE. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of vitiligo, nevus depigmentosus and nevus anemicus. *Skin Res Technol* 2011 Mar 24
38. Lange-Asschenfeldt B, Alborova A, Krüger-Corcoran D, Patzelt A, Richter H, Sterry W, Kramer A, Stockfleth E, Lademann J. Effects of a topically applied wound ointment on epidermal wound healing studied by in vivo fluorescence laser scanning microscopy analysis. *J Biomed Opt* 2009 Sep-Oct;14(5):054001
39. Langley RGB, Rajadhyashka M. Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(3): 365-76
40. Levi A, Mumcuoglu KY, Ingber A, Enk CD. Assessment of *Sarcoptes scabiei* viability in vivo by reflectance confocal microscopy. *Lasers Med Sci* 2011 May;26(3):291-2
41. Longo C, Bassoli S, Monari P, Seidenari S, Pellacani G. Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo detection of *Sarcoptes scabiei*. *Arch Dermatol* 2005 Oct;141(10):1336
42. Marra DE, Torres A, Schanbacher CF, Gonzalez S. Detection of residual basal cell carcinoma by in vivo confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2005;31(5):538-41
43. Meyer LE, Otberg N, Tietz HJ, Sterry W, Lademann J: In vivo imaging of *Malassezia* yeasts on human skin using confocal laser scanning microscopy. *Laser Physics Letters* 2005; 2(3):148-152
44. Middelkamp-Hup MA, Park HY, Lee J, Gilchrist BA, Gonzalez S: Detection of UV-induced pigmentary and epidermal changes over time using in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2006; 126(2):402-407

45. Nori S, Rius-Díaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P, Torres A, González S. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 2004;51(6):923-30
46. Patel YG, Nehal KS. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt* 2007; 12(3): 034027
47. 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;152:384-6
48. Pellacani G, Cesinaro A M, Seidenari S. "In Vivo Assessment of Melanocytic Nests in Nevi and Melanomas by Reflectance Confocal Microscopy". *Mod Pathol* 2005; 18(4):469-74
49. Pellacani G, Cesinaro AM, Longo C et al. Microscopic in vivo description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas. *Arch Dermatol* 2005; 141:147-54
50. Pellacani G, Cesinaro A.M., Seidenari S. "Reflectance-Mode Confocal Microscopy of Pigmented Skin Lesions – Improvement in Melanoma Diagnostic Specificity". *J Am Acad Dermatol* 2005; 53(6):979-85
51. Pellacani G, Guitera P, Longo C et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscope for imaging human tissue microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2007;127(12):2759-65
52. Pellacani G, Longo C, Malvehy J, Puig S, Carrera C, Segura S, Bassoli S, Seidenari S. "In Vivo Confocal Microscopic and Histopathologic Correlations of Dermoscopic Features in 202 Melanocytic Lesions". *Arch Dermatol* 2008;144(12):1597-1608
53. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 1995;104: 946-52
54. Rajadhyaksha M, Anderson RR, Webb RH. Video-rate confocal scanning laser s *in vivo*. *Applied Optics* 1999;38:1-12
55. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999;13:293-303
56. Ruocco E, Argenziano G, Pellacani G, Seidenari S. "Noninvasive Imaging of Skin Tumors". *Dermatol Surg* 2004; 30(2 Pt 2):301-10
57. Sauermann K, Gambichler T, Jaspers S, Radenhausen M, Rapp S, Reich S, Altmeyer P, Clemann S, Teichmann S, Ennen J, Hoffmann K. Histometric data obtained by in vivo confocal laser scanning microscopy in patients with systemic sclerosis. *BMC Dermatol* 2002;6:2-8
58. Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M, Rotterdam S, Strucker M, Altmeyer P, Hoffman K. "Investigation of basal Cell Carcinoma by Confocal Laser Scanning Microscopy In Vivo". *Skin Res Technol* 2002; 8(3):141-7
59. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero A, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, Busam K, Marra D, Torres A, Propperova I, Langley R, Marghoob A, Pellacani G, Seidenari S, Halpern

- A, González S. "In Vivo Reflectance Confocal Microscopy Imaging of Melanocytic Skin Lesions: Consensus Terminology, Glossary and Illustrative Images". *J Am Acad Dermatol* 2007; 57:644-58
60. Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Dietz K, Möhrle M. Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2009; 161: 691-720
61. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malveyh J. Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol* 2007;143(7):883-6
62. Suihko C, Swindle LD, Thomas SG, Serup J. Fluorescence fibre-optic confocal microscopy of skin in vivo: microscope and fluorophores. *Skin Res Technol* 2005 Nov;11(4):254-67
63. Swindells K, Burnett N, Rius-Diaz F, González E, Mihm MC, González S. Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:220-228
64. Swindle LD, Thomas SG, Freeman M, Delaney PM. View of normal human skin in vivo as observed using fluorescent fiber-optic confocal microscopic imaging. *J Invest Dermatol* 2003 Oct;121(4):706-12
65. Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *J Am Acad Dermatol* 2004 Feb;50(2):220-8
66. Tachihara R, Choi C, Langley RG, Anderson RR, González S. In vivo confocal imaging of pigmented eccrine poroma. *Dermatology* 2002;204(3):185-9
67. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, Presse G, Neubert RH, Sterry W, Lademann J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Nov;67(3):699-706
68. Ulrich M, Stockfleth E, Roewert J and Astner S. Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007, 157 S2:56-8
69. Ulrich M, Maltusch A, Röwert J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Actinic keratoses: non- invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol* 2007; 156(3):13-17
70. Ulrich M, Forschner T, Röwert J, González S, Stockfleth E, Sterry W, Astner S. Differentiation between actinic keratoses and disseminated superficial actinic porokeratoses with reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2007; 156(3):47-52
71. Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Röwert J, González S, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Clinical Applicability of in vivo Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnosis of Actinic Keratoses. *J Dermatol Surg*, 2008;34(5):610-9
72. Ulrich M, Rüter C, Astner S, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Röwert-Huber J. Comparison of UV-induced skin changes in sun-exposed vs. sun-protected skin- preliminary evaluation by reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol* 2009 Nov;161 Suppl 3:46-53
73. Ulrich M, Krueger-Corcoran D, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Reflectance Confocal Microscopy for Noninvasive Monitoring of Therapy and Detection of Subclinical Actinic Keratoses. *Dermatology* 2010;220(1):15-24

74. Ulrich M, González S, Lange-Asschenfeldt B, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011 Mar;25(3):276-84
75. Willard K, Warschaw KE, Swanson DL. Use of reflectance confocal microscopy to differentiate hidrocystoma from Basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2011 Mar;37(3):392-4
76. Yamashita T, Akita H, Astner S, Lerner EA, González S. The evaluation of the melanin and blood flow changes in UVA irradiated skin by reflectance-mode confocal microscopy. *Exp Dermatol* 2007; 16:905-911
77. Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Möhrle M. Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2010; 146(8): 843-847

Die Leitlinie wurde von der 2+2 Kommission ohne Einwände verabschiedet.

Autoren:

Julia Welzel, Martina Ulrich, Susanne Lange-Asschenfeldt, Ulrich Hohenleutner

Erstellungsdatum: 07/2011

Überarbeitung von:

Nächste Überprüfung geplant: 07/2016

Die "Leitlinien" der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften sind systematisch entwickelte Hilfen für Ärzte zur Entscheidungsfindung in spezifischen Situationen. Sie beruhen auf aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen und in der Praxis bewährten Verfahren und sorgen für mehr Sicherheit in der Medizin, sollen aber auch ökonomische Aspekte berücksichtigen. Die "Leitlinien" sind für Ärzte rechtlich nicht bindend und haben daher weder haftungsbegründende noch haftungsbefreiende Wirkung.

Die AWMF erfasst und publiziert die Leitlinien der Fachgesellschaften mit größtmöglicher Sorgfalt - dennoch kann die AWMF für die Richtigkeit des Inhalts keine Verantwortung übernehmen. Insbesondere für Dosierungsangaben sind stets die Angaben der Hersteller zu beachten!

© Deutsche Gesellschaft für Dermatologie

Autorisiert für elektronische Publikation: AWMF online