

# Ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie – die neue Bedside-Histologie

## Ex vivo Confocal Laserscanmicroscopy – New Bedside-Histology

### Autor

D. Hartmann

### Institut

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-1072-7162> |

Online-Publikation: 5.3.2020 |

Akt Dermatol 2020; 46: 152–157

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 0340-2541

### Korrespondenzadresse

PD Dr. Daniela Hartmann, PhD, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Frauenlobstr. 9–11, 80337 München und

Klinik für Dermatologie und Allergologie der München Klinik Thalkirchnerstraße,

Thalkirchner Str. 48, 80337 München

[Daniela.Hartmann@med.uni-muenchen.de](mailto:Daniela.Hartmann@med.uni-muenchen.de)

### ZUSAMMENFASSUNG

Ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie (ex vivo KLM) bietet eine schnelle histopathologische Untersuchung des frisch exzidierten Gewebes mit der Möglichkeit, eine schnittrand-

kontrollierte Chirurgie (Mohs-Chirurgie) direkt intraoperativ durchzuführen. Die aktuelle Literatur zeigt vielversprechende Ergebnisse insbesondere bei der Beurteilung von Basalzellkarzinomen. Überdies hinaus gibt es zahlreiche Hinweise, dass man diese innovative diagnostische Maßnahme auch bei der Untersuchung anderer nicht melanozytärer und melanozytärer Hautneoplasien sowie für entzündliche und infektiöse Dermatosen einsetzen kann. Dieser Beitrag fasst bisherige Erkenntnisse und Erfahrungen zur ex vivo KLM zusammen und bietet eine Übersicht der aktuellen Literatur zu diesem Thema.

### ABSTRACT

Ex vivo confocal laser scanning microscopy (ex vivo CLSM) provides a fast, histopathological examination of freshly excised tissue with the ability to perform a microscopically controlled surgery (Mohs surgery) directly intraoperatively. The current literature shows promising results especially in the assessment of basal cell carcinoma. In addition, there are numerous indications that this innovative diagnostic measure can also be used in the study of other non-melanocytic and melanocytic skin neoplasms as well as for inflammatory and infectious dermatoses. This article summarizes previous findings and experiences on ex vivo CLSM and provides an overview of current literature on this topic.

## Einleitung

Die ex vivo konfokale Laserscanmikroskopie (ex vivo KLM) ist eine neuartige diagnostische Methode, mit der sich frisch herausgeschnittenes oder gefrorenes Gewebe in Echtzeit und ultraschnell mikroskopisch untersuchen lässt. Im Gegensatz zur in vivo KLM, deren Eindringtiefe begrenzt ist, bietet die ex vivo KLM die Möglichkeit, alle Hautschichten ohne Einschränkung in der Tiefe zu untersuchen [1]. Ein weiterer Vorteil der ex vivo KLM ist die mögliche Kombination verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur Gewebefärbung, die den Kontrast bei der Bildgebung erhöht und sogar die Färbung spezifischer Strukturen ermöglicht [2, 3]. Die ex vivo KLM wurde hauptsächlich zur intraoperativen Beurteilung von nicht melanozytären, aber auch melanozytären Hauttumoren und zur Kontrolle chirurgischer Hautränder in der mikroskopisch kontrollierten oder mikrografischen Chirurgie verwendet [1, 2, 4–8]. Nur wenige Berichte haben bisher die Anwendbarkeit der ex vivo KLM für infektiöse und ent-

zündliche Erkrankungen der Haut [9–11] sowie bei Erkrankungen der inneren Organe [12–14] und bei Hautanhangsgebilden wie Haaren und Nägeln [11, 15, 16] gezeigt.

Seit Neuestem wurden erfolgreiche Untersuchungen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern von Hauttumoren [4], bei kutaner Vaskulitis [17] und bullösem Pemphigoid [18] durchgeführt. Dieses weist auf eine mögliche Anwendung von ex vivo KLM als Alternativmethode für immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen hin.

## Die ex vivo KLM-Methode

Die ex vivo KLM wird für eine schnelle mikroskopische Untersuchung angewendet. Sie ermöglicht die Durchführung von optischen Schnitten am frisch exzidierten Gewebe und generiert in extrem kurzer Zeit digitale Bilder mit hoher Auflösung, die der traditionellen Histologie sehr ähneln.

Das ex vivo KLM-Gerät (Vivascope 2500M-G4; Lucid Inc., Rochester, New York) verwendet 2 verschiedene Laser mit Wellenlängen von 488 nm (blau) und 785 nm (infrarot). Der blaue Laser regt Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Acridine Orange, Fluorescein) an, die vor der ex vivo KLM-Untersuchung auf das Gewebe aufgebracht werden, und hebt Zellstrukturen von Interesse hervor. Der Infrarotlaser wird verwendet, um ein Reflexionssignal zu erzeugen. Sowohl Fluoreszenz- als auch Reflexionssignale werden gleichzeitig erfasst und in Echtzeit korreliert. Die ex vivo KLM ermöglicht eine maximale Untersuchungstiefe von 200 µm, einen optischen 4-µm-dicken Schnitt und eine Bildauflösung von 1024 × 1024 Pixel. Die horizontale optische Auflösung beträgt in der Mitte des Sichtfelds weniger als 1,25 µm, die vertikale weniger als 5 µm. Das resultierende Bild kann mit einer bis zu 550-fachen Vergrößerung untersucht werden. Darüber hinaus kann das Gerät mithilfe von Reflexions- und Fluoreszenzsignalen in Falschfarben eine digitale rosa und violette Färbung reproduzieren und bietet somit eine digitale Hämatoxylin-Eosin (H&E)-ähnliche Färbung, die der echten H&E-Färbung in den konventionellen histopathologischen Schnitten sehr ähnelt [19]. Wichtig ist zu erwähnen, dass das frisch exzidierte Gewebe vor der ex vivo KLM-Untersuchung nicht in Formalin fixiert werden darf. Dementsprechend muss das Gewebe mit Vorsicht behandelt werden. Bei großen Gewebestücken, die einen makroskopischen manuellen Zuschnitt benötigen, so wie es aus der konventionellen Histologie bereits bekannt ist, kann es bei der ex vivo KLM zu gewissen Hindernissen kommen, v. a. aufgrund des erschwerten Zuschnitts des nicht fixierten Gewebes.

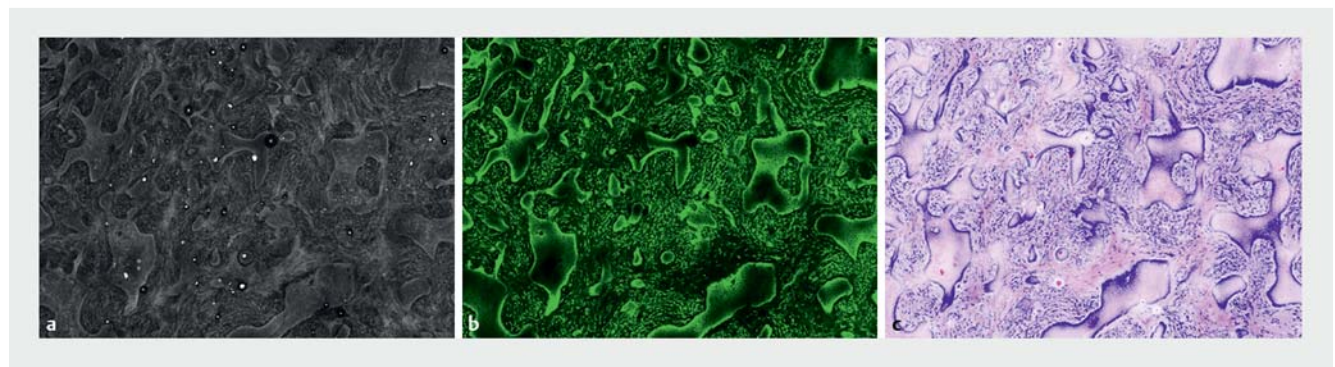
## Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (BZK; ► **Abb. 1**) ist die weltweit am häufigsten auftretende Form vom Hautkrebs und ist die bestuntersuchte dermatologische Entität in der Geschichte der ex vivo KLM, inklusive Studien zum ex vivo KLM-Einsatz in der Mohs-Chirurgie [4, 5, 8, 20–22]. In einer der kürzlich publizierten Arbeiten zur ex vivo KLM-Untersuchung des BZK konnte gezeigt werden, dass eine schnelle und einfache mikroskopische Beurteilung des BZK in der ex vivo KLM sogar nur anhand einer vereinfachten 3-Kriterien-basierten Tumorevaluation möglich

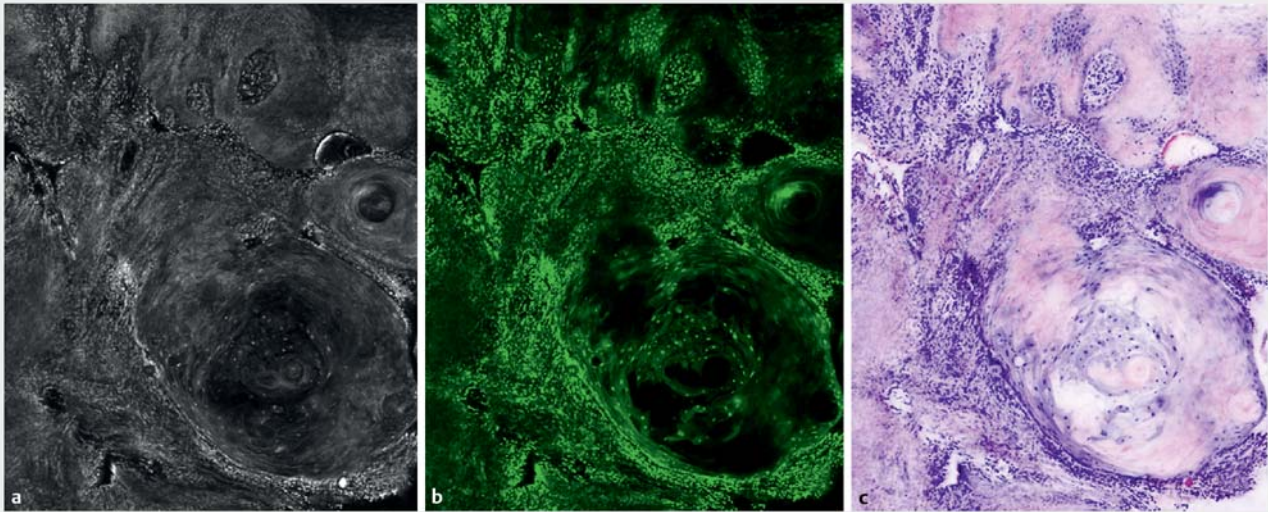
ist und dass es die diagnostischen und therapeutischen Verfahren in der Dermatologie einschließlich der mikroskopisch kontrollierten Chirurgie beschleunigen kann [5]. Die ex vivo KLM ermöglichte die intraoperative Untersuchung von BZK mit hoher Sensitivität und Spezifität, lieferte nützliche Informationen zum Tumorsubtyp und zeigte, dass sowohl erfahrene als auch nicht erfahrene Untersucher diesen diagnostischen Ansatz mit hervorragenden Ergebnissen anwenden können [5]. Es wurde auch in einer aktuell veröffentlichten Arbeit mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt, dass die ex vivo KLM ein neues vielversprechendes Instrument in der dermatologischen Diagnostik darstellt, welche sich als eine schnellere Alternative zur Gefrierhistologie beim BZK anbietet und eine Sensitivität von 79,8% sowie eine Spezifität von 95,8% zeigt [20].

## Plattenepithelkarzinom der Haut

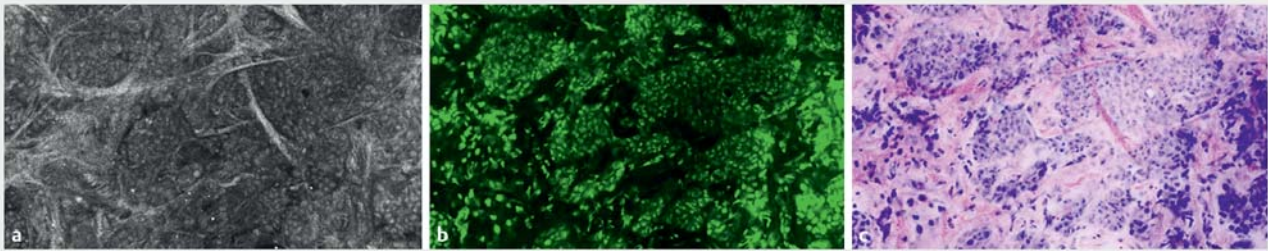
Ex vivo KLM hat sich als nützlich erwiesen, um den Grad der Dysplasie bei Epitheltumoren zu bestimmen, besonders bei der Erkennung einer hochgradigen Dysplasie [23]. Die ex vivo KLM-Eigenschaften der invasiven und In-situ-Karzinome wurden definiert [6, 15, 24]. Zudem wurde untersucht, ob die ex vivo KLM-spezifischen Kriterien nicht nur für die Diagnose eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Haut (PEK; ► **Abb. 2**) gegenüber einem In-situ-Karzinom, sondern auch für die Bestimmung des Differenzierungsgrads des PEK einzusetzen sind [6]. Die neueste Analyse zeigte, dass das Vorhandensein von Erosionen oder Ulzerationen, prallen hellen oder gesprenkelten Zellen in der Dermis, Keratinperlen und peritumorale entzündliche Infiltraten mit der Diagnose eines invasiven PEK korrelierte. Erosion oder Ulzeration sowie peritumorales entzündliches Infiltrat wurden häufiger bei schlecht differenzierten oder undifferenzierten Tumoren beobachtet. Pralle helle oder gesprenkelte Zellen in der Dermis wurden in gut differenzierten Tumoren seltener beobachtet. Das Vorhandensein von Keratinperlen war mit gut oder mäßig differenzierten Tumoren assoziiert [6]. Unter Verwendung des Reflexionsmodus (ohne Fluoreszenzmittel) wurden in der ex vivo KLM dicht gepackte und unregelmäßig organisierte Kerne sowie Kernatypien als die relevantesten KLM-Merkmale invasiver PEK mit einer Sensitivität und Spezifität von 95% bzw. 96% definiert [25, 26]. Zusammenfassend



► **Abb. 1** Sklerodermiformes Basalzellkarzinom in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie: **a** Reflexionsmodus, **b** Fluoreszenzmodus, **c** digitale Hämatoxylin-Eosin-ähnliche Färbung.



► **Abb. 2** Plattenepithelkarzinom der Haut in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie: **a** Reflexionsmodus, **b** Fluoreszenzmodus, **c** digitale Hämatoxylin-Eosin-ähnliche Färbung.



► **Abb. 3** Kutane Metastase eines malignen Melanoms in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie: **a** Reflexionsmodus, **b** Fluoreszenzmodus, **c** digitale Hämatoxylin-Eosin-ähnliche Färbung.

lässt sich sagen, dass die ex vivo KLM eine schnelle Untersuchung des PEK ermöglicht und nützliche Informationen zur Invasivität und Einstufung des Tumors liefert [6].

## Malignes Melanom

Die Erfahrung mit der ex vivo KLM hat gezeigt, dass die Untersuchung von melanozytären Läsionen komplexer und mit einer geringeren diagnostischen Sicherheit verbunden ist als die von BZK und PEK. Bisher wurde über einen Fall eines subungualen knotigen Melanoms [27–29] und eines Lidmelanoms berichtet, das mit in vivo und ex vivo KLM untersucht wurde [30] und über 9 Patienten mit einer in vivo und ex vivo durchgeführten intraoperativen Reflexionsmikroskopie der Nagelmatrix bei Melanonychia striata, um die Realisierbarkeit einer intraoperativen Diagnose mittels Reflexionsmikroskopie zu testen [25]. Die bisher größte Studie zur ex vivo KLM bei melanozytären Läsionen umfasste Junctional-, Compound-, Dermal-, Spitz- und dysplastische Nävi sowie verschiedene Subtypen des malignen Melanoms [2]. Die Korrelation der ex vivo konfokalen Befunde mit der Histopathologie ermöglichte die Identifizierung verschie-

dener Arten von melanozytären Läsionen und die Unterscheidung von gutartigen und bösartigen Merkmalen [2]. Die Studie zeigte, dass dadurch, dass die ex vivo KLM nicht die typischen In-vivo-Horizontalmosaiken, bekannt aus der in vivo KLM, reproduziert, sondern die vertikale histologische Darstellung widerspiegelt, hier nicht alle typischen In-vivo-Muster nachweisbar sind. Bei der ex vivo KLM der melanozytären Läsionen muss man sich eher an histologischen Kriterien orientieren. Diese Ergebnisse können dazu beitragen, die ex vivo KLM als zusätzliches Instrument für die unmittelbare intraoperative Diagnose von melanozytären Läsionen weiterzuentwickeln [2]. Eine kutane Metastase eines malignen Melanoms in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie zeigt die ► **Abb. 3**.

Bei malignen Melanomen spielt die histologische Tumordicke eine wesentliche Rolle für weitere Behandlungsstrategien. Die sofortige intraoperative Messung der Tumordicke mittels ex vivo KLM könnte die Entscheidung für weitere Operationsverfahren bei malignen Melanomen beschleunigen. Eine Pilotstudie untersuchte 10 histologisch bestätigte maligne Melanome von verschiedenen Spenderstellen, verglich dabei die histopathologische mit der konfokalen Tumordicke. Dabei ließ sich eine

hohe Korrelation nachweisen. Dadurch wurde das Potenzial der ex vivo KLM für die intraoperativen Entscheidungen zur Exzision des Sicherheitsabstandes beim malignen Melanom verstärkt [7], muss jedoch in der Zukunft an einer größeren Studienpopulation weiter untersucht werden. Eine der Limitationen in dieser Studie war das Fehlen der Möglichkeit, das Gewebe zusätzlich einer immunhistochemischen Untersuchung zu unterziehen [7]. Während der konventionellen histopathologischen Untersuchung ermöglicht die zusätzliche immunhistochemische Färbung die Unterscheidung verschiedener Zelltypen. Die Möglichkeit der Immunfluoreszenzfärbungen könnte die Genauigkeit der ex vivo KLM-Diagnose verbessern. Diese Fragestellung wurde in einer anderen Pilotstudie untersucht [4]. Hier wurden Gewebeproben aus verschiedenen Hauttumoren mit FITC-markierten S100-, Melan-A- und Anti-Ber-EP4-Antikörpern gefärbt, bevor sie mit der ex vivo KLM im Fluoreszenz- und Reflexionsmodus untersucht wurden. Die Ergebnisse wurden mit Negativkontrollen sowie konventioneller Histopathologie verglichen [4]. Die Färbeprotokolle wurden ausgewertet, indem ein Bewertungssystem entsprechend der in der ex vivo KLM gefundenen Signalintensität eingerichtet wurde. Die S100-Färbung war bei 55,6% erfolgreich. Die Melan-A-Färbung war in 66,7% positiv, die Ber-EP4-Färbung zeigte ein Signal in 85,7%. Die Ergebnisse geben also Hinweise dafür, dass die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in der ex vivo KLM möglich ist, und dies könnte die intraoperative Diagnostik von Hauttumoren erleichtern und verbessern [4].

## Entzündliche und infektiöse Dermatosen

### Herpes-Infektionen

Die ex vivo KLM wurde erfolgreich auch bei entzündlichen und infektiösen Diagnosen durchgeführt. Mit einem Einsatz von spezifischen FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Antikörpern anti-HSV 1 und anti-HSV-2 konnte Herpes simplex-Virus (HSV) in Hautläsionen mittels ex vivo KLM identifiziert werden. Als Negativkontrollen dienten Proben von BP-Patienten, als

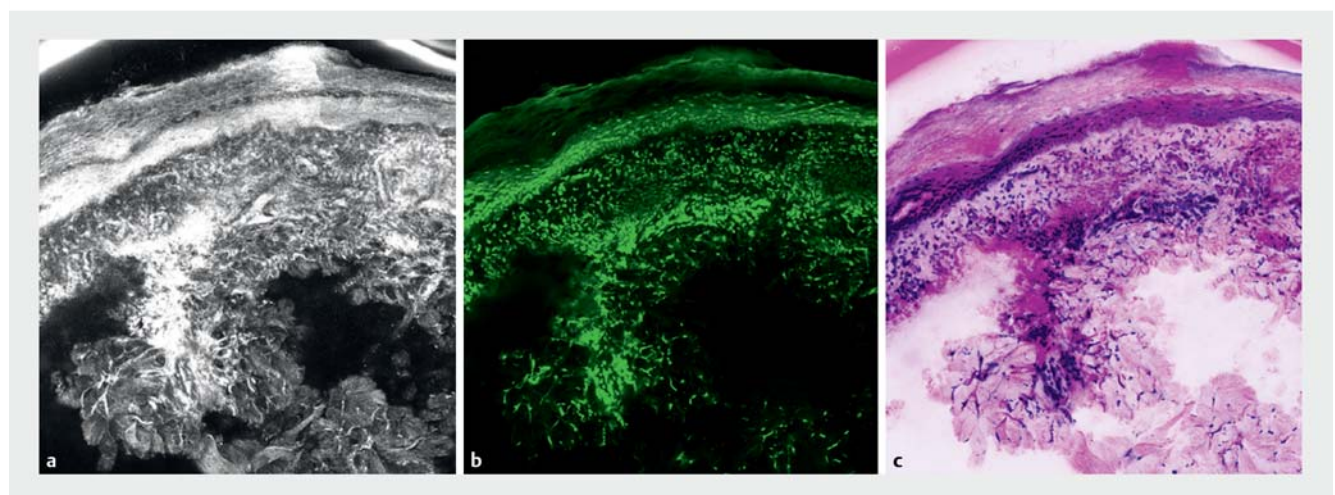
Positivkontrollen Viruskulturen und konventionelle direkte Fluoreszenzuntersuchung [9].

### Dermatophyosen

Die ex vivo KLM wurde auch zur Untersuchung von Dermatophyten-Infektionen verwendet. Bei der Ex-vivo-Anwendung wird das Problem der Bewegungen bei Kindern vermieden und ist nicht sehr invasiv, da das Sammeln der Haare im Falle einer Haardermatophyose aufgrund der parasitären Beteiligung i. d. R. nicht schmerzhaft ist [11]. Diese Studie konnte zeigen, dass die Haardermatophyten in der in vivo und ex vivo KLM identifizierbar und dass Konidien aufgrund ihres hohen Reflexionsvermögens in der KLM gut „sichtbar“ sind. Weitere Studien sind erforderlich, um die KLM-Merkmale verschiedener Arten von Dermatophyten zu definieren und die KLM-Leistungen mit den herkömmlichen Techniken zu vergleichen. Obwohl KLM derzeit die aktuellen diagnostischen Standards für die Haardermatophyose nicht ersetzen kann, kann es erfolgreich als zusätzliches Instrument eingesetzt werden, um die Diagnose zu erleichtern und die Notwendigkeit einer weiteren Untersuchung des Patienten aufzuzeigen [11].

### Psoriasis, Ekzem, Lichen planus und Lupus

Da entzündliche Erkrankungen häufig überlappende klinische Merkmale aufweisen, ist in zweifelhaften Fällen eine histopathologische Bewertung häufig erforderlich, um die endgültigen Diagnosen und damit die Therapie nicht zu verzögern. Eine retrospektive Studie zur Identifizierung der Schlüsselmerkmale für die Differenzialdiagnose von entzündlichen Hauterkrankungen, insbesondere Psoriasis, Ekzem, Lichen planus und diskoidem Lupus erythematoses in der ex vivo KLM analysierte und korrelierte die ex vivo KLM mit histologischen Untersuchungen der relevanten Diagnosen, um die Übereinstimmung und das für die korrekte Diagnose erforderliche Fachwissen zu bewerten [10]. Hier zeigte sich, dass die ex vivo KLM in den meisten Fällen die Unterscheidung der wichtigsten Entzündungsmerkmale ermöglichte und eine erhebliche Übereinstimmung mit den histopathologischen Diagnosen ergab [10]. Die ► **Abb. 4** präsen-



► **Abb. 4** Lichen ruber planus in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie: **a** Reflexionsmodus, **b** Fluoreszenzmodus, **c** digitale Hämatoxylin-Eosin-ähnliche Färbung.

tiert die Darstellung des Lichen ruber planus in der ex vivo konfokalen Laserscanmikroskopie in allen 3 Modi (Reflexions-, Fluoreszenzmodus und digitale Hämatoxylin-Eosin-ähnliche Färbung).

### Vaskulitis

Die Möglichkeit, die ex vivo KLM mit Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu kombinieren und sie als alternative diagnostische Methode für die immunhistochemische oder Immunfluoreszenz-Untersuchung der Haut anzuwenden, wurde nach den ersten Erfolgen beim Einsatz in der Tumordiagnostik [4] weiterverfolgt und an Hautproben von Patienten mit kutaner Vaskulitis getestet [17]. Die konventionelle direkte Immunfluoreszenz (DIF) liefert mithilfe des Fluoreszenzmikroskops den Nachweis von Antikörpern entlang der Gefäßwand und hilft bei der Klassifizierung der vaskulitischen Hauterkrankungen. Analog dazu wurden in der ex vivo KLM vaskuläre Immundeposita gesucht und die diagnostische Genauigkeit mit der konventionellen DIF verglichen. Es hat sich gezeigt, dass die ex vivo KLM die spezifische Bindung der Antikörper in oberflächlichen und tiefen dermalen Gefäßen identifizieren konnte, und es zeigte sich eine vergleichbare Leistung wie die konventionelle DIF bei der Diagnose von Vaskulitis [17].

### Bullöses Pemphigoid

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Bewertung der Anwendbarkeit von ex vivo KLM beim Nachweis der Basalmembran-Fluoreszenz beim bullösen Pemphigoid (BP) erzielt werden [18]. Hier zeigte sich eine Gesamtleistung von 65,3% bei der Identifizierung der Basalmembran-Fluoreszenz bei BP-Patienten. IgG- und C3-Ablagerungen entlang der Basalmembran wurden bei 50% bzw. 45,5% der Patienten nachgewiesen. Die Sensitivität der ex vivo KLM beim Nachweis der Basalmembran-Fluoreszenz war gering (IgG: 50%, C3: 45,5%), aber die Spezifität war hoch (IgG: 100, C3: 90%). Ex vivo KLM konnte neben der Immunreaktivität bei 84% der Patienten subepidermale Entzündungszellen ähnlich zu der histologischen Untersuchung nachweisen [18].

Aktuell laufen weitere Studien an Hautproben von Patienten mit Pemphigus vulgaris, Lichen planus und Lupus vulgaris. Hier wird v. a. darauf gewartet, ob auch bei diesen Diagnosen eine wesentliche Übereinstimmung mit herkömmlichen diagnostischen Methoden nachgewiesen werden kann und ob eine simultane Identifizierung von histopathologischen und Immunfluoreszenzmerkmalen mit der ex vivo KLM möglich ist.

### Andere Fachrichtungen

Nicht nur Dermatologen haben Interesse an ex vivo KLM gezeigt: Die innovative diagnostische Methode wurde zur Analyse verschiedener Organgewebe und -tumoren wie Brust- oder Blasenkrebs sowie in der Hals-, Nasen-, Ohrenchirurgie eingesetzt [12–14,31]. Erfolgreiche Versuche, die KLM im endoskopischen Einsatz zu verwenden, wurden in der Urologie berichtet [32]. Aktuell wird die intraoperative Nutzung der ex vivo KLM in der Prostata-Untersuchung getestet. Es ist zu erwarten, dass weitere Studien in anderen Fachrichtungen sowie Möglichkei-

ten, die pathologischen Untersuchungstechniken durch die ex vivo KLM zu erweitern und bereichern, folgen werden.

### Zusammenfassung

Die wichtigsten Vorteile der ex vivo KLM liegen in den schnellen Erfassungs- und Auswertungsprozessen, die eine zeit- und kostensparende Bedside-Histologie ermöglichen. Der Einsatz der ex vivo KLM in der Dermatologie ist nicht auf BZK beschränkt. Die Untersuchung eignet sich für andere nicht melanozytäre und sogar auch melanozytäre Läsionen. Die aktuellen Nachteile der ex vivo KLM sind eine bisher relativ kleine Erfahrung und Mangel an multizentrischen Studien, das Fehlen eines verlässlichen Äquivalents für die Immunhistochemie und manche technischen Hindernisse, einschließlich des Zuschnitts des nicht fixierten Gewebes. Weitere intensive Forschungen und Studien sind erforderlich, um die Diagnostikmöglichkeiten zu erweitern sowie Standards für die Bildevaluierung und Korrelation mit der Histopathologie zu setzen. Zu den Zukunftsvisionen gehören Verwendung der ex vivo KLM in der Telemedizin sowie Einsatz der künstlichen Intelligenz in Kombination mit der ex vivo KLM.

### Interessenkonflikt

Die Autorin erhielt ein Vortragshonorar von der Firma Mavig GmbH.

### Literatur

- [1] Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L et al. Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. *J Biophotonics* 2016; 9: 376–387
- [2] Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L et al. Identification of ex-vivo confocal laser scanning microscopic features of melanocytic lesions and their histological correlates. *J Biophotonics* 2017; 10: 128–142
- [3] Welzel J, Kastle R, Sattler EC. Fluorescence (Multiwave) Confocal Microscopy. *Dermatol Clin* 2016; 34: 527–533
- [4] Hartmann D, Krammer S, Vural S et al. Immunofluorescence and confocal microscopy for ex-vivo diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin tumors: A pilot study. *J Biophotonics* 2018; 11: 3
- [5] Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR et al. Simple 3-criteria-based ex vivo confocal diagnosis of basal cell carcinoma. *J Biophotonics* 2018; 11: e201800062
- [6] Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR et al. Ex vivo confocal microscopy features of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Biophotonics* 2018; 11: e201700318
- [7] Hartmann D, Krammer S, Ruini C et al. Correlation of histological and ex-vivo confocal tumor thickness in malignant melanoma. *Lasers Med Sci* 2016; 31: 921–927
- [8] Karen JK, Gareau DS, Dusza SW et al. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol* 2009; 160: 1242–1250
- [9] Cinotti E, Perrot JL, Labeille B et al. First identification of the herpes simplex virus by skin-dedicated ex vivo fluorescence confocal microscopy during herpetic skin infections. *Clin Exp Dermatol* 2015; 40: 421–425
- [10] Bertoni L, Azzoni P, Reggiani C et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for intraoperative, real-time diagnosis of cutaneous in-

- inflammatory diseases: A preliminary study. *Exp Dermatol* 2018; 27: 1152–1159
- [11] Cinotti E, Perrot JL, Labeille B et al. Hair dermatophytosis diagnosed by reflectance confocal microscopy: six cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 2257–2259
- [12] Schiffhauer LM, Boger JN, Bonfiglio TA et al. Confocal microscopy of unfixed breast needle core biopsies: a comparison to fixed and stained sections. *BMC Cancer* 2009; 9: 265
- [13] Forest F, Cinotti E, Yvoret V et al. Ex vivo confocal microscopy imaging to identify tumor tissue on freshly removed brain sample. *Neurooncol* 2015; 124: 157
- [14] Ragazzi M, Piana S, Longo C et al. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Mod Pathol* 2014; 27: 460
- [15] Debarbieux S, Gaspar R, Depaepe L et al. Intraoperative diagnosis of nonpigmented nail tumours with ex vivo fluorescence confocal microscopy: 10 cases. *Br J Dermatol* 2015; 172: 1037
- [16] Fattouh K, Debarbieux S, Depaepe L et al. Routine use of perioperative in vivo reflectance confocal microscopy of the nail matrix in melanonychia striata: about 30 cases. *Br J Dermatol* 2017; 177: 570
- [17] Bağcı IS, Aoki R, Krammer S et al. Ex vivo confocal laser scanning microscopy: an innovative method for direct immunofluorescence of cutaneous vasculitis. *J Biophotonics* 2019; 12: e201800425
- [18] Bağcı IS, Aoki R, Krammer S et al. Ex vivo confocal laser scanning microscopy for bullous pemphigoid diagnostics: new era in direct immunofluorescence? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33: 2123–2130
- [19] Bini J, Spain J, Nehal K et al. Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance. *J Biomed Opt* 2011; 16: 076008
- [20] Longo C, Pampena R, Bombonato C et al. Diagnostic accuracy of ex vivo fluorescence confocal microscopy in Mohs surgery of basal cell carcinomas: a prospective study on 753 margins. *Br J Dermatol* 2019; 180: 1473–1480
- [21] Cinotti E, Perrot JL, Labeille B et al. Ex vivo confocal microscopy: an emerging technique in dermatology. *Dermatol Pract Concept* 2018; 8: 109–119
- [22] Gareau DS. Feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt* 2009; 14: 034050
- [23] El Hallani S, Poh CF, Macaulay CE et al. Ex vivo confocal imaging with contrast agents for the detection of oral potentially malignant lesions. *Oral Oncol* 2013; 49: 582–590
- [24] Longo C, Ragazzi M, Gardini S et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy in conjunction with Mohs micrographic surgery for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2015; 73: 321–232
- [25] Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS et al. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004; 30: 1470–1478
- [26] Horn M, Gerger A, Koller S et al. The use of confocal laser-scanning microscopy in microsurgery for invasive squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007; 156: 81–88
- [27] Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J* 2003; 85: 572–580
- [28] Bisschops R, Bergman J. Probe-based confocal laser endomicroscopy: scientific toy or clinical tool? *Endoscopy* 2010; 42: 487–489
- [29] Bennàssar A, Vilalta A, Carrera C et al. Rapid diagnosis of two facial papules using ex vivo fluorescence confocal microscopy: toward a rapid bedside pathology. *Dermatol Surg* 2012; 38: 1548–1551
- [30] Larson B, Abeytunge S, Seltzer E et al. Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study. *Br J Dermatol* 2013; 169: 922–926
- [31] White WM, Baldassano M, Rajadhyaksha M et al. Confocal reflectance imaging of head and neck surgical specimens. A comparison with histologic analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 923–928
- [32] Bonnal JL, Rock A Jr, Gagnat A et al. Confocal laser endomicroscopy of bladder tumors associated with photodynamic diagnosis: an ex vivo pilot study. *Urology* 2012; 80: 1162.e1–5