



LUNDS
UNIVERSITET

Kan ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser användas för säker hudtumördiagnostik och marginalbedömning?

Can ex vivo fluorescence reflectance confocal microscopy be used for safe skin neoplasm diagnosis and assessment of tumor radicality?

Authors: Elliot Soomro, Linnea Rosengren

Telephone: (+46) 737251729, (+46) 706473131

Email: el1422so-s@student.lu.se, li5561ro-s@student.lu.se

Handledare: Kari Nielsen, Universitetslektor, Överläkare, Dermatologi och Venereologi

Keywords: ex vivo konfokalmikroskopi, bilddiagnostik, hudtumörer, radikalitetsbedömning, Mohs kirurgi, intraoperativ diagnostik

Innehållsförteckning

Innehållsförteckning	2
Abstract	4
Populärvetenskaplig sammanfattning	6
Förkortningar	8
Introduktion	8
Bakgrund	8
Diagnostik och marginalbedömning av hudtumörer	8
Konfokalmikroskopi	10
Mohs kirurgi	13
Alternativa histopatologiska undersökningsmetoder	13
Syfte	14
Metod	14
Urval	14
Datainsamling	15
PubMed	15
Embase	16
Covidence	17
Dataanalys	18
Forskningsetiska avvägningar	19
Resultat	20
Hartmann et al.	21
Schüürmann et al.	23
Mercuri et al.	23
Longo et al.	24
	2

Bennåssar et al	26
Begränsningar med ex vivo CM	26
Diskussion	27
Vald metod	27
Framtaget resultat	29
Begränsningar	30
Styrkor och svagheter	31
Slutsats och kliniska implikationer	32
Författarnas arbetsfördelning	32
Referenser	32
Bilagor	36
Analyserade artiklar	
Mall för kvalitetsgranskning	
Resultat vid kvalitetsgranskning	

Abstract

Background: Skin cancer is the most common type of cancer in Sweden. The gold standard for diagnosis is histopathological assessment, which can take several days or weeks to process. Ex vivo fluorescence reflectance confocal microscopy (FRCM) is a new method for diagnosis of skin neoplasms which can be used intraoperatively. It could replace or supplement conventional histopathological assessment, hence reducing costs and accelerating patient care.

Purpose: The purpose of this review is to evaluate current evidence to compare diagnostic accuracy and ability to assess tumor radicality between ex vivo FRCM and conventional histopathological assessment of skin neoplasms.

Scientific questions: How does the diagnostic accuracy of ex vivo FRCM differ from conventional histopathological microscopy? Can ex vivo FRCM replace histopathological microscopy for skin neoplasm diagnosis and assessment of tumor radicality?

Method: A literature review of published research articles on the subject of ex vivo confocal microscopy (CM) for diagnosis of skin neoplasms was performed using the databases PubMed and Embase.

Results: Due to low availability of articles describing FRCM, the review was expanded to describe the broader subject of ex vivo CM. Although, due to substantial differences between the included studies, it was difficult to deduce quantifiable results. However, there was a positive correlation between ex vivo CM and conventional histopathology, and the diagnostic accuracy was comparable.

Conclusion: There is not enough evidence to accurately determine the diagnostic accuracy of ex vivo FRCM. However, there are indications that ex vivo CM has a good correlation with conventional histopathology. Since ex vivo CM has the advantage of being able to examine freshly excised tissue intraoperatively, the method could drastically decrease the time required

for diagnosis, potentially accelerating the patient care process. However, it is necessary to perform additional studies on the topic to confidently replace the gold standard.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Hudcancer inkluderar flera olika cancersorter och sammanlagt drabbar hudcancer fler än 60 000 personer varje år i Sverige, vilket gör det till den vanligaste cancerdiagnosen. Hudcancer behandlas i de flesta fall med kirurgi, med målet att ta bort hela tumören vid första operationen, men ta bort så lite av den friska huden som möjligt och i minsta möjliga mån påverka patientens utseende och funktion. Hudcancer uppstår ofta på synlig, solexponerad hud, som i ansiktet. Det är nödvändigt att hela tumören tas bort för att man ska kunna betrakta behandlingen som slutförd och patienten som tumörfri. För att säkerställa detta måste huden som skärs bort undersökas mikroskopiskt, så man ser cancerceller respektive friska celler i detalj. Vävnaden som opereras bort måste först prepareras med kemiska ämnen i olika steg före en mikroskopiundersökning. Därefter skickas den till ett laboratorium och bearbetas vidare, oftast genom inbäddning i paraffin som ger huden stadga, så att det senare ska gå att skära mikrometer-tunna skivor av vävnaden.

Skälet till denna komplicerade hantering av vävnad är att när en cell tagits bort från kroppen börjar omedelbart en förruttnelseprocess om man inte hindrar detta. Så för att bibehålla vävnadsbitens utseende och celler intakta måste preparationen genomföras. Därefter färgas de tunna vävnadssnitten med färgämnen som tydliggör vissa strukturer innan den kan undersökas i mikroskop. Metoden när vävnad prepareras och sedan undersöks i ett ljusmikroskop kallas histopatologisk undersökning. Genom att man kan studera cellerna såsom de befinner i vävnadsbiten kan man vid denna undersökning både se vilka celler som finns och hur de är fördelade i vävnadsprovet. På detta sätt kan även varianten av hudcancer fastställas.

Då läkarna som utför den histopatologiska undersökningen är hårt belastade kan det dröja flera veckor innan den slutliga ljusmikroskopiska undersökningen genomförs. Det kan därför ta lång tid innan den behandlande läkaren och patienten som genomgått operationen får veta om operationen var lyckad eller om ytterligare operation krävs. Både preparation och histopatologisk undersökning är resurs- och tidskrävande.

En ny teknik som kanske kan komma att ersätta eller komplettera histopatologisk undersökning är konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser (FRCM). Denna nya teknik använder laserljus, som på bara några minuter, avbildar den färska huden som skurits bort och skapar digitala bilder med upplösning på cellnivå. Tekniken används än så länge inte inom sjukvården men förhoppningen är att den ska användas i samband med operation, under tiden patienten väntar i operationsrummet, för att bekräfta att hela tumören blivit borttagen samt att fastställa varianten av hudcancer. Om det visar sig att ytterligare operation krävs kan denna i så fall utföras omedelbart och patienten slipper därmed vänta flera veckor på ett svar och ny tid för operation.

Syftet med denna litteraturstudie var att jämföra hur säker och beprövad metodiken med FRCM är i jämförelse med den nuvarande standardmetoden histopatologisk undersökning, genom att sammanställa fakta från vetenskapliga artiklar. Jämförelsen fokuserade på om FRCM var sämre, likvärdig eller bättre på att avgöra vilken typ av hudcancer patienten hade samt om hela tumören opererats bort. Litteraturstudien baserades på 10 artiklar och sammanfattningsvis så tyder våra resultat på att FRCM är en metod med stor framtida potential, men det har inte gjorts tillräckligt med forskning för att utvärdera om metoden kan ersätta histopatologisk undersökning.

Förkortningar

BCC	Basal cell carcinoma / Basalcellscancer
CM	Confocal microscopy / Konfokalmikroskopi
FCM	Fluorescence confocal microscopy / Fluorescens-konfokalmikroskopi
FRCM	Fluorescence reflectance confocal microscopy / Konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser
H&E	Hematoxylin and eosin / Hematoxylin och eosin
MMS	Mohs micrographic surgery / Mohs kirurgi
RCM	Reflectance confocal microscopy / Reflektans-konfokalmikroskopi
SCC	Squamous cell carcinoma / Skivepitelcancer

Introduktion

Bakgrund

Hudcancer är de vanligaste cancerformerna i Sverige. I Socialstyrelsens årliga statistik över cancersjukdomar i Sverige framgår att ca 50 000 fall av basalcellscancer (BCC) diagnosticeras varje år och att det därmed är den enskilt vanligaste cancerdiagnosen i Sverige.¹ Inom gruppen hudcancer ryms även skivepitelcancer (SCC) och hudmelanom, med ca 8 000 respektive 4 000 nya fall årligen. Sammantaget är hudcancer en diagnosgrupp som påverkar ett stort antal individer i populationen, vilket därmed orsakar oro, lidande och inte sällan död.

Diagnostik och marginalbedömning av hudtumörer

Konventionell histopatologisk undersökning på klinisk patologisk avdelning har länge varit "gold standard", den främsta metoden, för diagnostik av hudtumörer. Vid denna metod prepareras vävnaden efter en hud- eller skrapbiopsi eller efter en operation så att den kan

undersökas mikroskopiskt. Prepareringen består av flera tidskrävande steg, bland annat inbäddning och fixering med paraffin respektive formalin, som beskrivs av Sadeghipour A och Babaheidarian P i Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks.² Paraffininbäddning introducerades redan 1869 och används fortfarande för att kunna skära vävnadspreparaten i tunna skikt. Därefter görs oftast en histokemisk färgning med hematoxylin och eosin (H&E), varefter man kan bedöma vävnadsmaterialet i ljusmikroskop. Efter att preparaten förberetts kan det dröja flera dagar, och ibland upp till flera veckor, innan radikalitetsbedömning samt patologisk anatomisk diagnos (PAD) fastställts av patologen.³ För patienten kan väntetiden därmed bli lång och besvärande.

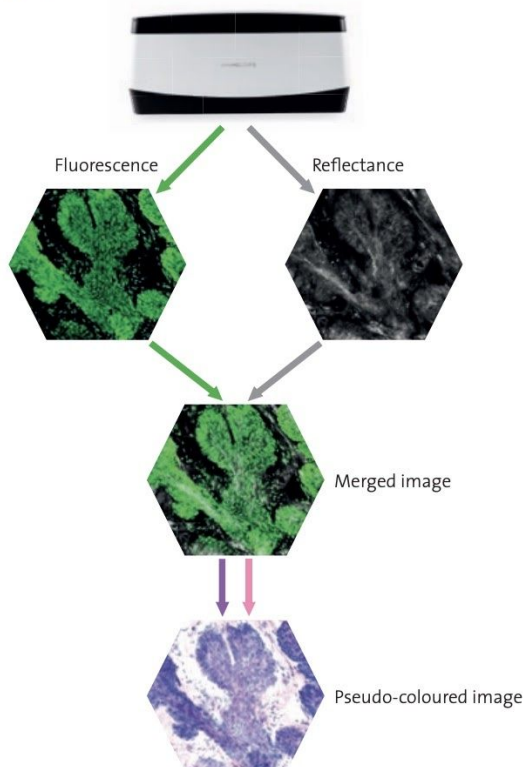
Histopatologisk undersökning kan också utföras på färsk vävnad intraoperativt, så kallad "bedside histology", genom att man istället för paraffininbäddning snabbfryser den färska, opreparerade vävnaden, snittar den frysta vävnaden tunt och gör en ljusmikroskopisk bedömning. Den senare metoden med frysta snitt av hudtumörer utförs på grund av att den är så resurskrävande i stort sett endast i samband med Mohs kirurgi, som beskrivs ingående nedan.⁴

Ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser (FRCM) är en ny metod för hudtumördiagnostik och bedömning av tumörradikalitet på färsk vävnad. Metoden kombinerar två bildsystem: fluorescens- och reflektanslaser som avbildar vävnaden i en bildupplösning som motsvarar ljusmikroskopets upplösning. Metoden har ännu inte blivit etablerad inom vården utan utvärderas fortfarande inom forskningsprojekt. Förhoppningen med ex vivo FRCM är att det ska fungera som ett snabbare alternativ till konventionell histopatologi, men även till fryssnittsbaserad histopatologisk undersökning. Därmed är det möjligt att FRCM kan ersätta befintlig histopatologi som idag är "gold standard" inom hudcancerdiagnostik. Med ex vivo FRCM kan diagnostik och marginalbedömning av färskt excisionsmaterial ske intraoperativt på endast några minuter. Om det efter bedömning visar sig att tumören inte är radikalt borttagen kan upprepat kirurgiskt ingrepp då utföras omedelbart, och patienten slipper vänta flera veckor på ett svar och eventuell ny tid för operation.^{5,6}

Konfokalmikroskopi

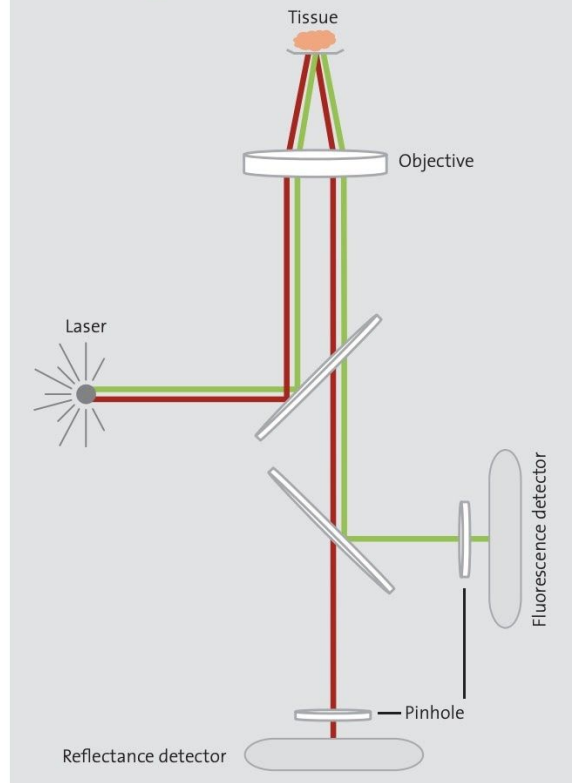
Konfokalmikroskopi (CM) är ett sammanfattande begrepp för en optisk diagnostisk metod. Inom dermatologins användningsområde kan denna metod på endast några minuter skapa högupplösta bilder av hudområden, antingen direkt på patienten (in vivo) eller av färsk, exciderad, icke-fixerad vävnad (ex vivo), utan krav på sedvanlig tidskonsumerande vävnadspreparering.⁴ Metoden använder en eller flera laserkällor med respektive specifika våglängder. Ljusenergin passerar genom huden för att belysa en punkt inom vävnaden. Ljuset reflekteras mot olika celler och strukturer i huden för att vända tillbaka upp genom huden och passera genom ett nålhål i mikroskopet, som endast tillåter passage av ljus från en fokal punkt. Slutligen når den reflekterade ljusenergin en detektor. Därmed kommer vävnad i endast ett plan avbildas samtidigt (Figur 1).⁷

Imaging Process



vivascope.eu

Technology



Figur 1. Bilden beskriver VivaScope 2500, ett kommersiellt tillgängligt konfokalmikroskop som använder två laserkomponenter för att avbilda vävnad. Två olika laserkällor används simultant för att skapa två bilder, en fluorescens- och en reflektansbild, som kombineras. Därefter skapas en digital pseudofärgning som simulerar hematoxylin-eosin-färgning. Ljusenergin från laserkällorna passerar genom huden och belyser en punkt i vävnaden. Ljuset reflekteras tillbaka och passerar genom ett nålhål i mikroskopet, som endast tillåter passage av ljus från en fokal punkt. Det reflekterade ljuset når sist en detektor. Bilden används med tillåtelse från MAVIG GmbH, återförsäljare av VivaScope i Europa.

Inom dermatologin används främst konfokalmikroskopi med två olika bildsystem.

Reflektans-konfokalmikroskopi (RCM) utnyttjar skillnader i naturlig reflektans hos olika subcellulära strukturer, på grund av molekylärt strukturella skillnader. Strukturer med högt refraktionsindex uppträder ljusst på bilderna, medan strukturer med lägre index uppträder

mörkare. RCM används främst in vivo och presenteras som en svartvit bild.

Fluorescens-konfokalmikroskopi (FCM) fångar istället upp och tydliggör skillnader i fluorescensen hos olika vävnadsstrukturer. Fluorescens finns inte naturligt i hudens strukturer, därför behöver man först tillsätta fluorescerande medel, vanligast akridinorange, som specifikt färgar in olika subcellulära strukturer, som cellkärnor hos epitelceller, och förstärker även kontrasten till bakomliggande dermis.^{7,8} FCM används därför ex vivo. FCM och RCM kan användas i kombination, sk. FRCM, eller var för sig. Var och ett av dessa tre lägen visualiserar vissa specifika strukturer bättre och bör därför kombineras för fullständig diagnostik.⁵

RCM kräver ingen färgning vid användning in vivo, men man kan vid användning ex vivo utnyttja aluminiumklorid, ättiksyra eller citronsyra för att ytterligare förstärka cellkärnornas reflektans. Jämförelsevis vid FCM sänks hela vävnadspreparatet ned i en lösning med fluorescerande medel för att skapa fluorescens, och överflödet sköljs sedan av med en fysiologisk saltlösning. En viktig faktor vid ex vivo konfokalmikroskopi är att färgningsprocesseringen inte förändrar vävnaden och hindrar därför inte vidare konfirmatorisk konventionell histopatologisk bedömning.⁹

Tidiga konfokalmikroskop producerade digitala bilder med en svårbedömd gråskala, något som varken dermatopatologer eller dermatokirurger normalt är tränade för att tolka. I jämförelse så baseras konventionell histologi vanligtvis på två infärgningar av preparatet som ska bedömas. Man använder främst hematoxylin och eosin, vilket uppträder lila och rosa när preparatet bedöms i ljusmikroskop och/eller som digitalt avfotograferade bilder. Förståelse för den nya konfokaltekniken och insikt i hur bilderna bör bedömas krävde därmed ytterligare träning. Ny teknik och produktutveckling av konfokalmikroskoperna har dock möjliggjort digital pseudofärgning av bilder från FRCM, för att simulera hematoxylin-eosin-färgning (Figur 1). Därmed kan denna uppdaterade metod producera bilder i likhet med konventionella histologibilder, men på betydligt kortare tid. I nuläget är fjärde generationens VivaScope 2500 den enda kommersiellt tillgängliga konfokalmikroskopiska ex vivo-enheten som kan kombinera RCM och FCM och visa digitalt färgade kombinerade bilder (Figur 1).^{4,10}

VivaScope 2500 skapar bilder, 750 x 750 µm i storlek, av exciderade hudpreparat. Den kan skapa bilder av strukturer från ytan av preparatet och ned till ett maximalt vävnadsdjup av 200 µm, dvs. oftast tillräckligt för att kunna avbilda epidermis och stratum papillare i dermis, men inte djupare än så. Flera enskilda bilder tas och sammanfogas sedan av mjukvara till en mosaikbild som kan studeras i sin helhet.^{8,9}

Ex vivo konfokalmikroskopi har hittills främst använts för marginalbedömning av basalcellscancer (BCC), men många andra typer av hudtumörer har börjat studeras, som andra epiteliala tumörer, malignt melanom och Pagets sjukdom.⁹

Mohs kirurgi

Mohs kirurgi (Mohs micrographic surgery, MMS) är en speciell kirurgisk metod för excision av hudtumörer, som utvecklades av och namngavs efter kirurgen Frederick Mohs. Metoden innebär successiv borttagning av tunna lager av tumören, följt av intraoperativ nedfrysning av preparatet, preparering, snittning och därefter marginalbedömning med ljusmikroskopisk undersökning. Processen med operation och bedömning av fryssnitt, upprepas till tumören bedöms radikalt borttagen, varefter operationssåret kan sys ihop. Metoden kräver en dermatokirurg, minst en assistent i operationssalen och minst en laborietekniker för vävnadspreparering, men kan inkludera ytterligare personal, vilket oftast är en extern klinisk patolog.¹¹ Metodens tillgänglighet är begränsad i Europa, på grund av att den är tids- och resurskrävande och medför höga vårdkostnader. Därmed krävs strikta indikationer för att patienten ska kvalificeras för behandling med MMS. I Sverige finns endast tre universitetskliniker som utför MMS (Personlig kommunikation Skånes universitetssjukhus Hudkliniken Operationsteamet Mohs 2020-12-14.)

Alternativa histopatologiska undersökningsmetoder

Hudoperationer som utförs i kombination med preparatundersökning med ex vivo FRCM skulle genom sin enkla metod och möjligheten till snabb bedömning av vävnaden kunna bli ett attraktivt alternativ till MMS och konventionell histopatologisk undersökning. Ett av målen med ex vivo FRCM är att förbättra vården för den enskilda patienten, genom att erbjuda fler patienter en intraoperativ preparatbedömning, utan krav på MMS. Ex vivo FRCM har därmed potential att ersätta både vissa histologiska analyser av konventionellt opererade och därefter

paraffinbäddade preparat, men även av frysta preparat inom MMS. På så sätt borde man kunna reducera användningen av resurser, operationstiden och därmed sänka kostnader.^{4,12}

Syfte

Syftet med studien är att genom kritisk litteraturgranskning av befintlig evidens jämföra ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser med konventionell histopatologisk mikroskopi gällande diagnostisk tillförlitlighet och marginalbedömning av hudtumörer.

Frågeställningar:

- Hur skiljer sig den diagnostiska tillförlitligheten mellan ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser och konventionell histopatologisk mikroskopi?
- Kan ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser komplettera eller ersätta diagnostik och marginalbedömning av hudtumörer med konventionell histopatologisk mikroskopi?

Metod

En kritisk litteraturstudie av befintlig och tillgänglig evidens utfördes för att undersöka det valda ämnesområdet och besvara frågeställningarna. En systematisk arbetsmetod har eftersträvat, men arbetet är inte en systematisk litteraturgranskning, då litteraturstudien enbart inkluderar delar av publicerad forskning, vilket beskrivs nedan. Efter databassökning valdes 10 artiklar ut, vilka analyserades och kvalitetsgranskades.

Urval

För att besvara våra definierade frågeställningar om diagnostisk tillförlitlighet utformades en strukturerad fråga utifrån formatet PIRO (Population, Indextest, Referensmetod, Utfall) efter beskrivning i SBU:s metodbok.⁶

- Population: Patienter med misstänkt hudcancer
- Indextest: Ex vivo konfokalmikroskopi med fluorescens- och reflektanslaser

- Referensmetod: Histopatologisk undersökning
- Utfall: Andel deltagare som är sant respektive falskt klassificerade

Dessutom formulerades följande inklusionskriterier:

- Artikeln var skriven på engelska.
- Fullständig artikel var tillgänglig.

Datainsamling

För att finna relevanta artiklar gjordes sökningar i databaserna PubMed och Embase, som inkluderar artiklar med biomedicinska och hälsovetenskapliga frågeställningar. PubMed underhålls av U.S. National Library of Medicine och utgörs till största delen av databasen MEDLINE. Embase är en produkt av Elsevier med unikt innehåll som inte finns i MEDLINE.^{13,14}

Sökningarna baserades på tre block som innehöll sökorden “hudcancer”, “konfokalmikroskopi” och “ex vivo”, genom användning av både Medical Subject Headings (MeSH-termer) och fritext. Sökningen gjordes så bred och känslig som möjligt för att hitta högst antal relevanta artiklar. Sökningarna i PubMed och Embase resulterade i totalt 120 artiklar som importerades till Covidence, ett webbaserat verktyg för systematiska översikter, där irrelevanta artiklar exkluderades i flera steg (Figur 2).

PubMed

Det första blocket bestod av följande MeSH-termer och fritext: **("skin neoplasms"[MeSH Terms]) OR (skin neoplasm*) OR (skin cancer) OR (skin tumor*) OR (skin tumour*)**. Detta kombinerades sedan med två block som innehöll **("microscopy, confocal"[MeSH Terms]) OR (confocal microscopy)** och **(exvivo) OR (ex vivo)**. Den resulterande sökningen blev **(("skin neoplasms"[MeSH Terms]) OR (skin neoplasm*) OR (skin cancer) OR (skin tumor*) OR (skin tumour*)) AND (("microscopy, confocal"[MeSH Terms]) OR (confocal microscopy)) AND ((exvivo) OR (ex vivo))**, vilket gav totalt 97 resultat (Tabell 1).

Tabell 1. Blocksökning i PubMed.

Databas: PubMed	Sökord	Resultat
Datum: 2020-11-27		
#1	("skin neoplasms"[MeSH Terms]) OR (skin neoplasm*) OR (skin cancer) OR (skin tumor*) OR (skin tumour*)	221 714
#2	AND (("microscopy, confocal"[MeSH Terms]) OR (confocal microscopy))	1 461
#3	AND ((exvivo) OR (ex vivo))	97

Embase

I Embase användes en liknande blocksökning som användes i PubMed: **'skin tumor'/exp AND 'confocal microscopy'/exp AND 'ex vivo study'**. Sökningen i Embase gav totalt 65 resultat. För att exkludera artiklar som även fanns i MEDLINE valdes "Embase" under filtret "Sources". Sökningen gav då 23 resultat med artiklar som enbart förekom i Embase (Tabell 2).

Tabell 2. Blocksökning i Embase.

Databas: Embase	Sökord	Resultat	Kommentar
Datum: 2020-11-27			
#1	'skin tumor'/exp AND 'confocal microscopy'/exp AND 'ex vivo study'	65	
#2	AND [embase]/lim NOT ([embase]/lim AND [medline]/lim)	23	Exkluderar artiklar från PubMed.

Covidence

Covidence är ett webbaserat verktyg för systematiska översikter. 120 artiklar från databassökning i PubMed och Embase importerades till Covidence, där urvalet gjordes. Alla artiklar granskades av båda författarna. 49 artiklar som ansågs relevanta utifrån titel och abstrakt valdes ut och granskades sedan baserat på innehållet. Utifrån bestämda inklusionskriterier valdes därefter 10 originalartiklar som litteraturstudien baserades på. En stor del av dessa 49 artiklar fanns enbart tillgängliga i konferensdokument, det vill säga korta introduktioner till ämnet i likhet med ett abstrakt, men var inte baserade på en färdigställd och publicerad studie. Därför exkluderades dessa artiklar, trots att de utifrån titel och abstrakt bedömdes relevanta. Vidare var vissa artiklar inte tillgängliga för oss som studenter vid Lunds universitet, eftersom de var bakom en betalvägg. Ytterligare studier exkluderades då de var publicerade på tyska, franska eller spanska, språk som inte behärskas av författarna.

Urvalsprocessen presenteras schematiskt enligt Preferred Reported Items for Systematic Reviews and Meta-analysis (PRISMA), ett evidensbaserad minimum för presentation av urvalsprocessen som används vid systematiska översikter och metaanalyser.¹⁵ PRISMA genererades automatiskt i Covidence och presenteras för denna litteraturstudie i Figur 2.



Figur 2. Bilden visar PRISMA som exporterades från Covidence. 120 artiklar granskades utifrån titel och abstrakt, varav 49 artiklar ansågs relevanta. 71 irrelevanta artiklar exkluderades i detta steg. Därefter granskades dessa 49 artiklar fullständigt och 39 av dem exkluderades enligt relevans för bestämda frågeställningar och inklusionskriterier. Urvalsprocessen resulterade i 10 artiklar som inkluderades i litteraturstudien.

Dataanalys

Artiklarna som ingick i litteraturstudien analyserades avseende innehåll av båda författare. För att skapa en överskådlig presentation av artiklarna presenteras denna analys i en tabell i Bilaga 1.

Artiklarna kvalitetsgranskades dessutom för att bedöma risken för systematiska fel (bias). Detta gjordes utifrån en för studien anpassad mall som baserades på granskningsmallen *Bedömning av studier om diagnostisk tillförlitlighet (QUADAS-2)* från SBU.¹⁶ Anpassad granskningsmall bifogas som Bilaga 2 och kvalitetsgranskningens resultat presenteras som en tabell i Bilaga 3.

SBU förklarar i sin metodbok att eftersom bilddiagnostik saknar tröskelvärde, till skillnad från andra diagnostiska test, påverkas klassificeringen av faktorer som skicklighet och erfarenhet hos personen som tolkar resultatet.⁶ Därför viktades fokus vid kvalitetsbedömningen mot att utvärdera vem som utfört indextestet respektive referensmetoden och om de var blindade eller ej. Eftersom indextestet utfördes före referensmetoden innebär det att de som utförde indextestet var blindade för referensmetoden, en kvalitetsaspekt som alla artiklar uppfyllde. Dessutom granskades urvalet av deltagare, eventuellt bortfall och etik. Frågorna i mallen besvarades för varje enskild studie genom att skriva en kort text. Slutligen sammanställdes svaren på alla frågor för respektive artikel och utifrån detta bedömdes artikeln uppnå låg, måttlig eller hög kvalitet.

Kvaliteten bedömdes till låg om personerna som tolkade referensmetoden inte var blindade för indextestet, om den tidigare fastställda kliniska diagnosen var känd eller om det saknades etiskt övervägande. Kvaliteten bedömdes till måttlig om deltagare hade exkluderats utan tydlig motivering. Kvaliteten bedömdes till hög om personen som tolkade referensmetoden var blindade för indextestet och om alla deltagare inkluderades i analysen.

Forskningsetiska avvägningar

Det var ej relevant enligt Etikprövningslagen att söka etiskt tillstånd för denna litteraturstudie, då arbetet utförs inom ramen för högskoleutbildning på grundläggande nivå och inte hanterar några personuppgifter. Enligt *Handbok i uppsatsskrivande och forskningsmetodik* (Kristensson 2016) är emellertid ett forskningsetiskt övervägande viktigt, eftersom vi granskar etiken i inkluderade artiklar.¹⁷ Vi har i denna studie kritiskt granskat hur olika etiska principer tillämpats i de artiklar vi analyserat. Alla artiklar som inkluderats har fått etiskt godkännande från regional etisk nämnd. Flera artiklar har dessutom uppgett att de uppfyller kriterierna i Helsinkideklarationen. I de flesta artiklarna, men inte alla, framgår det att patienterna har gett skriftligt godkännande innan deras medverkan.

Även forskningens påverkan på patienten har utvärderats. Eftersom vävnaden efter konfokalmikroskopisk undersökning är oförändrad påverkas inte efterföljande konventionell histopatologisk bedömning. I alla studier som granskades skickades preparaten efter

konfokalmikroskopi även till konventionell histopatologisk undersökning. Därmed bedöms deltagandet ha mycket liten eller ingen påverkan på förloppet eller kvaliteten av patientens vård.

Eventuella ekonomiska förhållanden mellan artikelförfattare och sponsorer är ytterligare en viktig etisk aspekt att reflektera över. I flera av artiklarna fick artikelförfattarna låna konfokalmikroskopet VivaScope utan kostnad, av antingen Caliber Imaging & Diagnostics (tidigare Lucid Inc.) eller MAVIG GmbH, vilket är företaget som utvecklat mikroskopet och deras europeiska samarbetspartner. Man kan påstå att det ligger i företagets intresse att artiklar som publiceras visar att VivaScope har god klinisk användning, på grund av ekonomiska incitament med försäljning. Alla inkluderade artiklar har dock intygat att det inte finns några ekonomiska eller personliga relationer som kan utgöra potentiella intressekonflikter. Om det mot förmodan skulle finnas bakomliggande intressen finns det risk att forskarna överskattar den diagnostiska tillförlitligheten. Då artiklarna presenterar begränsningar med metoden, vilket beskrivs i resultatdelen, tyder det dock på att forskningen genomförts och presenterats utan att vinklas. Det visar också att tidskrifterna inte väljer att enbart publicera artiklar med revolutionerande och häpnadsväckande resultat, utan också artiklar som inte medför lika mycket uppmärksamhet.

Resultat

Det var inte lämpligt att utföra en metaanalys av artiklarna som ingår i denna litteraturstudie eftersom de har mycket olika karaktär och skiljer sig åt avseende urval, indextest, referensmetod och utfallsmått. Därför presenteras artiklarna nedan genom en narrativ syntes utifrån analys och kvalitetsgranskning, vilket även sammanfattas översiktligt avseende syfte, metod och resultat i Bilaga 1.

Gemensamt för alla artiklar gällande metod var användningen av ex vivo CM som indextest för avbildning av exciderade hudpreparat. Två olika bildsystem användes, FCM och RCM, vilket användes var för sig eller i kombination. Endast två studier beskrev användningen av FRCM, den senaste tekniken då FCM och RCM används simultant, sk. "fusion mode". Resterande artiklar beskrev separat användning av dessa två bildsystem, eller endast användning av FCM.

Efter indextestet utfördes en konfirmatorisk bedömning av preparaten med konventionell histopatologi som referensmetod, vilket innebär att de som utför indextestet var blindade för referensmetoden. Slutligen jämfördes resultatet mellan indextest och referensmetod, vilket beskrevs med olika statistiska mått, som korrelation (Cohens k), sensitivitet, specificitet, positivt prediktivt värde (PPV) och negativt prediktivt värde (NPV).

Beroende på vilket eller vilka bildsystem som undersöktes i artiklarna användes olika konfokalmikroskop. Följande versioner av VivaScope nämns i artiklarna:

- VivaScope 2000 Multilaser, Lucid Inc., Rochester, New York
- VivaScope 2500 Multilaser, Lucid Inc., Rochester, New York
- VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH, München, Tyskland

Hartmann et al.

I fyra artiklar beskriver Hartmann et al. användningen av ex vivo CM (Vivascope 2500, Lucid Inc.) med separat användning av FCM och RCM. Samtliga vävnadspreparat var från personer som genomgått MMS vid Dermatosurgery Unit of the Department of Dermatology and Allergy, University Hospital, Ludwig-Maximilian University, München, Tyskland.

Hartmann et al. 2018b¹⁸ undersökte 235 vävnadspreparat som analyserades separat av två personer, en expert och en nybörjare inom ex vivo CM. Diagnostiken baserades på följande tre fördefinierade kriterier: "presence of tumor mass, peripheral palisading and clefting". Histopatologisk undersökning visade att 116 misstänkta tumörer var basalcellscancer och 119 påvisade inga tumörceller. Alla vävnadspreparat är inräknade i resultaten och eftersom de analyserades två gånger sattes totalt 470 diagnoser med ex vivo CM. Av dessa var 449 korrekt diagnostiserade (95,5 %), 235 var sant positiva och 214 var sant negativa efter konfirmatorisk bedömning med histopatologi. 3 vävnadspreparat diagnostiserades falskt positiva och 18 tumörer diagnostiserades falskt negativa. Sensitivitet var 96,6 % och specificitet var 98,7 %. Den diagnostiska tillförlitligheten var enbart 1,7 % högre för experten än nybörjaren, en skillnad som författarna belyser inte var statistiskt signifikant. Experterna kunde däremot ställa korrekt diagnos på kortare tid jämfört med nybörjaren, vilket var statistiskt signifikant ($P = 0,008$).

Hartmann et al. 2016¹⁹ beskriver avbildning av frisk hud med ex vivo CM och hur väl bildernas utseende korrelerade med histopatologi. 50 hudpreparat preparerades och avbildades av en dermatolog med särskild kunskap inom ex vivo CM. Två oberoende specialister inom konfokalmikroskopi, som också hade erfarenhet av histologi, analyserade bilderna och därefter genomförde de konventionell histopatologisk undersökning. Resultatet visade att ex vivo CM kunde visualisera frisk hud med stor likhet till konventionell histopatologi. Slutligen påpekar författarna att RCM ger en bättre överblick av hudens morfologi, men att vissa strukturer visualiseras bättre med FCM. De belyser att det därför kan vara fördelaktigt att byta från ett läge till det andra när en viss struktur observeras.

I artikeln av Hartmann et al. 2017²⁰ beskrivs avbildningen av 31 melanocytära hudförändringar. Författarna menar att melanocyternas utseende i ex vivo CM korrelerade med histopatologi och de kunde tydligt urskiljas från keratinocyterna. Vidare förklarar författarna att ex vivo CM är likvärdigt histopatologisk undersökning även när det gäller att urskilja de huvudsakliga typerna av nevi ("junctional, compound, dermal and dysplastic").

Hartmann et al. 2018a²¹ utvärderar tre immunohistokemiska färgningar för ex vivo CM med fluorescerande antikroppar. I artikeln preparerades vävnad från 50 hudtumörer och analyserades sedan av två specialister inom ex vivo CM. De jämför ex vivo CM och histopatologi utifrån olika aspekter, bland annat personal- och tidsåtgång, men presenterar inga värden på den diagnostiska tillförlitligheten. Infärgning med fluorescerande antikroppar tog längre tid än med de fluorescerande infärgningar som brukar användas inom ex vivo CM, exempelvis akridinorange. Författarna menar att i nuläget är immunhistokemisk infärgning med fluorescerande antikroppar inte en tillräckligt snabb metod för att användas intraoperativt, men betydligt snabbare än konventionell histopatologi.

Utifrån kvalitetsgranskningsmallen, som anpassats efter denna studie, bedömdes samtliga artiklar skrivna av Hartmann et al. uppnå låg kvalitet. Det framgick inte tydligt om personerna som tolkade referensmetoden var blindade för indextestet eller ej. Alla artiklarna utfördes dock enligt

Helsinkideklarationen och samtliga patienter lämnade skriftligt godkännande innan operation. Inga hudpreparat exkluderades i analyserna.

Schüürmann et al.

Schüürmann et al.²² studerar likt Hartmann et al. 2016¹⁹ också frisk hud, men med FRCM (VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH). Frisk vävnad från 26 patienter, som uppstod vid plastikkirurgisk rekonstruktion efter operation av hudtumörer, undersöktes först med FRCM och därefter utfördes konventionell histopatologi. Enligt Schüürmann et al. finns det en stark korrelation mellan digitalt infärgade bilder och konventionell histopatologi, men de presenterar inte något exakt värde för denna korrelation. Nästan alla hudstrukturer hade liknande morfologiskt utseende som vid histopatologi. Ett undantag var pigmenterade strukturer, som hår, melanocyter och melanofager, vilka avbildades dåligt i digitalt färgade bilder, på grund av deras intensiva reflektion. Detta motsätter sig resultatet från Hartmann et al. 2017²⁰ som menar att melanocyternas utseende i ex vivo CM korrelerade med histopatologi och de kunde tydligt urskiljas från keratinocyterna.

Vid kvalitetsgranskning av Schüürmann et al. bedömdes artikeln uppnå låg kvalitet. Referensmetoden tolkades av samma två dermatopatologer som tolkade indextestet och därmed var de inte blindade. Därför kan metoden anses ha introducerat bias.

Mercuri et al.

Mercuri et al.²³ beskriver två patientfall då FRCM användes i ett kort "letter to the editor". Författarna skriver att bilderna var jämförbara med histopatologisk undersökning. De påpekar även fördelarna med ex vivo CM, som att färre artefakter uppstår på bilderna och att de ger en bättre överblick av excisionsmaterialet, jämfört med konventionell histopatologi med fryssnitt.

Vid kvalitetsgranskning av Mercuri et al. bedömdes artikeln uppnå låg kvalitet. Det framgår ej vem som har utfört eller tolkat indextestet eller referensmetoden och de presenterar inget etiskt godkännande. Det är möjligt att det som saknas framkommer om deras arbete utvecklas till en fullständig originalartikel.

Longo et al.

Longo et al. beskriver i två artiklar användningen av ex vivo FCM och utvärderade den diagnostiska tillförlitligheten genom att jämföra resultatet med konventionell histopatologi och även med mikroskopi av fryssnitt. Vävnadspreparaten var från patienter som genomgått MMS vid olika kliniker.

Longo et al. 2014²⁴ beskriver utseendet av BCC i bilder från ex vivo FCM och dokumenterade skillnader i förekomst eller frånvaro av olika bildfynd mellan FCM och konventionell histopatologi. Totalt undersöktes 64 vävnadspreparat från två olika kliniker: Arcispedale Santa Maria Nuova-IRCCS (ASMN) i Reggio Emilia, Italien, och Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) i New York, USA. Anmärkningsvärt användes två olika mikroskop. MSKCC använde en modifierad version av en äldre VivaScope 2000 (Lucid Inc.), medan ASMN använde en nyare VivaScope 2500 (Lucid Inc.).

Korrelationen mellan FCM och histopatologi för fynd specifika för BCC beräknades av Longo et al. 2014 att variera mellan 0,903 och 1 (Cohens k). Större strukturer uppvisade högre korrelation jämfört med mindre strukturer, rimligtvis eftersom de var enklare att identifiera. 2253 av 2371 strukturer specifika för BCC som avbildades med FCM överensstämde med histopatologi, vilket resulterade i en sensitivitet på 94,9 %. 585 av 604 strukturer som ej var specifika för BCC och avbildades med FCM överensstämde med histopatologi, vilket resulterade i en specificitet på 96,8 %. Författarna skriver att viss diskrepans mellan FCM och histopatologi kan förklaras av den histologiska vävnadspreparationen, eftersom en del av vävnadens yttre kanter går förlorade vid konventionell histologisk preparation. Jämförelsevis kan vävnadspreparatet avbildas med FCM i sin helhet, utan krav på beskärning. Longo et al. 2014 jämförde dessutom fynd i normal hud och en korrelation beräknades där till 0,89 (Cohens k).

Longo et al. 2014 bedömdes utifrån kvalitetsgranskning uppnå hög kvalitet. Detta eftersom tolkningen av både indextest och referensmetod var blindad. Vidare beskriver författarna inte något bortfall av deltagare, därav anses alla deltagare ingå i analysen. Det är dock värt att undersöka betydelsen av att vävnadspreparaten avbildats med två olika mikroskop vid två olika kliniker. Artikelförfattarna nämner ej om denna skillnad i metod påverkade resultatet, men det är

möjligt att det finns en skillnad i bildkvalitet, vilket kan ha påverkat tolkningen och därmed resultatet.

Longo et al. 2019²⁵ utvärderade den diagnostiska tillförlitligheten vid marginalbedömning av BCC med FCM genom jämförelse med fryssnitt och histopatologi. 753 vävnadspreparat från 127 patienter avbildades med VivaScope 2500 (Lucid Inc.). Det framkommer dock i texten att 51 preparat saknades vid analysen, men detta förklaras inte och preparaten specificeras ej.

Vid jämförelse mellan FCM och fryssnitt beräknades sensitiviteten för FCM till 79,8 %, specificiteten till 95,8 %, PPV till 80,5 % och NPV till 95,7 %. 49 fall visade avvikande diagnos mellan FCM och fryssnitt, vilka utvärderades ytterligare en gång. Detta visade att 24 var falskt positiva (positiva på FCM, men negativa på fryssnitt) och 25 falskt negativa (negativa på FCM, men positiva på fryssnitt). De falskt positiva fallen kan enligt författarna förklaras på samma sätt som tidigare, att en del av vävnaden går förlorad vid preparation av fryssnitten, medan preparat kan avbildas i sin helhet med FCM. Författarna påpekar att alla falska negativa fall hade diverse artefakter, ett fel som skulle kunna minskas genom förbättrad teknik.

Vid jämförelse mellan FCM och histopatologi beräknades sensitivitet för FCM till 89,7 %, specificitet till 95,3 %, PPV till 78,2 % och NPV till 98,0 %. Sammantaget fick 650 av 702 fall (92,6 %) samma diagnos vid FCM, fryssnitt och histopatologi. Av resterande 52 fall var 33 i överensstämmelse mellan fryssnitt och histopatologi. Av resterande 19 fall var dock 16 i överensstämmelse mellan FCM och histopatologi. Författarna anser avslutningsvis att FCM har potential att ersätta fryssnitt vid MMS inom en snar framtid.

Longo et al. 2019 bedömdes utifrån kvalitetsgranskning uppnå måttlig kvalitet. Tolkning av både indextest och referensmetod var blindad, vilket höjer kvaliteten, men eftersom bortfallet av 51 preparat inte förklaras eller specificeras sänks kvaliteten. Bortfallet kan anses ha introducerat selektionsbias, det vill säga att stickprovet ej är representativt för populationen, i det fall bortfallet ej var slumpmässigt. Om majoriteten av preparaten som exkluderades var svåra att använda vid diagnostik kan bortfallet leda till att resultatet överskattas gällande diagnostisk tillförlitlighet med FCM.

Bennässar et al

Bennässar et al. 2013²⁶ beskriver och utvärderar kriterier för diagnostik av BCC med ex vivo FCM samt jämför resultatet med konventionell histopatologi. För klassifikation av BCC subtyp fanns det en korrelation på 0,9 (Cohens k) mellan bilder från FCM och histopatologi med H&E.

Bennässar et al. 2014²⁷ utvärderade den diagnostiska tillförlitligheten hos ex vivo FCM för marginalbedömning av BCC vid MMS. Av 89 fall med bekräftad BCC från histopatologi kunde 79 fall verifieras med ex vivo FCM, vilket gav 10 falska negativa. Av 391 fall som var negativa för BCC vid histopatologi observerades endast 1 falsk positiv med ex vivo FCM. Utifrån detta kunde författarna beräkna sensitivitet, specificitet, PPV och NPV för marginalbedömning av BCC som var 88 %, 99 %, 98 % respektive 97 %. Eftersom prevalensen för BCC var låg i denna studie är dock PPV och NPV inte tillförlitliga, vilket poängteras av författarna.

Bennässar et al. 2014 beräknade dessutom tiden som krävdes för diagnos med FCM och jämförde med tiden för fryssnitt. Medelvärde av tiden för avbildning med FCM var $10,1 \pm 1,22$ min, medan det var $28,2 \pm 2,2$ min för histopatologi, en skillnad som författarna påpekar var statistiskt signifikant ($P < 0,001$). I denna studie var därmed FCM en betydligt snabbare metod än konventionell histopatologi med fryssnitt.

Båda artiklar av Bennässar et al. bedömdes utifrån kvalitetsgranskning uppnå måttlig kvalitet. Tolkning av både indextest och referensmetod var blindad, dock beskrivs det i båda studier att en del preparat exkluderats eftersom de ej var lämpliga för tolkning av tekniska skäl. Detta sänker kvaliteten, med anledning som beskrivs för kvalitetsgranskning av Longo et al. 2019.

Begränsningar med ex vivo CM

Utifrån fyra artiklar av Hartmann et al. framgår det att ex vivo CM är en metod med stor potential som kan komma att underlätta diagnostiken av hudcancer, men det finns än så länge vissa begränsningar. Som tidigare nämnt menar Hartmann et al. 2017²⁰ att en begränsning inom diagnostik av malignt melanom är att det i nuläget finns mycket begränsad kunskap om immunhistokemiska infärgningar för ex vivo CM. Inom den konventionella histopatologin är

sådana infärgningar till stor nytta för diagnostiken och därför fortsätter histopatologi vara överlägset ex vivo CM när det kommer till att diagnostisera malignt melanom.

Hartmann et al. 2018b¹⁸ beskriver ytterligare en begränsning med ex vivo CM, nämligen att talgkörtlar utseendemässigt kan misstolkas som tumörer, vilket i deras studie gav upphov till några falskt positiva resultat. Enligt författarna visade det sig även svårt att identifiera alla komponenter i blandad typ av BCC, vilket gjorde att felaktig diagnos sattes i vissa fall. Longo et al. 2014 lyfte också fram problematik rörande talgkörtlar och beskrev dem som potentiella confounders, då de ibland misstolkades som öar av tumörvävnad. Longo et al. 2014 beskrev dessutom intensiv reflektion från stroma som en potentiell confounder, då det försvårade att skilja infiltrativ BCC från omkringliggande dermis. I samma led presenterar Schüürmann et al. att de upplevde att pigmenterade strukturer, som hår, melanocyter och melanofager, avbildades suddigt i digitalt färgade bilder, på grund av deras intensiva reflektion.

Longo et al. 2019²⁵ belyser ytterligare begränsningar med ex vivo CM. Enligt dem var sammanfogningen av bilderna till en mosaikbild inte fullständig, vilket gav upphov till förlust av vissa data. Dessutom framhäver författarna att storleken på mikroskopets bildfönster inte var tillräckligt stort. Det tillåter endast en vy av 12 x 12 mm, vilket ej var tillräckligt för att avbilda stora tumörer, som därmed krävde flera bilder.

Diskussion

Vald metod

Omfattningen av denna kritiska litteraturstudie är rimlig om man ser till den tid som getts för arbetet, men eftersom den enbart inkluderar 10 artiklar ger den inte en komplett översikt över ämnet. Litteraturstudien är därmed inte systematisk, även om det har eftersträvats. Eftersom arbetet skulle färdigställas på 8 veckor var det inte lämpligt att genomföra en systematisk litteraturanlys, trots att en sådan skulle bidra med en bredare förståelse. För att andra ska kunna reproducera detta arbetet har en systematisk arbetsmetod eftersträvats. Metoden för urval och datainsamling är tydligt beskriven i text som stöds av förtydligande tabeller och figurer.

Syftet med denna litteraturstudie var att undersöka ex vivo FRCM och jämföra denna metod med konventionell histopatologisk mikroskopi gällande diagnostisk tillförlitlighet och marginalbedömning av hudtumörer. Utifrån syftet formulerades två frågeställningar. Optimalt för att besvara dessa frågeställningar hade varit att enbart inkludera artiklar som behandlar ex vivo FRCM, men eftersom det är en relativt ny metod fanns det vid studiens genomförande inte tillräckligt med publicerade artiklar för att möta en rimlig omfattning av material att analysera och kvalitetsgranska. Därmed utvidgades indextestet till ex vivo CM och inkluderade artiklar som behandlade FRCM, FCM och RCM separat samt dem som endast behandlade en laser. Det är därmed ex vivo CM som diskuteras i resterande del av denna litteraturstudie.

En kritisk litteraturgranskning kan retrospektivt ifrågasättas som lämplig metod eftersom det saknas tillräckligt med material för att besvara frågeställningarna. Det innebär ett omfattande arbete kan anses ej vara befogat i förhållande till materialet som fanns tillgängligt. Det är möjligt att det hade varit mer passande att utföra en klinisk studie där man utvärderade den diagnostiska tillförlitligheten hos ex vivo FRCM, för att på så sätt bidra med data till forskningsvärlden, så att det i framtiden blir möjligt att utföra denna typ av litteraturgranskning.

Inför urvalet formulerades inklusionskriterierna att artiklarna skulle vara skrivna på engelska samt att fullständig artikel skulle vara tillgänglig. Om något av dessa kriterier inte uppfylldes exkluderades studien, trots att den utifrån titel och abstrakt bedömdes relevant. Detta innebär att artiklar som kunde bidra till litteraturstudiens syften kan ha exkluderats. Eftersom det visade sig att sökningen gav mycket få resultat som behandlade FRCM hade det varit lämpligt inkludera även dessa. Då fullständig artikel inte är tillgänglig är det möjligt att kontakta artikelförfattaren och be om artikeln i fulltext. I fall med artiklar skrivna på annat språk än engelska hade lämplig person kunnat tillfrågats att översätta artiklar från respektive språk till engelska.

Artikelsökningen begränsades till PubMed och Embase. För att identifiera ytterligare befintlig kunskap inom ex vivo CM hade även så kallad grå litteratur kunnat inkluderas, vilket bland annat utgörs av tekniska rapporter, konferensdokument och myndighetsrapporter. Genom att inkludera grå litteratur är det möjligt att få en bredare bild av forskningsområdet, då kravet på publicering

av forskningen tas bort, vilket motverkas publikationsbias. Publikationer av denna typ kan påträffas exempelvis genom att följa referenserna i de utvalda artiklarna.

Framtaget resultat

FRCM är som tidigare beskrivet en ny metod som ännu inte etablerats inom vården. Metoden utvärderas fortfarande inom forskningsprojekt och några av artiklarna som inkluderades i denna litteraturstudie behandlar just denna metod. FRCM har tidigare visat sig vara ett snabbare alternativ till konventionell histopatologi och kan producera digitalt färgade bilder i likhet med konventionell histopatologi.^{4,5,10} Dessa påståenden bekräftas även av resultatet från denna litteraturstudie.

Resultatet av denna litteraturstudie visar en varierad bild av ex vivo CM som metod vid diagnostik av hudtumörer. Flera olika varianter av metoden presenteras, med kombinerad eller separat användning av fluorescens- och reflektanslaser samt användning av digital infärgning eller ej. Dessutom finns det stor variation gällande urval och tolkning av metodens resultat. För de studier som har utvärderat den diagnostiska tillförlitligheten hos ex vivo CM och jämfört detta med konventionell histopatologisk mikroskopi skiljer sig metod och resultatet åt avsevärt mellan olika studier, varför det inte går att dra någon generell slutsats av detta. Flera studier intygar dock på att det finns en positiv korrelation mellan resultatet vid diagnostik med ex vivo CM och konventionell histopatologi. Dessutom visar beräkning av statistiska mått som mäter tillförlitligheten hos testmetoder, som sensitivitet och specificitet, att ex vivo CM kan ställa rätt diagnos hos nära 100 % av fallen, med en viss högre specificitet än sensitivitet.

Resultatet tyder på att ex vivo CM skulle kunna komplettera histopatologisk mikroskopi, då vissa strukturer visualiseras bättre med ex vivo CM jämfört med histopatologi. Ex vivo CM har dessutom fördelen att färskt excisionsmaterial kan undersökas intraoperativt på endast några minuter, till skillnad från tidskrävande konventionell histopatologi, vilket betyder att ex vivo CM skulle kunna drastiskt minska tiden som krävs för diagnostik. Vidare kan ex vivo CM undersöka vävnadspreparat i sin helhet, utan krav på beskärning, jämfört med konventionell histopatologi som kräver en viss beskärning av laterala kanter vid preparering med paraffin. Därmed kan ex

vivo CM visualisera eventuell ytterligare tumörvävnad som potentiellt går förlorad vid histopatologi.

En aspekt som ännu inte utvärderats är hur resultatet av tumörers utseende påverkas av patientens hudfärg. Shüürmann et al.²² belyser problemet med att vissa pigmenterade strukturer avbildades dåligt, med anledning av deras intensiva reflektion. Därmed är det rimligtvis möjligt att påstå att tumörer hos patienter med mörkare hudfärg, med pigmentrikare hud, skulle vara svårare att diagnosticera. Att endast inkludera patienter med ljusare hudfärg skulle därmed kunna introducera selektionsbias, vilket skulle betyda att urvalet inte är representativt för populationen. Hudfärg har inte presenterats i urvalet av deltagare i någon av studierna som analyserats och därmed är det inte möjligt att utvärdera detta i denna litteraturstudie. Att väga in mångfald bland patienter är dock något man borde ha i åtanke vid konstruktion av framtida studier för att ha möjlighet att utvärdera denna aspekt.

För att vidare utvärdera ex vivo CM som diagnostisk metod är det möjligt att undersöka andra tumörtyper än hudtumörer. Longo et al. 2014²⁴ skriver att FCM kan vara användbar för diagnostik av andra tumör- och vävnadstyper, exempelvis bröst, kolon och sköldkörtel. Ex vivo CM borde undersökas inom fler diagnostiska medicinska specialiteter än dermatologi för att se om metoden har möjlighet att förbättra vården även inom dessa områden.

Begränsningar

Resultatet presenterar flera begränsningar med ex vivo CM som borde åtgärdas för att förbättra metoden. Hartmann et al. 2017²⁰ beskriver att bristen på immunohistokemiska färgningar för ex vivo CM begränsar diagnostik av malignt melanom. För att åtgärda denna begränsning krävs det att man undersöker möjligheten till nya, eller modifikation av redan befintliga, färgningsmetoder. Hartmann et al. 2018a²¹ presenterar forskning som utgör en viktig utgångspunkt inom detta forskningsområde, även om det för närvarande inte går att fastställa metodens betydelse för diagnostik av hudcancer. Det är möjligt att mer kunskap om immunhistokemiska färgningar för ex vivo CM skulle kunna revolutionera forskningsområdet.

Ytterligare en begränsning, som presenteras av Hartmann et al. 2018b¹⁸, Longo et al. 2014 och Schüürmann et al., är att vissa strukturer visualiseras sämre med ex vivo CM jämfört med konventionell histopatologi. Det är möjligt att detta kan hanteras med utveckling av mjukvara som digitalt kan förbättra bilderna och exempelvis öka kontraster mellan olika strukturer. Longo et al. 2019 påpekar ytterligare tekniska begränsningar med ex vivo CM, som att sammanfogningen av bilderna till en mosaikbild inte var fullständig och att bildfönstret storlek var för litet. Dessa begränsningar skulle kunna åtgärdas med en kombination av utveckling både mjuk- och hårdvara. För att ex vivo CM ska bli en lämplig kandidat för att ersätta konventionell histopatologi krävs det därmed ytterligare forskning och att de tekniska förbättringarna implementeras av tillverkaren av konfokalmikroskopet.

Styrkor och svagheter

De analyserade artiklarna utforskar möjligheterna med ex vivo CM, men är inte särskilt kritiska till hur utformningen av deras metod har kunnat ge upphov till eventuella systematiska fel, vilket sänker deras kvalitet. I de fall då det inte framgick tydligt huruvida personerna som tolkade referensmetoden var blindade för indextestet eller ej antogs att personerna inte var blindade och därav bedömdes artikeln uppnå låg kvalitet. I de fall då den kliniska diagnosen redan var känd antogs att personerna som tolkade både indextest och referensmetod hade vetskap om diagnosen, vilket kan ha introducerat bias. På grund av dessa antaganden finns risk att artiklarnas kvalitet underskattats. Ifall personerna som utförde tolkningarna faktiskt var blindade så har artiklarna egentligen högre kvalitet än vad som anges i denna studie. De artiklar som tydligt redovisade att tolkningarna gjordes av personer som var blindade bedömdes ha måttlig eller hög kvalitet, då detta är ett bra sätt att studera diagnostisk tillförlitlighet.

I samtliga artiklar saknas motivering för hur urvalet gjordes och det går därför inte att utesluta att urvalet har introducerat bias. Flera av artiklarna undersökte hudpreparat från MMS och som tidigare nämnts krävs strikta indikationer för att patienten ska kvalificeras för denna behandling. Om urvalet bestod av patienter med de allvarligaste eller mest svårbedömda hudtumörerna finns risk att resultaten över- eller underskattas och inte är representativa för populationen.

Som tidigare nämnt är BCC den vanligaste hudcancern och följs därefter av SCC och hudmelanom. Artiklarna i denna litteraturstudie behandlar alla tre typerna, varav BCC är den hudcancer som beskrivs mest frekvent. Vad som är viktigt att understryka utifrån detta är att resultat från studier som undersöker diagnostik av BCC med ex vivo CM inte med säkerhet går att applicera på andra sorters hudtumörer. Mer forskning behövs för att fastställa vilken roll ex vivo CM kan ha i diagnostik och marginalbedömning av olika hudtumörer.

Slutsats och kliniska implikationer

Det finns inte tillräcklig evidens för att det i dagsläget ska vara möjligt att fastställa hur den diagnostiska tillförlitligheten och marginalbedömning av hudtumörer kan jämföras mellan ex vivo FRCM och konventionell histopatologisk mikroskopi. Resultatet tyder dock på att ex vivo CM har god korrelation med histopatologisk mikroskopi, även om resultatet är inte enstämigt, samt att ex vivo CM kan komplettera konventionell histopatologisk mikroskopi på vissa aspekter.

Eftersom färskt excisionsmaterial kan undersökas intraoperativt med ex vivo CM på endast några minuter betyder det att metoden drastiskt skulle kunna minska tiden för diagnostik. I det fall tumören inte är radikalt borttagen kan därmed upprepat kirurgiskt ingrepp ske omedelbart, vilket skulle accelerera vårdförloppet och minska lidandet för patienten. Sammanfattningsvis tyder resultatet därmed på att FRCM är en metod med stor framtida potential som kan komma att underlätta diagnostik av hudtumörer. Det krävs dock mer forskning för att fastställa om FRCM kan ersätta histopatologisk mikroskopi för diagnostik och marginalbedömning av hudtumörer.

Författarnas arbetsfördelning

Arbetsfördelningen har fördelats lika genom hela arbetet mellan författarna till denna kritiska litteraturstudie.

Referenser

1. Cancer i siffror 2018: populärvetenskapliga fakta om cancer. Socialstyrelsen; 2018.

2. Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. In: Biobanking. Humana Press, New York, NY; 2019. p. 253–68.
3. Region Blekinge. Patologi [Internet]. Blekinge: Region Blekinge; 2018 [uppdaterad 2018-12-21; citerad 2020-12-8]. Hämtad från: <https://regionblekinge.se/halsa-och-varld/for-varldgivarer/provtagningsanvisningar/provtagningsanvisningar-for-patologi-och-cytologi/patologi.html>
4. Malveyh J, Pérez-Anker J, Toll A, Pigem R, Garcia A, Alos LL, et al. Ex vivo confocal microscopy: revolution in fast pathology in dermatology. *Br J Dermatol*. 2020 Dec;183(6):1011–25.
5. Pérez-Anker J, Ribero S, Yélamos O, García-Herrera A, Alos L, Alejo B, et al. Basal cell carcinoma characterization using fusion ex vivo confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology. *Br J Dermatol*. 2020 Feb;182(2):468–76.
6. Statens beredning för medicinsk och social utvärdering (SBU). SBU:s metodbok [Internet]. Stockholm: SBU; 2020 [uppdaterad 2020-10-15; citerad 2020-12-14]. Hämtad från: <https://www.sbu.se/sv/metod/sbus-metodbok/>
7. Rossi AM, Sierra H, Rajadhyaksha M, Nehal K. Novel approaches to imaging basal cell carcinoma. *Future Oncol*. 2015 Nov;11(22):3039–46.
8. Que SKT. Research Techniques Made Simple: Noninvasive Imaging Technologies for the Delineation of Basal Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2016 Apr;136(4):e33–8.
9. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Cambazard F, Rubegni P. Ex vivo confocal microscopy: an emerging technique in dermatology. *Dermatol Pract Concept*. 2018 Apr;8(2):109–19.
10. Gareau DS. Feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt*. 2009 May;14(3):034050.
11. Prickett KA, Ramsey ML. Mohs Micrographic Surgery [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. [ciderad 2020-12-14]. Hämtad från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441833/>
12. Paoli J, Daryoni S, Wennberg A-M, Mölne L, Gillstedt M, Miocic M, et al. 5-year recurrence rates of Mohs micrographic surgery for aggressive and recurrent facial basal cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2011 Oct;91(6):689–93.
13. National Center for Biotechnology Information (NCBI). About - PubMed [Internet]. [okänt år; citerad 2020-12-29]. Hämtad från: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/about/>

14. Elsevier. About Embase - Biomedical research [Internet]. [c2020; citerad 2020-12-29]. Hämtad från: <https://www.elsevier.com/solutions/embase-biomedical-research>
15. PRISMA [Internet]. [c2015; citerad 2020-12-19]. Hämtad från: <http://www.prisma-statement.org/>
16. Statens beredning för medicinsk och social utvärdering (SBU). Bedömning av studier om diagnostisk tillförlitlighet [broschyr på Internet]. Stockholm: SBU; 2020. [citerad 2020-12-7]. Hämtad från: https://www.sbu.se/globalassets/ebm/bedomning_studier_diagnostisk_tillforlitlighet_quadas2.pdf
17. Kristensson J. Handbok i uppsatsskrivande och forskningsmetodik för studenter inom hälso- och vårdvetenskap. 1 uppl. Stockholm: Natur & Kultur; 2014.
18. Hartmann D, Krammer S, Bachmann MR, Mathemeier L, Ruzicka T, von Braunmühl T. Simple 3-criteria-based ex vivo confocal diagnosis of basal cell carcinoma. J Biophotonics. 2018 Jul;11(7):e201800062.
19. Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L, Dietrich A, Ruzicka T, von Braunmühl T. Identification of ex-vivo confocal scanning microscopic features and their histological correlates in human skin. J Biophotonics. 2016 Apr;9(4):376–87.
20. Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L, Bachmann MR, Dietrich A, Ruzicka T, et al. Identification of ex-vivo confocal laser scanning microscopic features of melanocytic lesions and their histological correlates. J Biophotonics. 2017 Jan;10(1):128–42.
21. Hartmann D, Krammer S, Vural S, Bachmann MR, Ruini C, Sárdy M, 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).
22. Schüürmann M, Stecher MM, Paasch U, Simon JC, Grunewald S. Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020 Jul;34(7):1496–9.
23. Mercuri SR, Rizzo N, Bellinzona F, Pampena R, Brianti P, Moffa G, et al. Digital ex-vivo confocal imaging for fast Mohs surgery in nonmelanoma skin cancers: An emerging technique in dermatologic surgery. Dermatol Ther. 2019 Nov;32(6):e13127.

24. Longo C, Rajadhyaksha M, Ragazzi M, Nehal K, Gardini S, Moscarella E, et al. Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. *Br J Dermatol*. 2014 Sep;171(3):561–70.
25. Longo C, Pampena R, Bombonato C, Gardini S, Piana S, Mirra M, 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 Jun;180(6):1473–80.
26. Bennàssar A, Carrera C, Puig S, Vilalta A, Malveyh J. Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with ex vivo fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement. *JAMA Dermatol*. 2013 Jul;149(7):839–47.
27. Bennàssar A, Vilata A, Puig S, Malveyh J. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery. *Br J Dermatol*. 2014 Feb;170(2):360–5.

Bilaga 1: Analyserade artiklar

Artikel	Syfte	Metod	Resultat
Bennassar A et al. 2013	Att beskriva och utvärdera kriterier för diagnostik av BCC med FCM samt jämföra med konventionell histopatologi.	80 patienter med BCC genomgick MMS, vilket resulterade i 84 vävnadspreparat som avbildades med ex vivo FCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.) och därefter histopatologi.	Korrelation mellan FCM och histopatologi var 0,9 (Cohens k) för klassifikation av BCC subtyp.
Bennassar A et al. 2014	Att utvärdera diagnostisk tillförlitlighet hos ex vivo FCM för marginalbedömning av BCC vid MMS och jämföra med histopatologi, samt att beräkna tiden som krävs för diagnos med FCM respektive histopatologi.	74 patienter med BCC genomgick MMS, vilket resulterade i 80 vävnadspreparat som avbildades med ex vivo FCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.) och därefter histopatologi.	Sensitivitet, specificitet, PPV och NPV för marginalbedömning av BCC var 88 %, 99 %, 98 % respektive 97 %. Medelvärdet av tiden för avbildning med FCM var $10,1 \pm 1,22$ min, medan det var $28,2 \pm 2,2$ min för histopatologi.
Hartmann et al. 2018a	Att utvärdera användningen av fluorescerande antikroppar vid tumördiagnostik med FCM och RCM.	Vävnad från 50 hudtumörer preparerades med tre olika fluorescerande infärgningar. Preparaten analyserades av två specialister inom CM (VivaScope 2500, Lucid Inc.), med FCM och RCM separat.	Infärgning med fluorescerande antikroppar tog betydligt längre tid än de fluorescerande infärgningar som brukar användas inom ex vivo CM, exempelvis akridinorange.
Hartmann et al. 2018b	Att undersöka om det är möjligt att diagnostisera BCC med ex vivo CM utifrån enbart tre kriterier samt att undersöka om den diagnostiska tillförlitligheten för ex vivo CM varierar beroende på erfarenhet hos personen som analyserar bilderna.	235 hudpreparat avbildades med FCM och RCM separat (Vivascope 2500, Lucid Inc.). Analys gjordes av två personer, en expert (person 1) och en nybörjare (person 2) inom ex vivo CM. Följande tre kriterier var definierade innan analysen utfördes: "presence of tumor mass, peripheral palisading and clefting". Därefter utfördes histopatologisk	Totalt sattes 470 diagnoser med ex vivo CM respektive histopatologi. Utifrån ex vivo CM-bilderna blev 449 hudprover korrekt diagnostiserade (95,5 %). Sant positiva: 235, sant negativa: 214, falskt positiva: tre samt falskt negativa: 18. Sensitivitet: 96,6 %, specificitet: 98,7 %. Skillnad i diagnostisk tillförlitlighet mellan

		undersökning.	person 1 och 2: 1,7 % högre för person 1 (ej signifikant). Person 1 ställde diagnos signifikant snabbare (P=0,008).
Hartmann et al. 2017	Att beskriva av benigna och maligna melanocytiska hudförändringar ex vivo CM och korrelera resultatet med konventionell histopatologi.	31 melanocytiska hudförändringar avbildades med FCM och RCM separat (VivaScope 2500, Lucid inc.). Bilderna analyserades och därefter analyserades preparaten med histopatologi.	Melanocyternas utseende i ex vivo CM korrelerade med histopatologi och de kunde tydligt urskiljas från keratinocyterna. Ex vivo CM är likvärdigt histopatologi när det kommer till att urskilja de huvudsakliga typerna av nevi ("junctional, compound, dermal and dysplastic"). Resultatet tyder dock på att histopatologi i nuläget är överlägset ex vivo CM när det kommer till diagnostik av malignt melanom, då det inte finns några immunohistokemiska infärgningar att använda vid ex vivo CM.
Hartmann et al. 2016	Att beskriva hur frisk hud avbildas vid ex vivo CM och hur väl bilderna korrelerar med det histopatologiska utseendet.	50 vävnadsprover från frisk hud preparerades och avbildades med FCM och RCM (Vivascope 2500, Lucid Inc.). Två oberoende specialister inom CM analyserade bilderna och därefter genomfördes konventionell histopatologi.	Ex vivo CM visualiserar frisk hud med stor likhet till konventionell histopatologi. RCM ger en bättre överblick av hudens morfologi men vissa strukturer visualiseras bättre med FCM.
Longo et al. 2019	Att utvärdera diagnostisk tillförlitlighet med ex vivo FCM jämfört med fryssnitt och histopatologi vid marginalbedömning av BCC.	127 patienter med BCC genomgick MMS, vilket resulterade i 753 vävnadspreparat som avbildades med ex vivo FCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.). Fryssnitt och konventionell histopatologi utfördes därefter och resultaten jämfördes med FCM.	FCM vs. fryssnitt: sensitivitet 79,8 %, specificitet 95,8 %, PPV 80,5 %, NPV 95,7 %. Med FCM var 24 falskt positiva och 25 falskt negativa. FCM vs. histopatologi: sensitivitet 89,7 %, specificitet 95,3 %, PPV 78,2 %, NPV 98,0 %. 650 av 702 (92,6 %) fick samma diagnos vid FCM, fryssnitt och histopatologi.

Longo et al. 2014	Att beskriva utseendet av BCC vid avbildning med ex vivo FCM och jämföra det med histopatologi.	64 vävnadpreparat från MMS vid två olika kliniker avbildades med ex vivo FCM (VivaScope 2000 och 2500, Lucid Inc.). Därefter utfördes konventionell histopatologi och resultatet jämfördes med FCM. För att korrelera samstämmighet mellan FCM och histopatologi beräknades Cohens k för olika typer av fynd som binära data (förekomst/frånvaro).	Korrelationen för olika fynd specifika för BCC varierade mellan 0,903 och 1. Större strukturer hade bättre korrelation. Sensitivitet och specificitet beräknades till 94,9 % respektive 96,8 %. Korrelation mellan FCM och histopatologi för fynd i normal hud beräknades till 0,89.
Mercuri et al. 2019	<i>Eftersom detta inte är en originalartikel framgår inget tydligt syfte.</i>	Två patientfall beskrivs, SCC respektive BCC. Tumörerna avbildas med FRCM (VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH). Därefter genomfördes histopatologisk undersökning.	Ex vivo CM-bilderna är jämförbara med histopatologisk undersökning. Fördelar med ex vivo CM är att färre artefakter uppstår på bilderna och de ger bättre överblick av excisionsmaterialet, jämfört med konventionell histopatologi med fryssnitt.
Schürmann et al. 2020	Att utvärdera utseendet hos hudstrukturer från frisk hud i digitalt färgade bilder från FRCM, samt att jämföra resultatet med konventionell histopatologi med H&E.	Frisk vävnad från 26 patienter, som uppstod vid plastikkirurgisk rekonstruktion efter operation av hudtumörer, undersöktes först med FRCM (VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH) och sedan med histopatologisk mikroskopi av två dermatopatologer.	Stark korrelation mellan digitalt infärgade bilder och de histopatologiska bilderna. Nästan alla hudstrukturer hade liknande morfologiskt utseende som vid histopatologi. Pigmenterade strukturer som hår, melanocyter och melanofager avbildades dåligt i digitalt färgade ex vivo CM-bilder, på grund av deras intensiva reflektion.

Bilaga 2: Mall för kvalitetsgranskning

1. Deltagare
 - a. Beskriv urvalet av deltagare.
 - b. Ange eventuella inklusions- och exklusionskriterier.
 - c. Beskriv deltagarna (föregående tester, presentation, syfte med indextestet).
2. Indextest
 - a. Beskriv indextestet, hur det genomfördes och tolkades.
 - b. Tolkades resultatet av indextestet utan kännedom om resultatet av referensstandarderna?
3. Referensmetod
 - a. Beskriv referensmetoden, hur den genomfördes och tolkades.
 - b. Tolkades resultaten från referensmetoden utan kännedom om resultatet från indextestet?
4. Flöde och tid
 - a. Beskriv deltagare som inte fick indextestet och/eller referensmetoden (dvs. bortfall).
 - b. Inkluderades alla deltagare i analysen?
5. Etik
 - a. Beskriv eventuellt etiskt godkännande.
 - b. Lämnade patienterna skriftligt medgivande?
6. Övergripande kvalitet (låg/måttlig/hög)
 - a. Låg: personerna som tolkade referensmetoden var inte blindade för indextestet, den tidigare fastställda kliniska diagnosen var känd eller det saknades etiskt övervägande.
 - b. Måttlig: deltagare har exkluderats utan tydlig motivering.
 - c. Hög: personerna som tolkade referensmetoden var blindade för indextestet och alla deltagare inkluderades i analysen.

Bilaga 3: Resultat vid kvalitetsgranskning

Artikel	Deltagare	Indextest	Referensmetod	Flöde och tid	Etik	Kvalitet
Bennässar A et al. 2013	80 patienter med 84 kirurgiskt borttagna BCC vid MMS inkluderades prospektivt.	FCM (modifierad version av VivaScope 2500, Lucid Inc.). Utfördes och tolkades av kirurgen som utförde MMS.	Histopatologi med H&E. Tolkades av obestämt antal oberoende dermatopatologer, som var blindade för indextestet.	15 preparat exkluderades av tekniska skäl. Därmed ingick 69 preparat från 66 patienter i analysen.	Har etiskt godkännande.	Måttlig
Bennässar A et al. 2014	74 patienter med 80 kirurgiskt borttagna BCC vid MMS inkluderades prospektivt.	FCM (modifierad version av VivaScope 2500, Lucid Inc.). Utfördes och tolkades av kirurgen som utförde MMS.	Histopatologi med H&E eller toluidinblå. Tolkades av obestämt antal dermatopatologer, som var blindade för indextestet.	10 preparat exkluderades av tekniska skäl.	Har etiskt godkännande.	Måttlig
Hartmann et al. 2018a	50 hudtumörer.	FCM och RCM (VivaScope 2500 Lucid Inc.). Utfördes av två dermatopatologer, som var specialister inom CM, varav en hade bakgrund inom histopatologi. Den tidigare kliniska diagnosen för preparatet var känd.	Histopatologi. Tolkades av samma två dermatopatologer som vid indextestet, som därmed inte var blindade.	Alla preparat inkluderades.	Utfördes enligt Helsinkideklaration en. Patienter lämnade skriftligt medgivande.	Låg

Hartmann et al. 2018b	150 patienter som skulle genomgå MMS inkluderades prospektivt. Inklusionskriterier var histologisk diagnos av BCC eller rester av BCC efter MMS.	FCM och RCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.). Tolkades av två oberoende personer, en expert inom ex vivo CM och en nybörjare.	Histopatologi. Det framgår ej vem som utförde eller tolkade referensmetoden, samt om de var blindade för indextestet eller ej.	Alla deltagare inkluderades.	Har etiskt godkännande. Utfördes enligt Helsinkideklaration en. Patienter lämnade skriftligt medgivande.	Låg
Hartmann et al. 2017	31 melanocytiska lesioner.	FCM och RCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.). Utfördes och tolkades oberoende av två dermatologer med erfarenhet inom histologi och CM.	Histopatologi. Utfördes och tolkades av samma dermatopatologer. Det framgår inte om de var blindade för indextestet när de genomförde referensmetoden.	Alla preparat inkluderades.	Utfördes enligt Helsinkideklaration en. Patienter lämnade skriftligt medgivande.	Låg
Hartmann et al. 2016	50 preparat av frisk hudvävnad.	FCM och RCM (VivaScope 2500, Lucid Inc.). Utfördes av en dermatolog. Tolkades av två specialister inom CM oberoende av varandra.	Histopatologi med H&E. Utfördes och tolkades av samma två oberoende specialister som vid indextestet.	Alla preparat inkluderades.	Utfördes enligt Helsinkideklaration en. Patienter lämnade skriftligt medgivande.	Låg
Longo et al. 2019	127 patienter med BCC, vilket gav 753 preparat, inkluderades prospektivt. Inklusionskriterier var >18 år, klinisk diagnos för BCC med indicerat för	FCM (VivaScope 2500). Tolkades av en dermatolog enligt förbestämda kriterier.	Fryschnitt utfördes och tolkades av en patolog som var blindad för resultatet från indextestet. Histopatologi utfördes och tolkades av en	51 av 753 preparat saknades vid undersökningen.	Har etiskt godkännande. Patienterna lämnade skriftligt medgivande.	Måttlig

		MMS, minimum uppföljning av 3 månader. Exklusionskriterier var <18 år och kortare uppföljningstid än 3 månader.		annan patolog, som var blindad för indextestet, men inte fryssnittet.				
Longo et al. 2014	64 exciderade BCC från MMS från två olika kliniker: Arcispedale Santa Maria Nuova-IRCCS (ASMN), Reggio Emilia, Italien, och Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), New York, USA.	FCM (modifierad version av VivaScope 2000 respektive VivaScope 2500). Utfördes och tolkades av en dermatolog, med erfarenhet inom CM och histopatologi, som var blindad för referensmetoden.	Histopatologi. Tolkades av en patolog som var blindad för indextestet.	Alla preparat inkluderades.	Har etiskt godkännande.	Hög		
Mercuri et al. 2019	2 patienter: en 88 årig man och en 72 årig kvinna.	FRCM med digital färgning (VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH). Det framgår ej vem som har utfört eller tolkat indextestet.	Histopatologi. Det framgår ej vem som har utfört eller tolkat referensmetoden.	Alla deltagare inkluderades.	-	Låg		
Schüürmann et al. 2020	26 patienter som donerat frisk hudvävnad (Burrow's triangle) från plastikkirurgisk rekonstruktion efter operation av hudtumörer.	FRCM med digital färgning (VivaScope 2500M-4G, MAVIG GmbH). Tolkades av två oberoende dermatopatologer.	Histopatologi med H&E. Tolkades av samma två dermatopatologer, som därmed inte var blindade för indextestet.	Alla deltagare inkluderades.	Har etiskt godkännande. Patienterna lämnade skriftligt medgivande.	Låg		

