

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA
Università degli Studi di Napoli Federico II**

**ATTENDIBILITA' DIAGNOSTICA DELL'ENDOMICROSCOPIA
LASER CONFOCALE "in vivo" PER LE NEOPLASIE DEL COLON
RETTO, MEDIANTE COMPARAZIONE CON IL QUADRO
ISTOLOGICO**

Candidato

Dr Giovanni Autiero

docente guida:

Prof. Stefania Staibano

ABSTRACT

I recenti progressi tecnologici nella miniaturizzazione hanno permesso di integrare un microscopio confocale a scansione in sonde trans-endoscopiche che consente agli endoscopisti di raccogliere in vivo biopsie virtuali della mucosa gastrointestinale durante l'esame.

Obiettivi: L'obiettivo del presente studio era di valutare in modo prospettico l'applicabilità clinica e il potere predittivo di un microendoscopio confocale per la diagnosi in vivo di neoplasia coloretale.

Metodi: Sono stati inclusi in questo studio i pazienti con evidenza di neoplasia del colon-retto superficiale all'endoscopia di routine. Le lesioni sono state identificate utilizzando un tradizionale colonscopio a luce bianca seguito da microendoscopio a scansione in grado di registrare immagini da una sonda Coloflex UHD-type. Le immagini ottenute, sono state interpretate come "neoplastica" o meno, in relazione alle modifiche della trama vascolare e cellulare. Le letture PCLE sono state poi confrontate con i risultati istopatologici delle resezioni endoscopiche delle lesioni e / o campioni ottenuti da biopsie mirate.

Risultati: Sono state identificate un totale di 32 lesioni in 20 pazienti reclutati consecutivamente presso la nostra unità di endoscopia digestiva di riferimento. La diagnosi Istopatologica è stata di "adenoma" in 19 casi, polipi iperplastici in 11 casi e adenocarcinoma in 2 casi. Per la rilevazione del tessuto neoplastico, PCLE, ha dimostrato una sensibilità del 100%, una specificità del 84,6%, con una precisione di 92,3, un VPP del 90,5% e un valore predittivo negativo del 100%.

Conclusioni: PCLE permette di ottenere immagini di alta qualità, consentendo la previsione di neoplasia intraepiteliale con un elevato livello di accuratezza.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, la qualità delle immagini endoscopiche è migliorata anche grazie all'avanzamento tecnologico dei dispositivi. Nonostante tecniche come la cromoendoscopia, l'alta risoluzione dell'endoscopia a magnificenza, l'imaging a banda stretta, e auto-imaging di fluorescenza, migliorano la visualizzazione e l'individuazione delle lesioni della mucosa, la biopsia mirata della lesione, rappresenta ancora oggi, l'unico strumento affidabile per rilevare la vera natura delle lesioni. Spesso il campionamento non adeguato di biopsie mancanti di parti di tessuto rilevanti, comportano una diagnosi errata; l'ideale sarebbe fare diagnosi definitiva durante l'esame endoscopico, senza effettuare biopsie. I recenti progressi tecnologici nella miniaturizzazione hanno permesso di integrare in un endoscopio flessibile convenzionale, la scansione confocale microscopica, dando origine ad un innovativo strumento, conosciuto ora come Endomicroscopio Confocale (EMC), o Endomicroscopio Confocale Laser (ECL)

Questa nuova tecnologia ha permesso agli endoscopisti di raccogliere in tempo reale "*in vivo*" immagini istologiche o "*biopsie virtuali*" della mucosa gastrointestinale durante l'endoscopia, stimolando un notevole interesse per l'applicazione di questa tecnica nella pratica clinica gastroenterologia. ECL può essere effettuato al momento con 2 dispositivi: uno integrato in un endoscopio (Pentax, Tokio, in Giappone), e uno come sonda stand-alone, in grado di passare attraverso il canale operativo della maggior parte dei comuni endoscopi (Cellvizio, Mauna Kea

Technologies, Parigi, Francia) [1-3]. La maggior parte degli studi clinici segnalati fino ad oggi ha utilizzato il sistema integrato (eECL).

METODI

Sono stati inclusi in questo studio prospettico, pazienti con lesioni neoplastiche superficiali, reclutati consecutivamente in sala endoscopica. I criteri di esclusione erano i seguenti: età inferiore a 18 anni, la gravidanza, disturbi allergici accertati e compromissione della funzione renale. I pazienti candidati allo studio, sono stati invitati a firmare uno specifico consenso informato; il Comitato Etico ha approvato lo studio. Tutte le procedure sono state eseguite utilizzando le Cellvizio Endomicroscopy System (Tecnologie Mauna Kea, Parigi, Francia). Questo sistema utilizza una sonda da 2,5 mm (sonda Coloflex UHD-type) che viene inserita attraverso il canale operativo dell'endoscopio per ottenere l'imaging dinamico della mucosa. I dati di imaging PECL sono stati raccolti in una scansione alla velocità di 12 fotogrammi al secondo con un campo di scansione di 30 000 pixel. Questo sistema ha un campo visivo di 240 X 200 micron, con una risoluzione laterale di 1 micron. Singoli fotogrammi video sono stati ricostruiti in una sola grande immagine (4X2 mm) da uno speciale software per computer ("mosaicing"). Mosaicing, è una ricostruzione di immagine post-procedura basata su un algoritmo quadro gerarchico, che è in grado di recuperare un globale coerente allineamento delle cornici di ingresso, per compensare le distorsioni del movimento indotto e per catturare deformazioni non rigide. Il video risultante dall'unione di tutte le immagini in movimento, annulla gli artefatti legati al movimento stesso, e ricostruisce la trama tissutale. Un singolo endoscopista esperto, adeguatamente preparato, ha eseguito tutti gli esami.

Ventiquattro ore prima della procedura, i pazienti hanno effettuato la toilette intestinale mediante

l'assunzione di 4 litri di soluzione ipertonica (polietilenglicol PEG): la sedazione cosciente è stata ottenuta mediante midazolam (iv 5-10 mg) nei pazienti che ne hanno fatto richiesta.

Le lesioni sono state identificate utilizzando l'endoscopia tradizionale a luce bianca, seguita da quella PECL. Dopo la localizzazione di ciascuna lesione, è stato somministrato un bolo di 10-20-mg per via endovenosa di Buscopan (Scopolamina N-butilbromuro) per limitare l'attività peristaltica, e 10 ml di fluoresceina di sodio al 10% per l'acquisizione di immagini dall'ECL; per definire la normalità, sono stati acquisiti l'immagine confocale delle lesioni circoscritte e quattro quadranti segmentali "Normali" del colon-retto. L'acquisizione delle immagini ECL è stata effettuata posizionando la punta della sonda a diretto contatto con il sito bersaglio del tessuto in esame, usando un cappuccio endoscopico per stabilizzare la mucosa. Immagini ECL di ciascuna lesione osservata e quelle ECL della mucosa normale del colon-retto sono state memorizzate in cartelle specifiche in un database. Un patologo esperto ha valutato in cieco, le resezioni endoscopiche ottenute e le ha classificate in base alla classificazione di Vienna [18]

Principali risultati

La classe morfologica delle lesioni è stato refertata in conformità con le linee guida del Workshop di Parigi [19], come segue: lesioni protrudenti (Pp: polipo peduncolato, Psp: polipo subpeduncolato, Ps: polipo sessile); lesioni rilevate (0-IIa: elevazione della mucosa piatta, 0IIa / c: lesioni piane (0-IIb; elevazione con depressione centrale): la variazione della mucosa piatta, 0-IIc: mucosa depressione, 0-IIc/IIa: depressione della mucosa con bordo rialzato).

Una diagnosi preliminare è stata effettuata dall'endoscopista sulla base delle immagini in vivo (videosequences) e poi sulla base di quelle del mosaico, secondo i criteri dell'endomicroscopia confocale di Mainz per la previsione della diagnosi di neoplasia coloretale intraepiteliale.

[4]. La diagnosi con PECL, è stato poi confrontata con la diagnosi finale istopatologica.

L'endoscopista ha ottenuto immagini di qualità **buona** (nessun artefatto legato al movimento, visibilità dell'architettura delle cripte e parete dei vasi e le cellule del sangue), **media** (in cui sono visibili artefatti ma possono essere riconosciute l'architettura delle cripte e quella vascolare), e **bassa** (in cui la presenza di artefatti non consentono la valutazione obiettiva). Per valutare la concordanza tra osservatori, sono stati valutati off-line in cieco da altri 4 endoscopisti (SS, FMDE, FS), con minima esperienza con PECL, 50 video-immagini ottenute elettronicamente nel confocale e scelte a caso dal database di mosaicing tra quelle di buona e media qualità (25 immagini che rappresentano le lesioni neoplastiche e 25 immagini che rappresentano le lesioni non-neoplastiche o normale epitelio del colon-retto), La loro capacità di predire l'istologia su PECL (classificazione di ogni sequenze video e dei mosaico in neoplastiche, non-neoplastiche o epitelio normale) è stata confrontata con la diagnosi istopatologica utilizzata come gold standard di riferimento.

Analisi statistica.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il pacchetto software statistico SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, USA). La sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP), valori predittivi negativi (VAN), e la precisione delle PCLE sono stati calcolati con il 95% intervalli di confidenza, utilizzando i risultati istologici come standard di riferimento di diagnosi. L'accordo interosservatore è stata misurata con il kappa score di Cohen [20].

Sono stati calcolati valori Kappa per concordanza interosservatore per la previsione della mucosa normale, neoplastica e non neoplastica. I valori assegnati sono 0,01-0,2 lieve, 0,21-0,4 sensibile, 0,41-0,6 moderato, 0,61-0,8 sostanziale, e 0,81-1,0 quasi perfetto.

RISULTATI

24 è il numero di pazienti selezionati in sala endoscopica; 20 di essi sono stati inclusi nello studio (14 maschi e 6 femmine, età media 62,5 anni); 3 pazienti sono stati esclusi a causa di patologie a carico dell'apparato respiratorio (asma) ed 1 per insufficienza renale.

l'esame ECL ha aggiunto 30-60 s per il sito in esame. Il processo di mosaicing video ha richiesto 4 minuti in media (range 2-13 min.); Non ci sono state complicanze endoscopiche, o reazioni avverse alla fluoresceina di sodio, se non in qualche isolato caso per cui si è avuta una colorazione leggermente giallastra della cute, (evenienza scomparsa entro 30-60 minuti). Sono state identificate un totale di 32 lesioni. Una singola lesione è stata trovata in 22 (62,5%) casi, 2 lesioni sono state riscontrate in 8 pazienti (25,0%) e tre lesioni in 2 (6,3%). La dimensione media del polipo era di 1,3 cm (da 0,5 a 2,5 cm). Sette delle lesioni sono state localizzate al retto, 19 nel sigma, 3 nel colon discendente, 1 nel colon trasverso e 2 nelle porzioni destre, rispettivamente. Dodici delle lesioni erano peduncolate e 20 sessili. La diagnosi istopatologica era di "adenoma" in 19 casi, "polipi iperplastici" in 11 casi e di "adenocarcinoma" in 2 casi (Tabella 1).

Sono state ottenute sequenze video in real time in tutti i pazienti con un totale di 192 immagini a mosaico. La qualità delle immagini ECL è stata classificata come buona in 163 casi (84,9%) e come bassa in 29 casi (15,1%), probabilmente a causa di artefatti legati al movimento e la perdita di contrasto, per effetto della escrezione di fluoresceina di sodio. Per ogni lesione, sono state classificate come buone e quindi ai fini della valutazione, adeguate almeno 2 immagini a mosaico.

Correlazione di istopatologia e le immagini PCLE.

La mucosa normale presentava la caratteristica forma esagonale, con aspetto a nido d'ape con regolare reticolo di capillari che delimitano l'orifizio luminale della cripta. L'architettura superficiale della cripta era rappresentata dal classico orifizio ordinato e regolare, ricoperto di un

omogeneo strato epiteliale con visibile "buco nero". (Figura 1).La mucosa iperplastica mostrava cripte stellate con bordi epiteliali scuri. L'architettura dei vasi, anche se appariva esagonale e regolare, spesso mostrava un aumento della densità capillare pericriptica (Figura 2). Il Tessuto neoplastico è stato rappresentato da "dark" cell, con deplezione della mucina e cellule caliciformi / che attenuano la densità della cripta; il modello architetturale era irregolare, così come lo spessore epiteliale, con strutture villiformi e bordi epiteliali "dark". I vasi sanguigni presentavano ramificazioni dilatate ed irregolari (figure 3-4). Tutte le immagini diagnosticate con ECL come mucosa "normale", hanno mostrato normale architettura della cripta all' istopatologia. Diciannove di 21 lesioni neoplastiche, sono state diagnosticate correttamente endomicroscopicamente secondo i criteri definiti. Due lesioni (9,5%) diagnosticate erroneamente come neoplastiche Con ECL hanno mostrato epitelio iperplastico all' istologia.

Nove di 11 lesioni che erano state identificate come non maligne (polipi iperplastici) al confocale sono state confermate come benigne all'esame istologico. Due di queste 11 lesioni (18,2%) sono stati valutate erroneamente come iperplastici all'endomicroscopia confocale. Entrambe le lesioni hanno mostrato normale epitelio all'esame istopatologico. Per la rilevazione del tessuto neoplastico PECL aveva una sensibilità del 100% (CI, 82,3% -100%), una specificità del 84,6% (CI, 54,5% -98,1%), con una precisione di 92,3 (CI, 68,4% -99,05%), un PPV del 90,5% (CI, 69,6% -98,8%) e un valore predittivo negativo del 100% (CI, 71,5% -100%)

Accordo inter-osservatore.

Nel predire l'istologia con i criteri di PECL (classificazione di ogni sequenza video e mosaico in epitelio neoplastico, non neoplastico o normale) c'è stata un'elevata concordanza inter-osservatore (valore medio kappa = 0,85). Tale concordanza è da ritenersi quasi perfetta.

DISCUSSIONE

Questo lavoro, rappresenta il primo studio prospettico, che mette in evidenza l'utilità clinica e la capacità revisionale del ECL ad alta risoluzione della sonda-based per la diagnosi in vivo delle neoplasie del colon-retto e delle lesioni pre-neoplastiche durante la colonscopia.

Altri gruppi hanno valutato applicabilità clinica ed il potere predittivo del sistema confocale (eECL) integrato per prevedere istologia di lesioni al colon *in vivo* durante l'esame endoscopico. La presenza di alterazioni neoplastiche è stato previsto con elevata accuratezza (97% di sensibilità, 99%, specificità, precisione del 99%) [3,18]. Nel nostro studio, PECL aveva una sensibilità del 100%, una specificità del 84,6%, con una precisione di 92,3, un VPP del 92,6% e un valore predittivo negativo del 100%, per l'individuazione del tessuto neoplastico. Questi risultati sono sostanzialmente paragonabili ai risultati ottenuti utilizzando il sistema integrato eECL. Non ci sono dati, al momento, a confronto con PCLE eECL a dimostrare la superiorità di un sistema [1-3,9-14]. PECL ha diversi vantaggi rispetto al eECL ma, alcuni svantaggi. I vantaggi includono la maggiore versatilità di sonde PCLE, che può essere utilizzato congiuntamente ad un qualsiasi endoscopio (endoscopi ad alta risoluzione, NBI, cholangioscope, ecc), "ad hoc" (ad esempio quando una lesione viene rilevata con un normale endoscopio) e, l'acquisizione video con frame rate di 12 fotogrammi / sec. permettendo imaging in vivo del flusso capillare. Gli svantaggi comprendono una risoluzione leggermente inferiore (circa 1µm rispetto allo 0,7. per eCLE) e più piccolo campo visivo (240 -600. m). Il nostro studio ha dimostrato che il sistema PECL consente di ottenere immagini di alta qualità della superficie cellulare, vascolare e di imaging stremali in vivo. Le immagini si correlano bene all' istologia convenzionale che consente la previsione di una neoplasia con un elevato livello di accuratezza. La

simultanea endomicroscopia laser confocale durante la colonscopia è stato possibile a prescindere dalla scansione anatomica e dalla posizione nel colon. Inoltre, l'acquisizione delle immagini è stata semplice, riproducibile e veloce. Un software specificamente sviluppato ("mosaicing", Mauna Kea Technologies) per la post-acquisizione è stato utilizzato per ricostituire le immagini dinamiche ad alta risoluzione in una più larga immagine statica. Dall'uso della mosaicing, l'area dell'immagine potrebbe essere aumentato da 2 a 4 volte, e la definizione dell'immagine

potrebbe essere ulteriormente migliorata per permettere la visualizzazione più dettagliata. Come risultato della grande immagine statica che comprende molte singole immagini di una sequenza video, la valutazione dell'esame è più facile e più efficiente. In tal modo, queste caratteristiche portano ad un'eccellente correlazione tra ECL e l'esame istopatologico standard (Figure 1-4).

Nessuna diagnosi di falsi negativi è stata fatta utilizzando PECL, in questa serie, ma ci sono state 2 lesioni che sono state diagnosticate erroneamente come neoplastica secondo i criteri di endomicroscopia. In entrambi i casi, l'analisi istologica ha mostrato epitelio iperplastici. Artefatti di movimento potrebbero spiegare l'interpretazione errata endomicroscopica di foci neoplastiche a causa dell'allargamento delle cellule e la distorsione architetturale.

L'acquisizione delle immagini al confocale senza artefatti legati al movimento è un problema noto in endomicroscopia. In particolare, durante la fase di pre-studio, abbiamo avuto questi problemi quando le lesioni erano peduncolate o avevano una posizione che era tangente al confocale. Nella nostra esperienza, il bolo endovenoso di Buscopan, aspirazione delicata e / o l'utilizzo di un cappuccio endoscopico prima che le immagini ECL fossero acquisite, sono stati utili a stabilizzare le apparecchiature e ridurre al minimo movimento eccessivo. La percentuale di confocale di buona qualità d'immagine in questo studio è stata dell'85%. Immagini confocale sono state ottenute utilizzando fluoresceina come agente di contrasto fluorescente (10 mL del 10% fluoresceina sodio). Dopo somministrazione endovenosa, la fluoresceina si lega ampiamente all'albumina sierica nel sangue. Il contrasto non legato diffonde attraverso i capillari, entrando nel tessuto colorando la matrice extracellulare dell'epitelio di superficie e della lamina propria fino a 30 min [1-3]. Nuclei

delle cellule e la mucina non sono colorati dalla fluoresceina e quindi appaiono scure. L'acriflavina topico è altamente specifico per l'architettura delle componenti acide, e colora i nuclei degli strati superficiali della mucosa. La colorazione fornisce una visualizzazione chiara dei nuclei delle cellule in alto della mucosa e può consentire una migliore differenziazione tra neoplasia intra-epiteliale e il cancro del tratto GI. Le preoccupazioni circa il danno al DNA da colorazione da acriflavina hanno ridotto il suo uso negli esseri umani [22,23].

La dose e tempi di somministrazione della fluoresceina non sono state standardizzate. Nei lavori pubblicati la dose varia da 5 a 10 ml. La migliore qualità di immagine può essere raggiunti entro 8 minuti dall'iniezione fluoresceina [1,8,9,21].

Nel presente studio non si sono avute reazioni avverse con la fluoresceina di sodio, oltre ad una lieve colorazione giallastra della cute, che di solito sono scomparsi entro 30-60 minuti. La Fluoresceina è un agente altamente sicuro i cui maggiori effetti collaterali sono a breve termine (1-2 h) e comprendono colorazione giallastra della cute e di brillanti urine di colore giallo. Nausea e vomito sono stati riportati durante l'angiografia della retina e sono stati transitori e lievi. Seri effetti collaterali, come anafilassi o effetti cardiaca o respiratoria, sono estremamente rari, e ad oggi, non sono stati registrati in ECL [1-3]. Il presente studio ha notevoli limitazioni: in primo luogo, il piccolo numero di pazienti inclusi, che potrebbero limitare il potere dello studio, in secondo luogo, lo studio non aveva un disegno randomizzato cieco, con un gruppo di controllo e, quindi, i nostri risultati necessitano di essere validati da diversi altri centri. Infine un unico endoscopista esperto ha interpretato tutte le immagini ECL. Il problema di uno studio singolo operatore può rappresentare la difficoltà nel decidere se tali risultati possono essere generalizzati. L'endomicroscopia confocale è una tecnologia esaminatore-dipendente e, quindi, un training teorico e pratico di formazione sarà di fondamentale importanza prima che si possa fare un affidabile diagnosi istologica; tuttavia, non si sa se endoscopisti senza esperienza in questa tecnologia sono in grado di fare tali distinzioni con sufficiente precisione e concordanza tra osservatori. I dati

attualmente disponibili sulla curva di apprendimento di EMC sono pubblicati solo come abstract a causa della novità della tecnologia [24,25]. Inoltre, la variabilità inter e intra osservatore di questa tecnica non è stata adeguatamente studiata

CONCLUSIONE.

Il presente studio ha mostrato che le lesioni superficiali neoplastiche del colon-retto potrebbero essere diagnosticate facilmente utilizzando PCLE. La sensibilità, accuratezza, la specificità, ed i valori predittivi negativo e positivo sono stati molto elevati in questa lavoro.

La domanda con ulteriori endomicroscopie confocali, è come potrà questa procedura cambiare la gestione del paziente. Chiaramente, questo studio senza un gruppo di controllo non è impostato per esaminare la questione, e questo potrebbe essere lasciato per studi futuri. Tuttavia, sembra ragionevole che questa nuova tecnologia può ottimizzare "al tavolo". decisioni di gestione con una riduzione correlata ad un istopatologia non significativa.

REFERENCES

1. De Palma GD. Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2009 Dec 14;15(46):5770-5.
2. Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, et al. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2005, 15:715-31. Review.
3. Hoffman A, Goetz M, Vieth M, et al. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy.* 2006 38:1275-83.
4. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127: 706–713.
5. Goetz M, Memadathil B, Biesterfeld S, et al. In vivo subsurface morphological and functional cellular and subcellular imaging of the gastrointestinal tract with confocal mini-microscopy. *World J Gastroenterol.* 2007, 21:2160-5.
6. Becker V, Vercauteren T, von Weyern CH, et al. High resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video-mosaicing. *Gastrointestinal Endoscopy* 2007, 66: 1001–1007
7. Meining A, Saur D, Bajbouj M, et al. In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: An examiner blinded analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007, 5: 1261–1267

8. Wang T.D., Friedland S., Sahbaie P., et al. Functional imaging of colonic mucosa with a fibered confocal microscope for realtime in vivo pathology. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007, 5: 1300–1305
9. Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, et al. Technology insight: confocal laser endoscopy for in vivo diagnosis of colorectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 4:480-90. Review
10. Gheorghe C, Iacob R, Becheanu G, et al. Confocal endomicroscopy for in vivo microscopic analysis of upper gastrointestinal tract premalignant and malignant lesions. *J Gastrointest Liver Dis.* 2008 17:95-100. Review.
11. Dunbar K, Canto M. Confocal endomicroscopy. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 24:631-7. Review.
12. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy for gastrointestinal diseases. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2008,18:451-66, Review
13. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF. Virtual histology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008; 22:883-97. Review
14. Kiesslich R, Canto MI. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2009, 19:261-72.
15. Wallace MB, Fockens P. Probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterology.* 2009 136:1509-13.
16. Monkemuller K., Neumann H., Fry L.C. Endoscopic examination of the small bowel: from standard white light to confocal endomicroscopy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2009, 7: 11–12
17. Hurlstone DP, Baraza W, Brown S, et al.. In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia. *Br J Surg.* 2008 95:636-45.
18. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000, 47:251–255
19. Participants in the Paris Workshop. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon. *Gastrointest Endosc* 2003; 58 (Suppl): S3–S43.
20. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* 1960;20:37-46.
21. Becker V, von Delius S, Bajbouj M, et al Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy: evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-to-imaging time, *Gastrointest Endosc* 2008;68:319-23
22. Burlinson GR, Caulfield MJ, Pollard M. Ozonation of mutagenic and carcinogenic polyaromatic amines and polyaromatic hydrocarbons in water. *Cancer Res* 1979;39:2149-23.
- Seeley HW, VanDemark PJ, Lee JJ, editors. *Microbes in action*, 4th ed. New York : Macmillan; 1997
24. Nguyen VX, Nguyen CC, Jonathan A., et al Accuracy and Inter-Observer Agreement in Identifying Neoplastic Gastrointestinal Mucosal Pathology By Probe-Based. Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE). *Gastrointest Endosc* 2009; 69, AB364
25. Buchner AM, Gomez V, Gill KR, et al. The Learning Curve for In Vivo Probe Based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) for Prediction of Colorectal Neoplasia. *Gastrointest Endosc* 2009; 69, AB364