

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI - FEDERICO II

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA



Scuola Di Dottorato In Scienze Biomorfologiche E Chirurgiche

Dottorato di ricerca in
"SCIENZE CHIRURGICHE E TECNOLOGIE DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE AVANZATE"

Indirizzo
"TECNOLOGIE TERAPEUTICHE IN CHIRURGIA ONCOLOGICA"

(XXV ciclo)

(Coordinatore: Prof. Andrea Renda)

Endomicroscopia Laser Confocale con minisonde Hd nell'individuazione di neoplasie invisibili nell'esofago di Barrett: uno studio di fattibilità per migliorare la routine endoscopia.

Tutor

Prof G. D. De Palma

Candidato

Dott. E. Coppola Bottazzi

ANNI ACCADEMICI 2010-2013

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 <i>Epidemiologia e fattori di rischio.....</i> | 3 |
| 2. STRATEGIE DI GESTIONE..... | 5 |
| 2.1 <i>Screening e sorveglianza dell'BE.....</i> | 5 |
| 2.2 <i>Immagini endoscopiche per il rilevamento di displasia e neoplasia precoce:.....</i> | 5 |
| 3. COS'E' L'ENDOMICROSCOPIA CONFOCALE | 6 |
| 3.1 <i>Principi di Microscopia Confocale.....</i> | 6 |
| 3.2 <i>Mezzi di contrasto.....</i> | 7 |
| 4. STRUMENTARIO | 8 |
| 4.1 <i>Pentax EG-3870CIK (endoscopio superiore) e CE-3870CILK (colonscopio).....</i> | 8 |
| 4.2 <i>Sistema Cellvizio ® Endomicroscopy</i> | 8 |
| 4.3 <i>Procedura</i> | 9 |
| 4.4 <i>Interpretazione delle immagini.....</i> | 9 |
| 5. STUDIO CLINICO | 10 |
| 5.1 <i>SCOPO.....</i> | 10 |
| 5.2 <i>METODI</i> | 10 |
| 5.2.1 <i>Pazienti</i> | 10 |
| 5.2.2 <i>Attrezzatura</i> | 10 |
| 5.2.3 <i>Procedura.....</i> | 10 |
| 5.2.4 <i>Principali misure di outcome</i> | 11 |
| 5.3 <i>ANALISI STATISTICA</i> | 11 |
| 5.4 <i>RISULTATI.....</i> | 11 |
| 5.4.1 <i>Correlazione delle immagini pCLE con l'istopatologia.....</i> | 12 |
| 5.4.2 <i>Concordanza tra gli osservatori</i> | 12 |
| 6. DISCUSSIONE..... | 13 |
| Tabella 1 | 15 |
| Tabella 2 | 16 |
| Tabella 3 | 17 |
| Tabella 4 | 18 |
| Tabella 5 | 19 |
| Figura 1 | 20 |
| Figura 2 | 21 |
| Figura 3 | 22 |
| Figura 4 | 23 |
| Figura 5 | 24 |
| Figura 6 | 25 |
| Figura 7 | 26 |
| BIBLIOGRAFIA | 27 |

1. INTRODUZIONE

L'Esofago di Barrett (BE) è una condizione patologica caratterizzata dalla sostituzione del normale epitelio squamoso stratificato dell'esofago distale con un epitelio di tipo colonnare.

La diagnosi di BE è una diagnosi basata su criteri endoscopici e istologici: presenza di una mucosa di colorito rosa-salmone nell'esofago distale all'endoscopia e di metaplasia intestinale completa nei campioni biotici prelevati a livello della mucosa anomala^{1,2} (Figura 1)

L'importanza clinica del BE è legata all'elevato rischio di sviluppare un adenocarcinoma esofageo, neoplasia con prognosi spesso infausta (sopravvivenza a 5 anni < 25%).

Il sospetto endoscopico di esofago di Barrett necessita sempre una conferma istologica. La diagnosi di BE richiede la campionatura biotica sistematica delle aree di mucosa esofagea che appaiono anomale, per documentare la Metaplasia Intestinale (IM) e per individuare l'eventuale presenza di displasia.

La classificazione più usata per valutare l'estensione del BE è quella di Praga che utilizza criteri basati sulla massima estensione circonferenziale (C) e longitudinale (M)³.

Le attuali linee-guida consigliate per l'individuazione di displasia nei pazienti con BE sono quelle basate sul protocollo "Seattle"^{4,5,6}.

Il protocollo raccomanda sempre 4 biopsie della Ginzione Esofago-Gastrica GEG (una per quadrante) e si differenzia a seconda delle caratteristiche endoscopiche della mucosa "vellutata" (circonferenziale, a lingue [= a fiamme], a isola). La differente topografia della mucosa vellutata propone diverse modalità di campionamento biotico: quattro biopsie ogni 2 cm sulla mucosa circonferenziale (1 per quadrante); una biopsia ogni 1-2 cm sulla fiamma (su ogni fiamma); una biopsia per isola e sempre una biopsia aggiuntiva della mucosa normale.

1.1 *Epidemiologia e fattori di rischio*

La prevalenza del BE è di circa il 3-7% nei pazienti che si sottopongono a esame endoscopico a causa dei sintomi da reflusso mentre è dell'1% in pazienti che si sottopongono a endoscopia per qualsiasi indicazione⁷.

Almeno il 60% dei pazienti con BE sviluppa la malattia come risultato di reflusso cronico; altra condizione d'infiammazione della mucosa dell'esofago inferiore, come i danni mucosali da chemioterapia, farmaci anti-infiammatori non-steroidi e le infezioni virali sono associate con lo sviluppo di BE in circa 1% dei casi⁸.

Il BE è associato a un aumentato rischio di adenocarcinoma dell'esofago. I pazienti con BE hanno una probabilità circa 40 volte più elevata di sviluppare una adenocarcinoma esofageo (EAC) rispetto alla popolazione senza IM. Il rischio per il singolo paziente con BE è stato stimato variare da 1 su 50 a 1 su 200 pazienti-anno, ovvero circa lo 0,5% all'anno.

Recenti studi di coorte di grandi dimensioni indicano che il tasso di progressione è pari allo 0,1% -0,3% l'anno⁹.

L'adenocarcinoma di Barrett è considerato un processo evolutivo che si realizza in più stadi: epitelio squamoso stratificato, metaplasia colonnare, displasia e carcinoma. Perché una tale progressione si verifichi, chi è a rischio e ciò che promuove questi cambiamenti rimane poco chiaro.

Fattori clinici e demografici come ad esempio, l'età, il sesso maschile, maggiore durata e maggiore frequenza dei sintomi GERD, lunghezza del segmento BE sono associati, in alcuni studi, con un lieve incremento di progressione a EAC^{10,11,12}. Biomarcatori come l'aneuploidia e la perdita di p53 sono stati recentemente associati con un aumento del rischio di progressione verso la displasia di alto grado (HGD) e/o EAC^{13,14}.

Attualmente, il migliore e più diffuso fattore predittivo di rischio di cancro nel BE è il grado di displasia. Soggetti senza displasia hanno tassi di cancro estremamente bassi per i cinque

anni successivi alla diagnosi. Viceversa, soggetti con HGD hanno tassi riportati fino al 10% l'anno¹⁵.

Diverse terapie sono state sviluppate nel tentativo di far regredire il BE e ridurre il rischio di cancro: il trattamento medico del reflusso acido con inibitori di pompa ad altro dosaggio, le modifiche dello stile di vita, la chirurgia antireflusso e i trattamenti endoscopici. Se questi interventi siano vantaggiosi dal punto di vista costo-efficacia e se riducano, di fatto, la mortalità per cancro esofageo, rimane controverso^{16,17,18,19,20}.

2. STRATEGIE DI GESTIONE

2.1 *Screening e sorveglianza dell'BE*

Le Strategie attuali per migliorare i tassi di sopravvivenza nei pazienti con adenocarcinoma di Barrett si basano sulla ricerca della displasia, con programmi di screening su coorti di pazienti ad alto rischio e/o con la sorveglianza mediante biopsie endoscopiche di pazienti con BE noto. Non esistono prove sufficienti per raccomandare uno screening endoscopico per BE nella popolazione generale dei pazienti con MRGE che non hanno fattori di rischio^{21,22}.

I fattori di rischio validati per il BE comprendono l'età maggiore di 50 anni, il sesso maschile, la razza caucasica, la GERD cronica, l'ernia iatale da scivolamento, l'elevato indice di massa corporea e la prevalente distribuzione intra-addominale del grasso corporeo²³. Questi fattori di rischio possono essere utilizzati per determinare quei pazienti con GERD da sottoporre a screening per la presenza di BE.

La sorveglianza endoscopica nei pazienti con BE è raccomandata per identificare una neoplasia precoce. Tuttavia i dati della letteratura dimostrano che, nonostante la sorveglianza sia molto praticata, vi è variabilità nella tecnica e nell'intervallo di sorveglianza nelle diverse linee guida (Tabella 1)²⁴.

2.2 *Indagini endoscopiche per il rilevamento di displasia e neoplasia precoce:*

L'endoscopia con più biopsie sistematiche (il protocollo di "Seattle") è necessaria per la rilevazione di displasia o adenocarcinoma e per la sorveglianza di BE. Quest'approccio, che prevede un gran numero di biopsie, richiede molto tempo e ha diverse limitazioni, tra cui errori di campionamento, incoerente interpretazione istologica e costi elevati.

Negli anni sono state sviluppate e testate diverse tecniche d'imaging endoscopico, con risultati variabili, per migliorare l'accuratezza della diagnosi endoscopica e per poter riconoscere o escludere con certezza la presenza di aree neoplastiche riducendo il numero di prelievi biotipici e quindi i costi^{25,26}. Queste tecniche possono essere generalmente classificate come: tecniche ad ampio campo (red-flag), come l'High-Definition/high-resolution White-Light Endoscopy (HD-WLE) e la Narrow-Band Imaging (NBI)^{27,28}, e tecniche focali, come l'Endomicroscopia Laser Confocale (CLE)²⁹.

Le tecniche ad ampio campo sono buone per fornire una visione d'insieme dell'intero segmento BE e rilevare una zona d'interesse, mentre le tecniche focali possono fornire un maggior dettaglio della zona d'interesse. A differenza della microscopia ottica, la microscopia confocale offre immagini notevolmente ingrandite di un'area molto piccola dell'epitelio (Figura 2).

Recenti studi hanno dimostrato che, in pazienti sottoposti a sorveglianza endoscopica, le immagini di CLE con biopsie mirate hanno migliorato significativamente la resa delle biopsie per la displasia, rispetto alla normale endoscopia con biopsie casuali. Analogamente, la CLE era utile come strumento per identificare un BE non displastico e quindi potenzialmente ridurre il numero di biopsie necessarie.

Tuttavia, ci sono dati limitati sulla standardizzazione dei criteri diagnostici e sulla variabilità tra gli operatori nella diagnosi di displasia, in particolare con la pCLE.

Il nostro è uno studio prospettico, non controllato, sull'applicazione dell'endomicroscopia laser confocale nell'Esofago di Barrett

3. COS'E' L'ENDOMICROSCOPIA CONFOCALE

Negli ultimi anni, la qualità delle immagini endoscopiche è migliorata grazie all'evoluzione tecnologica dei dispositivi. Sebbene tecniche come la cromoendoscopia, l'endoscopia ad alta risoluzione, la Narrow band e l'auto-fluorescenza migliorino la visualizzazione e l'individuazione delle lesioni della mucosa, la biopsia deve ancora essere eseguita per una diagnosi istologica formale di atipia cellulare e architetturale.

Zone sospette identificate durante l'endoscopia sono sottoposte a biopsie multiple. Tuttavia, ci sono diversi svantaggi che possono essere associati alle biopsie, compresi il sanguinamento o la perforazione. Possono inoltre essere eseguite biopsie non rappresentative perdendo porzioni rilevanti di tessuto, con conseguente sottostima della diagnosi. Il campionamento biptico casuale per le lesioni non-neoplastiche può richiedere anche molto tempo. *Sarebbe l'ideale se una diagnosi definitiva possa essere fatta durante un'endoscopia senza eseguire le biopsie.*

I recenti progressi tecnologici nella miniaturizzazione hanno consentito di integrare un microscopio in un endoscopio convenzionale flessibile o in una mini-sonda confocale laser che può essere inserita nel canale operativo di un qualunque endoscopio tradizionale (p-CLE), una tecnica ormai nota come Endomicroscopia Confocale (CEM) o Endomicroscopia Laser Confocale (CLE) (Figura 3). Questa nuova concezione tecnologica ha permesso agli endoscopisti di raccogliere in tempo reale e in vivo immagini istologiche o "biopsie virtuali" della mucosa gastrointestinale (GI) durante l'endoscopia, e ha stimolato notevole interesse per l'applicazione della presente tecnica in endoscopia clinica^{30,31}.

La pCLE permette di ottenere delle immagini della mucosa con una magnificazione e una risoluzione di circa 1000x, tale da consentire l'identificazione delle microstrutture cellulari e subcellulari delle aree esplorate (biopsie virtuali)

3.1 Principi di Microscopia Confocale

La microscopia confocale è stata utilizzata nelle scienze biologiche dal 1961 quando è stato introdotto il concetto di sezionamento ottico di un campione biologico.

Il microscopio confocale si differenzia strutturalmente da un tradizionale microscopio a fluorescenza per l'utilizzo di una sorgente luminosa laser e per la presenza di un sistema ottico ed elettronico che permette di eseguire la scansione di una sezione del campione osservato con successiva ricostruzione sullo schermo di un computer dell'immagine risultante. Per creare delle immagini confocali, un laser a bassa potenza (laser a ioni argon che genera una lunghezza d'onda di 88-600 nm, la luce laser monocromatica blu) è focalizzato da una lente obiettivo in un unico punto, all'interno di un campione fluorescente.

La stessa lente è utilizzata come condensatore e obiettivo. Il punto d'illuminazione coincide così con il punto di rilevamento all'interno del campione. La luce proveniente da quel punto si concentra attraverso un foro stenopeico su di un rivelatore, e la luce proveniente dall'esterno è respinta. I sistemi d'illuminazione e rilevazione sono sullo stesso piano focale e sono chiamati "confocali" (Figura 4).

Dopo aver superato il foro stenopeico, la luce fluorescente è rilevata da un dispositivo di fotorivelazione (un tubo fotomoltiplicatore o fotodiodo valanga), trasformando la luce in un segnale elettrico che è registrato da un computer. Tutti i segnali rilevati dal punto illuminato sono catturati e misurati.

Mentre il laser scansiona sopra il piano d'interesse, un'immagine completa è ottenuta pixel per pixel e linea per linea; la luminosità di un pixel dell'immagine risultante corrisponde all'intensità relativa della luce fluorescente.

L'immagine in scala di grigi creata è una sezione ottica che rappresenta un piano focale all'interno del campione esaminato.

Poiché le immagini confocali dipendono da una fluorescenza, un colorante fluorescente (mezzo di contrasto) è necessario per creare delle immagini visibili.

3.2 Mezzi di contrasto

Un agente di contrasto fluorescente è utilizzato ed è necessario per ottenere immagini ad alto contrasto con la CEM. Agenti potenzialmente utilizzabili sugli esseri umani sono la fluoresceina, l'acriflavina, la tetraciclina e il cristallo di violetto I mezzi di contrasto possono essere applicati per via sistemica (fluoresceina, tetraciclina) o topica (Acirflavina, cristallo di violetto) utilizzando un catetere a spruzzo.

Di questi, la fluoresceina sodica endovenosa (10%) e l'acriflavina applicata topicamente (0,2%) sono stati più frequentemente utilizzati. Nessun dato è, però, finora disponibile sull'uso di tetraciclina e del cristallo di violetto.

La fluoresceina sodica, già largamente utilizzata in oftalmologia e angiografia, è il mezzo di contrasto più adoperato per il basso costo e l'assenza di potenzialità mutagena.

Dopo l'iniezione endovenosa, la fluoresceina sodica si lega ampiamente all'albumina sierica nel sangue. Il contrasto non legato diffonde attraverso i capillari, entrando nei tessuti e colora la matrice extracellulare della superficie, dell'epitelio e della lamina propria fino a 30 min³².

I Nuclei cellulari e la mucina non sono marcati dalla fluoresceina sodica e quindi appaiono scuri. Le strutture della mucosa che possono essere identificate dopo la somministrazione, e che includono fluoresceina sodica, sono gli enterociti, l'infiltrato cellulare, la superficie delle cellule epiteliali, i vasi sanguigni e i globuli rossi. La Fluoresceina sodica è un agente sicuro, i cui principali effetti indesiderati sono di breve durata (1-2 ore) e comprendono colorazione giallastra della pelle ed un colore giallo brillante delle urine. Nausea e vomito, sono stati riportati durante l'angiografia, e sono transitori e di modesta entità. Effetti indesiderati gravi, come anafilassi o effetti cardiaci o respiratori, sono estremamente rari, e ad oggi, non sono stati registrati in CEM.

Un recente studio multicentrico ne ha confermato la sicurezza in corso di esame endomicroscopico. Si sono osservati solo eventi avversi lievi nell'1.4% di 2.272 esami endomicroscopici effettuati. I sintomi registrati sono: ipotensione arteriosa (0.5%), nausea (0.4%) eritema nel sito d'iniezione (0.35%), rash (0.04%) e lieve dolore epigastrico (0.08%)³³. L'acriflavina idrocloride può essere applicata per via topica per colorare il nucleo e il citoplasma cellulare. Questa sostanza è assorbita in pochi secondi e la sua azione è circoscritta agli strati superficiali della mucosa, circa 100 µm. Il suo uso è da limitare per una possibile attività mutagenica. Fluoresceina sodica e acriflavina possono essere utilizzate contemporaneamente.

4. STRUMENTARIO

CLE può essere eseguita attualmente con due dispositivi: (1) integrato in un endoscopio (Pentax, Tokio, Giappone, qui definito eCLE), e (2) come una mini sonda (di seguito definito pCLE) capace di passare attraverso il canale operativo della maggior parte degli endoscopi (Cellvizio, Mauna KeaTechnologies, Parigi, Francia).

4.1 *Pentax EG-3870CIK (endoscopio superiore) e CE-3870CILK (colonscopio)*

I componenti dell'endoscopio laser confocale sono basati sull'integrazione di un microscopio laser confocale nella punta distale di un endoscopio convenzionale, che consente di eseguire una microscopia confocale in aggiunta alla video endoscopia standard (Figura 5).

Il diametro è di 12,8 mm, la punta distale contiene un beccuccio per il getto di aria e acqua, 2 luci guida, un canale ausiliare per il getto d'acqua (usato per l'applicazione topica dell'agente di contrasto) e un canale operativo di 2,8 millimetri.

Questo sistema fornisce un'immagine confocale utilizzando un laser incidente con una lunghezza d'onda di 488 nm, e consente la rilevazione della fluorescenza con una lunghezza d'onda di 505-585 nm, con una riduzione del rumore dell'immagine rispetto ai sistemi di riflessione confocale.

Le immagini CLE vengono raccolte in una scansione con una velocità di 1,6 fotogrammi al secondo (1024×512 pixel) o 0,8 fotogrammi al secondo (1024×1024 pixel) con una profondità di scansione regolabile da 0 a 250 μm , un campo visivo di 475×475 μm , una risoluzione laterale 0,7 μm , e una risoluzione assiale di 7 μm .

Le immagini confocali sono generate simultaneamente con le immagini endoscopiche e il canale di lavoro dell'endoscopio può ancora essere utilizzato.

4.2 *Sistema Cellvizio® Endomicroscopy*

Il Sistema Cellvizio® Endomicroscopy (Figura 6) è basato su una sonda con un semiconduttore laser che oscilla a 488 nm. L'ultimo modello di minisonda Cellvizio confocale creata per l'applicazione sul tratto gastrointestinale includono CholangioFlex, GastroFlex, ColoFlex, GastroFlex-UHD, e ColoFlex-UHD.

Le Sonde CholangioFlex sono state progettate per l'uso durante la colangio-pancreatografia retrograda endoscopica che richiede un canale endoscopico di almeno 1,2 mm, mentre le altre sonde, che sono state progettate per l'uso in gastroscopia e colonscopia, richiedono un canale maggiore di 2,8 mm.

Tutte le sonde generano immagini dinamiche (12 fotogrammi al secondo) con un campo di scansione di 30.000 pixel.

Questo sistema ha un campo visivo di 240-600 μm (Sonde CholangioFlex: 325 μm ; GastroFlex e ColoFlex: 600 μm ; GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD: 240 μm) con una risoluzione laterale di 1-3,5 μm (la risoluzione laterale per il CholangioFlex e per le sonde GastroFlex e ColoFlex è 3,5 μm ; la risoluzione laterale per GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD è di 1 μm).

Questi sistemi hanno un pino dell'immagine con una profondità fissa, e le diverse minisonde confocali sono necessarie per variare la profondità d'imaging, che è per sonde CholangioFlex 40-70 μm , 70-130 μm per GastroFlex e ColoFlex, e 55-65 μm per GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD.

Singoli fotogrammi video sono ricostruiti da uno speciale algoritmo computerizzato (“mosaicatura”) in un’immagine con un campo visivo allargato (4 mm × 2 mm).

Il sistema e-CLE ha una maggiore risoluzione, esplora un’area di mucosa più ampia e permette la scansione della mucosa dalla superficie sino a 250 µm di profondità. L’integrazione del microscopio confocale al video endoscopio limita le dimensioni del canale operativo (2.8 mm) e condiziona una maggiore lunghezza del terminale rigido dell’endoscopio (48 mm), rendendo lo strumento meno flessibile di uno standard. L’utilizzo del sistema p-CLE è più versatile, poiché può essere inserito nel canale accessorio di qualunque tipo di endoscopio. Per eseguire il campionamento mirato è necessario estrarre la minisonda confocale dal canale operativo dell’endoscopio. Il campo microscopico esplorabile in vivo è inferiore al sistema e-CLE, è possibile comunque eseguire una ricostruzione della superficie esplorata nel post processing.

4.3 Procedura

Una volta che una zona sospetta della mucosa è stata identificata, vengono somministrati gli agenti di contrasto (fluoresceina e/o acriflavina), e un esame endomicroscopico confocale dell’area interessata si esegue posizionando la punta distale dell’endoscopio o la punta distale della sonda contro la mucosa. Un’aspirazione delicata può essere utilizzata per stabilizzare la macchina e minimizzare l’eccessivo movimento, che è importante per ridurre gli artefatti da movimento.

4.4 Interpretazione delle immagini

L’orientamento del piano di “taglio” confocale delle immagini istologiche in vivo è orizzontale mentre nei convenzionali campioni istologici è longitudinale. Nelle immagini CLE non è possibile visualizzare una panoramica simultanea della struttura mucosa e sottomucosa, a differenza istologia convenzionale.

Immagini CLE forniscono una visione completa dell’architettura mucosale consentono la differenziazione rapida tra mucosa normale, rigenerativa e neoplastica del tratto GI. La differenziazione con la CEM tra i gradi di neoplasia intra-epiteliale, tuttavia, non è ancora possibile con le tecniche di colorazione attualmente disponibili.

Per eseguire la CEM gli Endoscopisti devono possedere una buona conoscenza della microarchitettura normale e patologica del tratto GI. Durante il processo di apprendimento è raccomandato avere un patologo in loco o almeno una revisione delle immagini memorizzate da parte di un patologo e la correlazione con l’esame istologico su biopsia.

Alcuni studi della curva di apprendimento per CLE eseguita da endoscopisti dimostrano che è molto accurata, ed è efficiente nella previsione in vivo dell’esofago di Barrett che può essere raggiunta dopo circa 20-30 procedure CLE eseguite indipendentemente.

Aspetti normali e patologici delle immagini CLE del tratto GI superiore e inferiore sono riportati nelle Tabelle 2 e 3.

5. STUDIO CLINICO

5.1 SCOPO

L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di valutare la fattibilità e nel complesso l'affidabilità diagnostica della pCLE, in combinazione con videomosaicing, nel differenziare, in vivo, le forme neoplastiche (HGD e cancro) e non neoplastiche in pazienti con lesioni di Barrett. Scopo secondario è stato quello di valutare la qualità dell'immagine di pCLE e misurare la concordanza tra gli osservatori nella previsione istologica su criteri pCLE.

5.2 METODI

5.2.1 Pazienti

In questo studio prospettico monocentrico sono stati inclusi quei pazienti che mostravano in corso di un esame endoscopico di routine una lesione della mucosa esofagea di Barrett.

Criteri di esclusione sono stati i seguenti: età inferiore a 18 anni, gravidanza, anamnesi positiva per allergia e compromissione della funzione renale.

I pazienti eleggibili sono stati invitati a partecipare allo studio ed hanno sottoscritto uno specifico consenso informato.

5.2.2 Attrezzatura

Tutte le procedure sono state eseguite utilizzando il Cellvizio® Endomicroscopy System (Mauna Kea Technologies, Parigi, Francia). Questo sistema utilizza una sonda da 2,5 mm (GastroFlex UHD) che viene inserita attraverso il canale operativo dell'endoscopio per ottenere immagini dinamiche della mucosa.

I dati del pCLE sono stati raccolti ad una velocità di scansione di 12 fotogrammi al secondo con un campo di scansione di 30.000 pixel. Questo sistema ha un campo visivo di $240 \times 200 \mu\text{m}$, con una risoluzione laterale di $1 \mu\text{m}$.

I singoli fotogrammi video sono stati ricostruiti in una più grande immagine statica ($4 \times 2 \text{ mm}$) da un software speciale ("mosaicing"). Il risultato dei mosaici video ha permesso di ricombinare tutte le immagini in movimento, cancellare gli artefatti e ricostituire una panoramica dei tessuti.

5.2.3 Procedura

Un solo endoscopista esperto (GDDP), che aveva eseguito oltre 50 procedure CLE, ha eseguito tutti gli esami.

Una sedazione cosciente è stata ottenuta somministrando midazolam (5-10 mg i.v.) su richiesta del paziente. Le lesioni sono state identificate usando l'endoscopia a luce bianca.

Dopo l'ispezione dettagliata del segmento di Barrett, i siti da biopsiare sono stati "marcati" con argon plasma in quattro quadranti ogni 1-2 cm sulla base delle linee guida.

L'applicazione di argon plasma non ha influenzato negativamente l'istologia. Protocolli simili sono stati utilizzati da altri endoscopisti e, in questi, i segni dell'argon plasma non hanno avuto impatto sull'istologia.

Dopo la localizzazione di ogni lesione, è stato somministrato un bolo con 10 ml di fluoresceina sodica 10% per l'acquisizione delle immagini pCLE.

pCLE è stata utilizzata per visualizzare le aree premarcate con argon plasma e sono state eseguite registrazioni in tali sedi per 30s (12 fotogrammi/s). Dopo l'esame CLM sono stati

eseguiti campioni biotipici delle stesse zone e il corrispondente istologico è stato considerato il gold standard per l'interpretazione di neoplasia (HGD o EAC) vs no neoplasia.

5.2.4 *Principali misure di outcome*

Una diagnosi preliminare (la decisione se la lesione era o non neoplastica) è stata eseguita sulla base delle immagini in vivo (Videosequences) e poi, sulla base delle immagini mosaico, dall'endoscopista operatore (GDDP) secondo la Mainz Confocal Barrett's Classification (Tabella 3). La diagnosi pCLE è stata poi confrontata con la diagnosi finale istopatologica.

Il ricercatore principale (GDDP) ha classificato le immagini sulla base della qualità come buona (senza artefatti di movimento, l'architettura delle cripte ghiandolari, la parete dei vasi e le cellule del sangue possono essere identificate), media (artefatti presenti ma l'architettura delle cripte e l'architettura vascolare possono essere riconosciute) e scarsa (artefatti non consentono un giudizio dell'immagine).

Per valutare la concordanza tra gli osservatori, 40 delle immagini digitali memorizzate con il confocale e le immagini di mosaicatura di buona o media qualità (20 immagini che rappresentano le lesioni neoplastiche e 20 immagini che rappresentano lesioni non neoplastiche), selezionate casualmente dal database, sono state valutate off-line in cieco da altri 4 endoscopisti con un minimo di esperienza con pCLE.

La loro capacità di prevedere l'istologia su criteri pCLE (classificare ogni videosequenza e mosaico in neoplastica e non neoplastica) è stata confrontata con la diagnosi istopatologica utilizzata come gold standard.

5.3 ANALISI STATISTICA

La sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (NPV), e la precisione di pCLE sono stati calcolati con il 95% di intervallo di confidenza, utilizzando i risultati istologici come riferimento standard di diagnosi.

L'accordo tra gli osservatori è stato misurato in base al punteggio del kappa di Cohen³⁴. Il Kappa è stato calcolato per l'accordo tra gli osservatori per la previsione di mucosa neoplastica e non neoplastica. La forza di accordo è stata considerata come segue: 0.01-0.2 lieve, 0.21-0.4 sufficiente, 0.41-0.6 discreta, 0.61-0.8 notevole, e 0.81-1.0 quasi perfetta.

5.4 RISULTATI

Ventotto pazienti con esofago di Barrett sono stati arruolati durante il periodo di studio. 26 pazienti consecutivi (14 maschi, 12 femmine, età media 62,5anni) sono stati inclusi nello studio. Un paziente è stato escluso a causa della nota malattia allergica (asma) e uno per insufficienza renale (Tabella 4).

L'esame pCLE ha aggiunto 30-40 s per ogni sito esaminato. Il processo di video-mosaicing ha richiesto 4 minuti in media (range 2-7min).

Non ci sono state complicanze endoscopiche o reazioni avverse alla fluoresceina sodica, a parte una leggera colorazione giallastra della pelle, che di solito è scomparsa entro 30-60 min.

La lunghezza media delle lesioni esaminate è stata di 3 cm; sono stati esaminati 4 siti per paziente ed abbiamo ottenuto un totale di 104 acquisizioni di immagini e corrispondenti biopsie. In 20 pazienti (77%) abbiamo posto diagnosi di Esofago di Barrett, in 3 (11,5%) di carcinoma esofageo ed in altri 3 (11,5%) di epitelio esofageo normale.

La diagnosi istopatologica è stata in 19 pazienti di Esofago di Barrett (26 LGD e 7 HGD), in 1 di Carcinoma esofageo ed in 6 di epitelio normale.

Le sequenze video in tempo reale sono state ottenute in tutti i pazienti per un totale di 104 immagini mosaico. La qualità delle immagini CLE è stata classificata come buona in 88 casi

(84,9%) e come scarsa in 16 casi (15.1%), probabilmente a causa di artefatti di movimento e perdita di contrasto o a causa dell'escrezione della fluoresceina sodica. Per ogni lesione, almeno 2 immagini a mosaico sono state classificate come buone e adeguate per la valutazione.

5.4.1 Correlazione delle immagini pCLE con l'istopatologia.

20 su 23 (87 %) lesioni neoplastiche (19 BE e 1 CE) sono state diagnosticate correttamente con l'endomicroscopia (Tabella 5).

Due lesioni (7,7%), erroneamente diagnosticati come neoplastiche (1BE e 1 CE) con la pCLE, hanno mostrato epitelio iperplastico all'esame istologico. In un caso è stata posta un'erronea diagnosi di carcinoma con la pCLE che è risultata all'esame istologico un Barrett HGD (Figura 7). In tutti i tre pazienti cui era stata posta diagnosi di lesione non neoplastica alla CLE, questa è stata confermata all'esame istologico.

Per il rilevamento di tessuto neoplastico la pCLE ha mostrato una sensibilità del 100% (CI, 82,3-100%), una specificità del 84,6% (CI, 54,5-98,1%), una precisione di 92,3 (CI, 68,4-99,05%), un valore predittivo positivo PPV del 90,5% (CI, 69,6-98,8%); e un valore predittivo negativo NPV del 100% (CI, 71,5-100%).

5.4.2 Concordanza tra gli osservatori

Nel prevedere l'istologia su criteri pCLE (classificazione di ogni sequenza video e mosaico in carcinoma, Barrett o epitelio normale) si è ottenuto un elevato livello di accordo tra osservatori (valore medio kappa = 0,85). L'accordo tra gli osservatori è stato considerato quasi perfetto.

6. DISCUSSIONE

La costante evoluzione tecnologica dell'endoscopia ha consentito di passare da una semplice osservazione macroscopica delle lesioni ad una più approfondita analisi in vivo delle loro strutture. L'utilizzo di videoendoscopi elettronici ad alta risoluzione, magnificazione d'immagine o colorazioni della superficie mucosa ci consente già da alcuni anni di riconoscere l'architettura ghiandolare e la vascolarizzazione della mucosa normale e patologica. Raramente queste tecniche endoscopiche sono capaci di una diagnosi così specifica da non richiedere il campionamento biptico, che resta il punto cardine per la diagnosi delle patologie.

L'endomicroscopia confocale laser è una recente tecnica endoscopica che permette di ottenere delle immagini della mucosa con una magnificazione e risoluzione di circa 1000x, tale da consentire l'identificazione delle microstrutture cellulari e subcellulari delle aree esplorate, consentendo una diagnosi istologica *in vivo*. Queste caratteristiche rendono la microscopia confocale endoscopica utile nella diagnosi precoce di lesioni tumorali o displastiche, nell'ottimizzazione delle biopsie e del trattamento endoscopico. Il recente utilizzo di sonde molecolari fluorescenti rende l'endomicroscopia ancora più affascinante, poiché è al momento l'unica metodica che permette di valutare i meccanismi fisio-patologici *in vivo*.

Ad oggi sono stati condotti numerosi studi al fine di dimostrare la fattibilità della pCLE e la sua capacità di individuare in vivo lesioni preneoplastiche.

Meining et al.³⁵ hanno condotto uno studio monocentrico sulla fattibilità della pCLE nel rilevare lesioni maligne e pre-neoplastiche nel tratto gastrointestinale di 47 pazienti (34 con neoplasie). In questo studio i ricercatori hanno stimato che questa tecnica endoscopica aveva il 92% di precisione nella rilevazione delle neoplasie rispetto alla convenzionale istologia. Limite di questo studio era che un quinto delle sequenze pCLE non avevano una qualità sufficiente per consentire l'interpretazione dei risultati. Questo limite può essere spiegato col fatto che i ricercatori hanno utilizzato una sonda confocale con profondità di soli 10 micron (cosiddette sonde di superficie). Per quanto concerne il fluoroforo, il cristallo di violetto è stato utilizzato per via topica dopo mucolisi con N-acetilcisteina. Lo svantaggio di questo metodo è che il muco di superficie che rimane e il sanguinamento da contatto riducono la qualità dell'immagine³⁶. Questo problema può essere superato usando sonde confocali con profondità maggiore e coloranti iniettabili per via endovenosa come la fluoresceina sodica.

Kiesslich et al.³⁷, dopo l'iniezione di fluoresceina sodica hanno esaminato 63 pazienti con BE (15 con neoplasia) con pCLE. In un singolo centro e utilizzando endoscopisti esperti di pCLE hanno ottenuto una precisione sorprendentemente elevata, sia nella diagnosi di metaplasia di Barrett sia in quella di neoplasia esofagea (96,8% e 97,4% rispettivamente). Limite importante di questo lavoro è stato l'uso di un apposito endoscopio (Pentax, Ft. Wayne, NJ) e la colorazione con acriflavina un colorante topico potenzialmente cancerogeno. L'uso della fluoresceina sodica per la pCLE supera questo limite.

Uno studio monocentrico di Pohl et al.³⁸ ha valutato la capacità della pCLE di caratterizzare aree neoplastiche, aree con displasia di alto grado e neoplasie early in pazienti con BE. Hanno valutato 296 siti di biopsia da 38 pazienti. Carcinoma o displasia di alto grado è stata rilevata nel 6,4% delle biopsie. La precisione complessiva della pCLE per due osservatori diversi è stata 88% e 93%, con una sensibilità del 75% e 80%, una specificità del 89% e 94%, valore predittivo positivo del 44,4% e valore predittivo negativo di 98,8% con un ragionevole grado di accordo tra gli osservatori (kappa 0.6).

Sulla scorta di questi lavori, il nostro studio prospettico si è proposto di valutare la fattibilità e nel complesso la potenza diagnostica della pCLE, in combinazione con videomosaicing, nel differenziare le forme neoplastiche (HGD e cancro) e non neoplastiche in pazienti con lesioni di Barrett. Scopo secondario è stato quello di valutare la qualità dell'immagine di pCLE e misurare la concordanza tra gli osservatori nella previsione istologica su criteri pCLE. I

risultati ottenuti hanno dimostrato, per il rilevamento di tessuto neoplastico che la pCLE ha una sensibilità del 100% (CI, 82,3-100%), una specificità del 84,6% (CI, 54,5-98,1%), una precisione di 92,3 (CI, 68,4-99,05%), un valore predittivo positivo PPV del 90,5% (CI, 69,6-98,8%); e un valore predittivo negativo NPV del 100% (CI, 71,5-100%). Per quanto concerne la concordanza tra gli osservatori si è ottenuta un elevato livello di accordo (valore medio kappa = 0,85).

Limite del nostro studio è quello di essere uno studio monocentrico, condotto su un numero limitato di pazienti.

I risultati del nostro studio suggeriscono che la pCLE è potenzialmente una tecnica riproducibile ed accurata per la diagnosi di displasia e neoplasia nei pazienti affetti da BE.

Ovviamente i limiti da superare per la diffusione del suo impiego sono ancora diversi. Per acquisire dimestichezza nell'uso della sonda confocale e per la corretta interpretazione delle immagini acquisite è necessario eseguire un discreto numero di esami endoscopici; movimenti viscerali peristaltici o trasmessi da organi vicini e il notevole ingrandimento della visione possono generare artefatti; la profondità di esplorazione, limitata al massimo a 250 µm non consente di valutare l'infiltrazione neoplastica della sottomucosa; l'identificazione degli elementi strutturali è condizionata dalla necessità di usare un mezzo di contrasto; la fluoresceina sodica non permette di visualizzare i nuclei cellulari e pertanto la diagnosi di neoplasia e di displasia si basa sulla osservazione della disorganizzazione dell'architettura del tessuto e della sua vascolarizzazione.

Inoltre sussistono ancora limiti tecnici legati al tipo di strumentazione confocale utilizzata come lunghezza del segmento rigido terminale e scarso diametro del canale operativo per e-CLE e minore risoluzione e campo di esplorazione per p-CLE.

Tabella 1

Linee Guida per la valutazione e il follow-up dell'esofago di Barret

| | ACG | ASGE | AGA | BSG |
|---------------------|---|---|--|--|
| No Displasia | 2 esami dell'esofago con biopsie entro 1 anno e follow-up ogni 3 anni | 2 esami dell'esofago a 12 e 24 mesi con biopsie poi follow-up ogni 2-3 anni | EGDS con biopsie ogni 3-5 anni | EGDS ogni 2 anni |
| LGD | Primo controllo a 6 mesi, poi se viene confermata LGD EGDS ogni anno | EGDS con biopsie a 6 e 12 mesi. Se stabile poi EGDS con biopsie ogni anno | EGDS con biopsie a 6 e 12 mesi. | Terapia con IPP per 8-12 settimane poi se displasia basso grado EGDS ogni 6 mesi fino a ottenere biopsia negative altrimenti ogni 2 anni |
| HGD | Chirurgia o EGDS con biopsie ogni 3-6 mesi | Chirurgia o EGDS con biopsie ogni 3 mesi. | Chirurgia o EGDS con biopsie ogni 3 mesi | Paziente giovane ablazione chirurgica, paziente anziano ablazione endoscopica e follow-up ogni 6 mesi. |

ACG: American College of Gastroenterology; ASGE: American Society for Gastrointestinal Endoscopy; AGA: American Gastroenterological Association; BSG: British Society of Gastroenterology; LGD: Low-grade dysplasia; HGD: High-grade dysplasia.

Tabella 2

Criteria Confocali tra epitelio squamoso cellulare e carcinoma

| | Squamous cell epithelium | Squamous cell neoplasia |
|-------------------|--|---|
| Cellular criteria | Dark, homogeneous epithelial cells; regular architecture and clearly visible borders | Dark cells with different sizes; no clearly visible borders; irregular architecture |
| Vascularcriteria | Capillaries directed to luminal epithelium without leakage of fluorescein | Twisted and irregular vessels; elongated capillaries; capillary leakage |

Tabella 3

Endomicroscopia Laser Confocale: Classificazione dell'esofago di Barrett

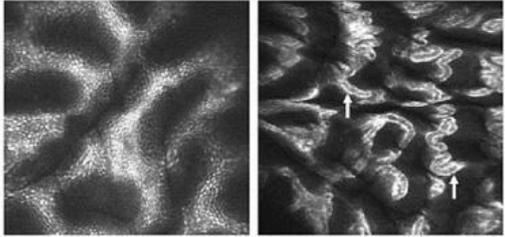
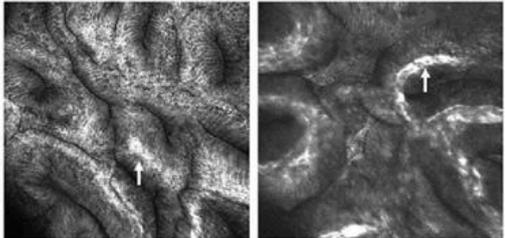
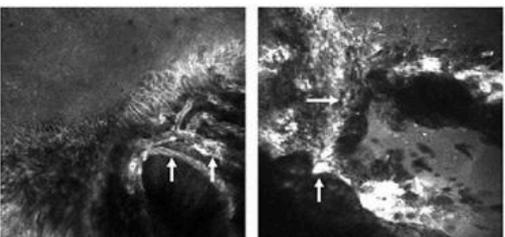
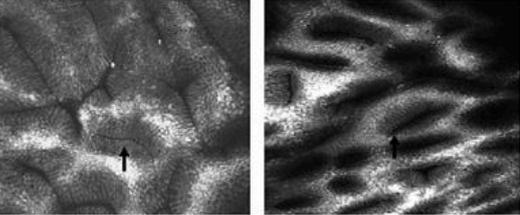
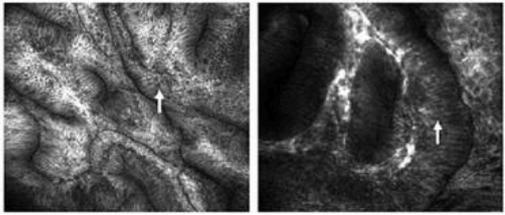
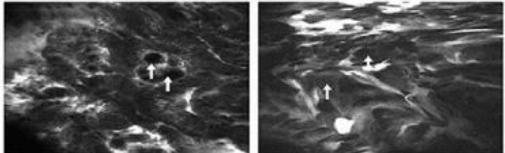
| Confocal diagnosis | Vessel architecture | Image Examples Upper and deeper parts of the mucosal layer |
|--------------------------------|--|--|
| Gastric type epithelium | Capillaries of regular shape only visible in deeper parts of the mucosal layer. |  |
| Barrett's epithelium | Subepithelial capillaries of regular shape beneath columnar lined epithelium visible in upper and deeper parts of the mucosal layer |  |
| Neoplasia | Irregular capillaries visible in upper and deeper parts of the mucosal layer. Leakage of vessels leads to a heterogeneous and brighter signal intensity within the lamina propria. |  |
| | Cell architecture | Image examples |
| Gastric type epithelium | Regular columnar lined epithelium with round glandular openings and typical cobble stone appearance |  |
| Barrett's epithelium | Columnar lined epithelium with in between dark mucin in goblet cells in upper parts of the mucosal layer. In deeper parts, villous like, dark shaped regular cylindrical Barrett's epithelial cells are present. |  |
| Neoplasia | Black cells with irregular apical and distal borders and shapes with high dark contrast to surrounded tissue |  |

Tabella 4

Caratteristiche dei pazienti inclusi nello studio

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Totale pazienti | 26 |
| Maschi/Femmine | 14/12 |
| Età media | 62,5 anni |
| Lunghezza media del Barrett | 3 cm |
| N° siti esaminati per paziente | 4 |
| Tempo medio pCLE | 3 min. |

Tabella 5

Concordanza diagnostica CLE ed istologia

| | pCLE | Istologia | χ^2 |
|---------------------|------|-----------|-----------------------------|
| Epitelio normale | 3 | 5 | 0.5 non significativo |
| Epitelio di Barrett | 20 | 20 | |
| Neoplasia | 3 | 1 | |

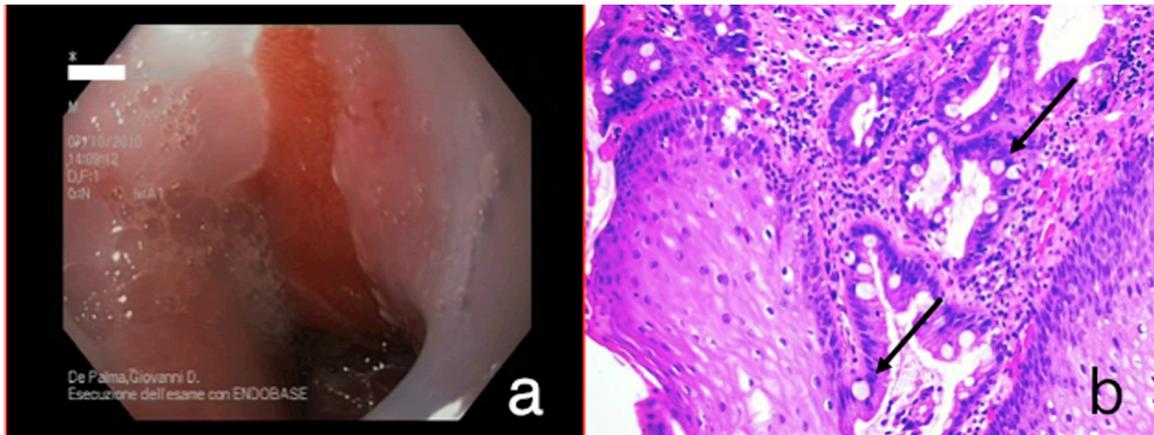


Figura 1

Immagine endoscopica e istologica di esofago di Barrett. **a**: visione endoscopica con colorazione rosa-salmone della mucosa al di sopra della giunzione gastro-esofagea; **b**: metaplasia intestinale con cellule caliciformi (freccie).

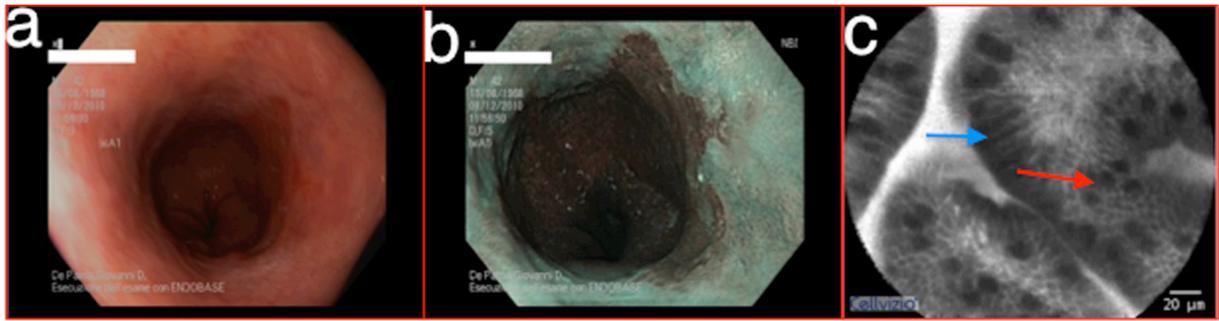


Figura 2

Immagine endoscopiche a luce bianca e magnificate di esofago di Barrett non displasico. **a:** Immagine e luce bianca; **b:** Immagine Narrow-band; **c:** Endomicroscopia Laser Confocale (pCLE) mostra un'architettura uniforme dei villi, cellule colonnari (freccia piena) e le cellule caliciformi scure (freccia tratteggiata) predittivi di esofago di Barrett non displasico.

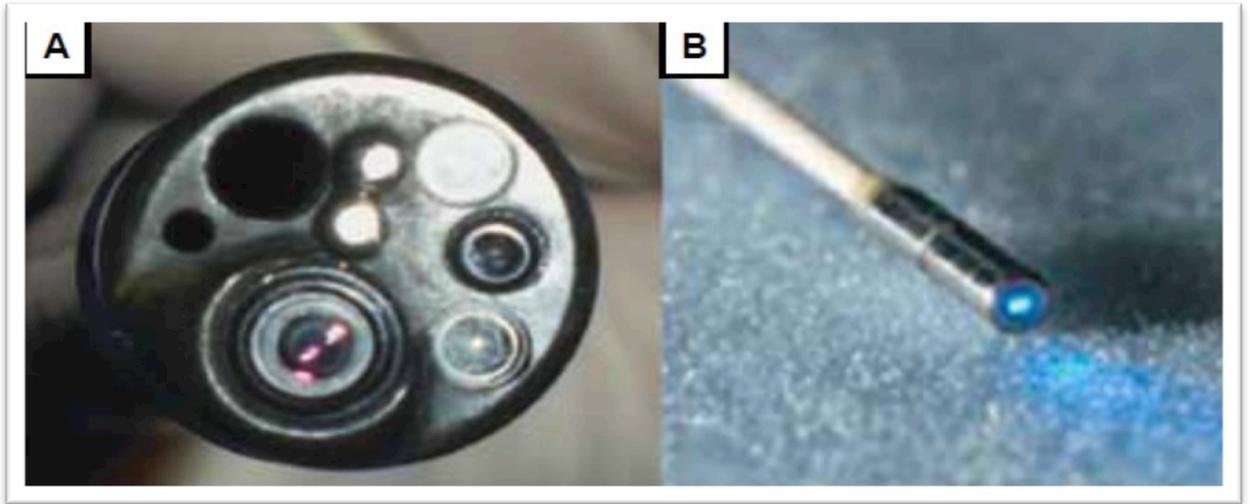


Figura 3

Endomicroscopia confocale – A) eCLE - B) pCLE

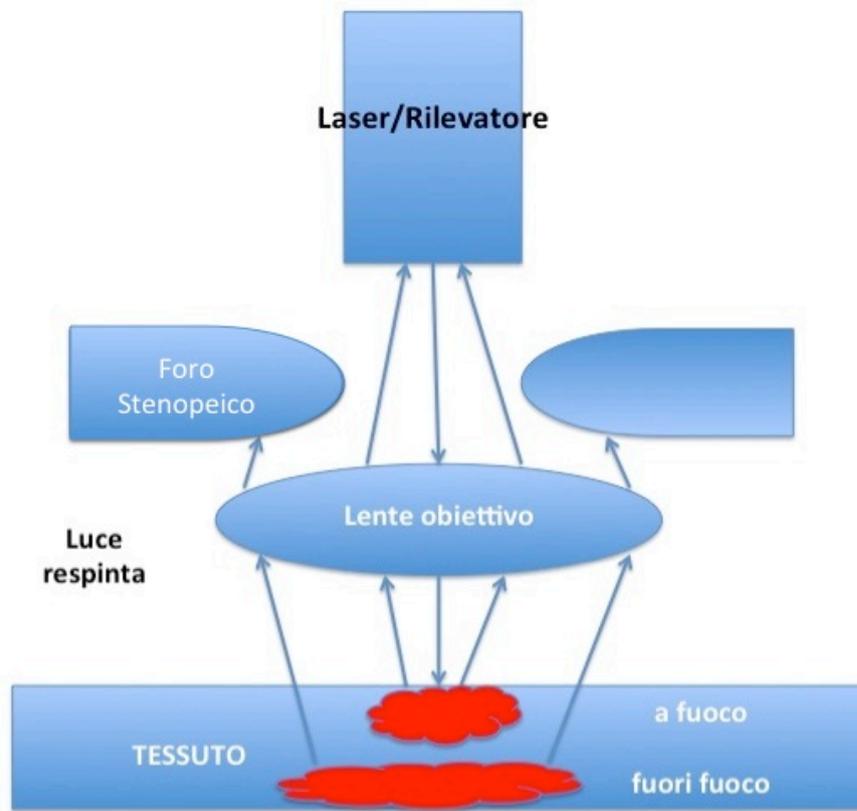


Figura 4

Schema del principio dell'endoscopia confocale

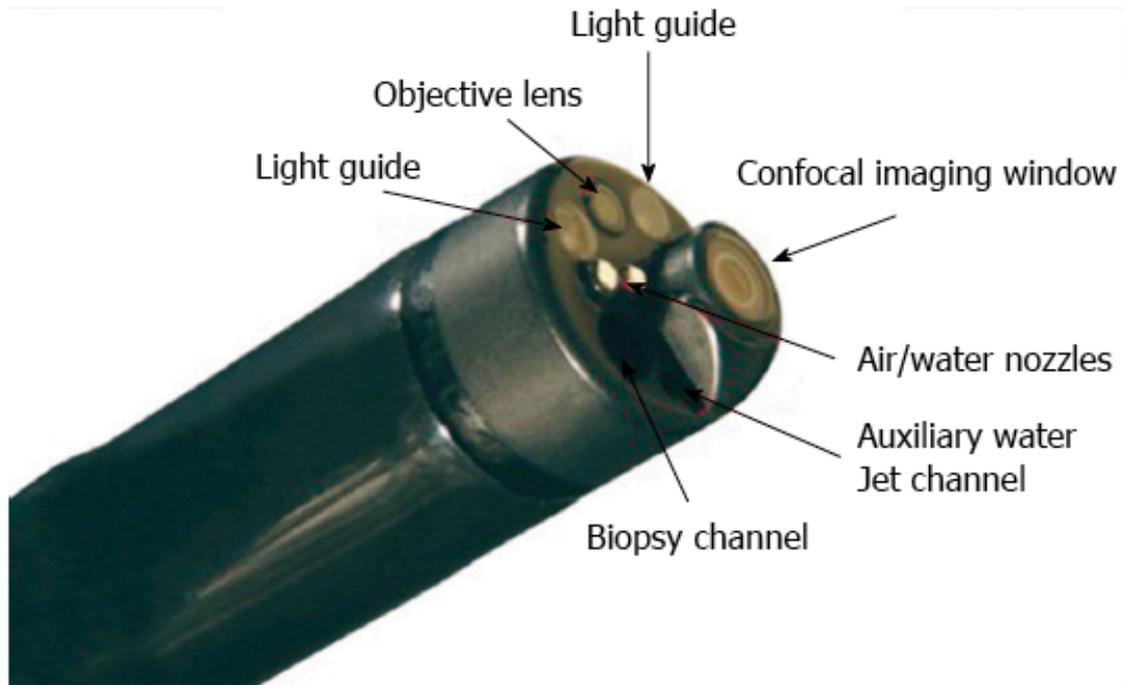


Figura 5
eCLE: punta distale

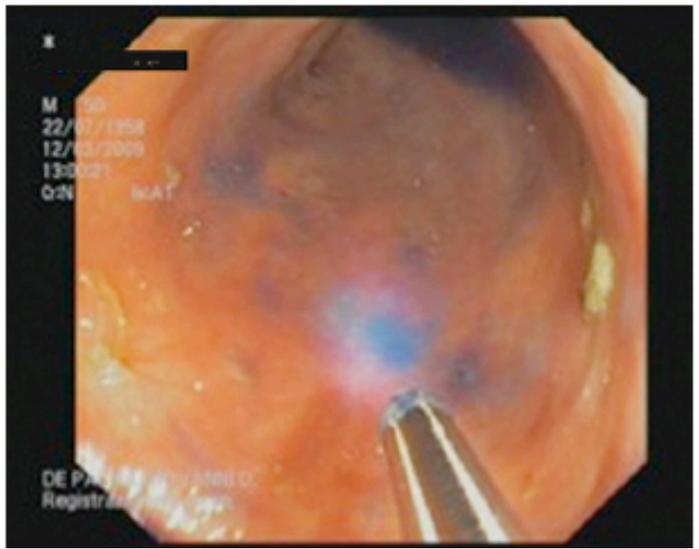


Figura 6
Sistema pCLE

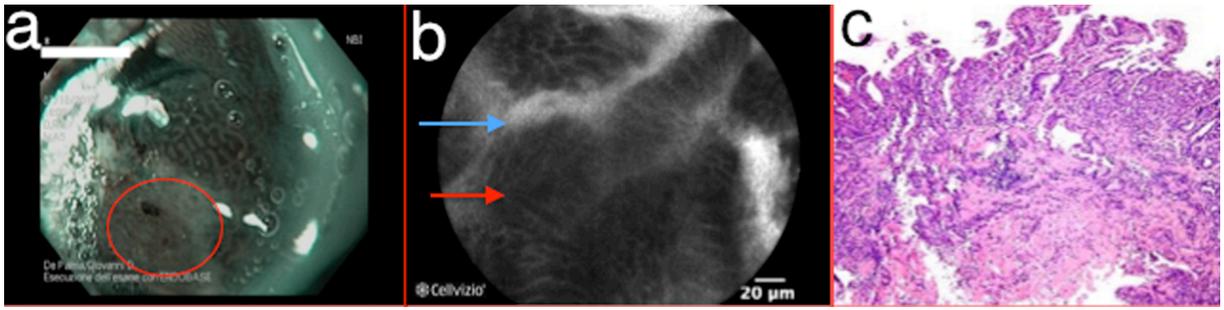


Figura 7

immagini di esofago di Barrett displasico. **a**: Immagine Narrow-band **b**: immagine pCLE mostra una struttura distorta dei villi e delle cripte, cellule colonnari scure (freccia blu) e vasi irregolari dilatati (freccia rossa), **c**: displasia di alto grado è stata trovata all'esame istologico dei campioni biotici effettuati a questo livello.

BIBLIOGRAFIA

1. **Sampliner RE.** Updated guidelines for the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 1888-1889
2. **Spechler SJ,** Sharma P, Souza RF, Inadomi JM, Shaheen NJ. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1084-109
3. **Vahabzadeh B,** Seetharam AB, Cook MB, Wani S, Rastogi A, Bansal A, Early DS, Sharma P. Validation of the Prague C & M criteria for the endoscopic grading of Barrett's esophagus by gastroenterology trainees: a multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2012; **75**: 236-241
4. **Wang KK,** Sampliner RE. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 788-797
5. **Sharma P,** McQuaid K, Dent J, Fennerty MB, Sampliner R, Spechler S, Cameron A, Corley D, Falk G, Goldblum J, Hunter J, Jankowski J, Lundell L, Reid B, Shaheen NJ, Sonnenberg A, Wang K, Weinstein W. A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: the AGA Chicago Workshop. *Gastroenterology* 2004; **127**: 310-330
6. **Hirota WK,** Zuckerman MJ, Adler DG, Davila RE, Egan J, Leighton JA, Qureshi WA, Rajan E, Fanelli R, Wheeler-Harbaugh J, Baron TH, Faigel DO. ASGE guideline: the role of endoscopy in the surveillance of premalignant conditions of the upper GI tract. *Gastrointest Endosc* 2006; **63**: 570-580
7. **Lagergren J,** Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; **340**: 825-831
8. **Moayyedi P,** Talley NJ. Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 2006; **367**: 2086-2100
9. **Conteduca V,** Sansonno D, Ingravallo G, Marangi S, Russi S, Lauletta G, Dammacco F. Barrett's esophagus and esophageal cancer: an overview. *Int J Oncol* 2012; **41**: 414-424
10. **Wiseman EF,** Ang YS. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2011; **17**: 3672-3683
11. **Wani S,** Falk GW, Post J, Yerian L, Hall M, Wang A, Gupta N, Gaddam S, Singh M, Singh V, Chuang KY, Boolchand V, Gavini H, Kuczynski J, Sud P, Bansal A, Rastogi A, Mathur SC, Young P, Cash B, Goldblum J, Lieberman DA, Sampliner RE, Sharma P. Risk factors for progression of low-grade dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1179-1186, 1186.e1
12. **Bobryshev YV,** Killingsworth MC, Lord RV. Structural alterations of the mucosa stroma in the Barrett's esophagus metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; **27**: 1498-1504
13. **Moyes LH,** Going JJ. Still waiting for predictive biomarkers in Barrett's esophagus. *J Clin Pathol* 2011; **64**: 742-750
14. **Chen H,** Fang Y, Tevebaugh W, Orlando RC, Shaheen NJ, Chen X. Molecular mechanisms of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 3405-3420
15. **Babar M,** Ryan AW, Anderson LA, Segurado R, Turner G, Murray LJ, Murphy SJ, Johnston BT, Comber H, Reynolds JV, McManus R. Genes of the Interleukin-18 Pathway Are Associated With Susceptibility to Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 1331-1341
16. **Bennett C,** Vakil N, Bergman J, Harrison R, Odze R, Vieth M, Sanders S, Gay L, Pech O, Longcroft-Wheaton G, Romero Y, Inadomi J, Tack J, Corley DA, Manner H, Green S, Al

Dulaimi D, Ali H, Allum B, Anderson M, Curtis H, Falk G, Fennerty MB, Fullarton G, Krishnadath K, Meltzer SJ, Armstrong D, Ganz R, Cengia G, Going JJ, Goldblum J, Gordon C, Grabsch H, Haigh C, Hongo M, Johnston D, Forbes-Young R, Kay E, Kaye P, Lerut T, Lovat LB, Lundell L, Mairs P, Shimoda T, Spechler S, Sontag S, Malfertheiner P, Murray I, Nanji M, Poller D, Ragnath K, Regula J, Cestari R, Shepherd N, Singh R, Stein HJ, Talley NJ, Galmiche JP, Tham TC, Watson P, Yerian L, Ruge M, Rice TW, Hart J, Gittens S, Hewin D, Hochberger J, Kahrilas P, Preston S, Sampliner R, Sharma P, Stuart R, Wang K, Waxman I, Abley C, Loft D, Penman I, Shaheen NJ, Chak A, Davies G, Dunn L, Falck-Ytter Y, DeCaestecker J, Bhandari P, Ell C, Griffin SM, Attwood S, Barr H, Allen J, Ferguson MK, Moayyedi P, Jankowski JA. Consensus statements for management of Barrett's dysplasia and early-stage esophageal adenocarcinoma, based on a Delphiprocess. *Gastroenterology*2012; **143**: 336-346

¹⁷ **Bhardwaj A**, McGarrity TJ, Stairs DB, Mani H. Barrett's Esophagus: Emerging Knowledge and Management Strategies. *Patholog Res Int*2012; **2012**: 814-146

¹⁸ **Chai NL**, Linghu EQ. Which is the optimal treatment for Barrett's esophagus with high grade dysplasia--ablation or complete endoscopic removal? *Endoscopy*2012; **44**: 218; author reply 219

¹⁹ **Konda VJ**, Waxman I. Endotherapy for Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*2012; **107**: 827-833

²⁰ **Fornari F**, Wagner R. Update on endoscopic diagnosis, management and surveillance strategies of esophageal diseases. *World J Gastrointest Endosc*2012; **4**: 117-122

²¹ **Chang JY**, Talley NJ, Locke GR, Katzka DA, Schleck CD, Zinsmeister AR, Dunagan KT, Wu TT, Wang KK, Prasad GA. Population screening for Barrett's esophagus: a prospective randomized pilot study. *Mayo Clin Proc*2011; **86**: 1174-1180

²² **Choi SE**, Hur C. Screening and surveillance for Barrett's esophagus: current issues and future directions. *Curr Opin Gastroenterol*2012; **28**: 377-381

²³ **Akiyama T**, Yoneda M, Maeda S, Nakajima A, Koyama S, Inamori M. Visceral obesity and the risk of Barrett's esophagus. *Digestion*2011; **83**: 142-145

²⁴ **Abrams JA**, Kapel RC, Lindberg GM, Saboorian MH, Genta RM, Neugut AI, Lightdale CJ. Adherence to biopsy guidelines for Barrett's esophagus surveillance in the community setting in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*2009; **7**: 736-742; quiz 710

²⁵ **Shahid MW**, Wallace MB. Endoscopic imaging for the detection of esophageal dysplasia and carcinoma. *Gastrointest Endosc Clin N Am*2010; **20**: 11-24, v

²⁶ **Kara MA**, Peters FP, Rosmolen WD, Krishnadath KK, ten Kate FJ, Fockens P, Bergman JJ. High-resolution endoscopy plus chromoendoscopy or narrow-band imaging in Barrett's esophagus: a prospective

²⁷ **Singh R**, Nordeen N, Shanmuganathan G, Thurairajah PH, Bhat YM. Role of narrow band imaging in Barrett's esophagus. *Dig Endosc*2011; **23**Suppl 1: 83-85

²⁸ **Sharma P**, Hawes RH, Bansal A, Gupta N, Curvers W, Rastogi A, Singh M, Hall M, Mathur SC, Wani SB, Hoffman B, Gaddam S, Fockens P, Bergman JJ. Standard endoscopy with random biopsies versus narrow band imaging targeted biopsies in Barrett's esophagus: a prospective, international, randomised controlled trial. *Gut*2012 Feb 7 [Epub ahead of print]

²⁹ **De Palma GD**. Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*2009; **15**: 5770-5775

³⁰ **Kantsevov SV**, Adler DG, Conway JD, Diehl DL, Farraye FA, Kaul V, Kethu SR, Kwon RS, Mamula P, Rodriguez SA, Tierney WM. Confocal laser endomicroscopy.

GastrointestEndosc 2009;70:197-200

³¹ **Venkatesh K**, Cohen M, Evans C, Delaney P, Thomas S, Taylor C, Abou-Taleb A, Kiesslich R, Thomson M. Feasibility of confocal endomicroscopy in the diagnosis of pediatric gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 2214-2219

³² **Becker V**, von Delius S, Bajbouj M, Karagianni A, Schmid RM, Meining A. Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy: evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-to-imaging time. *GastrointestEndosc* 2008; **68**: 319-323

³³ **Wallace MB**, Meining A, Canto MI et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 548-552.

³⁴ **Cohen J. A** coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; **20**: 37-46

³⁵ **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. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007; **5**: 1261-7

³⁶ **Becker V**, Vercauteren T, von Weyhern CH, et al. High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video). *GastrointestEndosc*. 2007; **66**: 1001-7

³⁷ **Kiesslich R**, Gossner L, Goetz M, et al. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; **4**: 979-87.

³⁸ **Pohl H**, Rösch T, Vieth M, et al. Miniprobe confocal laser microscopy for the detection of invisible neoplasia in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*. 2008; **57**: 1648-53.