

LUCRĂRI ORIGINALE

Rolul endoscopiei ultrasonografice cu puncție fină aspirativă transesofagiană și examen imunocitochimic în evaluarea pacienților cu suspiciune de cancer bronhopulmonar și biopsii bronșice negative

Ana Maria Ionică^{1,2}, Carmen Popescu³, Anca Malos⁴, Lucian Ionică², Monalisa Filip¹, Sevastița Iordache¹,
Larisa Săndulescu¹, Dan Ionuț Gheonea¹, Tudorel Ciurea¹, Daniela Neagoe¹, Adrian Săftoiu¹

¹ Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie Craiova,
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

² Clinica Pneumologie, Spitalul de Boli Infecțioase „Victor Babeș”, Craiova

³ Laboratorul de Citologie și Anatomie Patologică, Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova

⁴ Clinica Anestezie-Terapie Intensivă, Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova,
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova, România

REZUMAT

Introducere: Endoscopia ultrasonografică (EUS) însoțită de puncție fină aspirativă transesofagiană (EUS-FNA) permite examinarea mediastinului posterior, respectiv diagnosticul și stadializarea pacienților cu neoplasm bronhopulmonar. Scopul acestui studiu de fezabilitate a fost de a evalua utilitatea puncției fine aspirative transesofagiene ghidate ecoendoscopic asociată cu examen citologic și imunocitochimic, la pacienți cu suspiciune de cancer bronhopulmonar și biopsii negative prelevate prin bronhoscopie.

Material și metode: Studiul a inclus un număr de 20 de pacienți, evaluați consecutiv în Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie al Universității de Medicină și Farmacie din Craiova. Pacienții au fost examinați inițial prin radiografie toracică, computer tomografie și bronhoscopie, fără confirmare diagnostică tisulară de malignitate.

Rezultate și discuții: Din cei 20 de pacienți cu biopsii bronhoscopice negative pentru malignitate, la 16 pacienți, diagnosticul citopatologic a fost pozitiv pe frotiurile obținute prin EUS-FNA. La 11 pacienți s-a obținut material celular din adenopatii mediastinale, iar la 4 cazuri, direct din tumora mediastinală, o parte din material fiind inclus la parafină și obținându-se blocuri celulare. Pe secțiunile obținute din blocurile celulare s-a efectuat examen imunocitochimic în două scopuri: pentru stabilirea fenotipului epitelial sau mezenchimal al celulelor maligne, respectiv pentru stabilirea apartenenței la un anumit organ a celulelor atipice identificate.

Concluzii: Ecoendoscopia cu puncție fină aspirativă, însoțită obligatoriu de examen citopatologic, este o metodă sigură, minim-invazivă și cu acuratețe ridicată în evaluarea cancerului bronho-pulmonar, prin demonstrarea invaziei tumorale sau a ganglionilor limfatici, precum și alternativa ideală pentru stadializarea chirurgicală. Asocierea examenului imunocitochimic permite creșterea acurateței metodei și confirmarea diagnosticului tisular de malignitate.

Cuvinte cheie: endoscopia ultrasonografică, puncție transesofagiană, cancer pulmonar

ABSTRACT

The role of endoscopic ultrasound – guided transesophageal fine needle aspiration and immunocytochemistry assesment of the patients with suspected lung cancer and negative bronchoscopic biopsies

Introduction: Endoscopic ultrasound (EUS) guided fine needle aspiration (FNA) allows the assessment of the posterior mediastinum, as well as the diagnosis and staging of lung cancer patients. The purpose of this feasibility study was to assess the importance of EUS-FNA combined with cytology and immunocytochemistry for patients with suspected lung cancer and negative bronchoscopic biopsies.

Material and methods: Our study included 20 consecutive patients assessed at the Research Center of Gastroenterology and Hepatology Craiova, University of Medicine and Pharmacy Craiova. The patients were initially examined by chest X-ray, computer tomography scans and bronchoscopy, without a tissue confirmation of malignancy.

Results and discussion: Of the 20 patients included in our study without a tissue confirmation of malignancy, 16 patients had a positive EUS-FNA for malignancy. For 11 patients the samples were obtained from the mediastinal lymphnodes, and for 4 cases directly from the primary mediastinal tumor, some of the obtained samples being included in paraffin to obtain cell blocks. The cell blocks allowed us to accomplish imunocytochemistry for two purposes: to establish the epithelial and mesenchimal fenotype of the malignant cells, as well as the origin of the identified atypical cells.

Conclusions: EUS-FNA combined with cytology, is an excellent minimal invasive technique, highly accurate for the assessment of lung cancer, showing not only the tumoral and lymph node invasion, but also offering the ideal alternative for surgical staging. Association of immunocytochemistry determined an increase in the accuracy of the method, as well as the confirmation of a tissue diagnosis of malignancy.

Key words: endoscopic ultrasound, transesophageal fine needle aspiration, pulmonary cancer

Introducere

Cancerul bronho-pulmonar este cea mai frecventă cauză de deces prin cancer în SUA și Europa de Vest, afectând cu preponderență bărbații. Aproximativ 50% din cazuri sunt depistate în stadii inoperabile, iar prognosticul este extrem de sever, rata supraviețuirii la 5 ani fiind de 5%¹⁻³. Diagnosticul pozitiv și stadializarea corectă a pacienților sunt dificile, numeroase metode de diagnostic fiind propuse până în prezent: bronhoscopia, tomografia computerizată, tomografia cu emisie de pozitroni, mediastinoscopia sau toracoscopia, fiecare din aceste metode fiind limitată.

Endoscopia ultrasonografică (EUS) este o metodă de explorare a organelor tractului digestiv (esofag, stomac, duoden, colon și rect), dar și a organelor învecinate (mediastin, pancreas, căi biliare, suprarenale etc.) extinzând semnificativ posibilitățile de diagnostic precoce, stadializare precisă sau terapie minim-invazivă. Introducerea puncției fine aspirative ghidate ecoendoscopic a determinat creșterea posibilităților diagnostice ale ecoendoscopiei prin obținerea unui diagnostic de certitudine (prin examen citologic sau microhistologic).

Ecoendoscopia permite examinarea mediastinului posterior (regiune subcarinală, spațiul periaortic, recesul periazygos, fereastra aorto-pulmonară), cu diagnosticarea și stadializarea pacienților cu neoplasm bronhopulmonar, deoarece confirmă prezența invaziei tumorale mediastinale (T4) sau a metastazelor ganglionare mediastinale (N2, N3). Pacienții cu tumori cu posibilă invazie mediastinală (T4) evidențiată CT sau RM, pot fi evaluați prin puncție fină aspirativă care confirmă diagnosticul de incurabilitate (stadiul IIIB) și implicit imposibilitatea rezecției chirurgicale. Pacienții cu invazia limfoganglionilor ipsilaterali mediastinali sau subcarinali (N2), respectiv contralaterali mediastinali (N3), sunt încadrați în stadiul IIIA și beneficiază de radio- și chimioterapie.

Scopul acestui studiu de fezabilitate a fost de a evalua utilitatea puncției fine aspirative transesofagiene ghidate ecoendoscopic asociată cu examen citologic și imunocitochimic, la pacienți selecționați, cu suspiciune de cancer bronhopulmonar și biopsii negative prelevate prin endoscopie bronșică (bronhoscopia).

Material și metode

Studiul a inclus un număr de 20 de pacienți, evaluați consecutiv în Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie al Universității de Medicină și Farmacie din Craiova. Pacienții au fost explorați anterior prin radiografie toracică, tomografie computerizată și endoscopie bronșică, biopsiile prelevate prin endoscopie bronșică fiind neconcludente pentru stabilirea diagnosticului de malignitate.

Ecoendoscopia s-a realizat cu un ecoendoscop liniar (Olympus GF UCT-140-AL5, Hamburg, Germany) ce permi-

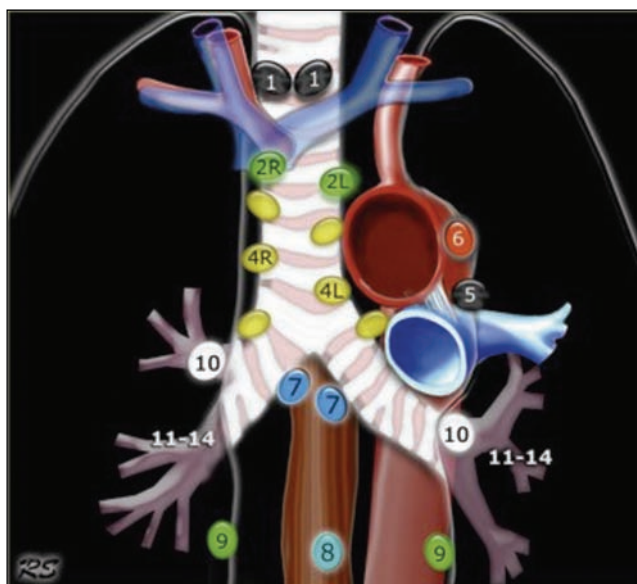
te vizualizarea unor imagini sectoriale, orientate în axul lung al ecoendoscopului. Puncția fină aspirativă ghidată ecoendoscopic s-a efectuat cu ace de 22G de unică folosință (Olympus NA-200H, Hamburg, Germany) (Figura 1)⁴. S-a vizualizat aria

Figura 1.
Aspectul acului de puncție fină aspirativă



de interes: tumora mediastinală primară sau stațiile ganglionare 2 și 4 (paratraheale), 4L (fereastra aorto-pulmonară) și 7 (spațiul subtraheal) (Figura 2).

Figura 2.
Stațiile ganglionare mediastinale (adaptată după ⁴)



S-a folosit modul Doppler color pentru evitarea vascularizației și s-a înaintat cu acul sub control ecoendoscopic direct, până în centrul leziunii explorate. S-a extras apoi stiletul central din ac și s-a atașat o seringă cu care s-a aspirat material celular pentru diagnostic citologic. La cei 20 de pacienți incluși în studiu, s-a efectuat puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) pentru confirmarea diagnosticului de malignitate, aceasta efectuându-se în 4 cazuri la nivelul stației ganglionare 4L (fereastra aorto-pulmonară), în 7 cazuri la nivelul stației ganglionare 7 (spațiul subtraheal) și în 4 cazuri direct la nivelul tumorii mediastinale primare. La un singur pacient nu s-a putut efectua EUS-FNA datorită imposibilității găsirii unui traiect care să nu traverseze vasele mari (aorta, artera pulmonară), diagnosticul fiind confirmat prin puncția ghidată ecoendoscopic a glandei suprarenale stângi. La alți 4 pacienți puncția ghidată ecoendoscopic a fost negativă, diagnosticul fiind confirmat prin puncție ghidată ecoendoscopic cu ac histologic de tip Trucut de 19 G (Quick-core EUSN-19-QC, Wilson-Cook, Ireland).

Materialul obținut prin EUS-FNA a fost ulterior etalat pe lame de sticlă realizându-se frotiuri pentru efectuarea examenului citologic. La fiecare caz în parte s-au obținut minim 6 frotiuri din care 3 frotiuri au fost fixate în alcool pentru colorația Papanicolaou și 3 frotiuri au fost fixate prin uscare pentru colorația May-Grünwald-Giemsa. Materialul restant din ac a fost spălat și colectat în alcool, urmând ca apoi să fie prelucrat în Laboratorul de Citologie pentru includerea la parafină cu obținerea blocurilor celulare. Pentru diagnosticul citologic pe frotiuri, am utilizat următoarele clase de diagnostic: frotiu neconcludent, frotiu benign, frotiu atipic probabil benign, frotiu atipic probabil malign și frotiu malign. Din blocurile celulare s-au efectuat secțiuni fine de 3 microni care au fost etalate pe lame de sticlă pretratate cu polilizină, pentru examenul imunocitochimic.

Examenul imunocitochimic a fost efectuat pentru toți pacienții în vederea confirmării originii pulmonare a celulelor tumorale extrase prin puncție fină aspirativă, folosindu-se metoda complexului avidină-biotină-Horse-Radish-Peroxidase (A.B.C.-H.R.P.). S-au utilizat următorii anticorpi: anti-antigenul

carcinoembrionar (CEA), clona II-7, diluție 1:50; anti-citokeratina 7 (CK 7), clona OV-TL 12/30, diluție 1:100; anti-citokeratina 20 (CK 20), clona Ks20.8, diluție 1:25; anti-factorul de transcripție tiroidian (TTF-1), clona 8G7G3/11, diluție 1:100.

Rezultate

Din totalul de 20 de pacienți cu biopsii bronhoscopice negative pentru malignitate, s-a efectuat puncție fină aspirativă ghidată endoscopic în 4 cazuri direct la nivelul tumorii mediastinale primare (Figura 3a, 3b), respectiv în 4 cazuri la nivelul stației ganglionare 4L (fereastra aorto-pulmonară) și în 7 cazuri la nivelul stației ganglionare 7 (spațiul subtraheal) (Figura 4a, 4b). La un pacient nu s-a putut efectua puncția ghidată ecoendoscopic datorită imposibilității găsirii unui traiect care să nu traverseze vasele mari, dar diagnosticul a fost confirmat prin puncția fină a glandei suprarenale stângi (Figura 5a, 5b). La alți 4 pacienți puncția fină aspirativă ghidată ecoendoscopic a fost negativă, diagnosticul fiind confirmat prin puncție ghidată ecoendoscopic cu ac histologic de tip Trucut (Figura 6).

Diagnosticul citopatologic a fost pozitiv pentru malignitate pe frotiurile obținute prin EUS-FNA la 15 pacienți (Tabel I). Astfel, la 11 pacienți s-a obținut material celular din adenopatii mediastinale, iar pe frotiuri au fost evidențiate frecvente limfocite mici (care au atestat o structură ganglionară normală) și frecvente placcarde de celule mari cu atipii nucleare moderate în 4 cazuri (Figura 7) și severe în 7 cazuri (Figura 8), cu nuclei mari, inegali, pleomorfi (polilobați), cu vacuolizări intranucleare și anizocariocromie. La 4 cazuri, puncția a fost efectuată direct în tumora mediastinală, iar pe frotiuri a fost obținută celularitate abundentă constituită din frecvente placcarde de celule cu caractere certe de malignitate: nuclei pleomorfi, cu anizocarii severe, tahicromatici, cu anizocariocromie și overlapping nuclear (Figura 9). La cele 4 cazuri de tumori mediastinale la care EUS-FNA a fost pozitivă pentru malignitate, o parte din materialul celular a fost inclus la parafină obținându-se blocuri celulare (Figura 10). Pe secțiunile obținute atât din blocurile celulare, cât și din produsele de puncție-biopsie incluse la parafină (4 cazuri) s-a efectuat în

Figura 3a.

Aspect ecoendoscopic de tumoră mediastinală primară cu aspect hipocogen, neomogen, cu aer periferic cu ecouri hiperecogene și semnal power Doppler în interior.



Figura 3b.

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la un pacient cu tumoră mediastinală hipocogenă, neomogenă, cu ecouri aerice în periferie.

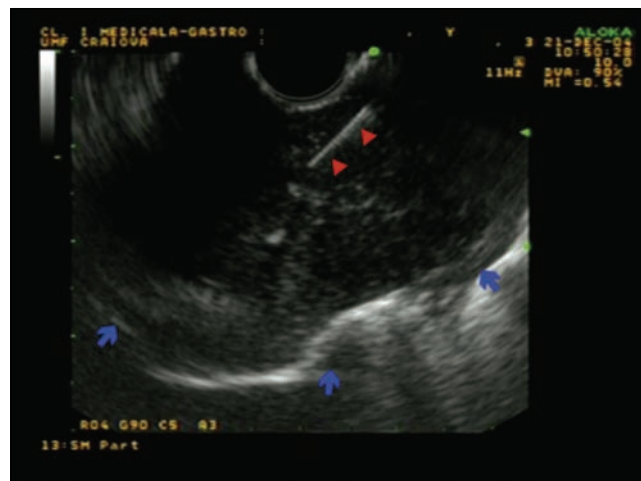


Figura 4a.

Aspect ecoendoscopic de ganglion mediastinal periesofagian, hipocogen, neomogen, triunghiular, cu semnal power Doppler în interior la nivelul hilului (aspect posibil sugestiv de benigneitate).

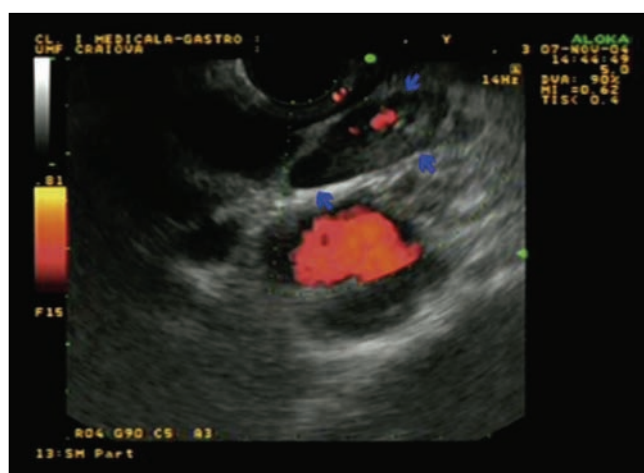


Figura 4b.

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul stației ganglionare 7 (spațiul subcarinal).



Figura 5a.

Glanda suprarenală stângă, cu aspect nodular sugestiv de determinare secundară.



Figura 5b.

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul glandei suprarenale stângi.



Figura 6.

Tumora mediastinală primară cu aspect hipocogen, neomogen, cu aer periferic cu ecouri hiperecogene, la nivelul căreia s-a efectuat puncție ghidată ecoendoscopic cu ac histologic de tip Trucut (Quick-core).

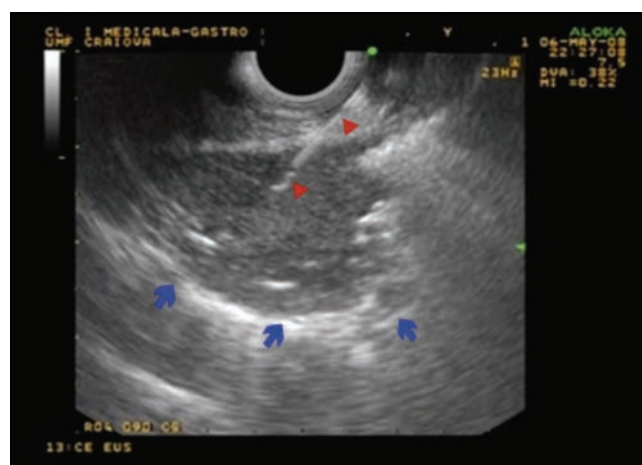
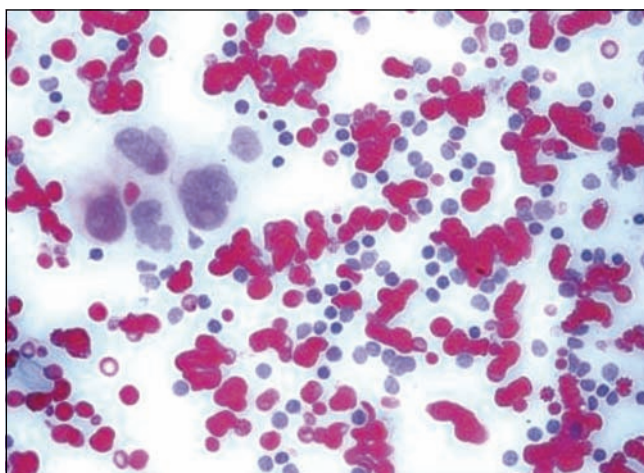
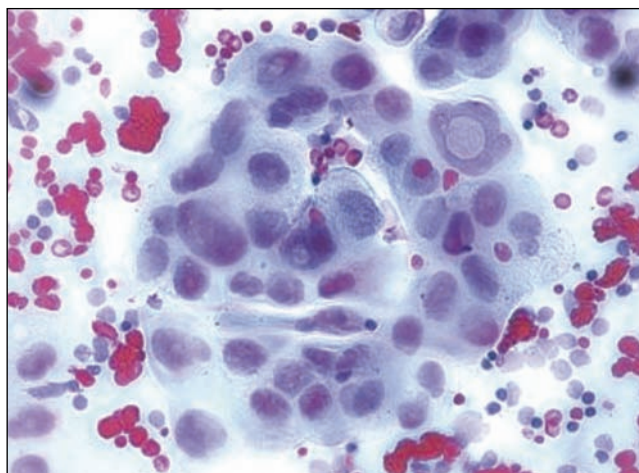


Figura 7.

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul unei adenopatii mediastinale (frotiu pozitiv). Celule cu atipii moderate, col. Papanicolaou, 200x.

**Figura 8.**

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul unei adenopatii mediastinale (frotiu pozitiv). Placard de celule epiteliale maligne cu atipii severe, col. Papanicolaou, 200x.



primul rând evaluarea histopatologică clasică pentru identificarea tipului de carcinom, iar ulterior s-a efectuat examenul imunocitochimic în două scopuri: în primul rând pentru stabilirea fenotipului epitelial sau mezenchimal al celulelor maligne și în al doilea rând pentru stabilirea apartenenței la un anumit organ a celulelor atipice identificate (originea tumorii). În aceste 8 cazuri materialul obținut prin puncție a fost destul de redus pentru a putea stabili cu certitudine tipul histopatologic și de aceea s-a efectuat complementar examenul imunohistochimic.

Astfel, în 5 cazuri imunomarcajul celulelor tumorale a fost intens pozitiv difuz pentru citokeratina 7 (CK 7) și slab pozitiv focal pentru citokeratinele AE1 / AE3, ceea ce a certificat natura epitelială a tumorii. De asemenea, în aceste cazuri imunoreacția pozitivă citoplasmatică pentru CEA și nucleară

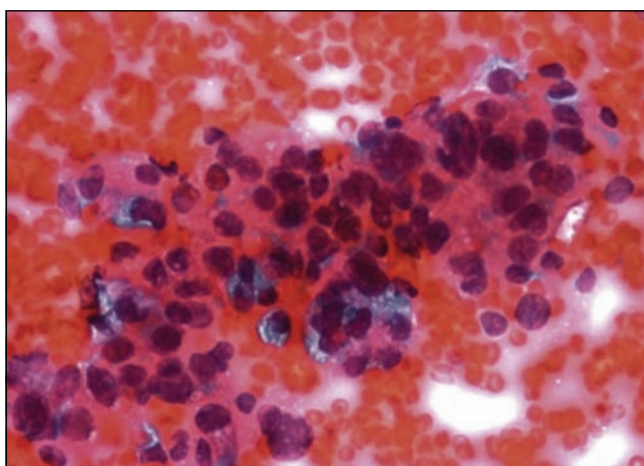
intens pozitivă difuz pentru factorul de transcripție tiroidian (TTF-1) a certificat tipul histopatologic de adenocarcinom și originea pulmonară a celulelor tumorale maligne (Figura 11). În celelalte 3 cazuri, celulele tumorale au fost pozitive difuz pentru citokeratinele AE1/AE3 (Figura 12), imunoreacția a fost negativă pentru CK 7 și CEA, iar TTF-1 a fost pozitiv focal în rare celule tumorale; aceste aspect au certificat tipul scuamos de carcinom cu origine pulmonară. Citokeratina 20 a fost negativă în toate aceste cazuri (Tabelul I).

Discuții

Ecoendoscopia are un rol important în afecțiunile mediastinale, în care diagnosticul pozitiv și diferențial este dificil datorită localizării anatomice profunde, cu organe vitale în vecinătate (cord, aortă etc.) și cu dificultăți majore de acces

Figura 9.

Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul unei tumori mediastinale (frotiu pozitiv). Frotiu pozitiv pentru malignitate, cu multipli nuclei hiperchromi, tahicromatici, cu anizocariocromie și overlapping nuclear.

**Figura 10.**

Bloc celular obținut după puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul tumorii pulmonare, col. H-E, 100x.

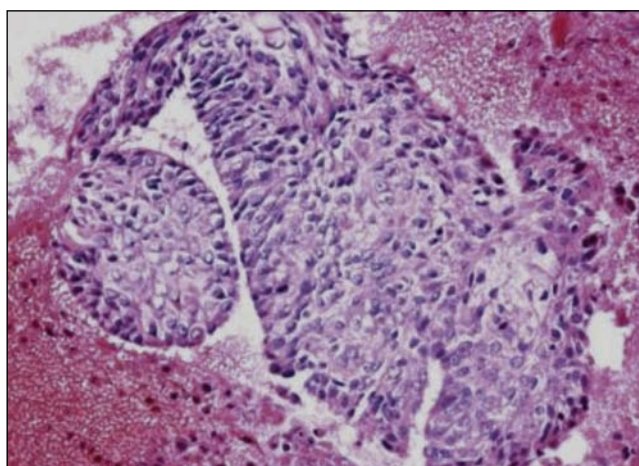
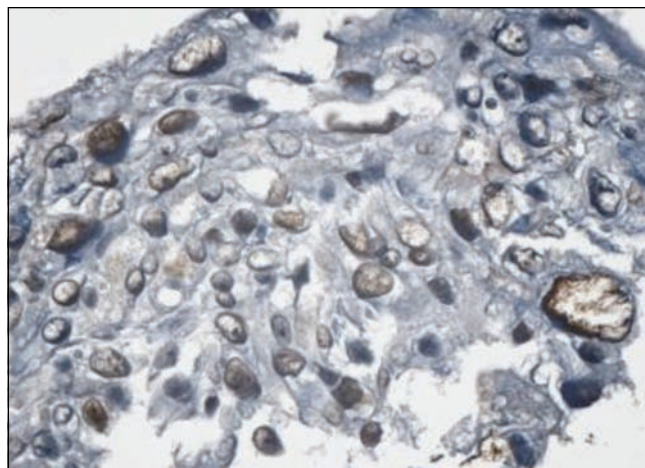
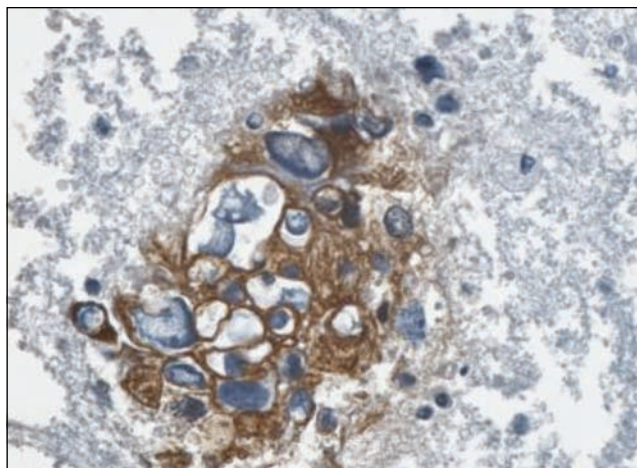


Figura 11.

Bloc celular obținut după puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) la nivelul tumorii pulmonare. Imunomarcaj pozitiv pentru TTF 1, tehnica LSAB, 200x.

**Figura 12.**

Bloc celular – Carcinom scuamos - imunomarcaj pozitiv citoplasmatic pentru citokeratinele AE1/AE3, tehnica LSAB, 200x.



tisular^{5,6}. Deși ecoendoscopia are sensibilitate mare în detectarea cancerului bronho-pulmonar, asocierea puncției fine aspirative transesofagiene crește specificitatea și implicit acuratețea, devenind recent o metodă sigură și precisă de stabilire a diagnosticului, dacă metodele bronhoscopice nu dau rezultate⁷. Există două alte metode de obținere a biopsiilor de la nivelul tumorii primare sau ganglionilor limfatici: mediastinoscopia și toracoscopia, acestea fiind însă obligatoriu realizate în sala de operație, implicit cu mortalitate și morbiditate crescute.

Ecoendoscopia permite astfel diagnosticul pozitiv al tumorilor vizualizate inițial prin radiografie toracică, endos-

copie digestivă superioară, CT sau RM, însă cu rezultate negative la examinările bioptice: bronhoscopie cu biopsie transbronșică, biopsie transtoracică ghidată ecografic sau computer tomografic, mediastinoscopie sau chiar biopsii endoscopice uzuale⁶. Datele publicate recent arată că aproximativ 30% din pacienții cu cancer bronhopulmonar au biopsii bronșice negative⁸. Tumorile maligne includ tumori mediastinale primare (limfoame, timoame, mezoteliome, teratoame), cancer bronhopulmonar, metastaze ale altor tumori primare (cancer de sân, laringian, esofagian, colonic, renal, testicular etc.) sau metastaze cu punct de plecare neprecizat. În majoritatea cazurilor este posibilă diferențierea dintre carcinoamele cu celu-

Tabel I.

Distribuția pacienților cu puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA) și respectiv puncție biopsie cu ac de tip Trucut.

METODA DE INVESTIGAȚIE	REZULTAT CITOLOGIC (CITODIAGNOSTIC)			REZULTAT HISTOPATOLOGIC					
				BLOCURI CELULARE			PRODUS DE PUNCȚIE BIOPSIE		
	NR. CAZURI	FROTIU MALIGN	FROTIU NECONCLUDENT PENTRU MALIGNITATE	NR. CAZURI	ADK *	CARCINOM SCUAMOS	NR. CAZURI	ADK *	CARCINOM SCUAMOS
Puncție fină aspirativă ghidată ecoendoscopic (EUS-FNA)	16	15	1	4**	3	1	-	-	-
Puncție biopsie ghidată ecoendoscopic cu ac Trucut	-	-	-	-	-	-	4	2	2

Legenda:

* Adenocarcinom;

** Cele 4 cazuri sunt incluse în cele 15 la care s-a efectuat EUS-FNA, iar materialul obținut a fost suficient atât pentru efectuarea frotiurilor cât și pentru realizarea blocurilor celulare.

le mici sau epidermoide, carcinoamele scuamoase sau adenocarcinoame. Acuratețea puncției fine aspirative ghidate ecoendoscopic pentru diagnosticul cancerului bronhopulmonar, este de peste 95% în majoritatea studiilor publicate⁹⁻¹³. Impactul clinic major al efectuării puncției biopsii cu ac fin aspirativ ghidată ecoendoscopic a impus această metodă pentru explorarea tumorilor mediastinale, deoarece evită toracotomia / toracosopia, respectiv mediastinosopia la peste jumătate din pacienți^{14,15}.

Conform studiilor realizate până în prezent s-a constatat că EUS-FNA însoțită obligatoriu de examen citologic, este o metodă sigură, minim-invazivă și cu acuratețe ridicată în evaluarea cancerului bronho-pulmonar prin demonstrarea invaziei tumorale sau a ganglionilor limfatici, precum și alternativa ideală pentru stadializarea chirurgicală¹⁶. Studiul actual a demonstrat suplimentar că puncția fină aspirativă poate permite obținerea de material suficient pentru efectuarea de blocuri celulare și examen imunocitochimic, chiar cu stabilirea completă a tipului tumoral, nu numai cu confirmarea unui diagnostic de malignitate.

Pentru realizarea unei evaluări complete a cancerului bronho-pulmonar, este nevoie de o abordare complementară și anume abordul transbronhial: EBUS-TBNA (endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration - ecoendoscopia bronșică cu puncție fină aspirativă transbronșică). Multiple studii au demonstrat că o combinație a acestor două tehnici ultrasonografice endoluminale poate stabili un diagnostic pozitiv complet și poate înlocui cu succes mediastinosopia¹⁷. Pentru realizarea cu succes a celor două proceduri de complexitate înaltă, este necesară o colaborare interdisciplinară între pneumologi, gastroenterologi, chirurghi toracici, anesteziști, anato-mo-patologi și citologi, angrenați într-un centru terțiar cu posibilități avansate de diagnostic și tratament. Beneficiul direct al acestor proceduri minim invazive rămâne diagnosticul precoce și stadializarea precisă a pacienților cu cancer bronhopulmonar. Astfel, pot fi operați curativ pacienții cu stadii incipiente sau pot fi îndrumați către radio- și chimioterapie pacienții cu stadii avansate, evitându-se intervențiile chirurgicale și toracotomiile inutile.

Informații

Lucrarea a fost susținută prin grantul de cercetare numărul 41-079/2007, intitulat „**Rolul ecoendoscopiei și ecobronhoscopiei, comparativ cu tehnicile moleculare, în diagnosticul și stadializarea afecțiunilor maligne mediastinale**” finanțat prin Ministerul Educației, Cercetării și Tineretului – Centrul Național de Management Programe (MEdCT – CNMP), în cadrul programului Parteneriate – PNCDI II (2007-2013).

Bibliografie

1. Savoy AD, Ravenel JG, Hoffman BJ, Wallace MB. Endoscopic ultrasound for thoracic malignancy: a review. *Curr Probl Diagn Radiol* 2005; 34: 106-115.
2. Silvestri GA, Hoffman BJ, Bhutani MS, et al. Endoscopic ultrasound with fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1441-1445.
3. Annema JT, Versteegh MI, Veselic M, et al. Endoscopic ultrasound-guided FNA in the diagnosis and staging of lung cancer and its impact on surgical staging. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8357-8361.
4. Smithuis R. Mediastinal lymph node stations (publication date 15 June 2007). Available from <http://www.radiologyassistant.nl/en/4646f1278c26f>. Accessed 15 June 2009.
5. Hawes RH, Fockens P. Endosonography. Saunders Elsevier Inc 2006, 57-61.
6. Vilman P, Jacobsen GK. Diagnostic fine needle biopsy. In Longitudinal Endosonography. Rösch T, Will U, Chang KJ eds, Springer, 2001; IV: 123-154.
7. Chang KJ. Maximizing the yield of EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest Endosc* 2002; 56 (Suppl.): S28-S34.
8. Joseph A, Govert Leslie G, Dodd, Peter S, Kussin, Wayne M, Samuelson A prospective comparison of fiberoptic transbronchial needle aspiration and bronchial biopsy for bronchoscopically visible lung cancer, *Cancer Cytopathology*, 1998.
9. Devereaux BM, LeBlanc JS, Yousif E, Kessler K, Brooks J, Mathur P et al. Clinical utility of EUS-guided fine-needle aspiration of mediastinal masses in the absence of known pulmonary malignancy. *Gastrointestinal Endoscopy* 2002; 56: 397-401.
10. Panelli F, Erickson RA, Prasad VM. Evaluation of mediastinal masses by endoscopic ultrasound and endoscopic-guided fine needle aspiration. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 401-408.
11. Fritscher-Ravens A, Petrasch S, Reinacker-Schick A, Graeven U, König M, Schmiegel W. Diagnostic value of endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration cytology of mediastinal masses in patients with intrapulmonary lesions and non-diagnostic bronchoscopy. *Respiration* 1999; 66: 150-155.
12. Hunerbein M, Ghadimi BM, Haensch W, Schlag PM. Transesophageal biopsy of mediastinal and pulmonary tumors by means of endoscopic ultrasound guidance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116: 554-559.
13. Serna DL, Aryan HE, Chang KJ, Brenner M, Tran LM, Chen JC. An early comparison between endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and mediastinoscopy for diagnosis of mediastinal malignancy. *Am Surg* 1998; 64: 1014-1018.
14. Larsen SS, Krasnik M, Vilman P, Jacobsen GKJ, Pedersen JH, Faurschou P, Folke K. Endoscopic ultrasound guided biopsy of mediastinal lesions has a major impact on patient management. *Thorax* 2002; 57: 98-103.
15. Storch I, Shah M, Thurer R, Donna E, Ribeiro A. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and Trucut biopsy in thoracic lesions: when tissue is the issue. *Surg Endosc* 2008; 22: 86-90.
16. Pedersen BH, Vilman P, Folke K, Jacobsen GKJ, Krasnik M, Milman N, Hancke S. Endoscopic ultrasonography and real-time guided fine-needle aspiration biopsy of solid lesions of the mediastinum suspected of malignancy. *Chest* 1996; 110: 539-544.
17. Krasnik M. Endoscopic transesophageal and endoscopic transbronchial real-time ultrasound-guided biopsy. *Respiration*. 2003; 70: 293-298.