

# Evoluzione della fotografia retinica e Imaging Widefield



Amedeo Lucente

## Abstract

L'imaging Widefield e Ultra-Widefield si è affermato nell'Oftalmologia con devices sempre più performanti e completi nella diagnosi delle patologie neuro-corio-retiniche. L'articolo traccia le linee più salienti di tale progresso, descrive la tecnologia alla base dell'imaging widefield con una disamina della letteratura più recente a sostegno dell'efficacia dell'ampio campo nelle più frequenti patologie retiniche.

**Keywords e abbreviazioni:** AMD Age Macular Degeneration, DME Diabetic Macular Edema, DR Diabetic Retinopathy, FA Fluorescein Angiography, FAF Fundus AutoFluorescence, FoV Field of View, ICG Indocyanine Green, NV Neovascularization, ROP Retinopathy of Prematurity, RPE Retinal Pigmen Epithelium, SLO Scanning Laser Ophthalmoscope, TRP Targeted Retinal Photocoagulation, UWF Ultra-WideField, UWFA Ultra-WideField Fluorescein Angiography, WF WideField.

## Introduzione

La fotografia retinica ha oltre un secolo di vita. *Lucien Howe* (1848-1928) fisico americano, professore di Oftalmologia all'Università di Buffalo, presidente della American Ophthalmological Society e fondatore dell'Howe Laboratory of Ophthalmology presso l'Università di Harvard, molto ha contribuito al progresso di tale tecnica, ottenendo prestigiosi premi e numerose medaglie da molti organismi nazionali ed internazionali.

Howe, prima di ritornare definitivamente negli USA, insieme al suo assistente *Elmer Starr*, ha compiuto numerosi studi sulla fotografia retinica in Germania ad Heidelberg, collaborando con *Hermann von Helmholtz* (1821-1894), scienziato poliedrico, tra i più conosciuti e valorosi del suo tempo, tanto da meritare l'appellativo di "Cancelliere della fisica".

In occasione della riunione della Società Transamericana nel 1887, nell'articolo "Photographs of the interior of the eye", Howe descrisse dettagliatamente la tecnica fotografica del fondo oculare e pubblicò un'immagine della retina definendola "first recognizable fundus photograph".

I primi tentativi per ottenere l'immagine interna del bulbo furono attuati con un bruciatore Bunsen.

Come descrive lo stesso Lucien Howe, l'esame risultava così doloroso da ricorrere alla somministrazione di cocaina:

*"The heat was so intense that we had to use topical cocaine to keep the patient from twisting in pain"* [1].

*S. Duke-Elder* fa risalire ad Adrian C. Van Trigh, mezzo secolo prima, l'illustrazione a colori della retina:

*"The first coloured printed illustration of the fundus of the eye which appeared in the thesis of Adrian Christopher Van Trigh (1825-64), Dissertatio Ophthalmologica Inauguralis de Speculo Oculi in 1853..."* [2,3] (Fig. 1).

Fig. 1 - Illustrazione del fondo oculare in bianco e nero attribuita a Van Trigh e disegnata originalmente a colori nel 1853 (reproduced from Duke-Elder, 1967).



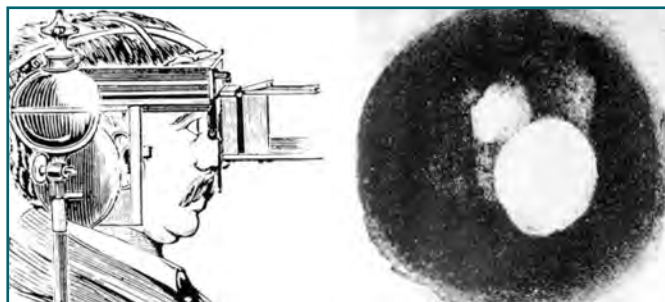


Fig. 2 - Prima fotografia del fondo oculare e della rudimentale Fundus Camera attribuita dalla maggior parte della letteratura a W.T. Jackman e J.D. Webster, apparsa un anno prima (1886) della relazione di Howe sul "Philadelphia Photographer"

La prima fotografia del fondo oculare dalla maggior parte della letteratura è tuttavia attribuita ai dottori W.T. Jackman e J.D. Webster, apparsa un anno prima (1886) della relazione di Howe sul "Philadelphia Photographer" [4] (Fig. 2).

Quest'immagine ottenuta dopo 2,5 minuti di esposizione con un bruciatore a carbonio (albo-carbon burner) e un rudimentale oftalmoscopio mostrava solo il nervo ottico.

La disputa su chi fu effettivamente il primo a fotografare e pubblicare l'immagine del fondo oculare è tuttora aperta e non definita.

All'inizio del Ventesimo Secolo, nel 1927, Frederick

Dimmer ideò, dopo studi iniziati nel 1889 e completati nel 1904, un prototipo di fundus camera che permetteva una fotografia della retina ripetibile e di buona qualità; lo strumento molto ingombrante non venne però mai prodotto in serie [5→7].

### Imaging retinico moderno

La prima effettiva fundus camera basata sui principi dell'ottica geometrica dell'oculista svedese e premio Nobel per la Medicina (1911) *Allvar Gullstrand* (1862-1930), fu progettata nel 1925 da J.W. Nordenson, e un anno dopo realizzata dalla ditta Carl Zeiss (Fig. 3a, Fig. 3b).

Questo device era caratterizzato inizialmente da un'apertura angolare di 10 gradi, raddoppiata in breve tempo a 20 gradi e, dopo lunga elaborazione, portata a 30 gradi, standard nella retinografia fino all'ETDRS degli anni Ottanta[8] (\*vedi nota).

Utilizzava un'esposizione di 0,5 secondi e un color film come pellicola con indubbi benefici per la definizione, gli artefatti da movimento e i minori danni retinici da esposizione.

Il problema principale della fotografia del fondo oculare era l'illuminazione del polo posteriore, fino agli anni Trenta non ottenibile in modo soddisfacente.

Inizialmente la luce di ritorno era infatti solo il 10% rispetto a quell'inviata; la dilatazione pupillare fu perciò

#### \*Nota

L'ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) è stato uno studio clinico multicentrico sostenuto dal NEI (National Eye Institute) randomizzato, progettato per valutare l'efficacia della fotocoagulazione con argon laser verso il trattamento con aspirina, nella gestione di pazienti con retinopatia diabetica non proliferante NPDR (Non-Proliferative Diabetic Retinopathy) o precocemente proliferante HR-PDR (High-Risk Proliferative Diabetic Retinopathy). Iniziato nel dicembre 1979, completato nel giugno 1985 con follow-up nel 1988, e pubblicato nel 1991, l'ETDRS ha coinvolto 22 centri, 3.711 pazienti tra 18 e 70 anni di entrambi i sessi, seguiti per un tempo minimo di 4 anni, senza precedenti trattamenti laser con un visus uguale o superiore a 20/40. I criteri di eleggibilità includevano un ampio range di aspetti retinici della malattia, dall'edema maculare severo con visus di 20/200, agli essudati duri di piccole o grandi dimensioni. L'efficacia dell'aspirina si basava sull'osservazione che i diabetici in terapia con grandi dosi di tale molecola per concomitante artrite reumatoide, mostravano minore prevalenza di lesioni vascolari retiniche rispetto ai diabetici senza malattie reumatiche. Le considerazioni sull'aggregazione piastrinica e la chiusura dei capillari migliorata dall'aspirina in vitro sono state attentamente valutate, controllate e monitorate in questo studio. I pazienti sono stati assegnati casualmente alla terapia con aspirina (650 mg al giorno) o al placebo [9]. Un occhio di ciascun paziente è stato assegnato, in modo del tutto casuale, al trattamento fotocoagulativo argon laser focale in macula (focal macular laser) o esteso in periferia (peripheral scatter laser), mentre l'occhio adelfo veniva osservato con differimento della fotocoagulazione; entrambi gli occhi dovevano essere esaminati almeno ogni 4 mesi. La fotocoagulazione era effettuata negli occhi assegnati al differimento non appena si rilevava retinopatia proliferativa ad alto rischio. L'uso di aspirina non ha influenzato la progressione della retinopatia nella fase proliferativa ad alto rischio negli occhi assegnati al differimento fotocoagulativo, non ha aumentato il rischio di emorragia vitreale, non ha influenzato il visus; si è invece constatata l'associazione tra l'assunzione dell'aspirina e un minor rischio di malattie cardiovascolari [9]. Lo studio ha concluso che per i pazienti con retinopatia diabetica non proliferativa o proliferativa da lieve a grave, era probabile che l'aspirina non avesse effetti benefici clinicamente importanti sulla progressione della retinopatia; non vi erano tuttavia controindicazioni oculari al suo uso se richiesto per malattie cardiovascolari o per altre indicazioni mediche. Inoltre ha dimostrato che il laser maculare focale riduce il rischio di una perdita moderata della vista fino al 50% negli occhi con "edema maculare clinicamente significativo", oltre l'utilità del trattamento argon laser con una minor perdita di visus statisticamente significativa per gli occhi trattati precocemente sulla retina periferica, più evidente per i non insulino-dipendenti. Tuttavia il trattamento laser poteva essere differito fino alla comparsa di una retinopatia intermedia/moderata non proliferativa; la fotocoagulazione doveva essere invece eseguita senza indugio in quasi tutti gli occhi con retinopatia proliferativa ad alto rischio. Infine la vitrectomia precoce era presa in considerazione nella retinopatia diabetica proliferativa attiva avanzata; tutti i pazienti con retinopatia diabetica dovevano sempre e comunque ricevere un attento e stretto follow-up [10]. L'imaging retinico utilizzato da questo trials comprendeva una fotografia a 7 campi che oltrepassava le arcate vascolari. Tale metodica permise una migliore diagnosi e trattamento della retinopatia diabetica e venne utilizzata presto come standard in molte patologie corioretiniche.

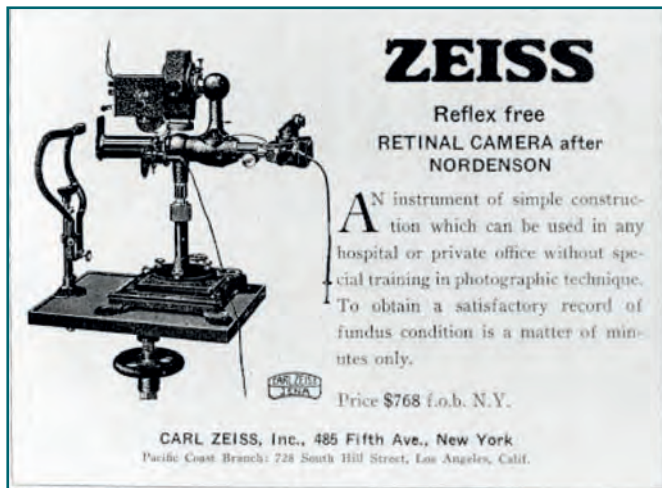


Fig. 3a - Brochure della Reflex free Retinal Camera after Nordenson Zeiss, Price \$ 768 f.o.b. N.Y.



Fig. 3b - Fundus Camera Zeiss progettata da J.W. Nordenson

in quegli anni la regola.

Altri limiti non meno importanti erano il tempo d'esposizione, già migliorato da 2,5 a 0,5 secondi, e la qualità delle pellicole.

L'ingegnere americano *Harold Edgerton* nel 1930, con l'invenzione del flash stroboscopico (στροβός vortice e scopio), permise il passaggio alla fotografia ad alta risoluzione, tanto da essere conosciuto come *"l'uomo che ferma il tempo"*.

Il time to market dall'ideazione alla commercializzazione per le fundus cameras serie FF Zeiss negli anni Trenta era ormai terminato.

Queste prime FF, in vendita al prezzo di \$ 768 f.o.b. N.Y. (free on board, New York), permettevano di fotografare nervo ottico e area maculare fino alle arcate vascolari, target definitivo dell'imaging per le patologie neuroretiniche.

Da allora le funzionalità delle fundus camera sono notevolmente migliorate con device non-mydratic, l'illuminazione elettronica, l'allineamento automatico degli occhi e l'acquisizione digitale ad alta risoluzione.

### Evoluzione dell'imaging retinico

L'imaging del polo posteriore delle comuni fundus camera ha una copertura da 45 a 60 gradi. Gli anni Ottanta hanno visto lo sviluppo e il plateau della fotografia retinica, con commercializzazione di numerosi devices capaci di fotografare non molto oltre le arcate vascolari retiniche [11, 12].

Nel Settembre del 1980 *Robert H. Webb et al.* descrissero una nuova tecnica per fotografare la retina, la *"flying spot TV ophthalmoscope"*.

La fonte luminosa era costituita da luce laser che scannerizzava la retina (raster pattern), mentre l'immagine di ritorno era catturata da una videocamera: era nato il

primo SLO Scanning Laser Ophthalmoscope.

Questa tecnologia ridusse l'intensità dell'illuminazione rispetto alle tradizionali fundus camera, visualizzando anche immagini in movimento.

Lo SLO sviluppato da Carl Zeiss e Rodenstock nei primi anni Novanta inizialmente non ha avuto grande diffusione per l'alto costo di produzione.

La Heidelberg Engineering introdusse poco dopo l'HRT che, al contrario, ha avuto largo successo commerciale per l'alto contrasto e l'ottima risoluzione, anche in presenza di opacità di media entità dei mezzi diottrici.

L'HRT è poco influenzato dalla dilatazione pupillare per il concorso dello SLO con le ottiche confocali, cSLO.

L'indagine fotografica retinica è ritenuta da più tempo indispensabile nella diagnosi e follow-up delle più frequenti e pericolose patologie neuroretiniche, tra tutte per frequenza glaucoma e maculopatie.

La retina periferica non compresa dalla fotografia standard è stata poco considerata dalla letteratura nelle patologie riguardanti il polo posteriore fino allo studio ETDRS.

Sempre più risultati emergenti dall'esperienza clinica e dalla ricerca in numerose patologie corioretiniche sostengono l'esigenza di un esame fotografico oltre le arcate vascolari, con riscontri che correlano patologie del polo posteriore alla retina periferica.

Quest'esigenza di documentare il più possibile tutta la neuroretina si rafforza oggi ancor di più per le crescenti esigenze medico-legali e assicurative.

L'apertura del campo retinico con il montaggio 7-Field da 30 gradi, standard fotografico ETDRS, copre un angolo di circa 75 gradi [9, 10].

Per fotografare bene i sette campi si effettuano tre scatti

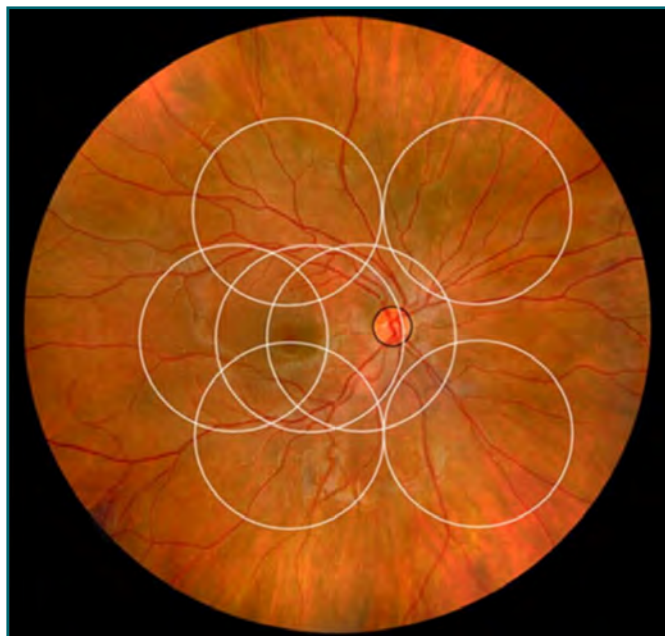


Fig. 4 - 7-Field ETDRS

sull'asse orizzontale, papilla ottica, macula e area temporale alla macula, un quarto e quinto scatto sull'area supero-temporale ed infero-temporale e infine un sesto e settimo scatto sull'area supero-nasale e infero-nasale (Fig. 4).

Il software monta le singole foto con un'imaging finale di 60/75 gradi circa, sovrapponendo automaticamente aree retiniche simili.

In particolare i campi uno→tre coprono 60 gradi, mentre gli altri aggiungono 45 gradi in sovrapposizione; site to site si possono raggiungere 90 gradi.

Clark TM. nel 2008, nel primo capitolo del libro di Arevalo JF "Retinal Angiography and Optical Coherence Tomography", illustra e discute sull'imaging fotografico a 9 campi, protocollo fotografico necessario per una corretta diagnosi e follow-up di molte retiniti periferiche, dall'infezione da citomegalovirus/AIDS (cytomegalovirus retinitis CMVR/AIDS) a molte uveiti [13].

Per i 9 campi sono necessarie fundus camera da 50/60 gradi.

Il Fundus Photography Reading Center FPRC dell'Università del Wisconsin è il centro di riferimento negli USA per le più importanti istituzioni accademiche, fondazioni, aziende farmaceutiche, biotecnologiche, il NEI National Eye Institute, il National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases, il Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, oltre che per il Dipartimento della Difesa.

Questo prestigioso centro d'imaging ha messo a punto i software per il 9-Field e il 7-Field modificato, ampiamente utilizzati ed accettati dalla letteratura scientifica internazionale (Fig. 5).

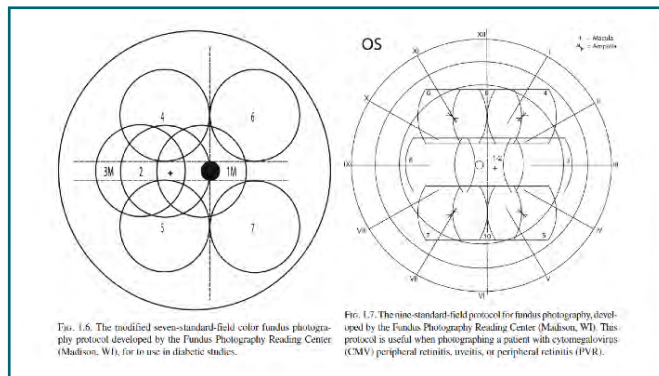


Fig. 5 - Aree retiniche 7-Field e 9-Field (by Arevalo JF)

## Widfield & Ultra-Widfield

La tradizionale oftalmoscopia utilizza la parte periferica più ampia dell'area pupillare come via d'entrata della luce; la parte centrale, più piccola, serve da ricezione con una qualità finale d'imaging non lusinghiera.

Lo SLO, inizialmente descritto nel 1980 da Robert H. Webb, G.W. Hurghes e O. Pomerantzeff, utilizza un fascio laser (*laser beam*) di potenza < 100 microW al posto del flash, confocal pinhole lungo il percorso ottico e beam-splitters migliorando molto la risoluzione finale dell'imaging retinico [11].

La rimozione delle interferenze provenienti dai piani adiacenti alla focalizzazione impedisce alla luce riflessa dalle zone fuori fuoco di interferire sul fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in segnale elettrico.

Nel sistema SLO, rispetto alla fotografia tradizionale, l'illuminazione e l'osservazione nel percorso dell'area pupillare sono invertite.

Il fascio laser utilizza circa 1/100 dell'area pupillare centrale (0.50 mm<sup>2</sup>); l'area periferica (50 mm<sup>2</sup>) è percorsa dalla luce riflessa dalla retina.

Il risultato è una migliore risoluzione delle immagini, minore intensità di luce utilizzata e aumentata sicurezza, grazie anche alla diminuzione della componente blue-light ad alta energia, tra 380 nm e 500 nm, HEV light (High Energy Visible light) [11] [14].

W. Lotmar descrisse nel 1977 la possibilità di ottenere un'imaging retinico di 96 gradi con illuminazione mobile e montaggio di 19 frame[15]. Tale metodica, possibile solo con buona cooperazione del paziente, ampia dilatazione pupillare, lunghi tempi d'esecuzione e grande capacità dell'operatore, di fatto non è proponibile nella pratica clinica di tutti i giorni.

Negli ultimi anni sono stati proposti numerosi devices e studiate varie metodiche per ottenere un'imaging Widefield e Ultra-Widefield della retina.

I più importanti sistemi sono:

- *Equator-plus camera di Pomerantzeff-148°→1975* [16]

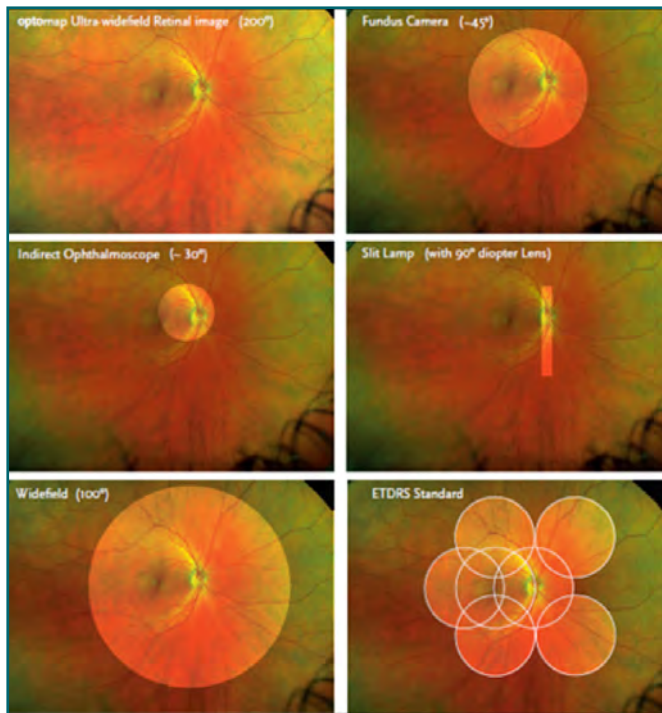


Fig. 6 - Confronto del FoV OPTOS con altri metodi e device (by Comparison of Fields of View An optomap retinal image compared to conventional devices in a single capture)

- RetCam-130°→1977 [17→19]
- Panoret-1000-130°→2002 [20]
- Staurenghi lens-150°→2004 [21, 22]

Questi devices permettono una fotografia retinica con FoV Field of View tra 100 e 160 gradi circa. Comunemente una fotografia retinica con FoV  $\geq 50$  gradi è definita Widefield WF imaging, con un FoV  $\geq 100$  gradi Ultra-Widefield UWF imaging. Sono in commercio nuove fundus camera che con uno/due scatti e montaggio automatico coprono un FoV ~ 200 gradi (Optos e Zeiss), mentre con 6 scatti e montaggio manuale arrivano ad un FoV ~ 267 gradi nasale/temporale (Clarus Zeiss 500) [23] (Fig. 6).

### Considerazioni sul FoV

L'occhio umano lo possiamo approssimare ad una sfera con angolo giro di 360 gradi. Per un'apertura di 180 gradi, fino all'equatore, l'area retinica è teoricamente fotografabile con dilatazione pupillare medio-ampia, anche se, fino all'avvento dell'UWF, non è stato facile raggiungere un tale FoV. Esistono due metodiche per misurare l'apertura angolare FoV: la prima ha il centro nell'area pupillare, la seconda pone il suo centro goniometrico all'interno del bulbo oculare, all'inserzione tra equatore e asse anatomico (asse ottico).

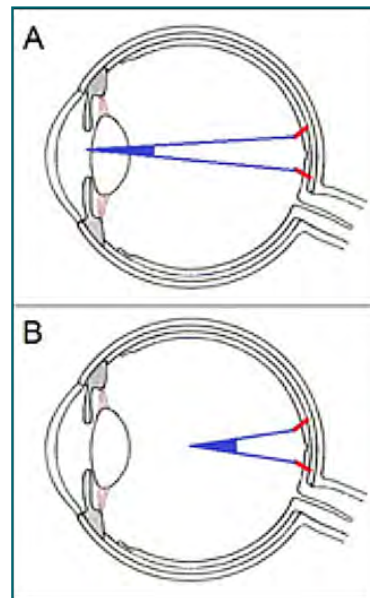


Fig. 7a - FoV secondo i due centri goniometrici

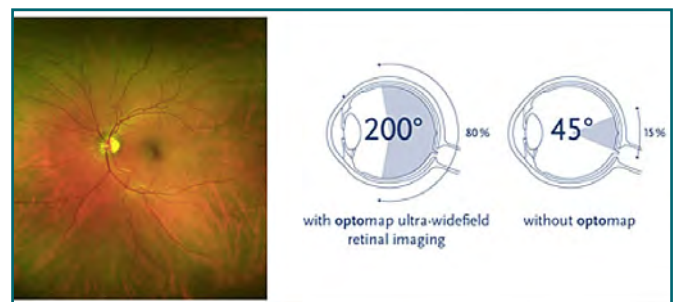


Fig. 7b - Optos Wide-Field Retinal Image e confronto FoV 45° / 200° (by Vision Source Signature eye care, Orland Park)

L'esistenza di questa doppia scala di misura angolare, poco nota, genera facile confusione. Il centro nell'area pupillare è utilizzato dai sistemi ottici con lente a contatto, non può superare i 180 gradi ed è conforme alle norme ISO 10940 (International Organization for Standardization). Tali norme riguardano gli strumenti oftalmici e ottici (ISO 10940 was prepared by Technical Committee ISO/TC 172, Optics and photonics, Subcommittee SC 7, Ophthalmic optics and instruments). La seconda metodica ha come centro goniometrico il centro del bulbo oculare e permette di andare oltre l'equatore. Con tale metodica l'apice dell'angolo goniometrico si avvicina alla retina e il FoV è inevitabilmente maggiore. Per fare un esempio, con il Clarus 500 Zeiss che utilizzo da qualche mese, un solo scatto (one shot) copre un'area retinica di 90 gradi secondo ISO 10940, oppure 133 gradi considerando il centro goniometrico nel bulbo oculare (Fig. 7a, Fig. 7b) [24]. Naturalmente le due aree sono sovrapponibili per estensione retinica.

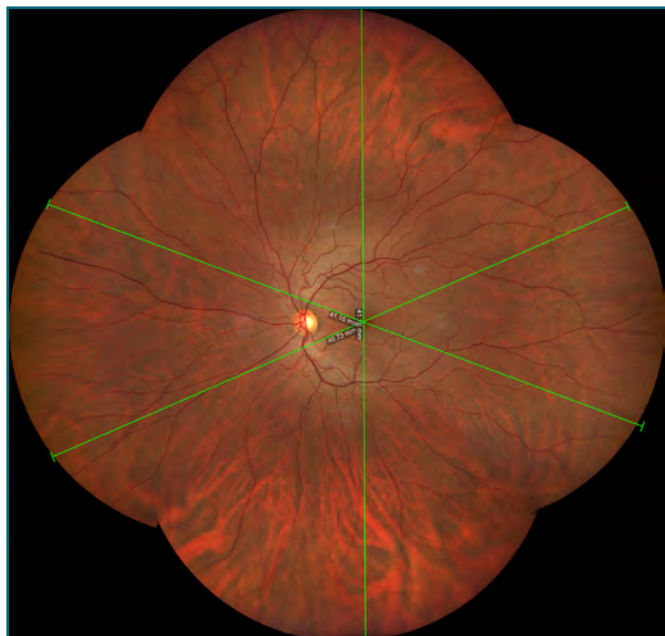


Fig. 8 - Montage automatico four shot (FoV 200° wide by 200° tall) con Clarus 500 Zeiss occhio emmetrope. La lunghezza misurabile è ~ 41 mm da estremo ad estremo.

Le curiosità tecniche e i calcoli possibili utilizzando i devices UWF sono molteplici.

Un bulbo oculare emmetrope teorico ha un diametro antero-posteriore ~ 24 mm e una lunghezza della circonferenza ~  $2 \pi r = 2 \times 3,14 \times 12 = 75,36$  mm (secondo molti autorevoli testi di anatomia, tra i quali Testut, Zaccheo, Bonnet, Orzalesi, le dimensioni del bulbo oculare umano sono: diametro trasverso 23,5 mm; diametro verticale 23 mm; diametro antero-posteriore o asse dell'occhio 25-26 mm; la sua forma ricalca un ellissoide triassiale).

Una fotografia con FoV di 180 gradi copre un'emicirconferenza di lunghezza ~ 37,68 mm ( $75,36/2$ ); l'area retinica della sfera con raggio 12 mm =  $4 \pi r^2 = 4 \times 3,14 \times 12^2 \sim 1808$  mm<sup>2</sup>; l'area dell'emisfera è di conseguenza  $\frac{1}{2}$  di 1808 mm<sup>2</sup> ~ 904 mm<sup>2</sup>.

Con il Clarus 500 Zeiss, da estremo nasale a temporale, due foto (two shots), montaggio automatico e FoV ~ 200 gradi, la distanza lineare riscontrabile è quasi sempre > di 40 mm.

I dati numerici quindi tornano: ~ 37,68 mm è la lunghezza dell'emisfera teorica con FoV di 180 gradi e ~ 40 mm è la lunghezza da estremo nasale-temporale con FoV ~ 200 gradi, lunghezza riscontrabile anche tra ore 12 ed ore 6 dopo montaggio di 4 foto in automatico (Fig. 8).

Altri intriganti quesiti che emergono utilizzando UWF sono la misura FoV da ora serrata ad ora serrata di un bulbo emmetrope e, di conseguenza, l'angolo non

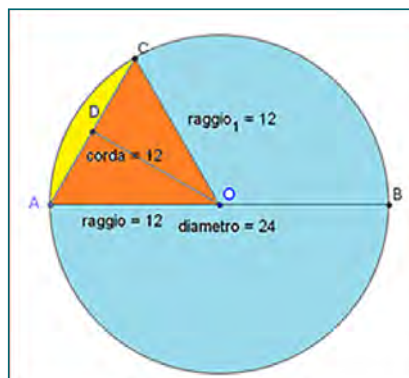


Fig. 9 - Cerchio considerato nel testo

compreso dall'attuale imaging UWF.

La Zeiss dichiara che il Clarus 500 può coprire un'area ~ 267 gradi con montaggio manuale di 6 scatti (six shots).

Partiamo da un bulbo oculare per semplicità simile ad una sfera teorica, con diametro ~ 24 mm, e consideriamo il centro angolare all'interno del bulbo oculare (fuori dalle norme ISO).

La distanza bianco-bianco corneale è ~ 12 mm, l'arco corneale sotteso a tale corda è lungo  $1/6$  di tutta la circonferenza ( $75,36 : 6 \sim 12,56$  mm), i raggi della sfera considerata sono ~ 12 mm.

Se consideriamo inoltre che un corpo ciliare è lungo ~ 6 mm (Testut et al.), e sottraiamo dalla circonferenza ~ 75,36 mm l'arco corneale ~ 12,56 mm + i due corpi ciliari (~ 6 mm x 2), troviamo una lunghezza residua:  $75,36 - [12,56 + (6 + 6)] \sim 50,8$  mm, corrispondente alla lunghezza interna della emisfera residua da ora serrata ad ora serrata (-).

Inoltre il triangolo equilatero con apice nel centro del bulbo, tre lati coincidenti ai raggi ~ 12 mm, di cui uno è il segmento bianco-bianco, ha gli angoli tutti ~ 60 gradi (equilatero/equiangolo; corda corneale  $1/6$  della circonferenza, angolo corrispondente  $60^\circ$ ;  $360^\circ : 6 \sim 60^\circ$ ) (Fig. 9).

Se si aggiunge alla lunghezza lineare dei due corpi ciliari (~ 6 mm x 2) l'arco corneale (~ 12,56 mm) troviamo un arco complessivo di ~ 24,56 mm (da ora serrata ad ora serrata passando per l'arco corneale), e un angolo sotteso a tale settore circolare ~ 117,32 gradi, facilmente ottenibile: ( $75,36 : 360 = 24,56 : x$ ;  $x \sim 117,32^\circ$ ).

Di conseguenza, le misure teoricamente fotografabili, pur se arrivassero fino all'ora serrata, sono inferiori da quelle riferite:  $360^\circ - 117,32^\circ \sim 242,68^\circ$ , anche considerando le molte approssimazioni di questi calcoli (-).

In una presentazione di Jean-François Korobelnik dell'Università di Bordeaux per Zeiss all'ora serrata è assegnato un FoV pari a 230 gradi [25].

Dalla mia esperienza e dall'imaging riscontrabile, anche con montaggio six shots, non si arriva a fotografare

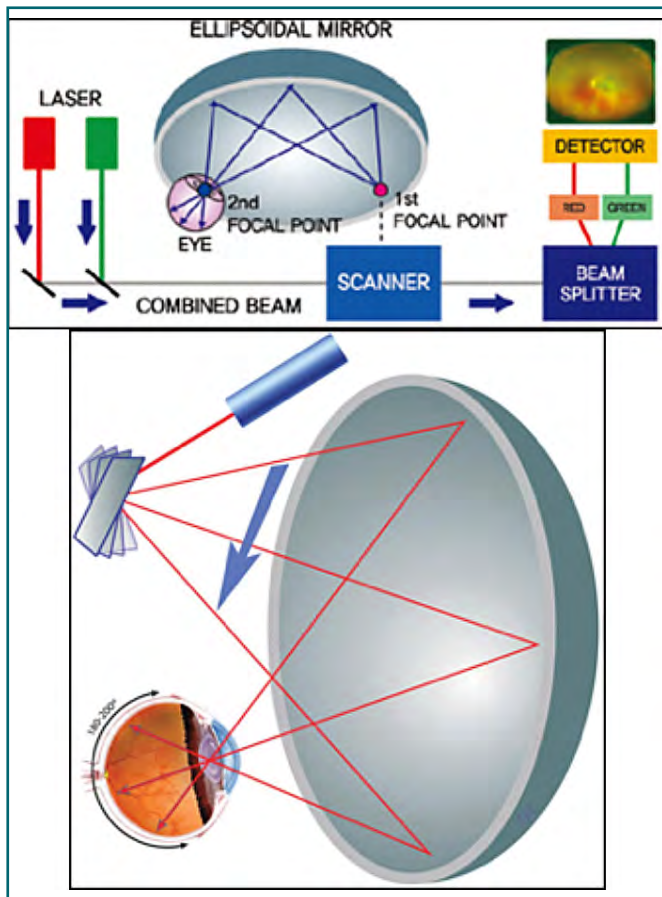


Fig. 10 - Schema di funzionamento di Optos

molto oltre le vene vortuose, tranne che facendo forzare lo sguardo al paziente. Pertanto, l'esame accurato della periferia retinica resta fondamentale.

La discussione è comunque tutta aperta al confronto, sicuramente proficua con la diffusione dei devices UWF.

### Devices Ultra-Widened no-contact

In commercio sono disponibili pochi devices UWF.

I primi in mercato dal Duemila sono stati gli Optos, disponibili in più versioni, Daytona, Daytona Plus e California af - fa - icg.

L'ultimo device disponibile sul mercato europeo dal 2018 è il Clarus 500 Zeiss.

La Heidelberg (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) con il modulo UWF non a contatto, che si adatta alla testa degli HRA cSLO, ha reso possibile l'ampliamento del FoV fino a 55 gradi per FA, ICGA e FAF, con grande beneficio per i suoi devices, i più utilizzati nell'imaging retinico con colorante [26].

Altri sistemi WF sono Eidon (CenterVue, Padova, Italy), F-10 Nidek (Nidek, Gamagori, Japan), e il wide-angle Canon (Canon, USA). Questi devices permettono immagini ~ 60 gradi.

Gli Optos Fundus camera (Optos 200Tx, Dunfermline, UK) sono cSLO con ottiche migliorate da beam-splitters e aperture confocali.

Questi devices permettono FoV ~ 200 gradi e, da poco tempo, con software advance, FoV ~ 220 gradi; la Optos riferisce di coprire 82% circa della superficie retinica (82% di 360° - 295°?) [27, 28].

I devices Optos utilizzano uno specchio ellissoide, un galvanometro oscillante ad altissima sensibilità e varie sorgenti laser con lunghezza di 532 nm e 633 nm per immagini digitali two-color verde e rosso, 488 nm blue per autofluorescenza FAF, e un laser a 805 nm per infrarosso/indocianina.

Hanno 20 pixel di risoluzione per grado angolare, tempo di scatto 0,25 secondi e necessitano di 2 mm come apertura minima pupillare [29] (Fig. 10).

Il Clarus 500 UWF Zeiss, sul mercato USA da Settembre 2017 e dai primi mesi di quest'anno in Europa, utilizza tre LED ad ampio spettro (RGB Channel) e un laser a diodi (IR laser diode) a 785nm.

Il canale Red Channel 585-640nm è indicato particolarmente per evidenziare i vasi retinici, coroideali e l'EPR; il canale Green Channel 500-585nm è utile per evidenziare le emorragie e i fori maculari; il canale Blue Channel 435-500nm è più idoneo per visualizzare le patologie epiretينية e i difetti delle fibre ottiche [30].

Una luce rettangolare spazza tutta la retina rapidamente, metodologia denominata Broad Line Fundus Imaging (BLFI; US Patent No 9.456,746 B2, date of Patent Oct. 4, 2016; Bulblitz et al.) e, con ottiche

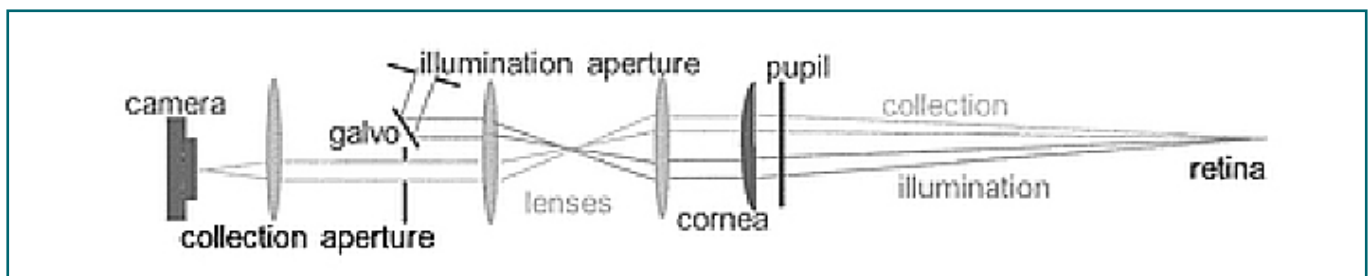


Fig. 11 - Broad Line Fundus Imaging utilizzato da Clarus 500 Zeiss

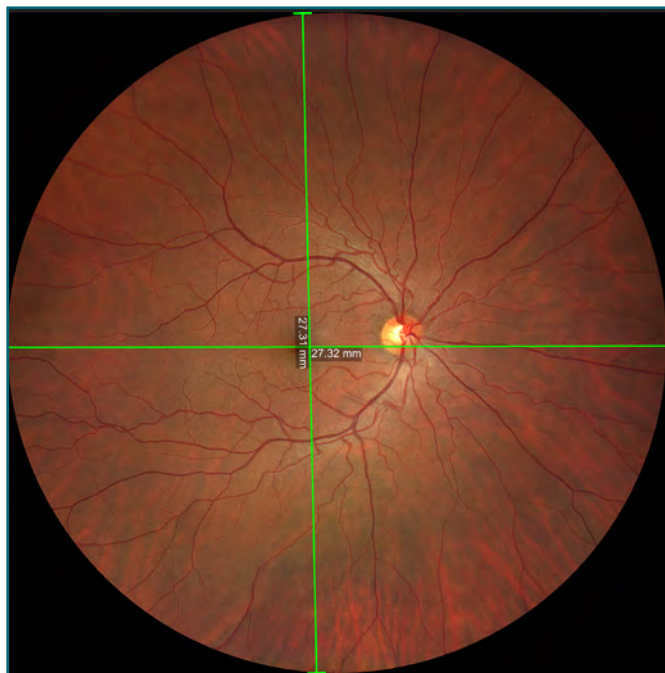


Fig. 12 - FoV 133° x 133° occhio emmetrope one shot con Clarus 500 Zeiss. Lunghezza misurabile da estremo ad estremo S-I-N-T è ~ 27 mm

confocali modificate, ottiene una riduzione notevole dei riflessi dovuti ai mezzi diottrici attraversati e annulla l'effetto dello sbiancamento generato dalla papilla ottica, permettendo un'imaging in presenza di opacità di media entità, specie a carico del cristallino in meno di 0,2 secondi (Fig. 11).

Questo nuovo UWF capace di catturare FAF Green e Blue molto dettagliate, ha un sensore di 12 megapixel, 7 micron di risoluzione con apertura pupillare  $\leq 2,5$  mm.

La FAF Green (FAF-G) è utile per lo studio delle maculopatie in genere, mentre la FAF Blue (FAF-B) aumenta le informazioni per la forma geografica.

L'illuminazione a laser infrarosso IR trova indicazione per l'indagine sulla coroide e per visualizzare le ghiandole di meibomio nella sindrome dry eye.

Il Clarus 500 Zeiss può scattare un'immagine singola con FoV di larghezza (wide) ed altezza (high) ~ 133 gradi (one shot), da preferire per le patologie del polo posteriore (Fig. 12).

In automontaggio si può optare per due immagini (two shots), FoV ~ 200 x 133 gradi (200° wide by 133° high) (Fig. 13a e 13b), oppure per quattro immagini (four shots), FoV ~ 200 x 200 gradi (200° wide by 200° tall) (Fig. 8); infine si può allargare ulteriormente ~ 267° con montaggio manuale (six shots), molto utile nelle patologie corioretiniche più estese [29] (Fig. 14).

Clarus 500 è capace ancora di scattare fotografie stereo della papilla ottica ed esterne della regione orbitaria;



Fig. 13a - FoV (200° wide by 133° high) con Clarus 500 Zeiss. Confronto d'imaging con altri FoV e con ETDRS



Fig. 13b - FoV (200° wide by 133° high) con misure lineari ottenibili

per Clarus 700 completo di FA/ICG bisognerà attendere il 2019 [31].

### Performance dell'imaging Ultra-Widefield

Importanti osservazioni cliniche in molteplici patologie stanno testimoniando sempre più l'importanza dell'imaging UWF come un valore diagnostico e prognostico imprescindibile.

La retinopatia diabetica RD, le uveiti, le occlusioni vascolari, i tumori endoculari, la retinopatia del prematuro, le degenerazioni periferiche con o senza rotture retiniche e presenza di distacco di retina, oltre che le patologie del polo posteriore, testimoniano sempre più l'efficacia di tale modalità d'imaging [32].

Patel RD, Wessel MM et al. confermano insieme a molte altre ricerche pubblicate da tempo, che l'ischemia retinica può indurre e sostenere l'edema maculare diabetico.



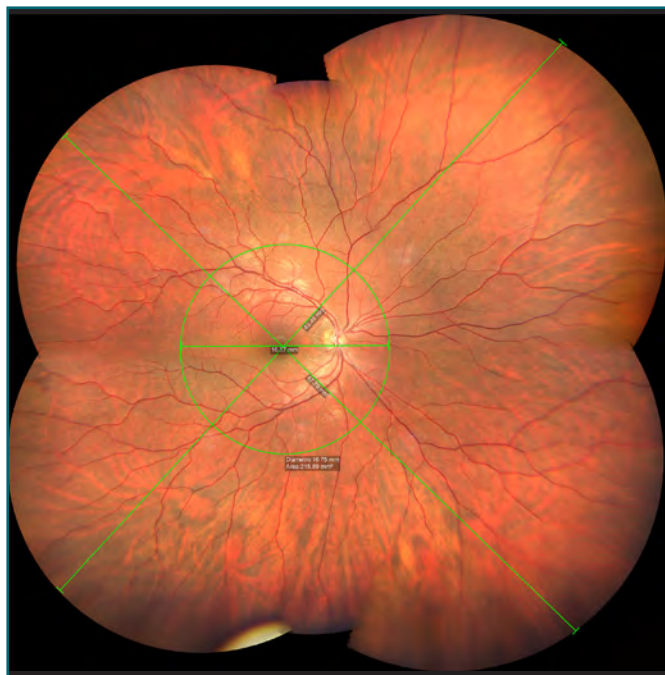


Fig. 14 - Six Shot con FoV fino a 267°. La lunghezza misurabile site to site è ~ 47/49 mm. Si può notare il confronto con l'area retinica ~ 45°

In particolare si è dimostrata l'associazione tra la non perfusione retinica periferica, con o senza neovasi presenti, e l'entità e la persistenza del DME [33, 34].

L'avvento della UWFA Ultra-Widefield Fluorescein Angiography ha permesso una più attenta valutazione dei processi vascolari corioretinici, indicando nuove vie di trattamento per il DME [35].

La modalità di trattamento laser denominata TRP Targeted Retinal Photocoagulation potrebbe sostituire nella DR avanzata con DME la panfotocoagulazione retinica e le inevitabili sue sequele.

Un trattamento selettivo delle aree retiniche sorgenti di VEGF suggerisce la positiva combinazione tra laser maculare, TRP e anti-VEGF [36].

Wessel *et al.* già nel 2012 hanno affermato l'importanza dell'imaging UWF, nonostante in un loro lavoro di revisione della classificazione della DR affermino che non esiste relazione tra l'entità dell'ischemia e lo spessore maculare. Terminano ribadendo l'efficacia del trattamento TRP step-wise per la regressione dei neovasi retinici, e che l'utilizzo dell'UWFA aumenta del 10% l'area retinica interessata da alterazioni vasali nella DR, non evidenziabile con FA [37, 38].

Gupta *V et al.* suggeriscono che l'utilizzo di UWFA può allargare la possibilità di diagnosi nelle uveiti posteriori rispetto alla FA [39].

Numerosi altri autori individuano l'importanza dell'imaging UWF/UWFA per monitorare le aree di attività infiammatoria recenti o pregresse nelle uveiti,

dimostrando la concordanza delle aree interessate con quelle scotomatose [40, 41].

Leder *HA e Mesquida et al.* hanno studiato e dimostrato l'utilità del UWF nelle vasculiti non infettive e nella Behçet.

I vasi retinici prequatoriali possono, dalle loro indagini e dalla letteratura, determinare spesso leakage, ischemia e NV, difficili da interpretare senza l'ausilio di una retinografia ad ampio campo [42, 43].

L'imaging UWF è stato molto apprezzato nelle occlusioni vascolari retiniche.

Prasad *et al.* già dal 2010 hanno studiato l'efficacia dell'UWFA nelle occlusioni di branca e emicentrali. Riferiscono che il UWF è essenziale per una migliore diagnosi, gestione e trattamento delle patologie vascolari, perché permette di individuare le aree non perfuse, delimitare in modo più accurato le aree target da fotocoagulare, aumentando la salvaguardia delle aree retiniche ancora perfuse [44].

Tsui *et al.* con l'imaging UWFA hanno cercato di stabilire un indice ischemico nelle occlusioni vascolari tra aree non perfuse e l'intera superficie retinica considerata, delimitando le aree ischemiche manualmente, con maggiore salvaguardia della retina sana [45].

Madhusudhan *S. e Beare N.*, dissertando sulla patogenesi della AMD, hanno confermato l'importanza dell'ipossia e dell'ischemia tissutale della retina periferica come fattori patogenetici della AMD e di NV [46].

Tan *CS et al.* confermando queste ricerche, ribadiscono che forse l'indice più sensibile per l'AMD neovascolare è il riscontro di leakage retinico, più agevolmente evidenziabile in periferia con UWFA. Concludono però dicendo che l'associazione tra la non perfusione periferica e l'insorgenza di NV non è finora adeguatamente supportata da una significatività statisticamente rilevante [47].

La retinopatia del prematuro ROP ha beneficiato da tempo dell'imaging WF con l'utilizzo della RetCam, in uso nei Servizi di Neonatologia dagli anni Ottanta.

Patel *CK et al.* in una loro recente pubblicazione affermano che le Skip areas possono essere più agevolmente evidenziate con UWFA e trattate con laser e/o anti VEGF [48].

Le neoplasie oculari primarie o secondarie sono spesso reperibili nella retina periferica.

Reznicek *L et al.* hanno confermato e revisionato, alla luce dell'UWF e dell'autofluorescenza, gli studi di Shields *et al.* del 1995 [49, 50].

Tali studi identificavano cinque criteri per la diagnosi differenziale tra melanoma maligno e nevo benigno della coroide: (1) la presenza di uno spessore > 2 mm, (2) fluido sottoretinico, (3) la presenza di sintomi

| System   | Fundus Illumination | Camera type                     | Field of view  | Available to buy? | Pro's   | Con's  |
|--|---------------------|---------------------------------|--|-------------------|---|--|
| 'Equator Plus' Pomerantzeff camera                   | Transscleral        | Contact                         | 148°   | No                | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ First wide-field system</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Not commercially available</li> </ul>   |
| Ret-Cam  | Transpupillary      | Contact                         | 130°   | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Portable</li> <li>■ Great on neonates and children</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Poor imaging through lens opacities</li> </ul>  |
| Heidelberg HRA / Spectralis with Staurenghl Lens     | Transpupillary      | Contact and non-contact options | 150°   | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ High resolution images</li> <li>■ Patient comfort as imaging less bright</li> <li>■ Video capabilities</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Contact poses a risk of corneal insult</li> <li>■ Limited to use by optometrist</li> </ul>  |
| Multi-image montaging with traditional fundus camera | Transpupillary      | Non-contact                     | Variable   | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Software modification of current system</li> <li>■ Easy-to-learn technique</li> <li>■ Auxiliary members of team capable of capturing images</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Requires dilation due to multiple flashes</li> <li>■ Artefacts</li> <li>■ Time consuming</li> </ul>                               |
| Eldon confocal scanner                               | Transpupillary      | Non-contact                     | 60° (H) x 55° (V) captured in a single exposure                              | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Fully automated or manual modes</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Lower field of view</li> </ul>  |
| Optos  | Transpupillary      | Non-contact                     | 200° with once exposure  | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Single image capture to achieve 200° image</li> <li>■ Easy to learn</li> <li>■ Fast image capture</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Pseudo-colour rendering</li> <li>■ Requires cooperative patient</li> <li>■ Artefacts (lids, lashes, lens and exposure)</li> </ul> |
| Clarus 500   | Transpupillary      | Non-contact                     | 133° (H) x 133° (V) in single exposure<br>200° (H) x 133° with two exposures | Yes               | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Easy-to-learn technique</li> <li>■ Auxiliary members of team capable of capturing images</li> <li>■ Fewer recaptures due to live IR view</li> <li>■ True colour images</li> <li>■ Anterior eye imaging including meibomian glands</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Two image captures required to achieve 200°</li> </ul>  |

Tabella 1 - Tabella riassuntiva con le caratteristiche di alcuni device WF e UWF

clinici, (4) la colorazione orange sulla superficie della neoformazione, (5) la localizzazione ad una distanza di 3 mm dal nervo ottico [51].

Utilizzando UWF per individuare le lesioni periferiche corioretiniche e l'intensità dell'autofluorescenza, meno evidente nei melanomi rispetto ai nevi della coroide, gli autori hanno precisato che UWF facilita la diagnosi differenziale, ed esalta degli aspetti oftalmoscopici di Shields e collaboratori [50].

Le performances dell'UWF hanno trovato positiva applicazione inoltre nella malattia di Coats [52], di Von Hippel-Lindau [53] e nel distacco di retina, con maggiori tutele anche in campo medico-legale.

### Prospettive future

L'imaging WF e UWF è ormai una realtà diagnostica, una rivoluzione nell'Oftalmologia mondiale, che ha contagiato anche degli angio-OCT.

Gli sviluppi futuri, sicuramente ancora più importanti e la diffusione sempre più capillare, determineranno

una più pronta diagnosi ed efficace prevenzione in molte malattie corioretiniche.

L'utilizzo di WF e UWF come esami imprescindibili in ogni visita oculistica si affermerà in tempi brevi, con benefici inestimabili in tutto il mondo e positive ricadute socio-economiche facilmente prevedibili.

La possibilità di un rapido sviluppo della telemedicina e di devices portatili come smartphone-based retinal camera con la trasmissione veloce e sicura dei dati digitali wireless, sicuramente potrà aiutare la diagnosi precoce anche nelle popolazioni lontane dai presidi sanitari d'eccellenza [54].

Lo sviluppo dell'UWF imaging, per ora non disponibile nei devices portatili, non potrà che aiutare il progresso nell'Oftalmologia, aumentando la sicurezza della diagnosi e favorendo le risposte terapeutiche più efficaci. ■

## REFERENCES

1. Jans Fromow-Guerra-. The evolution of Confocal Scanning Laser ophthalmoscop. *Retina Today*, sept 2012 63-4.
2. L. Howe. "Photographs of the interior of the eye". *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1887; 4:568-71.
3. Duke-Elder S. *System of Ophthalmology*; St. Louis: CV Mosby, 1961; Vol II:2-3.
4. Jackson W.T., Webster J.D. On Photographing the Retina on the Living Human Eye. *Photographer*, Philadelphia 1886;23:265-76.
5. Dimmer F. *Ueber die Photographie des Augnrhintergrundes.* Wiesbaden, Germany: Bergmann, 1907.
6. Dimmer F. *Der Augenspiegel und die Ophthalmoskopische Diagnostik.* Leipzig, Germany: F. Deuticke, 1921.
7. Dimmer F, Pillat A. *Atlas fotografischer Bilder des Menschlichen Augenhintergrundes.* Leipzig, Germany: F. Deuticke, 1927.
8. Nordenson J.W. *Augenkamera zum stationarem Ophthalmoskop von Gulstrand Berl. Dtsch. Ophthalm 1925; Ges. 45. 278.*
9. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00000151>.
10. Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Prepared by the Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21(1 Pt 2):1-226.
11. RH Webb, GW Hughes, O Pomerantzeff. Flying Spot TV Ophthalmoscope. *Appl Opt* 1980 Sep;19(17):2991-7.
12. <https://www.opticianonline.net/cet-archive/188>.
13. Clark TM. Retinal photography and angiography via film and digital imaging techniques. In: Arevalo JF, ed. *Retinal angiography and optical coherence tomography*, 1st ed. New York: Springer, 2008; chap. 1.
14. <https://www.aoa.org/Documents/CRG/Blue%20Light%20and%20Eye%20Damage.pdf>
15. Lotmar W. A fixation lamp for panoramic fundus pictures (author's transl) [in German]. *Klin Monbl Augenheilkd* 1977;170:767-74.
16. Pomerantzeff O. Equator-plus camera. *Invest Ophthalmol* 1975;14:401-06.
17. Schwartz SD, Harrison SA, Ferrone PJ, Trese MT. Telemedical evaluation and management of retinopathy of prematurity using a fiberoptic digital fundus camera. *Ophthalmology* 2000;107:25-8.
18. Wu C, Petersen RA, VanderVeen DK. RetCam imaging for retinopathy of prematurity screening. *J AAPOS* 2006;10: 107-11.
19. Azad R, Chandra P, Khan MA, Darswal A. Role of intravenous fluorescein angiography in early detection and regression of retinopathy of prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2008;45:36-9.
20. Pe'er J, Sancho C, Cantu J, et al. Measurement of choroidal melanoma basal diameter by wide-angle digital fundus camera: a comparison with ultrasound measurement. *Ophthalmologica* 2006;220:194-7.
21. Staurenghi G, Viola F, Mainster MA, et al. Scanning laser ophthalmoscopy and angiography with a wide-field contact lens system. *Arch Ophthalmol* 2005;123:244-52.
22. Spaide RF, Orlock DA, Herrmann-Delemazure B, et al. Wide-angle indocyanine green angiography. *Retina* 1998; 18:44-9.
23. ULTRA-WIDE IMAGING True colour ultra-widefield imaging is now a reality in practice, writes independent optometrist Craig McArthur. *PRODUCT FOCUS* 2018, 16 March [opticianonline.net](http://opticianonline.net).
24. <https://www.opticianonline.net/cet-archive/188>.
25. <https://eyetube.net/collection/zeiss-clinical/a-comparative-look-zeiss-clarus-500-versus-legacy-ultra-widefield-systems>.
26. Witmer MT, Parlitsis G, Patel S, Kiss S. Comparison of ultrawidefield fluorescein angiography with the Heidelberg Spectralis noncontact ultra-widefield module versus the Optos optomap. *Clin Ophthalmol* 2013;7:389-94.
27. Shoughy SS, Arevalo JF, Kozak I. Update on wide- and ultra-wide-field retinal imaging. *Indian J Ophthalmol.* 2015; 63:575-81.
28. Nagiel A, Lalane RA, Sadda SR, Schwartz SD. Ultra-widefield fundus imaging: a review of clinical applications and future trends. *Retina.* 2016;36:660-78.
29. Seidensticker F, Neubauer AS, Wasfy T, et al. Wide-field fundus autofluorescence corresponds to visual fields in chorioretinitis patients. *Clin Ophthalmol.* 2011.
30. [https://www.zeiss.com/content/dam/Meditec/us/products/clarus-500/brochures/zeiss\\_clarus\\_brochure\\_us-en\\_31\\_020\\_0005ii\\_web.pdf](https://www.zeiss.com/content/dam/Meditec/us/products/clarus-500/brochures/zeiss_clarus_brochure_us-en_31_020_0005ii_web.pdf)
31. [opticianonline.net](http://opticianonline.net); 1 *OPTICIAN PRODUCT FOCUS* 2018, 16 March.
32. Samir S Shoughy, J Fernando Arevalo, Igor Kozak. Update on wide-and ultra-widefield retinal imaging. *Indian J of Ophthalmology* 2015.
33. Patel RD, Messner LV, Teitelbaum B, Michel KA, Hariprasad SM. Characterization of ischemic index using ultra-widefield fluorescein angiography in patients with focal and diffuse recalcitrant diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2013;155:1038-44.e2.
34. Wessel MM, Nair N, Aaker GD, Ehrlich JR, D'Amico DJ, Kiss S. Peripheral retinal ischaemia, as evaluated by ultra-widefield fluorescein angiography, is associated with diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2012;96:694-8.
35. Tan CS, Sadda SR, Hariprasad SM. Ultra-widefield retinal imaging in the management of diabetic eye diseases. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2014;45:363-6.
36. Oliver SC, Schwartz SD. Ultra-widefield fluorescein angiography. In: Arevalo JF, editor. *Retinal Angiography and Optical Coherence Tomography.* New York: Springer Science and Business Media, LLC; 2009;407-17.
37. Wessel MM, Aaker GD, Parlitsis G, Cho M, D'Amico DJ, Kiss S. Ultra-wide-field angiography improves the detection and classification of diabetic retinopathy. *Retina* 2012;32:785-91.
38. Muqit MM, Marcellino GR, Henson DB, Young LB, Patton N, Charles SJ, et al. Optos-guided pattern scan laser (Pascal)-targeted retinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2013;91:251-8.
39. Gupta V, Al-Dhibi HA, Arevalo JF. Retinal imaging in uveitis. *Saudi J Ophthalmol* 2014;28:95-103.

## REFERENCES

40. Campbell JP, Leder HA, Sepah YJ, Gan T, Dunn JP, Hatef E, et al. Wide-field retinal imaging in the management of noninfectious posterior uveitis. *Am J Ophthalmol* 2012;154:908-11.e2.
41. Seidensticker F, Neubauer AS, Wasfy T, Stumpf C, Thureau SR, Kampik A, et al. Wide-field fundus autofluorescence corresponds to visual fields in chorioretinitis patients. *Clin Ophthalmol* 2011;5:1667-71.
42. Leder HA, Campbell JP, Sepah YJ, Gan T, Dunn JP, Hatef E, et al. Ultra-wide-field retinal imaging in the management of non-infectious retinal vasculitis. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2013;3:30.
43. Mesquida M, Llorenç V, Fontenla JR, Navarro MJ, Adán A. Use of ultra-wide-field retinal imaging in the management of active Behçet retinal vasculitis. *Retina* 2014;34:2121-7.
44. Prasad PS, Oliver SC, Coffee RE, Hubschman JP, Schwartz SD. Ultra wide-field angiographic characteristics of branch retinal and hemi-central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2010;117:780-4.
45. Tsui I, Kaines A, Havunjian MA, Hubschman S, Heilweil G, Prasad PS, et al. Ischemic index and neovascularization in central retinal vein occlusion. *Retina* 2011;31:105-10.
46. Madhusudhan S, Beare N. Wide-field fluorescein angiography in wet age-related macular degeneration. *The Scientific World Journal Vol* 2014, Article ID 536161,7 pages.
47. Tan CS, Heussen F, Sadda SR. Peripheral autofluorescence and clinical findings in neovascular and non-neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013;120:1271-7.
48. Patel CK, Fung TH, Muqit MM, Mordant DJ, Brett J, Smith L, et al. Non-contact ultra-widefield imaging of retinopathy of prematurity using the Optos dual wavelength scanning laser ophthalmoscope. *Eye (Lond)* 2013;27:589-96.
49. Reznicek L, Stumpf C, Seidensticker F, Kampik A, Neubauer AS, Kernt M. Role of wide-field autofluorescence imaging and scanning laser ophthalmoscopy in differentiation of choroidal pigmented lesions. *Int J Ophthalmol* 2014;7:697-703.
50. Shields CL, Shields JA, Kiratli H, De Potter P, Cater JR. Risk factors for growth and metastasis of small choroidal melanocytic lesions. *Ophthalmology* 1995;102:1351-61.
51. Kernt M, Schaller UC, Stumpf C, Ulbig MW, Kampik A, Neubauer AS. Choroidal pigmented lesions imaged by ultra-wide-field scanning laser ophthalmoscopy with two laser wavelengths (Optomap). *Clin Ophthalmol* 2010;4:829-36.
52. Kang KB, Wessel MM, Tong J, D'Amico DJ, Chan RV. Ultra-widefield imaging for the management of pediatric retinal diseases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2013;50:282-8.
53. Haddad NM, Cavallerano JD, Silva PS. Von hippel-lindau disease: A genetic and clinical review. *Semin Ophthalmol* 2013;28:377-86.
54. Maamari RN, Keenan JD, Fletcher DA, Margolis TP. A mobile phone-based retinal camera for portable wide field imaging. *Br J Ophthalmol* 2014;98:438-41.