



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
GASTROENTEROLOGIA

Ciclo XXVI

Settore scientifico disciplinare di afferenza MED/12

RUOLO DELL'ELASTOGRAFIA TRANSIENTE
(FIBROSCAN) EPATICA E SPLENICA NEL
PREDIRE LA SEVERITA' DI MALATTIA EPATICA
IN PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA POST-
VIRALE

Tesi di:

Claudia Terrani

Matricola R09070

Relatore: Chiar.mo Prof. Dario CONTE

Correlatore: Dott.ssa Mirella FRAQUELLI

1. INTRODUZIONE	2
ELASTOGRAFIA TRANSIENTE (FIBROSCAN®).ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.	
1.1. ASPETTI TECNICI.....	6
1.2. VALORI NORMALI DI STIFFNESS EPATICA.....	10
1.3. VALORI DI STIFFNESS EPATICA IN PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA.....	11
1.4. RUOLO DELL' ET NELL'INFEZIONE CRONICA DA HCV E HBV ...	12
1.5. RUOLO DELL' ET NELLA DIAGNOSI DI CIRROSI E DI IPERTENSIONE PORTALE.....	13
1.6. SEDI EXTRAEPATICHE DI MISURAZIONE COL FIBROSCAN.....	18
2. SCOPO DELLO STUDIO	17
3. PAZIENTI E METODI	18
3.1. PAZIENTI.....	18
3.2. METODI.....	19
3.3. ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	25
4. RISULTATI	25
5. DISCUSSIONE	40
6. BIBLIOGRAFIA	50

1. INTRODUZIONE

Basandosi sulla nota relazione tra malattia epatica cronica severa e splenomegalia, la misurazione dell'elasticità splenica potrebbe essere un'alternativa interessante e/o complementare all'elastografia transiente epatica per la valutazione della gravità della malattia cronica epatica.(7) L'ipertensione portale è una frequente complicazione della cirrosi, contribuisce allo sviluppo di ascite, varici esofagee, encefalopatia epatica. Per misurare il grado d'ipertensione portale bisogna misurare il gradiente pressorio della vena epatica (HVPG), che è una procedura invasiva, non routinaria, effettuabile solo in centri specializzati. Necessita quindi una metodica non invasiva e più maneggevole. Le relazioni tra la forma della milza e le sue dimensioni, l'epatopatia severa e l'ipertensione portale sono state confermate da uno studio parallelo su istologia epatica gradiente porto-cavale ed elastografia splenica, che si è pensato di utilizzare, come metodica predittiva non invasiva e semplice, per l'insorgenza d'ipertensione portale e di varici esofagee. Un ulteriore vantaggio dell'elastografia transiente splenica sarebbe di essere indipendente dal grado di degenerazione epatocellulare, dalla colestasi e dalla congestione della vena centrale lobulare, fattori, che invece influenzano il risultato dell'elastografia epatica.(8-14) Inoltre potrebbe aiutare l'identificazione di pazienti con patologie spleniche non correlate ad epatopatie quali le malattie ematologiche. Negli individui sani, l'elasticità splenica misurata sia con l'elastografia, che con la MR elastografia sembra indipendente dall'elasticità epatica e senza nessuna significativa correlazione tra l'indice di massa corporea, volume splenico e pressione arteriosa media (15).

In uno studio italiano su 100 pazienti cirrotici viene descritta, con un modello lineare, l'accuratezza con la quale l'elastografia epatica e quella splenica identifichino

pazienti con varici esofagee e abbiano valore predittivo per l'evoluzione dell'ipertensione portale. (19) Con questo studio abbiamo comparato pazienti con epatite cronica virale con pazienti ematologici e volontari sani per ottenere maggiori informazioni sulla predittività dell'elastografia transiente splenica della gravità delle epatopatie croniche.

ELASTOGRAFIA TRANSIENTE (FIBROSCAN)

La prognosi, la gestione clinica dei pazienti affetti da malattia cronica di fegato e le scelte terapeutiche dipendono in gran parte dalla presenza di fibrosi e dalla sua progressione nel tempo. E' quindi importante una diagnosi precoce e poco invasiva allo scopo di prevenire le complicanze della malattia.(varici esofagee ed ipertensione portale) Fino ad ora la biopsia epatica percutanea è considerata il *gold standard* per la diagnosi e la stadiazione dell' epatopatia cronica di fegato, perché permette di valutare e quantificare direttamente sia il grado di necroinfiammazione (*grading*), che di fibrosi (*staging*) e di analizzarne le caratteristiche , la distribuzione topografica, la presenza di steatosi, di depositi di ferro e la morfologia in toto della cellula.

Per quanto le linee guida indichino la biopsia epatica come strumento essenziale nella gestione del paziente con malattia cronica di fegato (4), la procedura bioptica è una procedura invasiva, complessa, eseguita sotto controllo ecografico e solo da personale medico specializzato, spesso dolorosa e può indurre complicanze come il sanguinamento e di conseguenza ha poca compliance da parte del paziente. La morbilità e la mortalità associate alle biopsie sono state stimate il 3% e lo 0.03% rispettivamente.(3/2). Inoltre, l'accuratezza della biopsia epatica è influenzata

dall'errore di campionamento, dall'adeguatezza del campione e dalla variabilità di interpretazione (con una percentuale di falsi negativi che può raggiungere, in alcune casistiche, anche il 20-30%) (5,6,7,8).

La fibrosi è stimata da diversi score istologici semiquantitativi. I più utilizzati per la valutazione dell'epatopatia cronica virale sono lo score di Ishak (tabella 2.) revisione dello storico sistema Knodell, e lo score METAVIR (tabella 1.) sistema più semplice e rivelatosi il migliore in termini di riproducibilità intra e interosservatore (9).

Tabella 1 – Classificazione istologica METAVIR.

Grading (Attività necroinfiammatoria)		
Necrosi "piecemeal"	+	Necrosi lobulare = Infiammazione
0 (assente)		0 (assente o lieve) A0
0		1 (moderata) A1
1 (lieve)		0,1 A1
0		2 (severa) A2
1		2 A2
2 (moderata)		0,1 A2
2		2 A3
3 (severa)		0,1,2 A3
Staging (Fibrosi)		
Assente		F0
Fibrosi portale		F1
Fibrosi portale con rari setti		F2
Fibrosi a ponte, numerosi setti		F3
Cirrosi		F4

Tabella 2 – Classificazione istologica di Ishak

Caratteristiche	Score	Descrizione
Necrosi periportale	0	Assente
	1	Lieve: piecemeal necrosis focale in alcuni spazi portali
	2	Lieve/moderata: focale nella maggior parte degli spazi portali
	3	Moderata: in < 50% degli spazi portali
	4	Severa: in > 50% degli spazi portali
Necrosi confluyente	0	Assente
	1	Focale
	2	Necrosi della zona 3 in alcuni spazi
	3	Necrosi della zona 3 in quasi tutti gli spazi
	4	Necrosi della zona 3 con alcuni ponti porto-centrali

	5	Necrosi della zona 3 con multipli ponti porto-centrali
	6	Necrosi pan-acinare o multi-acinare
Necrosi lobulare	0	Assente
	1	Lieve: 1 focus o meno per obiettivo 10X
	2	Lieve/moderata: 2-4 foci per obiettivo 10X
	3	Moderata: 5-10 foci per obiettivo 10X
	4	Severa: > 10 foci per obiettivo 10X
Infiammazione Periportale	0	Assente
	1	Lieve: cellule mononucleate in alcuni o tutti gli spazi portali
	2	Lieve/moderata: cellule in alcuni o tutti gli spazi portali
	3	Moderata/marcata: aggregati di cellule in tutti gli spazi portali
	4	Marcata: densi aggregati in tutti gli spazi portali
Fibrosi	0	Assente
	1	Fibrosi portale in alcuni spazi portali
	2	Fibrosi portale nella maggior parte degli spazi portali
	3	Occasionali ponti fibrosi porto-portali
	4	Marcati ponti fibrosi porto-portali
	5	Marcati ponti fibrosi ed occasionali noduli (cirrosi incompleta)
	6	Verosimile o certa cirrosi

Per ovviare agli svantaggi della procedura bioptica, negli ultimi decenni si sono studiati e si sono diffusi molteplici test non invasivi per diagnosticare e monitorare la fibrosi epatica. Tra questi, i più rilevanti nella comune pratica clinica, sono rappresentati dai markers biochimici, dall'ecografia e, negli anni più recenti, dall'elastografia transiente (ET). L'elastografia transiente (ET) mediante Fibroscan® (Echosens, Paris, France) è una tecnica non invasiva e semplice, che permette di valutare l'elasticità, o "stiffness" del parenchima epatico, quale indice indiretto di fibrosi epatica e quindi di severità dell'epatopatia (1,2,3).

E' stato ampiamente dimostrato che la stiffness epatica correla in maniera significativa con la stadiazione della fibrosi secondo METAVIR e ha una buona accuratezza nella valutazione dei gradi di fibrosi.

1.1 ASPETTI TECNICI

L'ET misura la velocità di propagazione di onde meccaniche in un tessuto omogeneo, quale il fegato, usando ultrasuoni pulsati, e un trasduttore ecografico per localizzare le onde elastiche nei diversi momenti. L'apparecchio (figura1.) è composto da una sonda (che contiene un trasduttore ecografico montato su un asse vibrante), da un sistema elettronico dedicato e da un'unità di controllo. Onde di ampiezza moderata a bassa frequenza sono trasmesse dall'asse vibrante e propagate all'interno del tessuto in esame. La velocità di propagazione è definita dal modulo elastico E (espresso come $E=3\rho V^2$, dove "V" è la velocità trasversale e "q" è la densità di massa, costante per i tessuti) ed è direttamente correlata con la consistenza del tessuto: più rigido è il parenchima, più velocemente l'onda si propaga, quindi tanto maggiore sarà il valore di stiffness misurato. Il range di misurazioni, espresso in kPa, varia da 2.5 a 75.0 kPa.

Queste rilevazioni sono effettuate a livello del lobo epatico destro, appoggiando l'estremità della sonda alla cute, due spazi intercostali sotto il margine sovraepatico superiore e all'incrocio della linea ascellare media e una linea trasversale passante

per il processo xifoideo, mentre il paziente si trova in decubito supino, con il braccio destro in massima abduzione, per facilitare l'accesso al quadrante superiore destro.

Figura 1. Elastografia transizionale o Fibroscan: strumentazione tecnica.



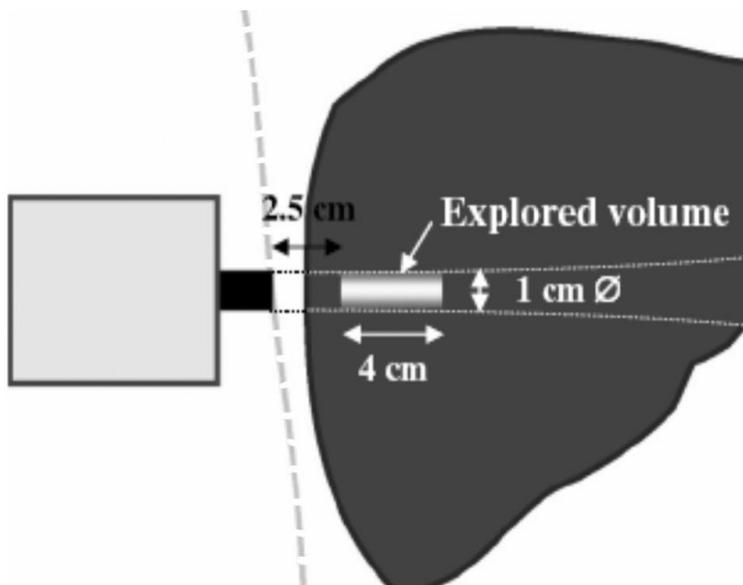


Figura 2. Rappresentata schematicamente in figura la sonda (in grigio) che viene posta sulla cute (linea tratteggiata). Si visualizza il lobo destro del parenchima epatico con definizione del volume esplorato tramite la sonda stessa.

Se le rilevazioni sono effettuate al di sotto di questo punto e troppo vicino al margine epatico inferiore, il valore mediano di stiffness tende a ridursi (13). Quando l'operatore ha individuato l'area migliore di campionamento, effettua una serie di acquisizioni mantenendo la sonda in posizione perpendicolare premendo il tasto della sonda. Il software dell'apparecchio stabilisce se l'acquisizione sia valida o meno, non riportando, in caso d'invalidità, alcun risultato. Il valore finale di stiffness risulta dalla mediana delle rilevazioni effettuate. L'esame è giudicato valido in base a due fondamentali parametri: il range interquartile (IQR) che esprime la variabilità tra le misure validate e il success rate (SR) ovvero il rapporto tra il numero di misurazioni valide e il numero totale di acquisizioni. Secondo la letteratura attuale e le raccomandazioni della casa produttrice, per ritenere attendibile l'esame, devono essere state effettuate almeno 10 misurazioni valide, il range interquartile non deve essere superiore al 30% del valore mediano (14) e il success rate deve

essere almeno del 60% (15). Un recente studio francese suggerirebbe come valore ottimale un range interquartile minore del 20% del valore mediano di stiffness ottenuto al termine dell' esame, al fine di ottenere una migliore concordanza tra risultati della biopsia e quelli dell' ET (16) eseguita nel punto standard di campionamento, accertandosi che la sonda sia mantenuta in posizione esattamente perpendicolare rispetto alla parete toracica e dopo avere escluso una significativa differenza di stiffness rispetto ad altre due posizioni. Il volume di parenchima campionato equivale a un cilindro di tessuto tra i 25 mm e i 65 mm sotto la cute, con base di 1cm e altezza di 4 cm (figura 2). Esso corrisponde circa all'1% del parenchima epatico ma a 100 volte il volume di un campione bioptico ed è quindi, rispetto a questo, molto più rappresentativo dell'intero parenchima (12).

La percentuale di risultati non adeguati riportati nelle diverse casistiche finora disponibile, varia dal 2 al 9.4% (18,19). I principali ostacoli ad un'adeguata esecuzione dell'esame sono rappresentati da un elevato indice di massa corporea (Body Mass Index $>28\text{Kg/m}^2$) (20), da spazi intercostali stretti e dalla presenza di formazioni cistiche molto ampie a livello del lobo destro; non è inoltre eseguibile in presenza di versamento ascitico. Nei pazienti obesi è l'accumulo di adipe a livello della cintura toracica, che ostacola fisicamente la penetrazione delle onde elastiche. La metodica non è eseguibile nei pazienti portatori di pacemaker ,di defibrillatori e nelle donne in gravidanza (tabella 3) in quanto non sono stati eseguiti studi in proposito.

Nel complesso l'esame, del tutto indolore, dura generalmente pochi minuti, viene eseguito in ambito ambulatoriale dopo un breve periodo di training (circa 100 esami) (15) ed il risultato è immediatamente elaborato e reso disponibile dal software.

L'interpretazione clinica dei risultati dell'ET dovrebbe però essere sempre riservata ad un medico esperto e formulata avendo a disposizione dati epidemiologici e parametri di laboratorio del paziente.

In uno studio condotto qualche anno fa dal nostro gruppo, si è osservata un'ottima riproducibilità della metodica sia in termini di accordo interosservatore, che intra-osservatore. I principali fattori, che determinano una significativa, per quanto lieve, riduzione della riproducibilità interosservatore, sono risultati un indice di massa corporea maggiore di 28 Kg/m², la presenza di steatosi epatica e un basso grado di fibrosi (<F2) (21).

Controindicazioni	Impossibilità ad eseguire l'esame (2-8%)
Gravidanza	Spazi intercostali stretti
Pace-maker Defibrillatore	BMI > 28 kg/m ²
Ascite	

1.2 VALORI NORMALI DI STIFFNESS EPATICA.

Sono stati eseguiti molti studi su pazienti con epatopatie croniche, ma vi sono pochi studi eseguiti su soggetti sani.

In letteratura sono apparsi quattro studi che hanno voluto analizzare quali fossero i valori di stiffness epatica in soggetti senza epatopatia.

Tabella 4. Valori di stiffness epatica (kPa) in tre studi effettuati in soggetti sani

	Corpechot C ^[11]	Roulot D ^[10]	Colombo S ^[12]
Number of subjects	71	429	327
Population	Healthy volunteers	Medical check-up	Blood donors
Mean stiffness (KPa)	4.8 (2.5-6.9) ¹	5.4 ± 1.5 ²	4.9 ± 1.7 ²
95th centile	-	8.6	7.8
Age	No effect	No effect	No effect
Gender	M > F	M > F	M = F
High BMI	Increased	Increased	Increased
Metabolic syndrome	-	Increased ³	-
Fatty liver	-	-	Increased ³

¹Range; ²Standard deviation; ³At multivariate analysis.

E' interessante notare come i valori medi di stiffness epatica nei tre studi siano di fatto sovrapponibili variando da 4.8 a 5.4 kPa valori intorno ai quali si pone il range di normalità (25); globalmente i livelli di stiffness sono maggiori nel sesso maschile rispetto al sesso femminile, non sembrano essere influenzati dall'età, mentre aumentano in presenza di elevati valori di BMI o in presenza di sindrome metabolica.

Tabella 5. Valori di stiffness (kPa) osservati e caratteristiche cliniche di 1001 donatori di sangue italiani.

	Femmine	Maschi
N	402	575
25th	3.4	4.0
50th	4.1	4.6
75th	4.8	5.6
95th	7.4	7.8

1.3 VALORI DI STIFFNESS EPATICA IN PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA

Le principali casistiche finora pubblicate hanno incluso soprattutto pazienti con infezione cronica da virus C o con malattia cronica di fegato ad eziologia mista, stabilendo come cut off per la presenza di fibrosi significativa ($F > 2$) valori di stiffness tra 7.1 e 8.7 kPa e tra 12.5 e 14.6 kPa per la presenza di cirrosi (27).

E' presente un' accuratezza diagnostica dell'ET rispettivamente nei casi di fibrosi significativa e di cirrosi, mentre l'accuratezza è minore in presenza di fibrosi lieve-moderata osservando inoltre un' evidente sovrapposizione dei dati negli stadi adiacenti di fibrosi.

1.4 RUOLO DELL'ET NELL'INFEZIONE CRONICA DA HCV E HBV.

La maggior parte degli studi sinora condotti e pubblicati hanno preso in esame pazienti affetti da epatiti croniche virali, evidenziando una stretta correlazione della stiffness epatica con lo score istologico METAVIR. Gli studi più numerosi prendono in esame pazienti con infezione da HCV. Ziol et al (27), mettendo a confronto i risultati dell'ET con quelli delle biopsie epatiche in 327 pazienti con infezione da HCV, propose 8.8 kPa come cut off corrispondente ad uno score di fibrosi severa (METAVIR F2) e 14.6 kPa come cut off correlato ad uno score di cirrosi (METAVIR F=4). Valutando inoltre, in pazienti con infezione da HCV, la performance diagnostica dell'ET rispetto a una combinazione di markers biochimici non invasivi come il (FibroTest [BioPredictive, France] e il rapporto tra AST e piastrine [APRI]) è emersa una superiorità dell'ET nella identificazione del grado di fibrosi epatica (30) e nel monitorare la progressione della fibrosi in corso di terapia antivirale. Uno studio su 211 pazienti trattati con interferoni peghilati e ribavirina (31) ha evidenziato la progressiva riduzione dei valori dell'ET in parallelo con l'effetto antifibrotico della terapia antivirale.

I dati relativi all'epatite cronica HBV-correlata sono meno numerosi ed ottenuti su casistiche, che comprendevano un numero esiguo di pazienti. Lo studio di Marcellin et al (32) ha mostrato che l'accuratezza diagnostica dell'ET nel predire i gradi di fibrosi epatica non è significativamente diversa da quella stimata su pazienti con infezione da HCV ma, rispetto a quest'ultima, i valori di cut off da tenere in considerazione sono sensibilmente più bassi in relazione alle caratteristiche di

macronodularità dell'epatite HBV-correlata, nella quale il minor numero di setti fibrosi spiega il valore leggermente inferiore di stiffness anche in corso di cirrosi.

1.5 RUOLO DELL'ET NELLA DIAGNOSI DI CIRROSI E DI IPERTENSIONE PORTALE

I risultati migliori dell'ET si hanno nella diagnosi di fibrosi severa e cirrosi (33) e dai dati della letteratura più recente, i valori di cut off che indicano cirrosi vanno da 12 kPa a 14.6 kPa (21,26). La ET appare inoltre più sensibile, se confrontata con altri test non invasivi, nella diagnosi precoce della cirrosi ed in questo modo, secondo alcune casistiche, è possibile evitare la biopsia epatica nel 90% dei casi, mentre la conta piastrinica, il FibroTest, l'indice protrombinico e l'APRI risparmierebbero rispettivamente 82%, 80% e 78% delle biopsie epatiche (34).

Indipendentemente dall'eziologia, l'evoluzione dell'epatopatia a cirrosi comporta il sovvertimento dell'architettura vascolare epatica, il rilascio di fattori vasoattivi e la costituzione di miocellule contrattili che, nel complesso, conducono a un aumento delle resistenze sinusoidali e infine all'instaurarsi dell'ipertensione portale, che è la più comune e grave complicanza della cirrosi, responsabile di un aumento significativo della morbilità e della mortalità, perchè associata alla formazione e al rischio di sanguinamento delle varici esofagee, all'insorgenza di ascite, alla suscettibilità ad infezioni batteriche e poi all'instaurarsi dell'encefalopatia epatica e della sindrome epatorenale.

L'ipertensione portale è definita da un gradiente venoso porto-epatico (HVPG) uguale o superiore a 5 mmHg. Questo gradiente rappresenta la differenza tra la pressione a livello della vena porta e quella esistente a livello delle vene

sovraepatiche ed è calcolato sottraendo alla *wedged hepatic venous pressure* (ovvero la pressione ottenuta ponendo un catetere in posizione di “blocco” a livello di un ramo periferico di una vena sovra epatica. La pressione nel distretto bloccato si equilibra rapidamente con quella portale permettendone quindi una valutazione indiretta ma fedele), la *free hepatic venus pressure* ovvero la pressione libera a livello delle vene sovraepatiche. Valori di HVPG tra 6 e 10 mmHg definiscono una condizione preclinica di ipertensione portale, ma essa diventa clinicamente manifesta per valori di HVPG superiori a 10 mmHg e si associa al rischio di comparsa e sanguinamento di varici esofagee già a valori tra i 10-12 mmHg (35,36). La principale procedura diagnostica finora utilizzata nella quantificazione dell’ipertensione portale è la misurazione pressoria tramite cateterismo, che consente di predire il rischio di sanguinamento, di scompenso ascitico e di progressione della malattia dopo trapianto. Si tratta però di una procedura altamente invasiva e poco vantaggiosa nell’ottica di un bilancio costi-benefici. Per questo negli ultimi anni si è cercato di introdurre nuove metodiche non invasive per valutare l’insorgenza di ipertensione portale e di varici esofagee. Tra queste la TC spirale, markers biochimici e l’elastografia transiente. La TC spirale (37), pur avendo una buona accuratezza diagnostica per varici di grosse dimensioni a rischio di sanguinamento (AUROC >0,90), si è rilevata inadeguata nella diagnosi di varici di piccole e medie dimensioni ed è comunque una tecnica costosa e associata all’uso di mezzo di contrasto e all’esposizione a radiazioni. Da un recente studio prospettico (38,39) su 311 pazienti con infezione cronica da HCV, la conta piastrinica e il diametro splenico hanno invece riportato un ottimo valore predittivo positivo e negativo (rispettivamente 100% e 94%) e un likelihood ratio (LR: rapporto di verosimiglianza) positivo di 2 per la presenza di varici in pazienti in buon compenso.

Questi risultati non sono stati però unanimemente dimostrati e richiedono ancora di una chiara validazione.

Anche l'elastografia transiente è stata proposta come metodica non invasiva nella stima del grado di ipertensione portale e diversi studi hanno cercato di valutare la possibile correlazione tra i valori di stiffness epatica e di HVPG (40,41). Significativi sono in particolare i dati pubblicati da Vizzutti et al (42), che esaminando 61 pazienti sottoposti alla misurazione dell'HVPG, osservano una correlazione lineare tra stiffness epatica e HVPG fino a 10 mmHg, mentre oltre questo valore non si osserva una correlazione statisticamente significativa. La spiegazione di ciò è verosimilmente attribuibile al fatto che, oltre un certo limite, l'ipertensione portale non è più causata soltanto e principalmente dalla deposizione di matrice fibrosa, ma piuttosto da fattori extraepatici quali la vasodilatazione splancnica, la circolazione iperdinamica e lo stato sodio ritenitivo (43). Inoltre lo studio attribuiva alla metodica un'alta sensibilità (90% usando un cut off di 17,6 kPa) ma una bassa specificità (43%) nello stimare la presenza di varici esofagee.

Analoghi risultati sono emersi da uno studio di Kazemi et al (44), focalizzato a valutare la capacità predittiva dell' ET per la presenza di varici esofagee sui dati di EGDS e l'ET di 140 pazienti stabilendo così un cut off di 20 kPa come predittivo di assenza di varici F2 e F3 e di varici del fondo gastrico, con un VPN del 99% e la possibilità di evitare l'esecuzione dell'EGDS nel 50% dei casi. Il successivo studio di Castera et al (45), su 298 pazienti, ha indicato 21.5 kPa come cut off ideale per la diagnosi di varici esofagee, portando la sensibilità della metodica a 76% e la specificità a 78%. Nel complesso, da una valutazione attenta di questi primi studi, risulta che l'elastografia transiente non ha una performance ottimale nella stima della presenza di varici esofagee, stimata in termini di area sotto la curva (AUROC), con

un range dai 0.76 a 0.84. Sebbene la sensibilità sia buona (tra il 70% e il 90%), la specificità e il valore predittivo positivo sono bassi (rispettivamente circa 60%-80% e 48%-54%) e comunque l'accuratezza è inferiore rispetto a test più semplici quali la conta piastrinica ed il diametro splenico. Inoltre da questi studi emerge un ampio range di cut off proposti, variando da 13.9 a 21.3 kPa per varici di qualunque dimensioni e da 19 a 30 kPa per varici F2. La letteratura attuale suggerisce quindi che le caratteristiche operative della ET per la diagnosi di ipertensione portale non sono ottimali (bassa capacità di esclusione e di conferma) e la non concordanza tra i vari studi ha al momento scoraggiato l'utilizzo della ET per selezionare i pazienti con varici esofagee.

1.6 SEDI EXTRAEPATICHE DI MISURAZIONE COL FIBROSCAN

Un ulteriore possibile e stimolante approccio diagnostico dell'ET riguarda il suo utilizzo nella misurazione della stiffness splenica ed una sua possibile correlazione con la severità di malattia epatica, visto il coinvolgimento splenico nella fase cirrotica di epatopatia.

A questo proposito l'unico studio, che a nostra conoscenza ha analizzato il problema, è uno studio siciliano (67) che ha misurato la stiffness splenica ed epatica in un gruppo di 144 pazienti con cirrosi HCV-correlata, tutti sottoposti ad EGDS come esame di riferimento nella diagnosi di varici e 18 di essi anche alla misurazione dell'HVPG. Dai dati ottenuti è emersa una correlazione significativa tra i valori di HVPG e stiffness splenica (con $r = 0,671$ e $p = 0.009$), nei 18 pazienti sottoposti a valutazione emodinamica. Inoltre è stata osservata una significativa differenza dei

valori di HVPG tra i pazienti (9) con stiffness splenica uguale a 75 kPa (valore massimale) e quelli con valori inferiori, rispettivamente 19.1 mmHg e 12.5 mmHg ($p=0,013$) senza invece significative differenze nei valori di bilirubina, albumina e INR. Tutti i 9 pazienti con stiffness splenica uguale a 75 kPa presentavano all'EGDS varici F2 e F3. Nel restante gruppo di pazienti il 55% presentava varici F1 e il 19,4% varici F2 o F3. L'AUROC della stiffness epatica e della stiffness splenica sono risultati analoghi (0.76 e 0.73) nel predire la presenza di varici esofagee ma la stiffness splenica si è rilevata superiore a quella epatica nel predire varici di grosse dimensioni (AUROC 0.84 vs 0.72). I valori ottimali di cut off della stiffness epatica e splenica per la diagnosi di cirrosi sono stati stimati essere rispettivamente 21 kPa (Sensibilità 71%, Specificità 72%) e 47 kPa (Sensibilità 79%, Specificità 70%). Dunque questo iniziale studio conclude per una significativa correlazione tra stiffness splenica e ipertensione portale e riconosce questo parametro come potenziale utile predittore della presenza di varici esofagee.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Come si è visto, i dati in letteratura riguardanti questo nuovo utilizzo dell'ET per la valutazione della stiffness splenica sono molto scarsi. Pertanto, prima di utilizzare questo strumento in ambito splenico, deve essere necessaria la standardizzazione della metodica valutando la riproducibilità intra- ed interosservatore e definendo i valori di normalità delle misurazioni spleniche.

Questo studio si è proposto di standardizzare la tecnica mediante l'analisi della frequenza e delle possibili cause di insuccesso dell'esame ed alla valutazione della

variabilità inter-osservatore e di valutare la predittività di entrambi i tipi di Fibroscan, splenico ed epatico, della gravità della malattia. Sono stati quindi analizzati i valori di stiffness epatica e splenica in un gruppo di pazienti con epatopatia cronica di differente gravità della malattia epatica e tali risultati sono stati comparati con quelli ottenuti in un gruppo di controllo costituito da volontari sani e con quelli ottenuti in un gruppo di pazienti con patologie ematologiche mieloproliferative, che danno un primitivo coinvolgimento splenico.

3. PAZIENTI E METODI

3.1 PAZIENTI

PAZIENTI AFFETTI DA EPATOPATIA CRONICA

Ai fini dello studio, tra gennaio 2010 e dicembre 2012, sono stati arruolati tutti i pazienti con epatite cronica B o C di età > 18 aa, che hanno eseguito una biopsia epatica parenchimale sia per diagnosi, che per un'eventuale valutazione di terapia antivirale, afferiti al Centro per lo Studio delle Malattie Epatiche A, Migliavacca della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

Criteri di esclusione sono stati considerati: epatopatie non ad eziologia virale, carcinoma epatocellulare, colangiocarcinoma, resezione o trapianto epatico e, per motivi tecnici, inerenti allo strumento Fibroscan, presenza di pacemaker, di sistemi di defibrillazione in situ, ascite e gravidanza. In totale sono stati inclusi nello studio 132 pazienti con epatopatia cronica, 48 con malattia ematologica e 64 volontari sani.

PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA MIELOPROLIFERATIVA CRONICA

Pazienti affetti da una fibrosi del midollo osseo classificata in accordo coi criteri WHO afferenti all'Unità di Ematologia della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

VOLONTARI SANI

Sono stati selezionati sulla base degli esami del sangue ed esaminati con ecografia addominale per escludere un'epatopatia o una malattia mieloproliferativa.

Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato, che è stato approvato dal comitato etico del nostro ospedale.

3.2 METODI

TEST DI LABORATORIO

Sono stati valutati: emocromo più formula leucocitaria, conta piastrinica (PLT, v.n. 130-400 $10^3/\text{mm}^3$), INR (v.n. 0.8-1.2) l'alanina aminotransferasi (ALT), l'aspartato aminotransferasi (AST) e la gamma glutamyltranspeptidasi (GGT) sieriche con un sistema automatico (v,r ALT e AST < 40 UI/L, GGT <50 UI/l.)

Gli antigeni di superficie HBsAG per l'epatite B , anticorpi per l'antigene core epatite B e gli anti HCV sono stati misurati con metodica ELISA .

HBV-DNA è stato eseguito con Amplicor HBV Monitor (Roche Diagnostic) HCV-RNA con (RT)-PCR adoperando primers del 5' regione non codificante con un L.L:D di 20 UI/ml.

ECOGRAFIA SPLENICA

Ciascun paziente è stato valutato ecograficamente allo scopo d' identificare la presenza di splenomegalia, misurando il diametro bipolare della milza in una scansione passante per l'ilo (figura 3), e l'eventuale presenza di circoli collaterali.

Il volume splenico è stato stimato in accordo con il calcolo convenzionale del volume di un elissoide ($0,52 \times W \times T \times L$, nel quale W= larghezza max, T = spessore e L = lunghezza) (20).

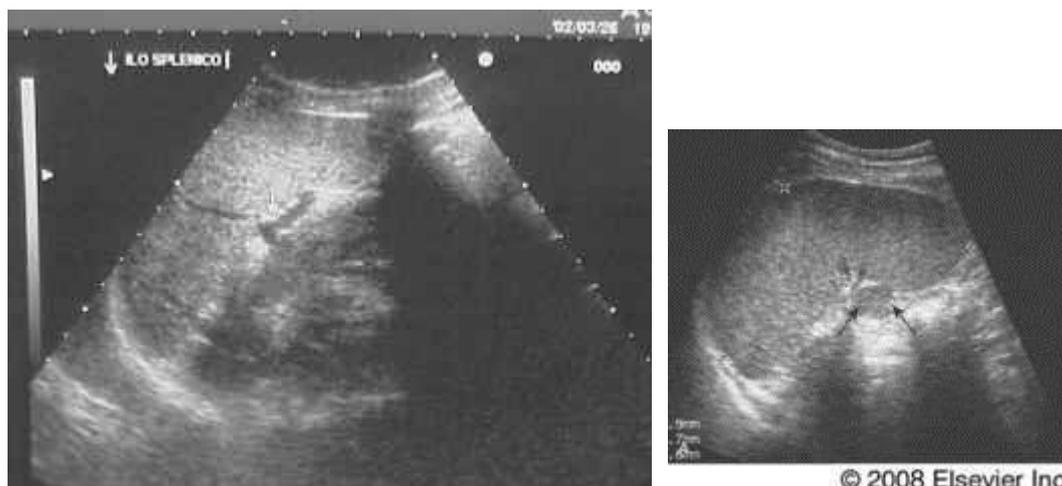


Figura 3. Immagini ecografiche della milza in scansioni passanti per l'ilo

ELASTOGRAFIA TRANSIENTE EPATICA

Tutte le misure sono state eseguite con lo strumento Fibroscan (Echosens, Paris, France) da 2 operatori indipendenti, in cieco rispetto ai dati clinici, sierologici ed istologici. Negli epatopatici cronici, il fibroscan è stato eseguito qualche ora prima della biopsia epatica. Le misurazioni sono state eseguite a livello del lobo epatico di destra attraverso uno spazio intercostale, con paziente in decubito supino e con il braccio destro in massima abduzione. Come precedentemente descritto, la punta

della sonda viene appoggiata sulla cute del paziente e l'operatore, una volta individuata sul monitor una traccia compatibile con parenchima epatico privo di strutture vascolari per una profondità di 6 cm, effettua le misurazioni. La profondità di misurazione corrisponde a 2.5-6.5 cm. La percentuale di successo (SR) dell'esecuzione è stata misurata come il rapporto tra il n delle misurazioni riuscite e quello totale. Il risultato è espresso come media del totale delle misurazioni in kilo Pascal (kPa). Sono state eseguite ripetute misurazioni in kilo-Pascal (kPa) fino ad ottenere almeno 10 valori validi su cui il software potesse calcolare il valore mediano, con un tasso di successo (success rate, SR) almeno del 60% ed un intervallo interquartile (IQR) considerato accettabile se inferiore ad 1/3 della mediana delle misurazioni.

Nel presente studio le performance diagnostiche della metodica sono state calcolate considerando valori di 7 kPa, 10 kPa e 12 Kpa come cut-off per la diagnosi, rispettivamente, di fibrosi significativa e fibrosi severa e cirrosi (tabella 6) utilizzando come reference standard l'esito istologico espresso secondo la classificazione Ishak (tabella 7). Il fibroscan non è stato ritenuto valido, se non è stato possibile ottenere nessuna misura.

ELASTOGRAFIA TRANSIENTE SPLENICA

Come nel caso del fibroscan epatico, le misure sono state eseguite da 2 operatori indipendenti, in cieco rispetto ai dati clinici, sierologici ed istologici. Il paziente è in decubito prono con le braccia stese in avanti e la punta della sonda è stata appoggiata sulla cute a livello di uno spazio intercostale. A differenza dell'elastografia del fegato, nel caso della milza non è stato possibile definire un punto di riferimento ideale sul quale porre la sonda per ottenere le misurazioni. Vi è infatti una variabilità

nella localizzazione splenica a seconda della costituzione fisica del soggetto. L'operatore appoggia la sonda a livello di uno degli ultimi spazi intercostali e, come per il fegato, ricerca un pattern compatibile con il parenchima splenico evitando le coste, il tessuto polmonare e le anse coliche. Nei pazienti con epatopatia cronica, il fibroscan splenico è stato eseguito dopo quello epatico e qualche ora prima della biopsia epatica. Tutte le misurazioni sono state eseguite con la sonda "M". Il punto di misura è stato identificato precedentemente dall'ecografia. Il tentativo di segnare con un pennarello il punto migliore di campionamento individuato tramite ecografia, si è rivelato invece poco utile, probabilmente a causa dello spostamento della milza nel passaggio dalla rilevazione ecografica in posizione supina all'esecuzione dell'elastografia in posizione prona. Un altro aspetto tecnico rilevante che è emerso durante l'acquisizione delle misure è stato la maggiore difficoltà nel reperire un punto adatto per il campionamento, che consentisse un corretto profilo di propagazione dell'onda e, di conseguenza, la necessità di angolare la sonda in modo da ottenere un pattern accettato dal software per il calcolo della stiffness. Verosimilmente questa difficoltà tecnica è dovuta alla posizione della milza non esattamente parallela alla parete toracica e allo spessore relativamente modesto della stessa (circa 6 cm) tale da non offrire una profondità sufficiente alla propagazione dell'onda, se non angolando adeguatamente la sonda poggiata sulla cute. La validità delle misure ha seguito gli stessi principi dell'elastografia epatica.

VALUTAZIONE CLINICA ANAMNESTICA

Sono stati registrati dati socio-demografici e clinici, tra cui età, sesso, peso, altezza ed indice di massa corporea (BMI).

ENDOSCOPIA E HVPG

A tutti i pazienti con diagnosi di cirrosi, confermata istologicamente, è stata eseguita un' EGDS. Le varici esofagee sono state classificate secondo le loro dimensioni: I grado piccole, strette; II grado allargate e tortuose, occupanti meno di un terzo del lume e III grado larghe, occupanti più di un terzo del lume.

ANATOMIA PATOLOGICA

La biopsia epatica percutanea eco-guidata è stata eseguita con ago 16 G. I campioni sono stati considerati adeguati se di lunghezza $\geq 1,5$ cm. In caso contrario il prelievo è stato ripetuto nella stessa seduta. I campioni sono stati fissati in formalina, posti in paraffina e colorati con ematossilina-eosina, con la colorazione tricromica di Masson e quella per la reticolina.

La lettura di tutti i preparati è stata condotta da un unico anatomo-patologo non informato sui dati clinici e laboratoristici dei pazienti. In questo modo sono state minimizzate le discrepanze inter-osservatore. Sono stati considerati idonei campioni di tessuto contenenti almeno 12 spazi portali. L'attività necroinfiammatoria (Grading) e l'entità della fibrosi (Staging) sono state determinate semi-quantitativamente secondo il sistema METAVIR illustrato in tabella 2 (vedi pagina 4). La steatosi è stata suddivisa arbitrariamente da 0 a 3 (**0**:<5%; **1**:6-24%; **2**:25-49%; **3**:> 50% di epatociti contenenti grasso).

Tabella 6 - Classificazione Staging secondo Ishak e METAVIR.

	Ishak	METAVIR
0	Assente	
1	Fibrosi portale in alcuni spazi portali	F0-1 Fibrosi assente-lieve
2	Fibrosi portale nella maggior parte degli spazi portali	F2-4 Fibrosi significativa
3	Occasionali ponti fibrosi porto-portali	
4	Marcati ponti fibrosi porto-portali	
5	Marcati ponti fibrosi ed occasionali noduli (cirrosi incompleta)	F3 Fibrosi severa
6	Verosimile o certa cirrosi	F4 Cirrosi

Tabella 7 – Tecniche non invasive: riassunto valori di cut-off utilizzati.

STIFFNESS (kPa)		
7	Ishak 2-3	Fibrosi significativa
10	Ishak 4-5	Fibrosi severa
>12	Ishak 6	Cirrosi

3.3. ANALISI STATISTICA DEI DATI

- L'accordo inter-osservatore per le misurazione della stiffness splenica è stato valutato calcolando i coefficienti di correlazione intraclasse (ICC con IC 95%).
- Il coefficiente di correlazione di Spearman è stato utilizzato per valutare la correlazione tra fibroscan, parametri istologici e biochimici
- Nei pazienti epatopatici le caratteristiche operative della stiffness epatica e splenica nel predire lo stadio di fibrosi sono state calcolate basandosi come reference standard sulla biopsia epatica.
- SAS software ha fornito l'analisi statistica.

4. RISULTATI

Globalmente sono stati studiati 244 soggetti; 132 con epatopatia cronica, 48 sindrome mieloproliferativa e 64 volontari sani. Su 22 pazienti epatopatici (16,6%), 12 pazienti con sindrome mieloproliferativa (25%) e 12 volontari sani (18%) non si hanno avuto risultati attendibili soprattutto per un elevato BMI >30% .La percentuale d'insuccessi nel fibroscan splenico è stato maggiore nei pazienti non cirrotici rispetto a quelli con cirrosi (20 18,8% vs 2 7.7% P<0,01).

PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA

110 pazienti hanno avuto un risultato attendibile con entrambe le elastografie, epatica e splenica. 65 maschi (60%) e 45 femmine (40%) età media 52 anni (30-75 aa). L'eziologia era rappresentata in 89 casi (81%) da epatopatia cronica da virus C,

in 21 casi (19%) da epatopatia cronica da virus B. Le caratteristiche demografiche e cliniche di questo gruppo sono riassunte nella tabella 6.

La media dei valori per il fibroscan epatico è risultata 10.5 kPa (range 3.2-51.5) e per quello splenico 37.1 kPa (range 15-75).E' stata trovata una correlazione significativa tra il fibroscan epatico e quello splenico ($r= 0.58$) $P<0,0001$ e $0.30, P<0.01$);

il fibroscan epatico, quello splenico e fibrosi epatica ($r=0.66$ e $0,55$ $P< 0,0001$ e $0,30$, $P <0,01$); fibroscan epatico e transaminasi (AST e ALT: $r= 0,23$ $P<0,01$ e $0,48$: $P< 0,0001$); fibroscan epatico e necroinfiammazione epatica ($r=0,30$; $P<0,001$).

Entrambi i fibroscan, epatico e splenico non correlano con età, sesso e BMI.

I valori del fibroscan splenico correlano col volume della milza ($r= 0,47$ $P < 0,01$) e sono inversamente correlati con la conta delle piastrine ($r= 0,48$, $P <0,01$).

Tabella 6 – Dati clinici e di laboratorio dei pazienti con epatopatia cronica.

Caratteristiche	Pazienti Epatopatici (n=110)
Età (media, range)	52, 30-75
HCV/HBV/	89/21
Uomini/Donne	65/55
Conta Piastrinica ($\times 10^3/L$)	173
AST (UI/L)	69
ALT (UI/L)	89
GGT (UI/L)	104
milza >12cm	38
BMI (kg/m)media	23

PAZIENTI CON SINDROME MIELOPROLIFERATIVA

36 pazienti (19 maschi, 17 femmine, 64 aa range 20-84) hanno ottenuto risultati attendibili per entrambi le tecniche.

-23 soffrono di mielofibrosi idiopatica

-8 policitemia vera

-5 trombocitemia essenziale

La media dei valori per il fibroscan epatico è risultata 7.2 kPa (range 3.7-19.2.) e per quello splenico 55.6 kPa (range 14-75).

I valori di stiffness splenica ed epatica non correlano tra loro o con età, sesso e BMI

Il valore di stiffness splenica correla significativamente con il diametro longitudinale ed il volume splenici. ($r= 0.39$ e 0.66 ; $P < 0,001$).

Il fibroscan splenico correla con la severità della fibrosi del midollo ($r= 0.64$; $P < 0.01$). Questa correlazione è più significativa nei pazienti con mielofibrosi rispetto a quelli con policitemia e trombocitemia essenziale.

Tutti i pazienti sono stati caratterizzati in accordo con la classificazione istologica per la fibrosi del midollo del WHO e nessuno presentava una trombosi dei vasi splenici. Le caratteristiche demografiche e cliniche di questo gruppo sono riassunte nella tabella 7.

VOLONTARI SANI

Sono stati ottenuti dati attendibili per entrambe le misurazioni di 52 volontari sani. (19 maschi e 33 femmine, età media 39 anni, range 24-55) La media dei valori per il fibroscan epatico è 4.7 kPa (range 2.6-7.6.) e per quello splenico, 25.7 kPa (range 9.4—65.2).

I valori di stiffness epatica e splenica non correlano tra loro né con l'età, sesso e BMI. La stiffness splenica non correla né con il volume né col diametro della milza. Tutti questi soggetti avevano recenti esami di routine (inferiori a sei mesi) nella norma soprattutto per quanto riguarda gli indici di funzionalità epatica ed emocromo e inoltre avevano un'ecografia epatica recente (inferiore a sei mesi) con assenza di steatosi di grado moderato o severo.

Le caratteristiche demografiche e cliniche di questo gruppo sono riassunte nella tabella 8.

BIOPSIA EPATICA

In tutti i 110 pazienti epatopatici è stato possibile eseguire la biopsia epatica. I campioni avevano una dimensione tra i 17 ed i 51 mm, con una media 33 mm. Tutti i preparati contenevano almeno 12 spazi portalì.

I risultati istologici dei 110 pazienti epatopatici sono descritti nella seguente tabella secondo la classificazione METAVIR

Grado di fibrosi	N. Pz (%)
F 0,1	38 (34)
F2	35 (32)
F3	11 (10)
F4	26 (23)
Necroinfiammazione	
A 0,1	57 (52)
A 2	38 (34)
A3	13 (12)
A 4-5	2 (2)
Steatosi	
0	66 (60)
1	38 (34)
2-3	6 (6)

Tabella 7. Dati clinici e di laboratorio dei pazienti con Sdr Mieloproliferativa

Caratteristiche	Pz con sdr mieloproliferativa (n=36)
Età (media, range)	64, 20-84
Uomini/Donne	19//17
BMI (kg/m ²) <25/≥25	23,6
Conta Piastrinica (x10 ³ /L)	362
AST (UI/L)	22
ALT (UI/L)	22
GGT (UI/L)	73
milza >12cm	28

Tabella 8 – Dati clinici e di laboratorio dei soggetti volontari sani

Caratteristiche	Volontari sani (n=40)
Età (media, range)	36 (24-55)
Uomini/Donne	19/33
BMI (kg/m ²)	21
AST (UI/L)	18
ALT (UI/L)	18
Diametro splenico	sempre <12cm

A differenza dell' ET eseguita sulla milza, le misurazioni della stiffness epatica sono state sempre eseguite con successo sia nel gruppo di pazienti con epatopatia cronica, che in quello con sindrome mieloproliferativa, che nei soggetti volontari sani.

Per quanto riguarda la riproducibilità della tecnica, i risultati inerenti l' accordo inter-osservatore delle misurazioni di stiffness splenica hanno evidenziato un'ottima riproducibilità della tecnica come riassunto in tabella.

In particolare i coefficienti di correlazione intraclasse (ICC) con i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) mostrano un'elevata riproducibilità soprattutto per il gruppo degli epatopatici e i pazienti con malattia ematologica.

Gruppi	ICC	95% IC
Controlli	0.863	[0.801 - 0.915]
Ematologici	0.908	[0.856 - 0.949]
Epatopatici	0.888	[0.843 - 0.927]

I valori di stiffness splenica in termini di media \pm DS, mediana e range sono risultati rispettivamente:

- Nei pazienti con epatopatia cronica \rightarrow 47.7 \pm 20.3 kPa, 45.7 kPa, range 14.6-75.0
- Nel gruppo di pazienti ematologici \rightarrow 54.0 \pm 19.5 kPa, 55.6 kPa, range 14.8-75.0
- Nei soggetti di controllo \rightarrow 27 \pm 11.5 kPa, 25.4 kPa, range 5.4- 58.3

I valori di stiffness epatica in termini di media \pm DS, mediana e range sono risultati rispettivamente:

- Nei pazienti con epatopatia cronica \rightarrow 17.4 \pm 13.7 kPa, 12.6 kPa, range 3.2- 58.3
- Nel gruppo di pazienti ematologici \rightarrow 8.3 \pm 4,1 kPa, 6.6 kPa, range 3.7-19.2
- Nei soggetti di controllo \rightarrow 4.9 \pm 1 kPa, 4.7 kPa , range 2.8-7.6.

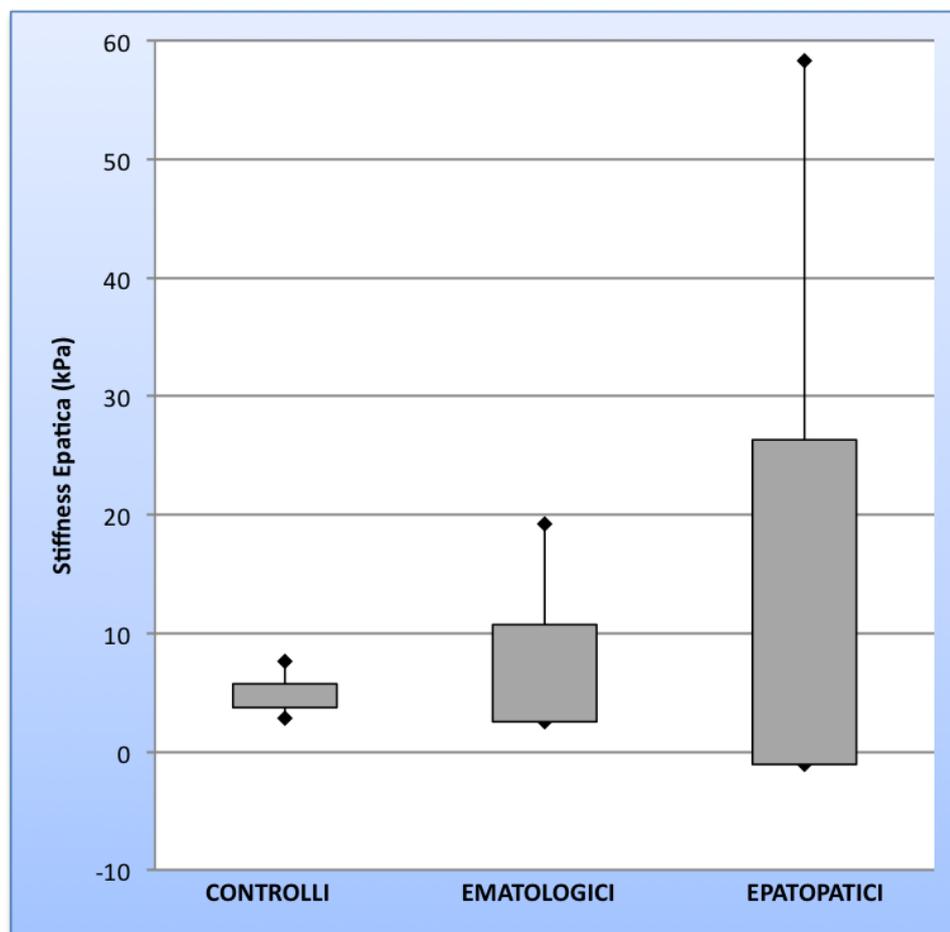
Tabella 11. Valori di Stiffness epatica (kPa) e splenica in popolazioni diverse di pazienti (mediana)

	Pazienti controllo	Pazienti con epatopatia cronica	Pazienti con Sindrome mieloproliferativa
Stiffness epatica	4,75 kPa	12,6 kPa	6,65 kPa
Stiffness splenica	25,4 kPa	45,7 kPa	55,6 kPa

Visualizzando graficamente la distribuzione dei valori di stiffness epatica e splenica, possiamo osservare la tendenza ad un progressivo aumento della stiffness sia epatica che splenica, dai soggetti volontari sani, nei quali si misurano i valori più bassi, ai pazienti epatopatici con HVPG alta, nei quali si misurano i valori più elevati di stiffness epatica e valori vicini ai massimali di stiffness splenica. Valori di stiffness intermedi a questi due estremi si hanno nei pazienti epatopatici in vari gradi di fibrosi e nei pazienti con sindrome mieloproliferativa.

Nelle figure 4 e 5 è rappresentata la distribuzione rispettivamente della stiffness epatica e splenica nelle coorti di pazienti in studio esprimendo i risultati in termini di mediana e di deviazione standard e visualizzando in ciascun gruppo il valore minimo e massimo di stiffness misurati.

Figura 4. Distribuzione dei valori di stiffness epatica.



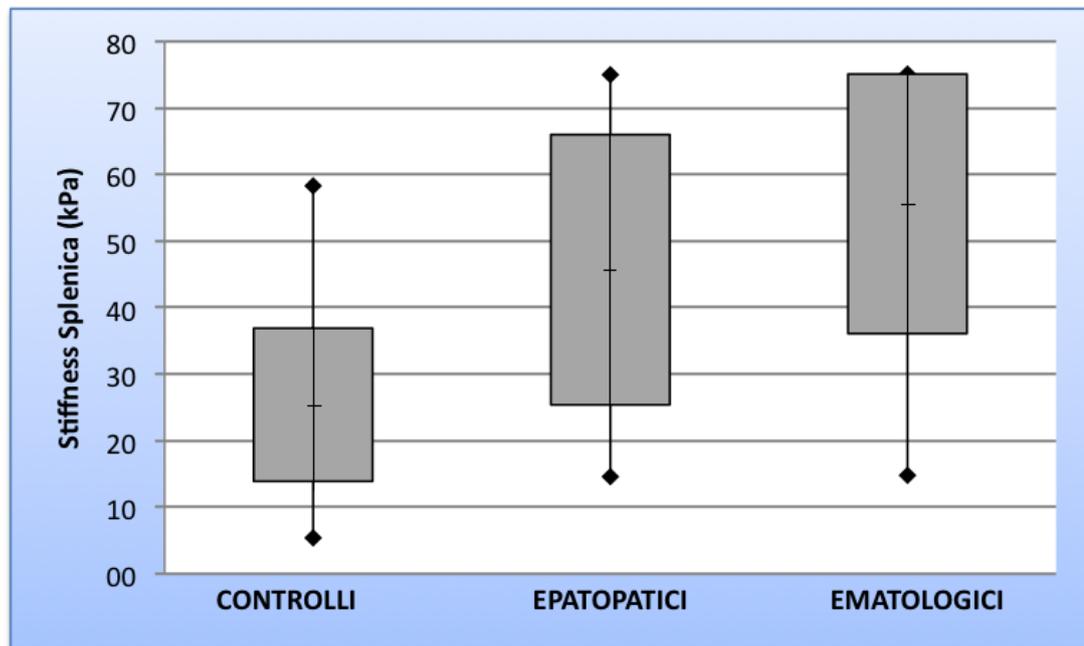
Nel grafico relativo alla distribuzione dei valori di stiffness epatica si sono calcolati i seguenti valori mediani:

- nei soggetti volontari sani → **4.7 kPa** (range 2.8- 7.6)
- nei pazienti con sindrome mieloproliferativa → **6.6 kPa** (range 3.7-19.2)
- nei pazienti con epatopatia cronica virale → **12.6 kPa** (range 3.2- 58.3)

Dunque, nonostante una certa sovrapposizione dei range di valori misurati nelle diverse coorti in studio, i valori medi di stiffness epatica si sono rilevati significativamente differenti tra i soggetti volontari sani e i pazienti con patologia

mieloproliferativa e soprattutto tra queste due prime popolazioni e i pazienti con epatopatia cronica.

Figura 5. Distribuzione dei valori di stiffness splenica



L'analisi dei dati relativi alle misurazioni della stiffness splenica hanno evidenziato una distribuzione con valori crescenti dai volontari sani ai pazienti epatopatici a quelli ematologici. I valori mediani calcolati per ciascun gruppo sono stati:

- nei volontari sani → **25.4 kPa** (range 5.4-58.3)
- nei pazienti con epatopatia cronica virale → **45.7 kPa** (range 14.6-75.0)
- nei pazienti con sindrome mieloproliferativa → **55.6 kPa** (range 14.8-75.0)

Dall'analisi dei dati emerge chiaramente che la distribuzione dei valori di stiffness splenica presenta ampi margini di sovrapposizione. Tuttavia, calcolando i valori mediani osserviamo che questi si discostano in modo significativo tra i soggetti volontari sani e i soggetti patologici. Le differenze più evidenti risultano tra i

soggetti sani e i pazienti epatopatici ($p=0.0001$) e tra soggetti sani e pazienti con sindrome mieloproliferativa ($p=0.0001$) mentre sono risultati non significativamente diversi ($p=0.124$) i valori di TE splenica tra pazienti epatopatici e pazienti ematologici.

Tabella 12. Valori di stiffness splenica in pazienti con epatopatia cronica e in pazienti sottoposti a misurazione dell'HVPG.

	Mediana	Valore minimo	Valore massimo
Pazienti con epatopatia cronica	43.1 kPa \pm 19.9	14.6 kPa	75.0 kPa
Pazienti con misurazione dell'HVPG	75.0 kPa \pm 13.4	45.0 kPa	75.0 kPa

Utilizzando il test di Spearman si osservata una buona correlazione tra valori di stiffness splenica e valori di stiffness epatica soltanto per quanto riguarda i pazienti con epatopatia cronica ($r=0.89$ $p= 0.001$) mentre i valori non sono risultati correlati negli altri due gruppi.

E' stata quindi valutata nei pazienti con epatopatia cronica l'accuratezza diagnostica sia della stiffness epatica, che di quella splenica nei predire lo stadio di fibrosi epatica utilizzando come reference standard la biopsia epatica.

Nelle due tabelle seguenti sono riportate le caratteristiche operative dei due test per la diagnosi rispettivamente di fibrosi significativa ($S \geq 3$) e per la diagnosi di cirrosi ($S \geq 5$). I risultati sono espressi come sensibilità, specificità, rapporto di verosimiglianza

positivo (LR+) e negativo (LR-), AUROC con i relativi intervalli di confidenza al 95%.

Pazienti con epatopatia cronica: diagnosi di fibrosi significativa (S \geq 3)

	Cut off (kPa)	Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	AUROC
SE	8.3	75.8 (56.5-89.7)	45.4 (16.7-76.6)	1.4 (0.7-2.7)	0.5 (0.2-1.2)	0.83 (0.68-0.93)
SS	30.3	86.2 (68.3-96.1)	63.6 (30.8-89.1)	2.3 (1.5-3.8)	0.2 (0.07-0.7)	0.76 (0.59-0.87)

Pazienti con epatopatia cronica: diagnosi di cirrosi (S 5-6)

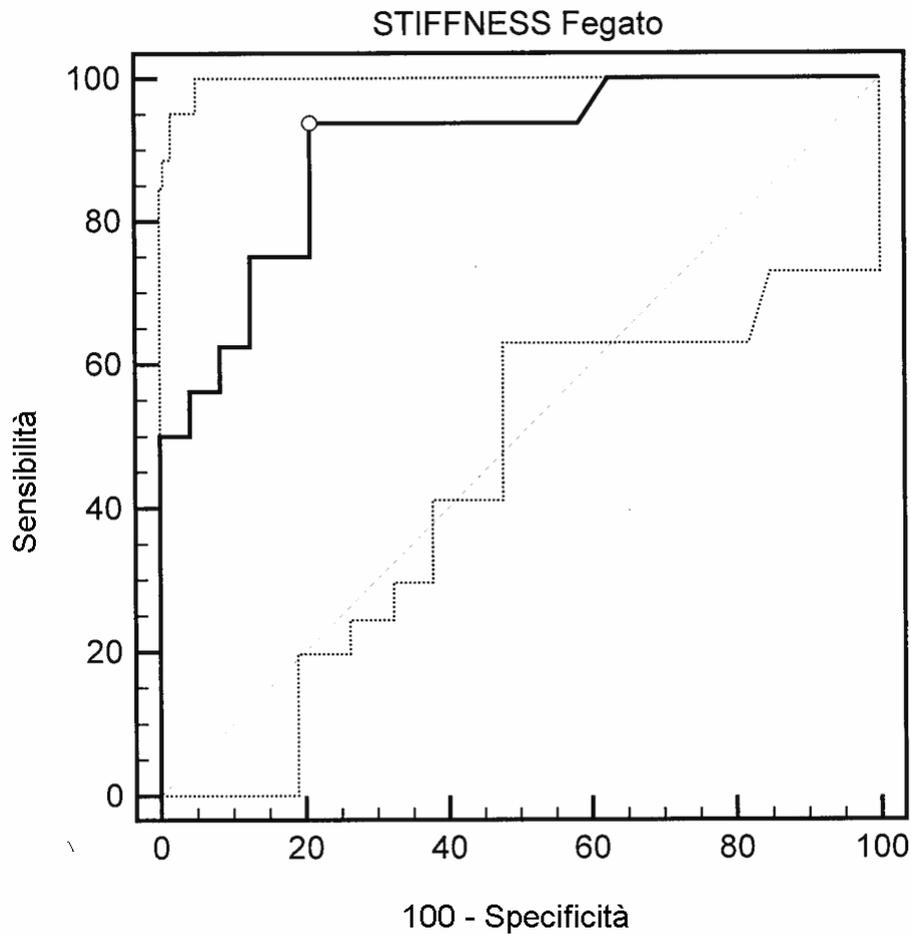
	Cut off (kPa)	Sens (%)	Spec (%)	LR+	LR-	AUROC
SE	11.6	93.7 (69.8-99.8)	79.1 (57.8-92.9)	4.5 (3.5-5.7)	0.07 (0.01-0.6)	0.90 (0.76-0.97)
SS	37.4	93.7 (69.8-99.8)	66.7 (44.7-84.4)	2.8 (2.1-3.8)	0.09 (0.01-0.7)	0.90 (0.71-0.95)

Nelle figure seguenti sono rappresentate le curve ROC dell' elastografia transiente epatica e splenica per la diagnosi di fibrosi significativa (figure 6 e 7) e per la diagnosi di cirrosi (figure 8 e 9).

La figura 6 mostra l'area sotto la curva (AUROC) della stiffness epatica nella diagnosi di fibrosi significativa istologicamente determinata. L'area sotto la curva è

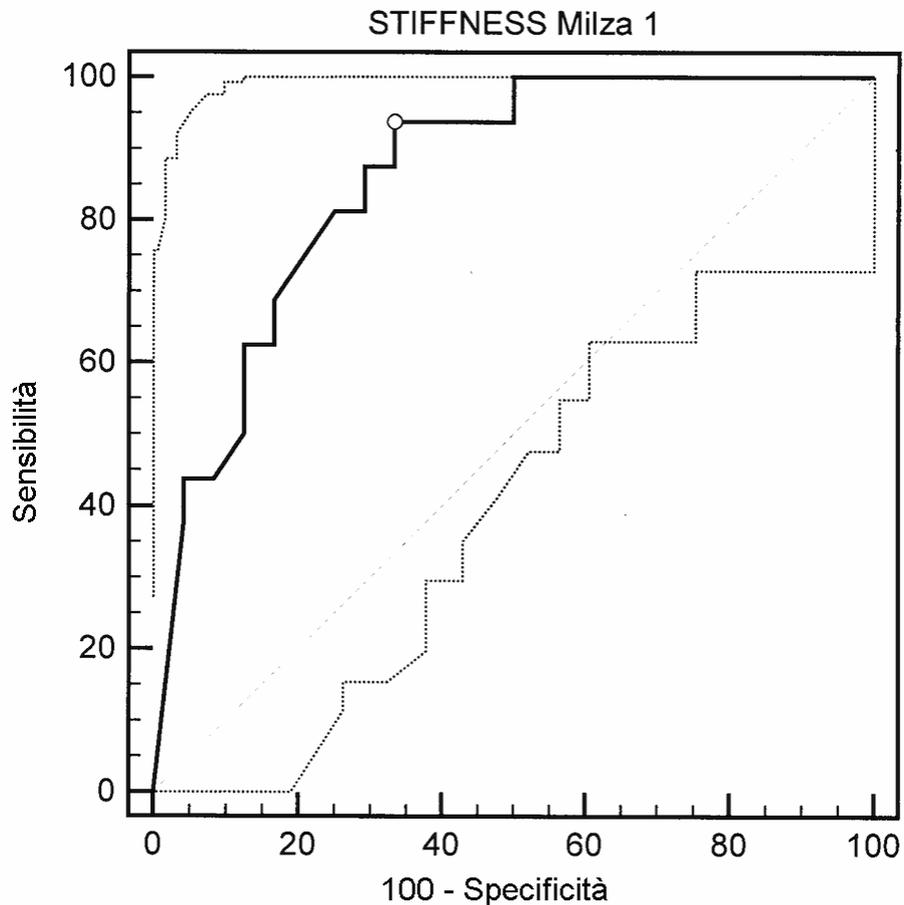
il più comune parametro che esprime l'accuratezza complessiva di un test diagnostico. Un' area pari ad 1 rappresenta un'accuratezza ottima, un' area di 0,5 rappresenta una accuratezza inadeguata. Un test si considera sufficientemente accurato se l' area sotto la curva raggiunge o si avvicina al valore di 0,90. L' AUROC dell'elastografia transiente epatica per la diagnosi di fibrosi significativa (S>3) è stata, nella nostra casistica, di 0,83 con intervallo di confidenza IC 95% di 0,69-0,93. Dunque si può ritenere che la stiffness epatica abbia una buona accuratezza nella stima di stadi significativi di fibrosi epatica. E' stato scelto come cut-off ottimale l'8.3 kPa per ottenere migliori valori di sensibilità e specificità risultati rispettivamente di 75.8% e 45.4%.

Figura 6. Curva ROC con IC 95% dell'elastografia transiente epatica per la diagnosi di fibrosi significativa ($S>3$) in 40 pazienti con epatopatia cronica virale.



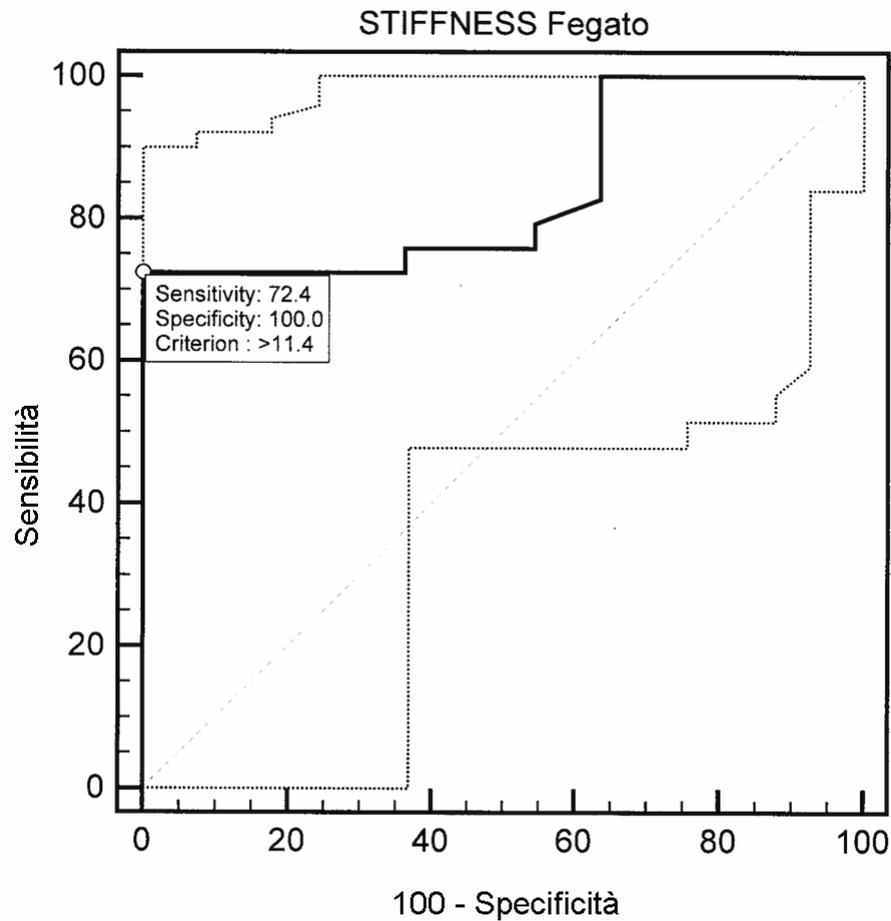
La figura 7 mostra l'area sotto la curva (AUROC) della stiffness splenica nella diagnosi di fibrosi significativa istologicamente determinata. L' AUROC dell'elastografia transiente splenica per la diagnosi di fibrosi significativa ($S>3$) è stata, nella nostra casistica, di 0,76 con intervallo di confidenza IC 95% di 0,59-0,87. Il cut off ottimale scelto è stato in questo caso di 30,3 kPa con valori di sensibilità e specificità rispettivamente di 86,2 % e 63,3%. Dunque anche la stiffness splenica ha una buona accuratezza nella stima di stadi significativi di fibrosi epatica.

Figura 7. Curva ROC con IC 95% dell'elastografia transiente splenica per la diagnosi di fibrosi significativa ($S>3$) in 40 pazienti con epatopatia cronica virale.



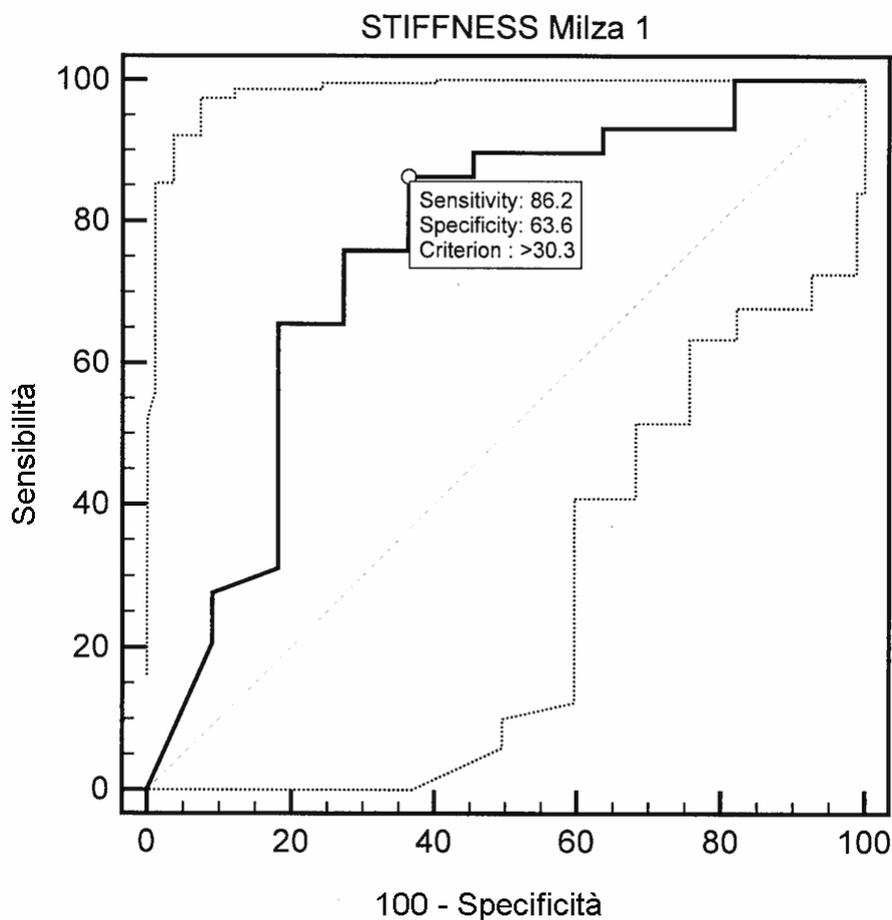
La figura 8 mostra l'area sotto la curva della stiffness epatica nella diagnosi di cirrosi ($S>5$). L'AUROC in questo caso è stato di 0,90 con un intervallo di confidenza IC 95% di 0.76 – 0.97. Il cut off ottimale scelto è stato di 11,6 kPa con valori di sensibilità e specificità risultati rispettivamente di 93.7% e 79.1%. Dunque la stiffness epatica nella nostro studio risulta avere un'ottima accuratezza nella stima di cirrosi.

Figura 8. Curva ROC con IC 95% dell'elastografia transiente epatica per la diagnosi di cirrosi (S>5) in 40 pazienti con epatopatia cronica virale.



Ed infine la figura 9 mostra l'area sotto la curva della stiffness splenica nella diagnosi di cirrosi (S>5). L'AUROC anche in questo caso è stato di 0,90 con un intervallo di confidenza IC 95% di 0.71 – 0.95. Il cut off ottimale scelto è stato di 37.4 kPa con valori di sensibilità e specificità risultati rispettivamente di 93.7% e 66.7%. Dunque, anche la stiffness splenica nella nostro studio, risulta avere un'ottima accuratezza nella stima di cirrosi.

Figura 9. Curva ROC con IC 95% dell'elastografia transiente splenica per la diagnosi di cirrosi (S>5) in 40 pazienti con epatopatia cronica virale.



5. DISCUSSIONE

L'elastografia transiente epatica è un'affidabile metodica non invasiva per la valutazione del grado di fibrosi e quindi della gravità della malattia nei pazienti epatopatici cronici ad eziologia virale. In questo studio è apparso evidente, che l'elastografia splenica è più soggetta, rispetto a quella epatica, a fattori interferenti

quali il grado di esperienza dell'operatore, la variabilità individuale delle strutture anatomiche (volume e dimensioni della milza , spazi intercostali stretti, obesità).

Il fatto che il fibroscan epatico correli con quello splenico solo nei pazienti epatopatici cronici ad eziologia virale, sottolinea l'importanza della fibrosi epatica nella fisiopatologia dell'ipertensione portale nella cirrosi. La correlazione tra la fibrosi epatica, l'ipertensione portale e la splenomegalia fa supporre il fibroscan splenico come test predittivo della severità dell'ipertensione portale nei pazienti cirrotici compensati e, di conseguenza, potrebbe rappresentare un'alternativa non invasiva all'EGDS per valutare la presenza di varici esofagee nei pazienti cirrotici.

In questo studio l'accuratezza diagnostica del fibroscan splenico nella diagnosi di cirrosi è stata eccellente, mentre per le varici esofagee, è stata subottimale, se valutata come singolo parametro , mentre il suo valore diagnostico è aumentato significativamente in combinazione col fibroscan epatico.

Ma il risultato più interessante è la capacità del fibroscan splenico sia come singolo parametro, che in coppia col fibroscan epatico, di diagnosticare le varici esofagee in pazienti cirrotici con un cut -off < 48 kPa. Questo è confermato anche dai lavori di Collecchia A et al., Stefanescu H et al., Bota et al.(69,70,71).

Malgrado manchino ancora dei dati sui pazienti a rischio di varici esofagee, appare concreta la possibilità di adoperare il fibroscan splenico come predittivo di varici esofagee nei pazienti con ipertensione portale al posto dell'EGDS.

Nei pazienti con sindrome mieloproliferativa invece non è stata possibile osservare una correlazione tra splenomegalia ed ipertensione portale , mentre è presente una correlazione con la gravità della malattia ematologica, in quanto causa di splenomegalia, aumento della vascolarizzazione, aumento della serie rossa e/o dei reticolociti.

Come supposto, non si è trovata nessuna correlazione tra il fibroscan splenico e le dimensioni/volume della milza nei volontari sani. Ciò ha confermato studi precedenti con MR elastografia (1-15).

La determinazione del fibroscan splenico è un importante passo avanti per una pre selezione di pazienti cirrotici, che abbisognano di un'EGDS per valutare la presenza di varici esofagee soprattutto in presenza d'ipertensione portale, che definisce una fase avanzata di cirrosi. Inoltre permetterebbe una migliore accuratezza diagnostica in tutti quei casi nei quali fattori metabolici o anatomici influiscono sul risultato del fibroscan epatico.

Con l'analisi multivariata, il fibroscan splenico è stato il migliore diagnostico per la cirrosi con un OR maggiore di 9.

I punti di forza di questo studio sono stati: l'arruolamento di un largo numero di pazienti, che nello stesso giorno hanno eseguito prima il fibroscan epatico poi quello splenico e, subito dopo, la biopsia epatica; la notevole riproducibilità dei risultati delle misurazioni del fibroscan e la correlazione coi risultati biotici per un'accurata stadiazione del grado di fibrosi epatica. Bisogna però tenere conto anche del punto debole di questa metodica: il 17% di dati non accettabili del fibroscan splenico per la difficoltà causata dalla diversa anatomia. Inoltre, è stato nostro intento valutare la riproducibilità dell'elastografia transiente nelle determinazioni spleniche, valutando l'accordo interosservatore, le percentuali di insuccesso dell'esame e definendo i valori normali della rigidità del parenchima splenico. In uno studio condotto nel 2007 dal nostro gruppo, la determinazione della stiffness epatica ha riportato un'ottima riproducibilità della metodica sia in termini di accordo interosservatore che intra-osservatore (21) con un ICC globale di 0.98 che risultava ridotto in casi di steatosi e in presenza di bassi gradi di fibrosi. In questo studio i coefficienti di correlazione

interclasse (ICC) per le determinazioni spleniche sono risultati 0.863 nei controlli, 0.908 nel gruppo dei paziente ematologici e di 0.888 nei pazienti con epatopatia cronica. Dunque è emerso che, al pari dell' elastografia epatica, anche l'elastografia splenica possiede una buona riproducibilità, soprattutto nei pazienti epatopatici e con malattia ematologica che presentano un significativo incremento delle dimensioni spleniche, mentre nei soggetti normali , con milza di dimensioni nei limiti, la riproducibilità è risultata lievemente, ma non significativamente inferiore.

Questo è un aspetto molto rilevante dei nostri risultati in quanto garantisce la affidabilità dell'esame.

Un secondo aspetto basilare che abbiamo voluto analizzare è stata la percentuale di insuccesso di questa nuova metodica per poter giudicare se essa possa essere applicata in un setting clinico su ampie coorti di pazienti. Dai dati presenti in letteratura, la percentuale di risultati non adeguati riportati nelle diverse casistiche, per quanto riguarda la stiffness epatica , varia dal 2 al 9.4% (18,19). I fattori associati ad insuccesso sono stati analizzati in uno studio francese che ha osservato quale più importante variabile associata all'insuccesso della tecnica un elevato indice di massa corporea (Body Mass Index $>28\text{Kg/m}^2$) (20).

Nella nostra casistica per quanto riguarda la stiffness epatica non abbiamo registrato alcun insuccesso mentre, per quanto riguarda la milza, le percentuali di insuccesso osservate sono state del 13% nel gruppo dei controlli, 18% nel gruppo dei pazienti con malattia mieloproliferativa e 27% nel gruppo dei pazienti con epatopatia cronica. Queste percentuali sono globalmente maggiori a quanto osservato per le misurazioni epatiche, il che non è inatteso in quanto la milza, sia per le dimensioni che per la disposizione anatomica, è meno facilmente campionabile rispetto al fegato

Inoltre, un recente lavoro di Castera et al. (67) , effettuato su oltre 13.000 pazienti, ha riportato anche per la stiffness epatica una percentuale di insuccesso pari al 18% (considerando in questa percentuale sia i pazienti in cui non era ottenibile alcuna misurazione, che quelli con success rate <60% e/o range interquartile >30%). Dunque le percentuali di insuccesso delle misurazioni spleniche nel nostro studio, calcolate come numero di esami non adeguati per SR% e/o IQR sul totale di esami effettuati per ciascun gruppo, risultano del tutto sovrapponibili a quelle emerse da questo ultimo studio su ampia casistica. Mentre il fallimento dell'esame, inteso come impossibilità ad effettuare neppure una rilevazione valida, è risultato essere del 4.7% nei pazienti epatopatici, del tutto analogo al dato riportato in letteratura.

La percentuale di esami inadeguati nei pazienti con patologia mieloproliferativa, è risultata lievemente inferiore rispetto a quella dei pazienti epatopatici (18% vs 24%). Anche questa osservazione potrebbe essere legata al fatto, che la maggioranza dei pazienti con patologia ematologica, presentava un' importante splenomegalia (di cui la metà con diametro bipolare >20 cm) e questo ha facilitato il campionamento del parenchima splenico rispetto a quello dei pazienti epatopatici, nei quali solo il 42% dei casi presentava una lieve splenomegalia.

Dopo avere stabilito una buona riproducibilità della metodica e una percentuale di insuccesso decisamente accettabile, abbiamo voluto definire quali fossero i valori normali di stiffness splenica.

Per quanto riguarda la stiffness epatica, in letteratura sono presenti al momento quattro studi che hanno voluto analizzare quali fossero i valori di rigidità del fegato in soggetti sani (22, 23, 24, 25). I valori medi di stiffness epatica ottenuti in queste casistiche sono di fatto sovrapponibili, variando da 4.8 a 5.4 kPa, valori intorno ai quali si pone il range di normalità.

Per quanto riguarda la stiffness splenica invece è presente in letteratura soltanto uno studio (66) sottoforma di abstract che ha indagato la stiffness splenica solo in pazienti con epatopatia cronica avanzata fino allo sviluppo di ipertensione portale e sottoposti a misurazione dell'HVPG. Il dato conclusivo riportato è stato una buona correlazione del grado di ipertensione portale coi valori di stiffness splenica. Nessuno studio in letteratura ha però ancora valutato quale sia il range di normalità della stiffness splenica e in che modo vari nei pazienti epatopatici in differenti stadi di fibrosi.

Dai risultati del nostro studio, il primo aspetto rilevante chiaramente emerso, è stato osservare, che i valori di stiffness splenica dei controlli sani sono notevolmente e significativamente inferiori rispetto a quelli ottenuti nei pazienti sia con patologia epatica cronica, che ematologica mieloproliferativa. I valori mediani calcolati sono infatti di 27 kPa, 47.7 kPa e 54 kPa rispettivamente nei controlli, nei pazienti epatopatici e nei pazienti con sindrome mieloproliferativa.

I valori mediani calcolati di stiffness epatica sono stati invece di 4.7 kPa, 6.6 kPa, 12.7 kPa rispettivamente nei controlli, nei pazienti ematologici e nei pazienti con epatopatia.

Una prima evidenza è, che i valori di stiffness epatica dei pazienti ematologici sono ai limiti superiori di norma, mentre i valori di stiffness splenica sono chiaramente elevati rispetto ai controlli, ma anche rispetto ai pazienti epatopatici. Dunque in tale gruppo non vi è una correlazione tra valori di stiffness epatica e splenica e soltanto quella splenica appare suggestivamente patologica; questo dato è verosimilmente attribuibile all'iniziale esclusivo interessamento splenico della malattia mieloproliferativa.

L'esistenza di una correlazione tra stiffness epatica e splenica è stata invece osservata esclusivamente nel gruppo di pazienti con epatopatia cronica. Questo riscontro ci ha suggerito la possibilità che, in aggiunta alla stiffness epatica, anche la stiffness splenica possa rappresentare un indicatore indiretto del grado di fibrosi e conseguentemente della severità e dell'avanzamento della malattia epatica. L'aumento della stiffness splenica potrebbe riconoscere uno stato preclinico di congestione splenica da iniziale ipertensione portale correlata con il grado di aumentata consistenza epatica.

Allo scopo di valutare la capacità predittiva della stiffness splenica abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica nel predire lo stadio di fibrosi epatica utilizzando come reference standard la biopsia epatica. La stessa valutazione è stata eseguita sui valori di stiffness epatica sempre sui pazienti con malattia di fegato cronica. Per quanto riguarda questo ultimo punto in letteratura sono state pubblicate tre metanalisi .

Dalla prima metanalisi di Talkwalkar (28) su 7 studi che consideravano pazienti affetti da epatopatia cronica con differente eziologia, il valore "pooled" ottenuto rilevava un' elevata accuratezza diagnostica nei casi di fibrosi severa-cirrosi mentre l'accuratezza era inferiore nei casi di fibrosi lieve. Anche la successiva metanalisi di Friedrich-Rust (14) ha confermato un'accuratezza diagnostica elevata nell'identificare gli stati più avanzati di fibrosi mentre l'accuratezza nel predire gli stati lievi e moderati è relativamente inferiore con evidente sovrapposizione dei dati negli stati di fibrosi intermedia. Per la diagnosi di fibrosi significativa ($F \geq 2$ o $S \geq 3$) con un cut off tra 7-8 kPa i valori risultavano di 70% di sensibilità, 84% di specificità, mentre con cut-off tra gli 11e 17 kPa, per la diagnosi di cirrosi ($F=4$) i valori "pooled" ottenuti erano del 91% per la sensibilità, del 87% per la specificità. Un ulteriore importante risultato di queste metanalisi come di altri studi primari

presenti in letteratura, è che l'eziologia rappresenta un importante fattore di eterogeneità e da ciò si evince la necessità di stabilire differenti cut-off a seconda dell'eziologia sottostante.

La terza metanalisi presente in letteratura (67) ha confermato valori analoghi di sensibilità e specificità ribadendo il fatto che le migliori performance dell'ET si hanno per la diagnosi di fibrosi severa e cirrosi (33) e che, dai dati della letteratura più recente, possibili valori di cut off per la cirrosi vanno da 12 kPa a 14.6 kPa (21,26).

Nel nostro studio abbiamo calcolato le caratteristiche operative sia della stiffness epatica, che splenica per la diagnosi rispettivamente di fibrosi significativa ($S \geq 3$) e per la diagnosi di cirrosi ($S \geq 5$).

Per quanto riguarda la diagnosi di fibrosi significativa, la sensibilità della stiffness epatica, ottenuta dal nostro studio, con un cut off di 8.3 kPa, è risultata del 75,8 % e la specificità del 45.4%. Dunque anche il nostro studio ha confermato una sensibilità buona se pur non ottimale nella stima di gradi significativi di fibrosi, confermando i dati già riportati dal nostro gruppo in studi precedenti (21).

Allo stesso modo anche per la diagnosi di fibrosi severa - cirrosi, la sensibilità della stiffness epatica ottenuta dal nostro studio, con un cut off di 11.6 kPa, è risultata del 93.7 % e la specificità del 79.1%.

Per quanto riguarda invece l'accuratezza diagnostica della stiffness splenica nella stadiazione del grado di fibrosi, che rappresenta il vero elemento di novità dello studio, i risultati ottenuti hanno evidenziato utilizzando con un cut-off di 30.3 kPa nella diagnosi di fibrosi significativa ($S > 3$) una sensibilità della stiffness splenica addirittura superiore a quella epatica e cioè dell' 86.2% (vs 75.8%). E superiore è stata anche la specificità (63.6% vs 45,%) indicando che la anche la stiffness

splenica oltre quella epatica può essere utilizzata come predittore di fibrosi significativa. Questi risultati si consolidano, diventando ancor più significativi se consideriamo la diagnosi di fibrosi severa-cirrosi

A questo proposito la sensibilità della stiffness splenica, utilizzando un cut off di 37.4 kPa è risultata del 93.7 %, quindi del tutto identica a quella della stiffness epatica e la specificità del 66.6% cioè di poco inferiore a quella epatica.

In sintesi, nel paziente con epatopatia cronica, la stiffness splenica si è dimostrata essere uno strumento capace di riconoscere con sensibilità buona e perfino superiore a quella della stiffness epatica, la presenza di fibrosi significativa e con sensibilità ottima, non inferiore a quella della stiffness epatica, la presenza di stadi avanzati di fibrosi-cirrosi. E' molto verosimile, che applicando consecutivamente la stiffness splenica a quella epatica, usate consequenzialmente in un apposito algoritmo, possa aumentare ulteriormente l'accuratezza dell' elastografia transiente nella stima e nella stadiazione della fibrosi.

Quindi anche se si tratta di risultati ancora preliminari e che dovranno essere confermati in una casistica più ampia, possiamo affermare che la stiffness splenica sia un' indicatore affidabile della severità di malattia di fegato e che possa esprimere ugualmente o forse meglio della stiffness epatica la stadiazione della fibrosi.

Passando quindi ad analizzare i valori di stiffness ottenuti nei pazienti con patologia mieloproliferativa, si è già detto che il valore mediano di stiffness epatica calcolato è stato di poco superiore a quello del gruppo di controlli mentre quello di stiffness splenica di 55.6 kPa, risultando più' elevato sia del valore mediano del gruppo di controlli (25.4 kPa) che del gruppo di epatopatici (45.7 kPa). Questo rilievo non è inatteso visto che questi pazienti, data la loro patologia, hanno un' iniziale esclusivo interessamento splenico. Anche in questo caso i dati del nostro studio sono ancora

preliminari, ma è ragionevole pensare che, in questa categoria di pazienti, la stiffness splenica possa essere utilizzata per monitorare sia l'attività di malattia che eventualmente la risposta al trattamento.

1. Sanada M, Ebara M, Fukuda H, Yashikawa M, Sugiura N, Saisho H, et al. Clinical evaluation of sonoelasticity measurement in liver using ultrasonic imaging of internal forced low-frequency vibration. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:1455-60.
2. Sandrin L, Tanter M, Gennison JL, Hatlin S, Fink M. Shear elasticity probe for soft tissues with 1-D transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr freq Control* 2002;49:436-46.
3. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Catheline S, Fink M. Transient elastography: a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1705-13.
4. Rockey DC, Aldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver Biopsy. *J Hepatology* 2009;49:1017-44.
5. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver Biopsy. *New Engl J Med* 2001;344:495-500.
6. Saadeh S, Cammell G, Carey WD, Younossi Z, Barnes D, Easley K. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *J Hepatology* 2001; 33:196-200.
7. Piccino F, Sagnelli E, Pasquale G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68, 276 biopsies. *J Hepatol* 1986; 2:165-73.
8. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis c. *J Hepatology* 2003; 38:1449-57.
9. Bedossa P, Poinard T. An Algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis c. The Metavir cooperative Study Group *Hepatology* 1996; 24: 289-93.
10. Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, et al. Sampling variability and its influence of the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986; 1. 523 - 5.
11. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patient with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2614 – 8.
12. De Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography. *Gastroenterologie e Clinique et Biologique* Vol 32; 651: 58-67 Set 2008.
13. Abergel A, Bonny C, Nicolas C, Randl K, Nicolas C, Roszyk L, Noirefals C, Massoulier S, Chauterame B, Sapin V, Bommelaer G, Fibroscan measures according to intercostal space: validity and concordance. *J Hepatol* 2008 ; 48 Suppl 2 : S268.

- 14.** Friedrich – Rust M, Ong Mf, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zenzenis Hermann E. Performance of TE for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 134 : 960_974355:887-91.
- 15.** Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Zioli M, Beaugrand M, De Ledinghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol.* 2007; 46 Suppl: A318.
- 16.** Lucidarme D, Foucher J, Le Bail B, Castera L, Villars S, Forzy G, Filoche B, Coizigou P, De Ledinghen V. Ratio interquartile range/median value of liver stiffness measurements is a key factor of accuracy of transient elastography (FIBROSCAN®) for the diagnosis of liver fibrosis. *Hepatology* 2007; 46 Suppl: A318.
- 17.** Ingiliz P, Pav Chhay K, Munteanu M, Lebrary P, Ngo Y, Roulot D, Benhamou Y, Thabut D, Ratzu V, and Poinard T. Applicability and variability of liver stiffness measurements according to probe position. *W J Gastroenterol* 2009 July 21; 15 (27). 3398-3404.
- 18.** Gamme . Carrie N, Zid M, De Ledinghen V, Duovin C, Marcellin P, Castera c, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Accuracy of liver stiffness measurements for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatol* 2006; 44: 1511-1517.
- 19.** Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombotto P, Bonino F, Brunetto MR. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14:360-369.
- 20.** Foucher J, Castera L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurements using in a prospective study in 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:411-416.
- 21.** Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patient with chronic liver disease. *Gut* 2007;56:968-73.
- 22.** Corpechot C, El naggar A, Poupon R. Gender and liver: is the liver stiffness weaker in weaker sex? *Hepatology* 2006;44:513-4.
- 23.** Roulot D, Czernichow S, Le Chesia H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol* 2008;48:606-13.
- 24.** Del Poggio P, Colombo S. Is transient elastography a useful tool for screening liver disease? *World Journal of Gastroenterology* 2009;15:1409-1414.

- 25.** Castera L, Forns X, Alberti A. Non invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008;48:835-47.
- 26.** Berzuini A, Prati D, Colli A, Gerosa A, Duca P, Bonino F. 1023 Factors related to liver stiffness measurement by transient elastography among healthy individuals: results from a prospective study. *Journal of Hepatology*, ISSN: 01688278, Vol: 50, Date: April, 2009, S370-S370.
- 27.** Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneth A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:48-54.
- 28.** Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenber SJ, West CP, Montari VM. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1214-20.
- 29.** Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis : a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 134:960-74.
- 30.** Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, FibroTest, APRI and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-50.
- 31.** de Ledinghen V, Castera L, Foucher J, et al. Le Fibroscan permet d'apprécier la régression de la fibrose hépatique chez les malades infectés par le VHC répondeurs au traitement par interféron retard and ribavirine. Etude prospective contrôlée. *Proceedings of 30eme Journées Francophones de pathologie Digestive*. Paris : Masson, March 2006.
- 32.** Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, Douvin C, Poupon R, de Ledinghen V, et al. Non invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver international* 2008; ISSN 1478-3223.
- 33.** Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55:403-408.
- 34.** Castera L, Bernard PH, Le Bail B, Foucher J, Merrouche W, Couzigou P, et al. What is the best non invasive method for early prediction of cirrhosis in chronic hepatitis C ? Prospective comparison between FibroScan and serum markers (Lok index, APRI, AST/ALT ratio, platelet count and Fibrotest) (abstract). *Hepatology* 2007; 46:156A.
- 35.** Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Adraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatology* 2008;48(Suppl1): S68-S92.

- 36.** Robert S, Gordon A, McLean c, et al. Effect and sustained viral response on hepatic venous pressure gradient in hepatic C-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:932-937.
- 37.** Kim H, Choi D, Gwak G-Y et al. Evaluation of esophageal varices on liver computed tomography: Receiver operating characteristic analyses of the performance of radiologists and endoscopists. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:1534-40.
- 38.** Giannini E, Botta F, Oro P, et al. Application of the platelet count/spleen diameter ratio: proposal and validation of a non invasive parameter to predict the presence of esophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Gut* 2003; 52:1200-5.
- 39.** Agha A, Awar E, Bashir K, Savarino V, Giannini EG. External validation of the platelet count/spleen diameter ratio for the diagnosis of esophageal varices in hepatitis C virus-related cirrhosis. *Dig. Sci* 2009; 54: 65460.
- 40.** Bureau C, Metivier S, Peron JM, Selves J, Robic MA, Gourraud PA, et al. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Alim Pharm Ther* 2008;27:1261-8.
- 41.** Carrion JA, Navasa M, Bosh J. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006,12:1791-8.
- 42.** Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, Rega L, Foschi M, Colagrande S, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:1087-90.
- 43.** Lim JK, Groszmann RJ. Transient elastography for the diagnosis of portal hypertension in liver cirrhosis: is there still a role for hepatic venous pressure gradient measurement? *Hepatology* 2007;45:1087-1090.
- 44.** Kazemi F, Kettaneh A, N'kontchou G. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large esophageal varices. *J Hepatol* 2006; 45:230-5.
- 45.** Castera L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F et al. Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and esophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non invasive scores. *J Hepatol* 2009; 50(1): 59-68.
- 46.** Nguyen-Khac E, Chatelain D, Tramier B, Decrombeque C, Robert B, Joly JP, et al. Assessment of asymptomatic liver fibrosis in alcoholic patients using Fibroscan: prospective comparison with 7 non invasive laboratory tests. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:1188-98.
- 47.** Rigamonti C, Donato MF, Fraquelli M, Agnelli F, Ronchi G, Casazza G, et al. Transient elastography predicts fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Gut* 2008; 57:821-17.

- 48.** Corphecot C, el Naggar A, Poujiol-Robert A, Zioli M, Wendum D, Chazouilliers O, et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006; 43:1118-24.
- 49.** Gómez-Domínguez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno-Monteagudo JA, García-Buey L, Moreno-Otero R. Transient elastography to assess hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis. *Alim Pharm Ther* 2008;27:441-7.
- 50.** de Ledínghen V, Douvin C, Kettaneh A, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Deficit Syndr* 2006; 41:175-9.
- 51.** Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, Choi PC, Komo M, Chan AW, Merrouche W, Sung JJ, de Ledínghen V. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52: 454-62.
- 52.** Klemmnsen Mossner B, Riis Jorgensen T, Skamling M, Pedersen C, Christensen PB. Outreach screening of drug users with fibrosca identifies a high proportion of severe fibrosis not previously recognized. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 2:S276..
- 53.** Laurent Castera, M.D, Ph. D. Liver stiffness and hepatocellular Carcinoma: Liaisons Dangerous? *Hepatology*, June 2009.
- 54.** Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, Haussinger D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* 2008;47:592-5.
- 55.** Coco B, Olivieri P, Colombatto P, Ciccorossi P, Sacco R, Bonino F, et al. Liver stiffness measured by transient elastography: the influence of biochemical activity. *Hepatology* 2008;47:380-4.
- 56.** Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008;47:380-4.
- 57.** Millonig G, Reimann FM, Friedrich S, Fonouni H, Mehrabi A, Buchler MW, Seitz HK, Mueller S. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (Fibroscan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008 Nov; 48(5): 1718-23.
- 58.** Millonig G, Friedrich S, Adolf S, Fonouni H, Gorkiz M, Mehrabi A, Stiefel P, Poschl G, Buchler MW, Seitz HK, Mueller S. Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure. *EASL Journal Hepatology* 2010 vol.52/ 206-210.

- 59.** Lupor M, Badea R, Stefnescu H, Grigorescu M, Sparchez Z, Serban A, et al. Analysis of histopathological changes that influence liver stiffness in chronic hepatitis C. Result from a cohort of 324 patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2008;17:155-63.
- 60.** Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-50.
- 61.** Sebastiani G, Halfon P, Casera L, Pol S, Thomas DL, Mangia A, Di Marco V, Pirisi M, Voiculescu M, Guido M, Bourlier M, Noventa F, Alberti A. SAFE biopsy: a validated method for large-scale staging of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009, 49:1821-7
- 62.** Castera L, Foucher J, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology* 2006;43:373-74.
- 63.** Colli A, Colucci A, Paggi S, Fraquelli M, Massironi S, Andreoletti M, Michela V, Conte D. Accuracy of a predictive model for severe hepatic fibrosis or cirrhosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2005;11:7318-22.
- 64.** Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Viganò M, Del Poggio P, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. *J Hepatol.* 2008;49:564-71.
- 65.** Crina Frinaiu-Mallos, Ph-D. ENDO 2009: Dynamic Elastography shows promise as diagnostic tool for thyroid nodules. *Medscape Medical News.*
- 66.** Calvaruso V, Di Marco V, Bronte F, Licata G, Simone F, Butera G, Pecoraro G, Cabibi D, Alessi N, Camma' C, Craxi A. Spleen stiffness correlates with portal hypertension and increases the accuracy of detection of esophageal varices in HCV cirrhosis. *Gastroenterology and Hepatology, DIBIMIS, University of Palermo; Anatomia Patologica, University of Palermo.* April 2010.
- 67.** Castera L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, Couzigou P, de Ledinghen V. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology* 2010 Mar; 51 (3): 828-35.
- 68.** Stebbing J, Farouk L, Panos G, Anderson M, Jiao LR, Mandalia S, Bower M, Gazzard B, Nelson M. A meta-analysis of transient elastography for the detection of hepatic fibrosis. *Journal Gastroenterology* 2010 Mar; 44 (3) 214-9.
- 69.** Collecchia A, Montrone L, Scaiola E, et al. Measurement of Spleen Stiffness to Evaluate Portal Hypertension and the Presence of Esophageal Varices in Patients with HCV-Related Cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:646-54.

- 70.** Stefanescu H, Grigorescu M, Lupsor M, Procopet B, Maniu A, Badea R. Spleen Stiffness measurement using Fibroscan for the non-invasive assessment of esophageal varices in liver cirrhosis patients, *J. Gastroenterol Hepatol* 2011;26:164-70.
- 71.** Bota S, Sporea I, Sirli R et al. Spleen assessment by Acoustic radiation Force Impulse Elastography (ARFI) for prediction of liver cirrhosis and portal hypertension. *Med Ultrason* 2010;12 213-7
- 72.** Fraquelli M, Giunta M, Pozzi R et al. Feasibility and reproducibility of spleen transient elastography and its role in combination with liver transient elastography for predicting the severity of chronic viral hepatitis, *J of Viral Hepatitis*, 2013