



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche cliniche e sperimentali

Dipartimento di Fisiopatologia Medico-chirurgica e dei Trapianti

Corso di Dottorato in Gastroenterologia

Ciclo XXVIII

**LA STIFFNESS EPATICA NELLE MALATTIE
EPATICHE CRONICHE: NUOVI SCENARI A
CONFRONTO**

SSD MED/12-SSD MED/36-SSD/MED 08

Relatore: Chiar.mo Prof Dario Conte

Correlatore: Chiar.ma prof.ssa Mirella Fraquelli

Tesi di Dottorato di
Dott.ssa Alessandra Baccarin
Matricola N R09921

Anno accademico 2014-2015

INDICE

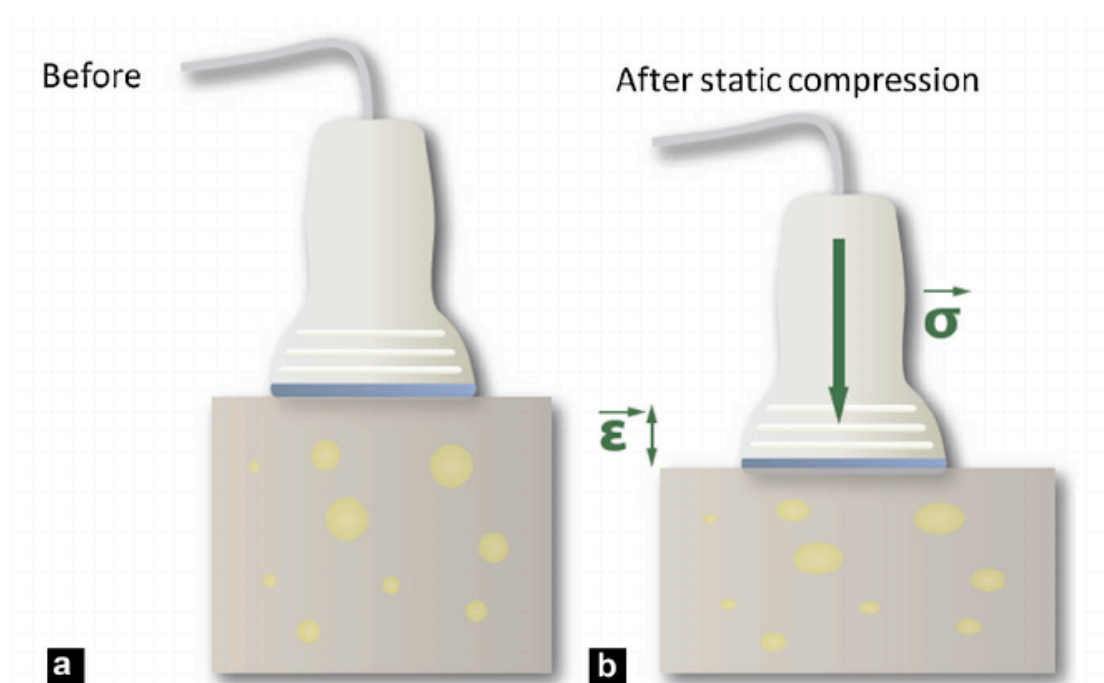
1.1 LE TECNICHE ELASTOMETRICHE, PRINCIPI.....	3
1.2 ELASTOMETRIA EPATICA.....	9
2.1 SCOPO DELLO STUDIO.....	12
2.2 PAZIENTI E METODI.....	12
2.3 ECOGRAFIA ADDOME.....	13
2.4 ELAST PQ® -pSWE.....	14
2.5 TRANSIENT ELASTOGRAPHY.....	15
2.6 BIOPSIA EPATICA ECO-GUIDATA.....	15
2.7 ALTRI PARAMETRI.....	16
3. ANALISI STATISTICA.....	17
4. RISULTATI.....	19
4.1 RISULTATI ECOGRAFICI.....	20
4.1.1 TRANSIENT ELASTOGRAPHY.....	22
4.3 BIOPSIA EPATICA E RISULTATI ISTOLOGICI.....	22
4.3.1 DIAGNOSI DEI DIFFERENTI STADI DI FIBROSI EPATICA.....	25
5. DISCUSSIONE.....	29
6. BIBLIOGRAFIA.....	34

1.1 LE TECNICHE ELASTOMETRICHE, PRINCIPI

Nell'arco dell'ultimo decennio la ricerca in campo ecografico si è focalizzata sullo studio e sull'applicabilità clinica delle tecniche elastometriche utilizzate nella valutazione della fibrosi (stiffness) dei tessuti.

Tutte le tecniche elastometriche si basano su un analogo principio; ovvero lo studio della risposta "movimento" tissutale quando questo viene sottoposto a una forza esterna. La forza esterna applicata può essere di tipo statico (o quasi-statico) o di tipo dinamico.

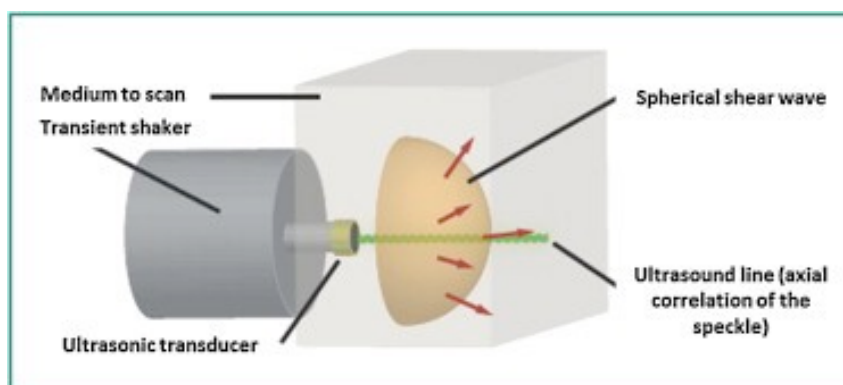
Le metodiche di tipo statico o quasi-statico (elastometria strain) si basano sulla compressione esterna del tessuto (compressione applicata dall'operatore sulla sonda ecografica) e di fatto valutano la deformabilità tissutale in risposta allo stimolo compressivo esterno.



I limiti maggiori di queste metodiche sono la difficoltà nel creare uno standard di stimolo esterno, che rimane per definizione operatore dipendente, e la mancanza di una quantificazione numerica della stiffness. Inoltre la compressione non può essere ristretta alla sola regione di interesse da studiare. Il risultato è di tipo qualitativo e va interpretato su una specifica scala di colori dal blu (per le aree a stiffness maggiore) al rosso (per le aree a stiffness minore/normale); il verde indica zone a stiffness intermedia. Tale metodica è stata principalmente validata per lo studio della mammella (1,2). Recentemente la metodica è stata implementata anche per lo studio di altri tessuti e studi preliminari hanno ottenuto risultati molto promettenti anche sulle anse intestinali in pazienti con malattia infiammatoria cronica tipo la malattia di Crohn (3).

Le metodiche di tipo dinamico comprendono invece tutte le tecniche di elastometria transiente: Fibroscan, ARFI e Shear Wave elastography.

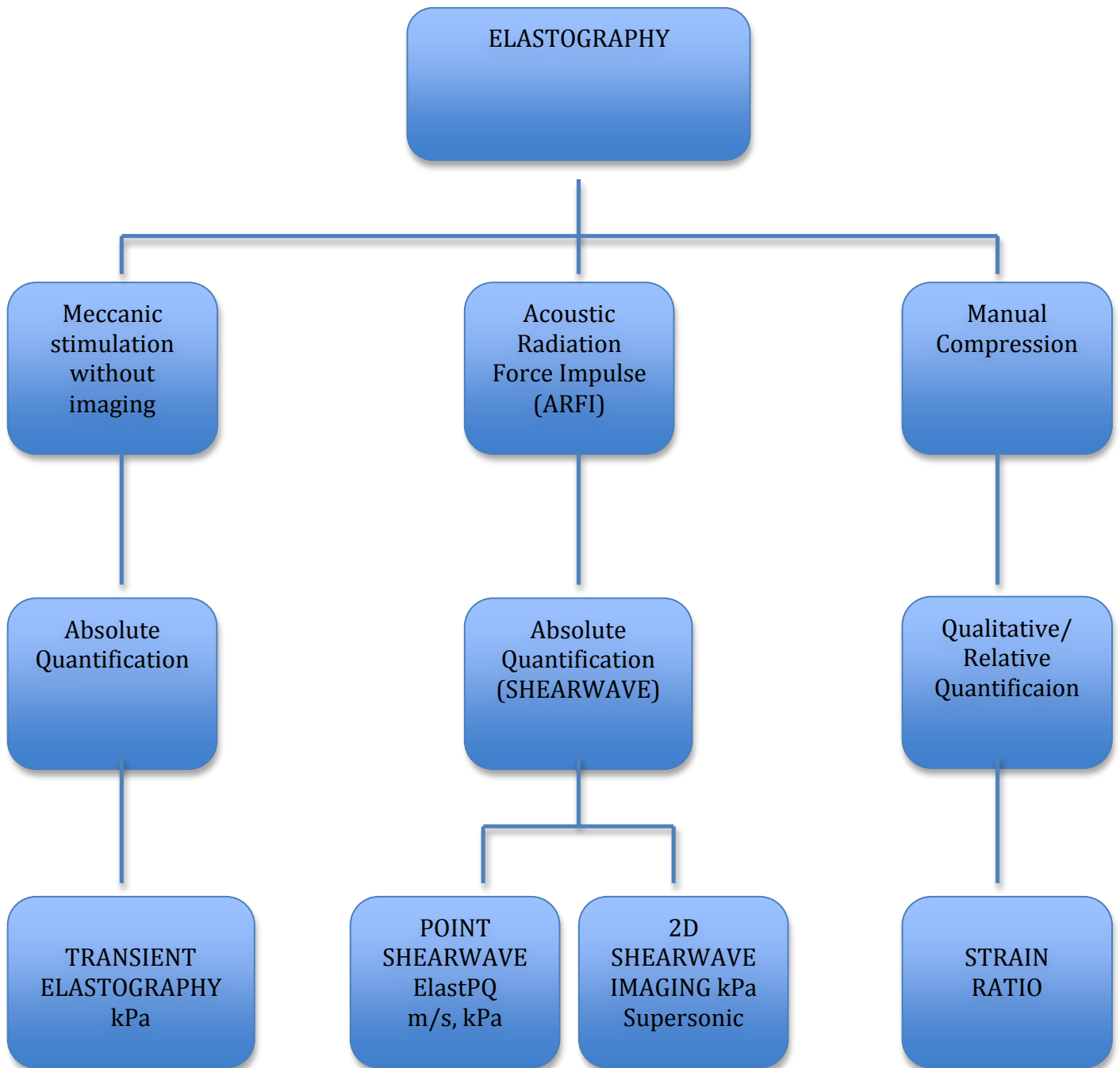
Con l'elastografia transiente lo stimolo viene fornito da un vibratore esterno che trasmette, tramite un trasduttore ecografico, l'impulso al tessuto. In questo modo lo stimolo esterno è standardizzato e non operatore dipendente come nelle tecniche statiche.



La tecnica ARFI “Acoustic Radiation Force Impulse” dà una misura sia qualitativa (scala di colori) sia quantitativa (valore espresso in KiloPascal o m/sec) della stiffness tissutale utilizzando onde acustiche e dando una valutazione della deformabilità tissutale in una specifica regione di interesse (ROI). Le misurazioni ottenute con ARFI danno una variabilità operatore dipendente molto meno significativa rispetto alla strain poiché non occorre compressione esterna da parte dell'operatore.

Con la tecnica Shear Wave Elastography vengono inviati impulsi di breve durata (1 ms) sul tessuto da esaminare, tali impulsi generano onde di propagazione tissutali e la velocità di tali onde è direttamente proporzionale alla stiffness tissutale (4,5).

Il Fibroscan (1D Transient Elastography) è la metodica ad oggi di riferimento per la valutazione non invasiva della stiffness epatica e la performance diagnostica delle nuove tecniche elastometriche viene paragonata a quella del Fibroscan. Le principali tecniche elastometriche attualmente disponibili sono qui riassunte :



L'avanzamento di queste metodiche non invasive per la valutazione della stiffness epatica ha condotto negli ultimi anni ad un risparmio notevole di biopsie epatiche. La biopsia epatica rimane tuttavia, ad oggi, il reference standard per la stadiazione delle epatopatie pur avendo dei limiti intrinseci legati al sampling error (errore di campionamento), alla bassa riproducibilità nella stadiazione della fibrosi ed essendo un esame invasivo, costoso e comunque poco tollerato dal paziente. L'elastografia transiente (Fibroscan) ha mostrato risultati molto affidabili nella stadiazione della fibrosi epatica (6,7,8).

Epatite HCV	Epatite HBV	Colestasi cronica	Steatosi epatica	Steatoepatite non alcolica (NASH)	Epatite alcolica (ASH)
F4 ≥ 14.5	F4 ≥ 13.4	F4 ≥ 17.3	F4 ≥ 10.4	F4 ≥ 17.5	F4 ≥ 19.5
F3 ≥ 9.5	F3 ≥ 9	F3 ≥ 14.7	F3 ≥ 8.7	F3 ≥ 9.8	F3 ≥ 11
F2 ≥ 7.1	F2 ≥ 8.4	F2 ≥ 7.1	F2 ≥ 7	F2 ≥ 6.7	F2 ≥ 7.8
F0-F1 < 7.1	F0-F1 < 7.2	F0-F1 < 7.1	F0-F1 < 7	F0-F1 < 6.7	F0-F1 < 7.8

Tratto da livercom.forumfree.it Fibroscane scale di riferimento e interpretazione valori

Autore	Pubblicazione	Eziologia	F1	F2	F3	F4
Castera'	Gastroenterology 2005	HCV	< 7.1	> 7.1	> 9.5	> 12.5
Ziol	Hepatology 2005	HCV	< 8.8	> 8.8	> 9.6	> 14.6
Fraquelli	Gut 2007	HBV		> 7.9	> 10.3	> 11.9
Coperchot	Hepatology 2006	PBC/PSC	< 7.3	> 7.3	> 9.8	> 17.3
Foucher	Gut 2006	CLD	< 7.2	> 7.2	> 12.5	> 17.6
Coco	J. Viral Hepatitis 2007	CLD	< 8.3	> 8.3		> 14
Carrion	Liver transplantation 2006	OLT su HCV	< 8.5	> 8.5		> 12.5
Harada	Transplantation 2008	OLT su HCV	< 8.8	> 9.9	>15.4	> 26.4

Il fibroscan è però un apparecchio DEDICATO ALLA MISURAZIONE DELLA STIFFNESS TISSUTATE, dissociato da un comune ecografo mentre un grosso vantaggio delle tecniche elastometriche nuove ARFI sta anche nel fatto che si tratta di un software incorporato all'ecografo. Ciò comporta un notevole risparmio di risorse sia per il personale medico che per il paziente che, contestualmente all'ecografia addominale, viene sottoposto alla misurazione della stiffness epatica.

In questo lavoro è stata utilizzata la point share wave elastography (pSWE), con software incorporato ad ecografo Philips iU22, Bothell, USA.

La tecnica si basa su una sequenza di impulsi che produce onde di taglio nei tessuti e quindi misura la velocità di propagazione.

La tecnica si basa su una sequenza di impulsi che produce onde di taglio nei tessuti e quindi misura la velocità di propagazione delle onde. Sfrutta il principio secondo cui tanto più sia elevata la velocità di propagazione dell'onda nel parenchima tanto maggiore risulta la stiffness tissutale.

.Con questa tecnica, durante un esame ecografico, viene individuata una regione di interesse (ROI), libera da grosse strutture vascolari o biliari. Viene rilevata una sequenza di misurazioni (almeno 10 valide) e il risultato finale della stiffness viene ricavato dal software facendo la media dei valori ottenuti.

Le misurazioni sul fegato vengono effettuate con paziente a respiro fermo, indifferente.

Il vantaggio di questa metodica rispetto al Fibroscan convenzionale è l'applicabilità per pazienti con elevato BMI e per pazienti con ascite, condizioni in cui l'elastografia transiente tradizionale è di difficile applicazione o addirittura non applicabile.

1.2 ELASTOMETRIA EPATICA

Alcuni studi sono stati condotti per valutare l'accuratezza diagnostica dell'elastometria epatica in pazienti con epatopatia cronica di varia eziologia. Grande interesse è rivolto alla valutazione non invasiva della stiffness epatica nelle epatopatie croniche; lo scopo è quello di avere un esame diagnostico che consenta il follow up del paziente e dell'evoluzione a eventuale fibrosi senza dover ricorrere alla biopsia epatica.

Come già accennato nel paragrafo precedente il Fibroscan rappresenta la metodica non invasiva di riferimento (9,10,11), la cui accuratezza diagnostica è stata dimostrata in numerosi lavori. Il Fibroscan ha oggi ampio impiego nella pratica clinica nei centri epatologici di riferimento e ha

consentito negli ultimi dieci anni un notevole risparmio di biopsie epatiche (12,13).

In questa sezione verranno approfondite le conoscenze ad oggi disponibili sulle nuove tecniche elastometriche citate nella precedente sezione (strain, ARFI e shear wave ElastPQ).

Una recente meta-analisi (14) ha paragonato l'accuratezza diagnostica della tecnica ARFI con il Fibroscan dimostrando, con l'inclusione di 13 studi per un totale di 1163 pazienti con epatopatia cronica, una sostanziale sovrapposizione tra le due metodiche per livello di sensibilità e specificità per la diagnosi sia della fibrosi moderata (F2 secondo Metavir) sia della fibrosi severa (F4 secondo Metavir).

Diversi studi condotti con metodica ARFI hanno mostrato valori cut off simili per la diagnosi di cirrosi; nella casistica di Friedrich-Rust del 2009 (15) il miglior cut off (ARFI) per la diagnosi di cirrosi è il valore di 1.75 m/sec; valore sovrapponibile di 1.77 cm/sec è stato rilevato nella casistica di Piscaglia (16). Altri studi hanno ottenuto valori simili con massimo cut off fissato a 2 m/sec per la diagnosi non invasiva di cirrosi (17,18).

Pochi lavori sono invece stati condotti con metodica elastometrica strain, che sul fegato ha per il momento poca applicabilità clinica ed è in fase preliminare (19,20,21). Tale metodica è stata infatti inizialmente sviluppata per la caratterizzazione dei tessuti superficiali (es mammella, tiroide, cute) (22, 23) e con valutazione comparativa più che assoluta (es: ghiandola mammaria normale morbida versus carcinoma con consistenza dura; misura la deformabilità del tessuto al rilascio della sonda). Gli studi disponibili sui tessuti superficiali sono stati condotti con sonda lineare, pochi sono i dati disponibili con sonda convex (che è quella che deve essere utilizzata per lo studio del fegato).

Per quanto riguarda la tecnica point shear wave elastography (pSWE) ElastPQ, che è la metodica utilizzata in questo lavoro, sono disponibili solo alcuni studi di accuratezza diagnostica per la valutazione della stiffness epatica. Uno studio internazionale multicentrico (24) ha mostrato una non inferiorità della tecnica pSWE rispetto alla elastometria transiente nella stadiazione non invasiva della fibrosi nei pazienti con infezione HCV.

Uno studio comparativo tra ARFI ed ElastPQ (25) ha dimostrato che entrambe le tecniche hanno buona performance diagnostica ma i valori di stiffness ottenuti con tecnica ElastPQ sono risultati significativamente inferiori rispetto a quelli ottenuti con ARFI (1.23 m/sec versus 1.4 m/sec per la diagnosi di epatopatia cronica).

Un recente lavoro (26) condotto su pazienti con epatite cronica B ha mostrato buona riproducibilità e accuratezza diagnostica della tecnica ElastPQ nella valutazione della fibrosi epatica. Il risultato di questo studio è molto rilevante in quanto si tratta di una casistica ampia (291 pazienti) e la comparazione è con pezzo istologico (biopsia).

I suddetti studi preliminari sembrano suggerire una buona riproducibilità della tecnica nella determinazione della stiffness epatica, tuttavia la sua applicazione nella pratica clinica e le variabili che possono influenzarla nel setting dei pazienti epatopatici non sono ancora state esplicitamente stabilite.

2.1 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è quello di stabilire la fattibilità, riproducibilità e i maggiori determinanti della stiffness epatica misurata con ElastPQ- pSWE in una serie di pazienti consecutivi affetti da malattia cronica di fegato i quali venivano sottoposti a valutazione mediante TE e biopsia epatica.

2.2 Pazienti e metodi

Nel periodo compreso tra Gennaio 2014 e Luglio 2015 sono stati arruolati nel protocollo di studio tutti i pazienti consecutivi 186 pazienti consecutivi (116 maschi e 70 femmine), età media $52.7 \pm DS 13.3$ anni (range 47-61) provenienti dal centro delle Malattie del Fegato A.M & A. Migliavacca, che venivano sottoposti a biopsia epatica per scopo diagnostico e/o ottimizzazione iter terapeutico.

Il protocollo di studio era stato approvato dal Comitato Etico del nostro Istituto e ogni paziente aveva fornito per iscritto il proprio consenso informato al momento dell'arruolamento.

Il giorno medesimo della procedura bioptica ciascun paziente veniva preliminarmente sottoposto ad un'ecografia standard dell'addome (US) e alla misurazione della stiffness epatica (LMS) mediante la tecnica ElastPQ[®]-p-SWE (iU22; Philips, Bothell, Wahington, USA) e TE (Fibroscan; Echosens, Paris, France).

Le misurazioni mediante ElastPQ[®] p-SWE venivano eseguite da due medici esperti (MF, AB) in cieco rispetto la storia clinica del paziente, i parametri biomurali, ecografici ed elastografici. TE veniva invece eseguito da un singolo operatore esperto (MF, AB, BC).

Per ciascun paziente arruolato veniva inoltre compilata una CFR (case report form) contenente informazioni demografiche cliniche, bioumorali, parametri ecografici ed elastografici.

Nella Tabella 1 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti.

2.3 Ecografia addome

Come già menzionato ciascun paziente veniva sottoposto nel medesimo giorno della biopsia a valutazione ecografica dell'addome (iU22; Philips, Bothell, Wahington, USA) con studio attento e mirato del fegato, milza e vasi splancnici.

Piu' nel dettaglio, alcuni parametri ecografici prestabiliti venivano registrati per ciascuno dei pazienti:

- nodularità epatica di superficie: stabilita mediante sonda lineare ad alta frequenza, 5-12 MHz, dedicata alla valutazione dell'intera superficie epatica ad una profondità max di 3 cm. Il segno suddetto veniva valutato in entrambi i lobi del parenchima tramite scansioni molteplici. Il reperto trovato veniva considerato positivo nel caso in cui la superficie epatica appariva irregolare e discontinua invece che una linea iperecogena regolare senza tratti alterati, oppure nel caso in cui l'ecogenicità in superficie del parenchima fosse disomogenea come espressione di nodularità del parenchima sottostante.
- Velocità (cm/sec) e diametro della vena porta (cm)
- Diametro bipolare della milza

2.4 ElastPQ®-pSWE

La stiffness epatica veniva misurata utilizzando l'ecografo iU22 (Philips, Bothell, Washington, USA) mediante scansioni con sonda convex e software ElastPQ®.

Come per le altre tecniche elastografiche anche la nostra genera onde meccaniche che si propagano all'interno del parenchima epatico. L'apparecchio ecografico controlla la propagazione delle onde attraverso una metodica simile al Doppler misurandone dunque la velocità di propagazione. La velocità delle onde viene espressa in metri al secondo (m/sec) o in KPa attraverso il modulo di Young $E=3(vS^2.\rho)$ dove E è il modulo di Young, vS è la velocità della shear wave e la ρ è la densità del tessuto. Le misurazioni vengono effettuate a livello del lobo epatico destro in scansioni transcostali con il paziente posizionato in decubito supino con il braccio destro in massima abduzione. Usando la modalità in B-mode l'operatore seleziona un'area del parenchima priva di vasi e strutture biliari ad almeno 1.5 cm al di sotto della Glissoniana: una volta individuato il punto prescelto l'operatore posiziona la ROI (Region of Interest) di 0,5 x 1 cm. La profondità massima raggiungibile della ROI è circa 7 cm.

Il paziente viene preventivamente istruito sulla modalità di mantenere l'inspirio durante l'acquisizione dei dati. Solo i dati con almeno 10 misurazioni valide espresse in kPa sono considerate accettabili, inoltre la media dei valori ottenuti può essere considerata rappresentativa della stiffness epatica solo se il range interquartile (IQR) di tutte le misurazioni è inferiore al 30% della media.

2.5 Transient Elastography (TE)

Le misurazioni venivano eseguite singolarmente a uno dei due operatori (MF e AB in cieco l'uno dall'altro e dai dati clinici, bioumorali e istologici dei pazienti). La rilevazione TE veniva eseguita la medesima giornata della procedure biptica, in particolare prime della procedeura stessa. Il lobo epatico destro veniva campionato attraverso spazi intercostali in posizione supina con il braccio destro portato in massima abduzione. Mediante la guida ecografica del FibroScan veniva individuata una porzione di parenchima epatico, di almeno 6 cm di spessore priva di strutture vascolari, sulla quale effettuare le misurazioni. La quota di rilevazioni valide era calcolata come rapporto tra il numero di misurazioni valide e il totale delle misurazioni. I risultati venivano espressi in kilopascal (kPa) come la mediana delle misurazioni totali. Solo le determinazioni con almeno 10 misurazioni valide e una success rate di 60% venivano considerate rappresentative. Inoltre il valore della mediana delle misurazioni ritenute valide puo' essere realmente rappresentativa della stiffness epatica sono se il range interquartile (IQR) di tutte le determinazioni rimanga inferiore al 30% della mediana..

2.6 Biopsia epatica eco-guidata

La biopsia epatica veniva eseguita sotto guida ecografica da esperti epatologi con un ago Menghini da 16 G (Biomol; Hospital Service, Rome, Italy). Il frustolo veniva poi fissato in formalina e successivamente incorporato in paraffina. Il frustolo veniva poi colorato con ematossilina eosina e Masson trichrome, successivamente analizzato da esperti anatomo-patologi dedicati (MM, MFD) i quali erano rigorosamente in cieco rispetto i dati clinci e i risultati dell'elastometria. Solo i campioni istologici

con una lunghezza > 15 mm con almeno 12 spazi portali completi venivano considerati adeguati. La fibrosi epatica e l'attività necroinfiammatoria erano valutate in maniera semiquantitativa utilizzando lo score METAVIR (27,28). In particolare la fibrosi (F) viene abitualmente stadiata secondo una scala con 4 livelli in accordo allo score METAVIR (F0, non fibrosi; F1 fibrosi portale senza setti; F2 fibrosi portale e pochi setti, F3 numerosi setti senza cirrosi, F4 cirrosi).

L'attività necroinfiammatoria (A) viene anch'essa graduata secondo una scala con 4 gradi (A0 non infiammazione, A1 lieve, A2 moderata, A3 severa). Per ogni frustolo è stata registrata la lunghezza (mm) e il numero di frammenti. Il grado di steatosi veniva arbitrariamente classificata da 0 a 3 (0 =5%, 1.5=24%, 2,25=49%, 3>50% degli epatociti steatosici).

Il grado di steatosi determinato con l'ecografia veniva stabilito in base alla progressiva attenuazione dei fasci sonori sui piani profondi secondo grado 1, scomparsa del diaframma (grado 2) perdita completa del fascio sonoro con impossibilità a riconoscere la parete dei vasi (grado 3).

La procedura bioptica veniva eseguita in condizioni di digiuno (>12 ore) dopo la verifica di alcuni parametri coagulativi: attività protrombinica > 50% e conta piastrinica $\geq 50.000/\mu\text{L}$.

2.7 Altri parametri

I livelli sierici di transaminasi (AST, ALT) e GGT sono stati misurati mediante un sistema automatico a 37°C (valori normali (40 IU/L, for GGTP (50 IU/L). test immunoenzimatici disponibili sono stati utilizzati per rilevare antigeni di superficie per epatite B, anticorpi anti core del virus B e anticorpi anti epatite C. L'HCV RNA è stato testato attraverso reazione PCR a trascrizione inversa usando i primi dei 59 codoni non codificanti; il livello minimo

riconoscibile era circa 20 IU/ml in accordo con Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Tutte le altre analisi e procedure sono state eseguite in condizioni di digiuno.

3. ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono espresse come media (deviazione standard) o mediana (range), come appropriato.

La variabilità inter osservatore dei valori di stiffness pancreatico ottenuti con ElastPQ è stata effettuato calcolando i coefficienti di correlazione intraclasse (ICC).

L'effetto sull'agreement dato dal periodo di studio (primo periodo vs secondo periodo), sesso, età (≤ 45 vs ≥ 45 years), BMI (≤ 25 vs ≥ 25 kg/m²), ALT (≤ 40 vs > 40), GGT (≤ 50 vs > 50) e livelli di fosfatasi alcalina (ALP) (≤ 110 vs > 110) sono stati anch'essi verificati attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione (ICC) in nei sottogruppi di pazienti. Il livello di concordanza è stato classificato come scarso (ICC=0.00-0.20), da medio a buono (ICC=0.40-0.75) ed eccellente (ICC>0.75) (29-31).

La presenza di correlazione tra i valori di stiffness epatica e pancreatico ottenuti con ElastPQ e di stiffness epatica ottenuti con ElastPQ e TE è stata valutata mediante coefficiente di correlazione di Pearson (r).

È stata inoltre valutata l'accuratezza diagnostica per la determinazione della fibrosi epatica delle due metodiche (ElastPQ e TE), utilizzando come reference standard l'istologia del fegato.

In particolare abbiamo costruito una curva ROC per ogni grado di fibrosi, calcolando l'AUC (area sotto la curva) con un intervallo di confidenza al 95% come stima dell'accuratezza globale di entrambe le metodiche. Per ogni valore cut-off sono state valutate sensibilità, specificità, likelihood ratio

positiva e negativa (LH +, LH -) con intervallo di confidenza del 95%. Il miglior cut-off per ogni grado di fibrosi è stato selezionato in base al valore che piu' ottimizzava l'indice di Youden (sensibilità + 1-specificità); i cut-off suddetti sono inoltre stati utilizzati come per determinare la concordanza inter-osservatore della tecnica con ElastPQ®-pSWE.

La concordanza tra i due operatori nella classificazione di ciascun paziente secondo il cut off stimato (es: stima dello stesso grado di fibrosi) è stata calcolata utilizzando il coefficiente kappa di Cohen. Il grado di concordanza è stato classificato come povero (ICC=0.00 a 0.20), tra scarso e buono (ICC=0.40 a 0.75) oppure eccellente (ICC 0.75).

Infine per identificare l'effetto di alcune variabili sulla determinazione della stiffness epatica mediante ElastPQ sono stati eseguiti modelli di regressione lineare). Lo stadio di fibrosi, l'attività necro infiammatoria, la steatosi, i livelli ematici di ALT, GGT e ALP sono considerati i potenziali predittori della stiffness epatica misurata tramite ElastPQ® pSWE.

L'analisi univariata è stata eseguita per ognuno dei parametri suddetti; successivamente solo le variabili risultate statisticamente significative all'univariata sono state inserite nell'analisi multivariata.

I risultati dei modelli lineari sono stati calcolati attraverso la determinazione del coefficiente (R^2)P valori inferiori a 0.05 venivano considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SAS (release 9.4; SAS Institute Inc, Cary, NC).

4. RISULTATI

186 pazienti consecutivi (116 maschi e 70 femmine), età media $52.7 \pm DS13.3$ anni (range 47-61) sono stati arruolati e sottoposti ad analisi mediante ElastPQ[®], TE e biopsia epatica eco-guidata durante lo stessa giornata. Le principali caratteristiche demografiche, cliniche e bioumorali sono riportate nel dettaglio nella Tabella 1

Caratteristiche dei pazienti

Male, number	116 (62%)
Age, years	52.7±13.3
BMI, kg/m ²	25.2±4.1
ALT (IU/L, n.v. < 38)	53 (30-52)
GGT (IU/L, n.v. < 50)	86 (39-179)
Alkaline phosphatase (IU/L, n.v. 40-129)	117 (77-179)
Platelets count (10 ³ /L)	213 (134-256)
Portal vein diameter	1.1 (0.90-1.22)
Portal vein velocity	1.9 (16.8-22.4)
Spleen diameter	11.8 (10-13.5)

Tabella 1 :

caratteristiche demografiche e cliniche dei 186 pz che sono stati sottoposti a ElastPQ[®], TE e biopsia epatica ;Media \pm DS, Mediana (range); n.v. valori normal ; BMI. body mass index: ALT alanine aminotransferase; GGT gamma-glutamilltranspeptidasi

L'eziologia della malattia epatica era da riferire a genesi virale (HCV cronica e infezione da HBV) in 132 casi, a genesi autoimmune (PSC-PBC-AIH) in 32 casi, base metabolica (NAFLD-NASH) in 12 casi, e miscelanea nei rimanenti 10 casi.

4.1 Risultati ecografici

I dati prettamente ecografici sono riassunti nella Tabella 1 in termini di media range di valori.

4.1.1 ElastPQ[®]-pSWE

Determinazioni fattibili sono state ottenute in 186 pazienti (100%) con ElastPQ[®] p-SWE e in 184 con TE. I valori di stiffness epatica misurati con ElastPQ[®] p-SWE sono i seguenti: $8.1 \pm DS 4.5$, mediana 7.0 kPa per il primo operatore e $8.0 \pm DS 4.2$, 6.8 kPa per il secondo operatore.

L'agreement, o concordanza, per la metodica con ElastPQ[®] p-SWE (Tabella 2) espresso come ICC è 0.89 (I.C 0.85-0.91).

Variabili	ICC (95% IC)
Primo anno di studio	0.86 (0.81-0.90)
Secondo anno di studio	0.92 (0.87- 0.95)
Sesso : male	0.90 (0.86-0.93)
female	0.87 (0.79-0.91)
Età: \leq 45	0.87 (0.83-0.90)
3 > 45	0.88 (0.83-0.91)
BMI: \leq 25	0.89 (0.85-0.93)
> 25	0.86 (0.79-0.91)
ALT: \leq 40	0.92 (0.88-0.96)
> 40	0.86 (0.80-0.90)
GGT: \pm 50	0.87 (0.79-0.92)
> 50	0.88 (0.83-0.92)
Fosfatasi alcalina: \leq 110	0.89 (0.85-0.93)
> 110	0.87 (0.82-0.91)
Complessiva	0.89 (0.85-0.91)

Tabella 2 Agreement espresso secondo ICC nel primo e secondo periodo di studio

Nel primo periodo di studio era molto inferiore 0.86 (0.81-0.90) rispetto al secondo period 0.92 (0.87-0.95), mentre la stessa concordanza non sembra essere influenzata da sesso, età, BMI, livelli sierici di ALT, GGT e ALP.

4.2 Transient Elastography (TE)

I valori di stiffness misurati con TE hanno un valore medio di 8.8 kPa (2.7-22.8). Due esaminazioni sono risultate inattendibili (failure) rispettivamente in pazienti con un BMI di 27 e 32. I valori di stiffness epatica misurati con ElastPQ®-pSWE e TE sono correlati tra loro in modo significativo ($r=0.67$, $p<0.0001$).

4.3 Biopsia epatica e risultati istologici

La lunghezza media dei frustoli di tessuto epatico era 3.5 cm (1.6-6.1) e in tutti casi il campione conteneva almeno 12 spazi portal. In 133 pazienti (71%) il campione istologico era maggiore di 2 cm di lunghezza.

La procedura è stata ripetuta in due casi per l'inadeguatezza del campione prelevato. In accordo con i risultati istologici (Tabella 3) 87 pazienti (46%) mostravano uno stadio di fibrosi pari a F=0-1, 44 (24%) stadio F=2, 35 (19%) F=3 e 20 (11%) F=4.

Per quanto concerne invece l'attività necro-infiammatoria 107 pazienti (57%) mostravano uno stadio A = 0-1, 57 (31%) uno stadio A=2, 20 (11%) A=3 e i rimanenti due A=4-5.

54 pazienti (29%) avevano una steatosi di grado lieve, 12 (7%) un grado moderato, 6 (3%) un grado di steatosi severo, mentre 114 non mostravano segni di steatosi.

La Figura 1 mostra i risultati di stiffness epatica misurati con ElastPQ® - pSWE stratificati in base alla fibrosi descritta dall'istologia.

Variabili	N (%)
Stadio fibrosi (F)	
0-1	87 (46)
2	44 (24)
3	35 (19)
4	20 (11)
Attività necroinfiammatoria (A)	
0-1	107 (57)
2	57 (31)
3	20 (11)
4-5	2 (1)
Grado di steatosi	
0	114(61)
1	54 (29)
2	12 (7)
3	6 (3)

Tabella 3 Risultati istologici : staging (F) secondo METAVIR, grading (A) e grado di steatosi

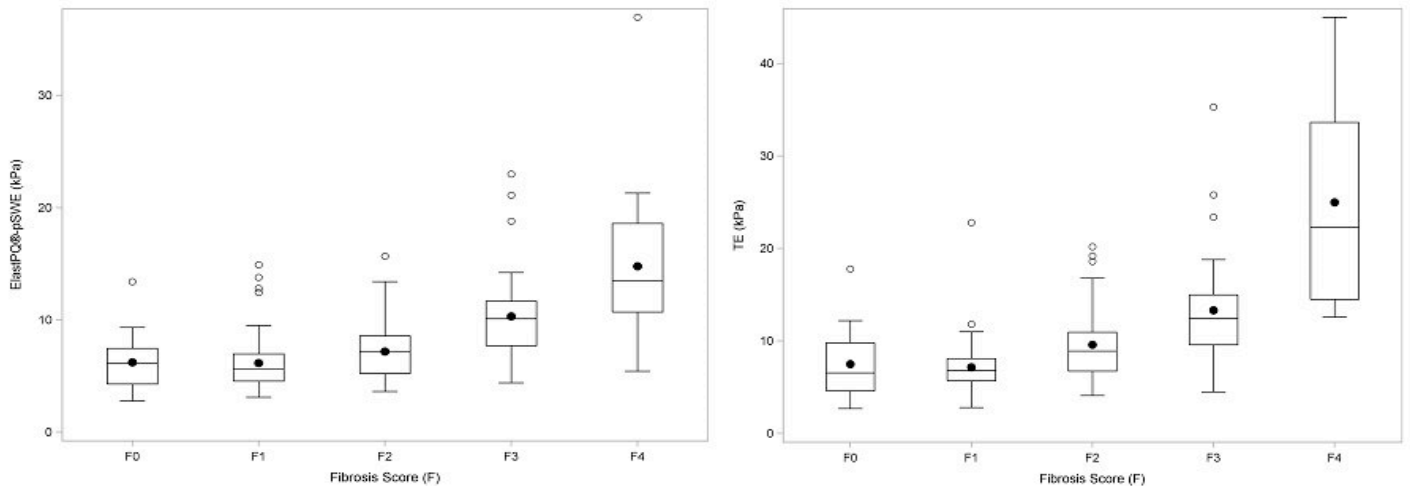


Fig. 1 Risultati di stiffness epatica misurati con ElastPQ® -pSWE stratificati in base alla fibrosi descritta dall'istologia

4.3.1 Diagnosi dei differenti stadi di fibrosi epatica

La performance diagnostiche delle due metodiche oggetto di studio (ElastPQ® p-SWE e TE) per la diagnosi dei diversi gradi di fibrosi epatica $F > 2, F > 3, F = 4$ sono riassunte nella Tabella 4 con maggior dettagli in termini di sensibilità, specificità, LR+, LR- e AUROC.

Nel caso dell'ElastPQ®p-SWE il valore con migliore ottimizzazione in sensibilità e specificità per la diagnosi di $F \geq 2, F \geq 3, F = 4$ sono risultati i seguenti: 7.6, 8.8 e 10.4 kPa; nel caso invece del TE i valori corrispondenti sono: 9.3, 10.1 and 12.6 kPa.

L'accuratezza diagnostica globale (espresso come AUROC) per la diagnosi dei differenti stadi di fibrosi non sono significativamente differenti tra

ElastPQ[®]-p-SWE e TE: 0.77, 0.85 e 0.88 per il primo e 0.81, 0.88 and 0.94 per quest'ultimo.

Abbiamo inoltre notato che l'accuratezza diagnostica della tecnica ha mostrato un miglioramento considerevole dopo un anno dall'inizio del protocollo di studio rispetto il primo period: l'AUROC per la diagnosi di F>2, F>3 and F=4 è risultata rispettivamente 0.86, 0.94 e 0,91.

ElastPQ[®]-pSWE (n=186)

Fibrosi stage	Cut off (kPa)	Sens	Spec	LR+	LR –	AUROC (95% CI)
F ≥2	7.6	65 (55-74)	86 (77-93)	4.7 (2.8-8.2)	0.40 (0.30-0.53)	0.77 (0.70-0.83)
F≥3	8.8	73 (59-83)	88 (80-93)	5.9 (3.7-9.7)	0.31 (0.20-0.48)	0.85 (0.78-0.91)
F=4	10.4	80 (56-94)	86 (80-91)	5.8 (3.7-8.9)	0.23 (0.10-0.56)	0.88 (0.78-0.96)

TE (n=184)

F ≥2	9.3	69	85	4.6	0.36	0.81
		(59-78)	(76-92)	(2.7-7.7)	(0.26-0.49)	(0.75-0.88)
F ≥3	10.8	80	85	5.4	0.24	0.88
		(67-89)	(78-91)	(3.5-8.4)	(0.14-0.41)	(0.82-0.93)
F=4	13.1	95	86	6.8	0.06	0.94
		(75-99)	(80-91)	(4.6-10.0)	(0.01-0.39)	(0.91-0.98)

Tabella 4: Caratteristiche operative e di accuratezza diagnostic dei pazienti sottoposti a biopsia, ElastPQ® p-SWE e TE

La concordanza inter-osservatore di ElastPQ®-pSWE per la classificazione della stiffness epatica è riportata come statistica K di Cohen con variazioni tra 0.63 (0.52-0.76) per la fibrosi significativa (F3) e 0.73 (0.61-0.86) per la cirrosi.

Nell'analisi multivariata I maggiori determinanti della stiffness, misurata con ElastPQ®-pSWE, sono risulati la fibrosi (F) e l'attività necro infiammatoria (A); nell'analisi multivariata solo lo stadio istologico di fibrosi epatica ha mantenuto la significatività statistica ($p=0.0001$) (Tabella 5).

Variabili	Univariate	Multivariate
	p	p
Grado di fibrosi (F)[§]	0.0001	0.0001
Attività Infiammatoria (A)[*]	0.0002	0.31
Steatosi	0.48	
ALT	0.09	
GGT	0.77	
Fosfatasi alcalina	0.63	

Tabella 5. Analisi univariata: [§] R²=0.38; ^{*} R²=0.12

5. DISCUSSIONE

Lo studio dimostra come la nuova tecnica ElastPQ[®]pSWE possa essere fattibile e molto ben riproducibile, avendo una concordanza inter-osservatore che migliora con l'esperienza dell'operatore (curva di apprendimento). Il maggior determinante di tale metodica è risultata essere la fibrosi epatica; la sua accuratezza nel diagnosticare il grado di fibrosi epatica si ottimizza notevolmente in modo proporzionale all'esperienza dell'operatore. Viste le suddette caratteristiche, molti studi sono stati recentemente dedicati al potenziale utilizzo di altre tecniche, oltre la tradizionale elastografia transiente, TE, per la diagnosi e il follow up della stiffness epatica.

Queste tecnologie innovative si rifanno alla point shear wave elastography la quale a sua volta comprende la Virtual Touch Quantification (VTTQ), l'ElastPQ[®] p-SWE e la shear wave techniques (SWSI) (WFUNG).

Rispetto al classico TE queste metodiche mostrano il vantaggio di essere installate direttamente su apparecchi ecografici e di permettere dunque misurazioni sotto guida ecografica, con l'opportunità di scegliere esattamente la sede anatomica da campionare.

Sebbene allo stato dell'arte si possono annoverare diversi studi pubblicati su VTTQ, esistono solo alcuni studi preliminari sull'ElastPQ[®]p-SWE condotti su volontari sani (32) e su pazienti con malattie croniche di fegato di differente etiologia (6) oppure in pazienti con epatite cronica HBV correlata (26).

L'outcome primario di questo studio è quello di stabilire la fattibilità e di conseguenza l'applicabilità clinica, l'agreement inter-osservatore della tecnica in oggetto.

Per ciò che concerne la fattibilità della metodica ElastPQ®- pSWE i risultati sono ottimi, considerato nessun caso failure o esiti indeterminati; contrariamente nel caso del TE sono stati 2 i casi di misurazioni non attendibili, dovuti alla presenza di obesità.

La riproducibilità dell' ElastPQ®-pSWE si è dimostrata eccellente ma lievemente inferiore rispetto i dati riportati dalla letteratura sulla cisticità con TE.

In particolare due studi, uno pubblicato dal nostro gruppo (7), e un altro da un gruppo francese (33), hanno valutato la variabilità inter osservatore del TE. In un terzo studio precedente (34) si era dimostrata un'ottima riproducibilità del TE sia inter che intra-osservatore, con un coefficiente di correlazione intraclassa (ICC) di 0.98.

Ad ogni modo l'agreement interosservatore era significativamente più basso nei seguenti casi: nei pazienti con gradi di fibrosi lievi (ICC per F0-F1 0.60 vs 0.99 per F \geq 2), con presenza di steatosi epatica (ICC nel caso di steatosi \geq 25% degli epatociti 0.90 vs 0.98 nel caso di steatosi < 25%), in quei pazienti con BMI elevato (ICC nel caso di BMI \geq 25 kg/m² 0,94 vs 0.98 per BMI < 25 kg/m²). Risultati simili sono stati riportati da Boursier (33) in una serie di 46 pazienti esaminati da 4 diversi operatori.

Per ElastPQ® p-SWE l'unica variabile che influenzava la riproducibilità era l'esperienza degli operatori: una lunga curva di apprendimento mostrava maggior difficoltà di apprendimento rispetto TE e maggior tempo necessario per ottenere esaminazioni accettabili.

A questo proposito nel nostro studio abbiamo infatti osservato un netto miglioramento della riproducibilità con il tempo come di fatto secondo una curva di apprendimento; dopo i primi 12 mesi abbiamo raggiunto risultati eccellenti (ICC > 0.90) in termini di riproducibilità. Ulteriore importante

osservazione del nostro studio è stata la buona riproducibilità tra i due operatori nel classificare il medesimo stadio di fibrosi: tale riscontro possiede sicuramente un notevole risvolto nella pratica clinica.

I punti di forza dello studio sono rappresentati dall'acquisizione contemporanea di ElastPQ® -pSWE, TE e l'esecuzione della biopsia epatica lo stesso giorno delle suddette procedure con prelievi istologici soddisfacenti: infatti più del 70% dei campioni istologici erano 20 mm in lunghezza ed includevano almeno 12 spazi portalari.

La lunghezza del campione bioptico epatico è di rilevante significato quando si compara l'accuratezza diagnostica di test non invasivi utilizzando l'istologia come reference standard:

più nello specifico quest'ultima viene considerata come reference standard imperfetto visto il rischio di falsi negativi nella quantificazione della fibrosi dovuti a campionamenti scorretti (frustoli di lunghezza insufficiente) (35). Tale imperfezione potrebbe impattare sull'accuratezza diagnostica dell'index test, solitamente con una sottostima della sensibilità: è dunque mandatorio stabilire a priori rigidi criteri di adeguatezza per il reference standard.

Piuttosto la valutazione contemporanea dei due index test e del reference standard permette di impedire bias riguardo la progressione/regressione della malattia o bias dovuti al trattamento.

Infine lo studio dovrebbe risultare scevro da spectrum bias per l'arruolamento consecutivo della popolazione in oggetto, popolazione caratterizzata da pazienti consecutive affetti da malattie croniche di fegato compensata; solo 11% dell'intera serie di pazienti era affetta da cirrosi epatica documentata dall'istologia: nessuno di questi mostrava segni clinici, ecografici e biochimici di scompenso. Per quanto concerne l'accuratezza

diagnostica della metodica ElastPQ[®]-pSWE nel predire il grado di fibrosi epatica, alcuni studi preliminari effettuati in pazienti affetti da malattia epatica cronica HCV correlata (6) hanno mostrato performance diagnostiche simili al TE. Il nostro studio conferma su una coorte piu' ampia di pazienti i risultati di Ferraioli et al (6): infatti anche noi abbiamo osservato un'accuratezza diagnostica simili, curve AUROC, tra ElastPQ[®]-pSWE e TE.

La performance diagnostica dell' ElastPQ[®]-pSWE si è inoltre dimostrata in increment con l'esperienza e senz'altro maggiore nell'ambito della diagnosi dei gradi di fibrosi lievi-moderata rispetto il TE.

Secondo i nostri dati, i migliori cut off per la diagnosi $F \geq 2$, $F \geq 3$ e $F=4$ appaiono meno elevati rispetto I cut off stimati per la diagnosi effettuata tramite TE :questi ultimi sovrapponibili a quelli ottenuti da almeno due studi precedenti (7) .

Questo risultato parrebbe essere specificamente legato alla tecnica ElastPQ[®]-pSWE , così come Ferraioli et al concludevano tramite la loro ricerca osservando parimenti risultati di stiffness minore per ElastPQ[®]-pSWE .

La maggiore limitazione del nostro studio è rappresentata dall'eziologia mista della patologia epatica cronica della popolazione: molte metanalisi hanno infatti dimostrato chiaramente che una delle principali cause di eterogeneità degli studi è proprio la differenza eziologica della patologia in oggetto: sarebbe opportuno analizzare i diversi gruppi separatamente in base all'eziologia in modo da interpretarne i risultati più correttamente.

Ovviamente questo stesso concetto dovrebbe essere applicato anche nell'ambito delle tecniche elastografiche come ad esempio ElastPQ[®]-pSWE Nonostante I dati riguardanti il nostro gruppo di pazienti epatopatici per HCV non sembravano essere così differenti rispetto l'intera popolazione

dello studio, occorrerebbe una casistica numerosa e omogenea per confermare i nostri risultati.

Per concludere possiamo affermare che ElastPQ®-pSWE è una tecnica fattibile, riproducibile e applicabile nella pratica clinica quotidiana per definire la stiffness epatica. La curva di apprendimento della metodica è leggermente più lunga rispetto a quella del TE, ma la riproducibilità della tecnica non risulta influenzata da altre variabili.

L'accuratezza diagnostica dell'ElastPQ®-pSWE nel determinare il grado di fibrosi epatica si incrementa con il tempo legato all'esperienza diretta dell'operatore, ed è simile all'accuratezza dimostrata per TE nella diagnosi di fibrosi epatica. La fibrosi epatica è il più importante determinante dei valori ottenuti mediante ElastPQ®-pSWE.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Gennisson J.L, Deffieux T. et al. Ultrasound Elastography: Principles and techniques. *Diagn Interv Imaging* 2013; 94: 487-95
- 2) Itoh A, Ueno E et al. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology* 2006;239: 341-50
- 3) Fraquelli M, Branchi F et al. The Role of Ultrasound Elasticity Imaging in Predicting Ileal Fibrosis in Crohn's Disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2015 (epub)
- 4) Ophir J, Céspedes I et al. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic Imaging* 1991; 13:111-34
- 5) Garra BS. Elastography: history, principles, and technique comparison. *Abdom Imaging* 2015; 40:680-97
- 6) Ferraioli G, Tinelli C et al. Reproducibility and performance of a new point shear wave elastography technique for assessing fibrosis in chronic Hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2014; 20(16):4787-96
- 7) Fraquelli M, Rigamonti C et al. Etiology-related determinants of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B or C. *J Hepatol* 54(4):621-8

- 8) Bonino F, Arena U et al. Liver stiffness, a non-invasive marker of liver disease: a core study group report. *Antivir Ther* 2010; 15:69-78
- 9) Castera L. Non-invasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterol* 2012; 142:1293-302
- 10) Fraquelli M, Rigamonti C. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography: what is hidden behind misleading results. *Hepatology* 2007; 46:282
- 11) Castera L. Non invasive assessment of liver fibrosis. *Dig Dis*. 2015; 33:498-503
- 12) Castera L, Bedossa P. How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: serum markers or transient elastography vs. liver biopsy? *Liver Int* 2011; 31: 13-7
- 13) Viganò M, Paggi S et al. Dual cut-off transient elastography to assess liver fibrosis in chronic hepatitis B: a cohort study with internal validation. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 353-62
- 14) Bota S, Herkner H et al. Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. *Liver int* 2013; 33:1138-47

- 15) Friedrich-Rust M, Wunder K et al. Liver Fibrosis in Viral Hepatitis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Imaging versus Transient Elastography. *Radiology* 2009; 252:595-604
- 16) Piscaglia F, Salvatore V et al. Accuracy of VirtualTouch Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging for the Diagnosis of Cirrhosis during Liver Ultrasonography. *Ultraschall Med* 2011; 32:167-75
- 17) Fierbinteanu-Braticevi C, Andronescu D et al. Acoustic radiation force imaging sonoelastography for non invasive staging of liver fibrosis. *World J gastroenterol* 2009; 15: 5525-32
- 18) Lupsor M, Badea R et al. Performance of a new elastographic method (ARFI technology) compared to unidimensional transient elastography in the noninvasive assessment of chronic hepatitis C. Preliminary results. *Gastrointest Liver Dis* 2009; 18:303-10
- 19) Friedrich-Rust M, Ong M et al. Real time Elastography for Noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *Am J Roentgenol* 2007; 188:758-64.
- 20) Gheonea D, Saftiou A et al. Real time sono-elastography in the diagnosis of diffuse liver diseases. *World J gastroenterol* 2010; 16:1720-6
- 21) Morikawa H, Fukuda K et al. Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2011 Mar; 46:350-8.

- 22) Goddi A, Bonardi M et al. Breast elastography: a literature review. *Journ Ultrasound* 2012; 15: 192-8
- 23) Dighe M, Luo S et al. Efficacy of thyroid ultrasound elastography in differential diagnosis of small thyroid nodules. *Eur J Radiol* 2013; 82:274-80
- 24) Friedrich-Rust M, Lupsor M et al. Point Shear Wave Elastography by Acoustic Radiation Force Impulse Quantification in Comparison to Transient Elastography for the Non-invasive Assessment of Liver Fibrosis in Chronic hepatitis C. *Ultrasound Med* 2015; 36:239-47
- 25) Sporea I, Bota S et al. Comparative study between two point Shear Wave Elastographic techniques: Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) elastography and ElastPQ. *Med Ultrason* 2014; 16:309-14
- 26) Ma JJ, Ding H et al. Assessment of liver fibrosis with elastography point quantification technique in chronic hepatitis B virus patients: a comparison with liver pathological results. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29:814-9
- 27) The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20:15–20.
- 28) Bedossa P, Poinard T. An algorithm for the grading of activity of chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–93.

29) Shrout P E, JL Fleiss Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. Psychol Bull 1979;86:420–428.428 [PubMed]

30) Fleiss J L. The design and analysis of clinical experiments. New York: John Wiley and Sons, 1981

31) Bland J M, Altman D G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;i307–310.310 [PubMed]

32) Ferraioli G, Filice C, Castera L, Choi BI, Sporea I, Wilson SR, Cosgrove D, Dietrich CF, Amy D, Bamber JC, Barr R, Chou YH, Ding H, Farrokh A, Friedrich-Rust M, Hall TJ, Nakashima K, Nightingale KR, Palmeri ML, Schafer F, Shiina T, Suzuki S, Kudo M.

WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 3: liver.

Ultrasound Med Biol. 2015 May;41(5):1161-79.

33) Boursier J, Konaté A, Gorea G, Reaud S, Quemener E, Oberti F, Hubert-Fouchard I, Dib N, Calès P. Reproducibility of liver stiffness measurement by ultrasonographic elastometry.

Clin Gastroenterol Hepatol. 2008 Nov;6(11):1263-9.

34) Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease.

Gut. 2007 Jul;56(7):968-73. Epub 2007 Jan 25

35) Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, et al. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. J Hepatol 2003;39:239-44.