

**DOTTORATO DI RICERCA IN ULTRASONOLOGIA IN
MEDICINA UMANA E VETERINARIA (XIX CICLO)**

**RUOLO DELL'ELASTOMETRIA PULSATA MONODIMENSIONALE
AD ULTRASUONI (FIBROSCAN®) NELLA STADIAZIONE DELLA
FIBROSI EPATICA IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO
ORTOTOPICO DI FEGATO CON RECIDIVA DI EPATITE C**

TESI DI DOTTORATO

Area tematica: Medicina Interna - Med 09

**Presentata dal Dott.
Francesco Corradi**

**Relatore Chiar.mo Prof.
Luigi Bolondi**

A.A.2006-2007

INDICE

SOMMARIO	PAGINA 3
INTRODUZIONE	PAGINA 5
PAZIENTI E METODI	PAGINA 7
STATISTICA	PAGINA 11
RISULTATI	PAGINA 12
CONCLUSIONI	PAGINA 14
BIBLIOGRAFIA	PAGINA 17
TABELLE	PAGINA 22
FIGURE	PAGINA 26
TAVOLE	PAGINA 30

SOMMARIO

PREMESSA: La progressione della recidiva d'epatite C è accelerata nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato e ciò ha portato alla necessità di sviluppare nuove e validate metodiche non invasive per la quantificazione e la misura della fibrosi epatica.

SCOPI: Stabilire l'efficacia dell'elastometria epatica (Fibroscan[®]) e dei parametri sierici di fibrosi, attualmente disponibili nella pratica clinica, per predire il grado di fibrosi nei pazienti sottoposti a trapianto epatico.

METODI: La correlazione fra fibrosi epatica, determinata mediante biopsia epatica ed esame istologico, e Fibroscan[®] o indici clinico-sierologici di fibrosi (Benlloch, Apri, Forns, Fibrotest and Doppler resistance index), è stata studiata in pazienti che avevano ricevuto un trapianto ortotopico di fegato con evidenza di recidiva d'epatite da HCV. Un totale di 36 pazienti, con la seguente classificazione istologica: fibrosi secondo METAVIR F1=24, F2=8, F3=3, F4=1, sono stati arruolati nella popolazione oggetto di studio. Un totale di 29 individui volontari sani sono serviti come controllo. Le differenze fra gli stadi di fibrosi sono state calcolate mediante analisi statistica non parametrica. Il miglior cut-off per la differenziazione di fibrosi significativa (F2-F4) è stato identificato mediante l'analisi delle curve ROC.

RISULTATI: La rigidità epatica ha presentato valori di 4.4 KPa (2.7-6.9) nei controlli (mediane e ranges), con valori in tutti i soggetti <7.0 KPa; 7.75 KPa (4.2-28.0) negli F1; 16.95 KPa (10.2-31.6) negli F_{≥2}; 21.10 KPa nell'unico paziente F4 cirrotico. Le differenze sono state statisticamente significative per i soggetti controllo versus F1 e _≥F2 (p<0.0001) e per F1 versus _≥F2 (p<0.0001). Un cut-off elastografico di 11.2 KPa

garantisce 88% di Sensibilità, 90% di Specificità, 79% di PPV e 95% di NPV nel differenziare i soggetti F1 dagli F2-F4. Le AUROC, relativamente alla capacità di discriminare fra i differenti gradi di fibrosi, evidenziavano un netto vantaggio per il Fibroscan[®] rispetto ad ognuno degli indici non invasivi di fibrosi.

CONCLUSIONI: L'elastometria epatica presenta una buona accuratezza diagnostica nell'identificare pazienti con fibrosi epatica di grado significativo, superiore a quella di tutti gli altri test non invasivi al momento disponibili nella clinica, nei pazienti portatori di trapianto epatico ortotopico da cadavere con recidiva di HCV.

INTRODUZIONE

La cirrosi epatica da HCV è la più comune indicazione al trapianto di fegato (LT), ma l'infezione da HCV ricorre nella quasi totalità dei casi, con lo sviluppo d'epatite nella maggior parte dei pazienti, entro il primo anno dal trapianto.

La progressione dell'epatite da virus C è accelerata nei riceventi LT rispetto ai pazienti immunocompetenti e a quella che interessa primitivamente organi nativi (1). Comunque, la storia naturale della recidiva d'epatite C è estremamente variabile: il 30-50% dei pazienti presenta minimo danno epatico, mentre il 10-30% delle infezioni progredisce a cirrosi con sviluppo di insufficienza epato-cellulare nel corso dei successivi 5 anni in media, ed in questi casi il grado di fibrosi rappresenta il maggior fattore determinante la sopravvivenza a lungo termine del graft. (2, 3).

Numerose variabili sono implicate nel decorso della reinfezione da HCV nel post-trapianto, come ad esempio l'età del donatore, lo schema di immunosoppressione, la precocità della recidiva, la carica virale nel pre e post trapianto, le concomitanti infezioni da CMV e la precocità del danno istologico, ma la rapidità della progressione di fibrosi presenta un'elevata variabilità inter-individuale e non è possibile desumerla basandosi unicamente su variabili cliniche. Proprio per questo motivo il timing e le strategie di trattamento antivirale non sono state uniformemente stabilite, ma variano in ogni singolo centro trapianto (1). In passato in diversi centri trapianto di fegato si sono praticate biopsie epatiche seriate per monitorizzare la progressione di danno epatico e la deposizione di fibrosi, così da poter stabilire il momento migliore per iniziare il trattamento antivirale. Comunque la biopsia epatica è una manovra invasiva che comporta varie limitazioni quali una seppur minima morbidità e mortalità oltre al

rischio di sottostadiazione dovuto alla troppo esigua campionatura bioptica (4-10). È proprio per questo motivo che recentemente l'emergere di vari indici basati su parametri clinici e biochimici, proposti per stadiare le epatiti croniche su fegati nativi ha suscitato grande interesse. Questi indici tuttavia non sono stati ancora validati relativamente al loro utilizzo in corso di recidiva di HCV in pazienti trapiantati di fegato. Inoltre, a causa dei rischi connessi con la pratica, ad oggi, la biopsia epatica è indicata solamente in caso di reale necessità clinica in chiave diagnostica e terapeutica, come per esempio in caso di alterazioni dei test di funzione epatica e non più in maniera seriatata per protocollo (11). Quindi al momento non sono disponibili metodiche non invasive validate per stabilire il grado di fibrosi epatica in pazienti sottoposti a LT con recidiva di HCV.

Ad oggi finalmente disponiamo di un nuovo apparato, non invasivo, in grado di misurare l'elasticità epatica, parametro correlato con il grado di fibrosi (12). Questa nuova tecnologia chiamata Fibroscan[®] (Echosens Co., Paris, France), valuta il grado d'elasticità del fegato misurando la velocità di un'onda a bassa frequenza che attraversa il parenchima epatico (13).

Scopo del presente studio è stato quella di valutare prospetticamente le performance diagnostiche del Fibroscan[®] e dei vari indici clinico sierologici al momento disponibili (Fibrotest[®], APRI, Forns index, Benlloch index) (12, 14-18) e le loro capacità di predire lo stadio di fibrosi nei pazienti con recidiva di HCV sottoposti a LT. Inoltre si è valutato anche il contributo diagnostico della misurazione degli indici di resistenza dell'arteria splenica misurati mediante eco-color-Doppler, un parametro questo strettamente correlato con le resistenze portali.

MATERIALI E METODI

Il protocollo del presente studio è stato approvato dal comitato etico dell'ospedale nel Dicembre del 2004, e lo studio è stato condotto nella prima metà del 2005, quando l'apparecchiatura biomedicale Fibroscan[®] è stata disponibile nel nostro Centro. Tutti i pazienti sottoposti a trapianto epatico ortotopico di lobo destro con recidiva d'epatite C, determinata dal riscontro di positività per il test dell' HCV-RNA e rialzo degli enzimi di citonecrosi epatica sono stati considerati per l'arruolamento nello studio qualora presentassero indicazioni cliniche alla biopsia epatica ed essa fosse stata eseguita nel periodo compreso fra Febbraio ed Agosto 2005. Indicazioni alla biopsia epatica sono state la conferma di recidiva di HCV e la esclusione di concomitanti patologie quali rigetto e l'epatite auto-immune, oppure il re-staging di un'epatite cronica in pazienti in cui la diagnosi fosse già precedentemente stata accertata. I criteri d'esclusione sono stati co-infezione con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o co-infezione da HBV, altre cause di malattie epatiche o biliari, riscontro di rigetto o di epatite autoimmune all'esame istologico, obesità (BMI>35), consumo di alcool in quantità maggiore a 20 mg/die, ascite, impossibilità tecnica ad ottenere un'affidabile misurazione elastografica (es: sovrappeso o spazi intercostali estremamente ravvicinati).

Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti prima dell'arruolamento.

Un gruppo di pazienti afferenti all'ambulatorio di Ultrasonologia dell'Unità di Medicina Interna nei quali si erano escluse concomitanti malattie epatiche sulla base della storia clinica, dell'esame ecografico, della normalità dei parametri di funzionalità epatica e delle trasaminasi (ALT < 30) (19), sono stati utilizzati come gruppo di controllo per la

misurazione dell'elasticità parenchimale epatica. La biopsia epatica in questi pazienti non è stata praticata per ragioni etiche.

Le misurazioni di elasticità parenchimale epatica sono state eseguite mediante l'apparato biomedicale denominato Fibroscan[®] (Echosens[™], Paris France), e sono state ottenute nella maggior parte dei casi immediatamente prima dell'esecuzione della biopsia epatica o comunque in tutti i casi entro 40 giorni dall'esecuzione della biopsia epatica e sempre in ogni caso senza che nessun tipo di trattamento fosse intrapreso nel mentre. Le determinazioni elastografiche sono state precedute da un esame eco-color-Doppler finalizzato a reperire la posizione ottimale nella quale posizionare la sonda del Fibroscan[®]. La punta della sonda del Fibroscan[®] ricoperta da gel veniva posizionata sulla pelle, fra le costole a livello del lobo destro del fegato sul punto di reperi indicato dall'ecografia B-mode. L'operatore assistito da un'immagine ultrasonografica A-mode fornita dall'apparecchio del Fibroscan[®] medesimo si sincerava che la posizione del fegato al di sotto del trasduttore fosse profonda almeno 6 cm e senza grossolane strutture vascolari interposte. In circa il 15% dei casi il posizionamento ideale del trasduttore identificato con l'esame ultrasonologico preliminare in B-mode differiva notevolmente (almeno di 3 cm) dal posizionamento iniziale che si sarebbe utilizzato senza l'ausilio delle esame ecografico convenzionale preliminare. Una volta che l'area bersaglio è stata localizzata, l'operatore preme ripetutamente il bottone per eseguire le misurazioni. Tutte le misurazioni sono state eseguite ad una profondità variabile tra i 25 ed i 65 mm. In tutto sono stati eseguiti almeno 10 rilievi validi per ogni paziente. In un certo numero di casi il primo sito di reperi selezionato per la determinazione elastometrica non è stato in grado di produrre misurazioni valide. Infatti nei pazienti riceventi LT, la posizione del fegato può non essere quella più convenzionale, a causa della sopraelevazione dell'emidiaframma, o alla discrepanza fra le dimensioni del graft

e le dimensioni della loggia epatica del ricevente. Pertanto, in questi casi in cui le determinazioni elastometriche risultavano ripetutamente errate un ulteriore punto di reperi per la sonda veniva ricercato mediante ripetizione dell'esame ultrasonografico convenzionale in B-mode. L'elasticità viene espressa in kilopascals (KPa) ed il valore mediano delle ripetute determinazioni veniva considerato come rappresentativo del modulo elastico del fegato in questione. L'intero esame non necessitava di più di 5-10 minuti. Solo esami con almeno 10 determinazioni valide sono stati presi in considerazione.

La determinazione del grado di fibrosi nei pazienti con epatite cronica da HCV può inoltre essere determinato mediante alcuni indici clinico sierologici di fibrosi. Questi indici sono stati originariamente introdotti per escludere o diagnosticare la presenza di fibrosi epatica di grado significativo (15, 16, 20, 21). L'accuratezza di alcuni di questi indici è stata successivamente validata da diversi studi, ma non sono mai stati testati in pazienti riceventi LT con recidiva di infezione HCV lasciando pertanto irrisolto il quesito relativo alla loro effettiva utilità in questo sottogruppo di pazienti (22).

I dosaggi sierici di questo studio sono stati eseguiti dal laboratorio centralizzato del nostro Ospedale, da campioni di sangue prelevati subito prima dell'esecuzione della biopsia epatica (23). Lo score del Fibrotest è stato calcolato dal sito web della Biopredictive (www.biopredictive.com), in base alla formula brevettata (Biopredictive, Paris, France, Fibrosure in the Ultrasound patented artificial intelligence algorithm USPTO 6,631,330 <http://www.uspto.gov/patft/index.html>) che includeva il calcolo di: alpha2-macroglobulina, aptoglobina, gamma-glutamyl transpeptidasi, età, bilirubina, apolipoproteina A1 e sesso. L'aspartato transaminasi to platelets ratio index [APRI-index] (16) è stato calcolato come segue: aspartato transaminasi (X limite superiore della norma) X100/plt ($10^9/L$). Il Forns index è stato calcolato come segue: 7.811-

$3.131 \cdot \ln(\text{plt}) + 0.781 \cdot \ln(\text{ggt}) + 3.467 \cdot \ln(\text{età}) - 0.014(\text{colesterolo})$. L'indice di Benlloch è stato calcolato a partire dalla percentuale di albumina, il tempo di protrombina, AST ed il tempo intercorso dal LT in accordo con la formula proposta da Berenguer & collaboratori (18).

Le biopsie epatiche sono state eseguite per via transcutanea eco guidata utilizzando aghi di Menghini (24), 17-18 G (1.4-1.2 mm diametro) (Biomol, Boca Raton, FL, USA).

Il materiale istologico ottenuto tramite biopsia epatica percutanea è stato fissato in formalina e successivamente riposto in paraffina. Tutti i campioni istologici sono stati analizzati in doppio cieco da 2 anatomo patologi, ignari dei risultati del Fibroscan[®], Fibrotest, APRI, Forns index, Benlloch index e dei parametri Doppler. La fibrosi epatica e l'attività necroinfiammatoria è stata valutata in maniera semiquantitativa in accordo con il METAVIR scoring system (17, 25).

Precisamente la presenza di fibrosi è stata classificata in una scala da 0 a 4 come segue: F0 = no fibrosi; F1 = fibrosi portale senza setti; F2 = fibrosi portale e pochi setti; F3 = numerosi setti senza cirrosi; F4 = cirrosi.

I parametri Doppler sono stati misurati in tutti i pazienti mediante una sola apparecchiatura dedicata ecografica (Technos[®] Esaote[™], Genoa, Italy) da uno o due ecografisti esperti (F.C. o F.P.). Abbiamo inoltre deciso di campionare in particolare l'indice di resistenza dell'arteria splenica in quanto questo indice correla strettamente con le resistenze portali intraepatiche (26) e decresce rapidamente tornando a valori prossimi alla normalità nel decorso post-operatorio non complicato (27, 28). L'indice di resistenza dell'arteria splenica è stato campionato a livello intraparenchimale, in prossimità dell'ilo, in accordo con le linee guida precedentemente pubblicate (29). Tutti gli indici di resistenza sono stati misurati almeno 3 volte, e la media di queste misurazioni è stata presa come valore finale.

ANALISI STATISTICA

Le variabili quantitative sono state espresse come mediane ed interquartili (IQ) (25^{mo} e 75^{mo} quartile) e le differenze sono state analizzate mediante test non-parametrici (Kruskal-Wallis). Le differenze fra le variabili qualitative sono state elaborate mediante il test di Fisher. La sensibilità (S), specificità (Sp), il valore predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV) dei diversi valori soglia di rigidità epatica precedentemente pubblicati e considerati predittivi di fibrosi sono stati calcolati. Il valore diagnostico della rigidità epatica, degli indici di fibrosi (APRI, Forns, Fibrotest, Benlloch) e dell'indice di resistenza dell'arteria splenica nel predire un grado di fibrosi significativa ($F \geq 2$) sono stati ricavati dal calcolo delle aree sotto la curva (areas under the receiver operator curve-AUROC). Un valore di area sotto la curva di 1.0 è caratteristico di un test ideale, mentre un valore 0.5 indica un test privo di potere diagnostico.

I valori ottimali di cut-off sono stati identificati così da massimizzare sensibilità e specificità per ogni dato valore. I valori predittivi positivi e negativi e le likelihood ratios sono state calcolate per ognuno dei valori di cut-off presi in considerazione. Un valore cut-off di 0.6 è stato utilizzato come indice di riferimento per l'arteria splenica come precedentemente validato per la diagnosi di insorgenza di ipertensione portale nei pazienti cirrotici (30). Ci si è avvalsi per le analisi statistiche di SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago IL, USA).

RISULTATI

Complessivamente 36 pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato (LT) sono stati inclusi nello studio. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in Tabella 1.

La lunghezza media delle biopsie epatiche trans-cutanee eseguite è stata di 29 mm.

La distribuzione di fibrosi in accordo alla classificazione di METAVIR è stata la seguente F1, n = 24 ; F2, n = 8; F3, n = 3; F4, n = 1. Nessuno dei pazienti arruolati ha presentato fibrosi in stadio F0. A causa dello scarso numero di pazienti con fibrosi di grado F3 e F4, tutte le fibrosi di grado \geq F2 sono state raggruppate e considerate come “fibrosi significative”, in accordo con i lavori precedentemente pubblicati a riguardo su tali argomenti (15-17, 21) e le necessità cliniche. L’analisi statistica è stata pertanto condotta confrontando fra gruppi per la presenza o l’assenza di “fibrosi significativa” riguardo a tutti i test. Per assenza di “fibrosi significativa” s’intende lo stadio di fibrosi F1 in accordo con la presente casistica.

In pazienti con recidiva di infezione da HCV, il valore mediano di rigidità epatica è risultato essere 9.5 KPa (range 4.2-31.6 KPa), mentre nel gruppo controllo è stato 4.4 KPa (range 2.7-6.9 KPa) ($p < 0.001$). In pazienti con “fibrosi significativa” la rigidità mediana è stata 16.9 KPa (range 10.2-31.6 KPa), mentre nei pazienti F1 è stata 7.7 KPa (range 4.2-28.0 KPa) ($p < 0.001$) (Fig.1). Il valore cut-off di 11.2 KPa ha fornito la migliore accuratezza diagnostica nel differenziare le fibrosi epatiche di grado significativo. Abbiamo testato inoltre le performances dei valori cut-off di rigidità epatica precedentemente pubblicati (7.1 , 8.7 , 12.5 e 14.5 KPa) (31, 32) come mostrato in Tabella 2.

Una differenza statisticamente significativa relativamente alla capacità di discriminare fra pazienti con e senza fibrosi di grado significativo è stata riscontrata per il Fibroscan[®], l'indice di Benlloch, l'indice di resistenza dell'arteria splenica determinato all'indagine Doppler e l'APRI, ma non per l'indice di Forns ed il Fibrotest (Kruskal-Wallis, rispettivamente: $p < 0.001$; 0.015; 0.017; 0.026; 0.065; 0.631); la Figura 2 mostra i box-plots del Fibroscan[®], dell'indice di resistenza dell'arteria splenica, e dei parametri sierici di fibrosi epatica (Benlloch, APRI, Forns, Fibrotest) relativamente ai 2 gruppi di pazienti; La performance diagnostica complessiva nel discriminare fra pazienti con e senza fibrosi di grado significativo è maggiore per il Fibroscan[®] come evidenziato dalla comparazione delle AUROC (Fig.3-Tab.3). La Figura 3 mostra il potere diagnostico nell'identificare fibrosi epatica di grado significativa (curve ROC) per ognuna delle 6 variabili in oggetto. Solamente il Fibroscan[®], l'indice di Benlloch, l'indice di resistenza dell'arteria splenica e l'APRI hanno mostrato una capacità diagnostica statisticamente significativa in questi pazienti. (Table 3).

CONCLUSIONI

I dati emersi dalla presente ricerca hanno dimostrato che la misurazione dell'elasticità epatica mediante Fibroscan[®] rappresenta una metodica, semplice, non invasiva, facilmente ripetibile ed accurata per stabilire la severità della deposizione di tessuto fibroso nella recidiva d'epatite C a seguito di LT. Questa metodica inoltre si è dimostrata molto più accurata ed affidabile rispetto al calcolo di indici sierici di fibrosi basati su variabili clinico-sierologiche.

Negli anni recenti sono stati intrapresi numerosi tentativi per stabilire il grado di fibrosi basandosi su variabili biochimiche ed ematologiche (14, 17). L'applicazione di queste metodiche nei riceventi LT, può essere imprecisa e poco accurata, poichè le variabili incluse nel calcolo dei loro scores possono essere alterate da condizioni non strettamente correlate con la progressione di fibrosi nei grafts con reinfezione da HCV. Per esempio: a) la persistenza di splenomegalia correlata con l'ipertensione portale pre-trapianto influenza la conta piastrinica nel post-trapianto, b) le terapie immunosoppressive aumentano i livelli plasmatici di colesterolo, c) l'età del ricevente quasi mai corrisponde all'età del graft.

Sino ad oggi in letteratura è apparso un solo studio che analizzasse l'utilità dei marcatori non invasivi di fibrosi per determinare la severità della recidiva d'epatite C in pazienti trapiantati di fegato (18) e questo, nonostante fornisca un modello matematico, non si è dimostrato in grado di fornire una accuratezza diagnostica ottimale, se non per escludere la presenza di fibrosi epatica di grado significativo, limitatamente ad un piccolo gruppo di pazienti.

L'elastometria pulsata monodimensionale ad ultrasuoni al contrario, non è influenzata da variabili clinico sierologiche e misura direttamente l'elasticità del parenchima epatico. Ciò giustifica la maggiore accuratezza diagnostica rispetto alle variabili clinico-sierologiche nei pazienti portatori di trapianto di fegato. I valori dei migliori cut-off da noi identificati, nella nostra serie di pazienti, risultano essere leggermente più alti rispetto a quelli proposti negli articoli precedentemente pubblicati relativamente a fegati nativi non trapiantati e nell'unico articolo relativo a trapianti di fegato (33). 2 spiegazioni potrebbero giustificare i valori soglia più elevati riscontrati nel nostro studio. Da un lato il fegato trapiantato è esposto a vari potenziali agenti lesivi. Questi potrebbero aumentare il tasso di deposizione della componente mesenchimale nel parenchima, ma con una distribuzione differente rispetto a quella che si riscontra in corso di epatite C e per questo non ben rappresentata dallo score di METAVIR. Per esempio, gli inibitori della calcineurina, il mantenimento di regimi immunosoppressivi, è noto che accelerino la deposizione di tessuto fibroso e la rigidità vascolare, determinando danni clinici su organi bersaglio come ad esempio il rene. Una seconda spiegazione è la distribuzione della fibrosi nella nostra serie. In nessun caso la fibrosi era completamente assente nella nostra serie e questo probabilmente rende conto di un grado maggiore di fibrosi e conseguentemente di più elevati livelli di rigidità epatica nel sottogruppo di pazienti classificato come "senza fibrosi di grado significativo" a differenza dei precedenti studi nei quali una proporzione rilevante di pazienti "senza fibrosi di grado significativo" presentava un Metavir score pari a F0 (assenza di fibrosi). La completa assenza di pazienti senza fibrosi (F0) deriva dai criteri di selezione da noi applicati. Infatti la nostra popolazione non è stata sottoposta per protocollo a biopsia epatica, ma la biopsia è stata eseguita solo sulla base dell'indicazione clinica. Pertanto è molto probabile che i nostri pazienti fossero tutti affetti da almeno un qualche grado di

fibrosi, rispetto a casistiche con pazienti sottoposti a biopsia epatica per protocollo, come invece è stato in altri studi (18, 33). Comunque la nostra scelta, nel presente studio, è stata quella di includere solamente pazienti con indicazione clinica alla biopsia epatica e segnatamente con test di funzione epatici alterati, in accordo con la corrente corretta pratica clinica e pertanto il presente risultato rappresenta più da vicino la prospettiva clinica nella quale necessitiamo di avere maggiori informazioni (11).

In conclusione, l'elastometria pulsata monodimensionale ad ultrasuoni rappresenta una metodica accurata per la diagnosi non invasiva di fibrosi epatica di grado significativo in riceventi di LT con recidiva di HCV. Questa metodica potrebbe sostituire la biopsia epatica in tutti i casi in cui quest'ultima fosse indicata solamente per stabilire la severità della fibrosi. Pertanto potrebbe trovare applicazione clinica ideale in tutti quei casi in cui si ritiene necessario monitorizzare solamente la progressione della fibrosi, durante il follow-up e dopo avere perfezionato la diagnosi istologica di recidiva di epatite C ed avere escluso altre possibili concomitanti diagnosi con la biopsia epatica.

In tale contesto è auspicato uno studio prospettico per valutare la capacità di monitoraggio della progressione di fibrosi di tale metodica.

BIBLIOGRAFIA

1. Berenguer M, Palau A, Fernandez A, Benlloch S, Aguilera V, Prieto M, Rayon JM, et al. Efficacy, predictors of response, and potential risks associated with antiviral therapy in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2006;12:1067-1076.
2. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002;8:S14-18.
3. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, et al. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996;334:815-820.
4. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* 2003;39:239-244.
5. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:1449-1457.
6. Abdi W, Millan JC, Mezey E. Sampling variability on percutaneous liver biopsy. *Arch Intern Med* 1979;139:667-669.
7. Garcia G, Keeffe EB. Liver biopsy in chronic hepatitis C: routine or selective. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3053-3055.
8. Holund B, Poulsen H, Schlichting P. Reproducibility of liver biopsy diagnosis in relation to the size of the specimen. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:329-335.

9. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* 1986;2:165-173.
10. Buscarini L, Fornari F, Bolondi L, Colombo P, Livraghi T, Magnolfi F, Rapaccini GL, et al. Ultrasound-guided fine-needle biopsy of focal liver lesions: techniques, diagnostic accuracy and complications. A retrospective study on 2091 biopsies. *J Hepatol* 1990;11:344-348.
11. Sebagh M, Samuel D. Place of the liver biopsy in liver transplantation. *J Hepatol* 2004;41:897-901.
12. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1705-1713.
13. Sandrin L, Tanter M, Gennisson JL, Catheline S, Fink M. Shear elasticity probe for soft tissues with 1-D transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2002;49:436-446.
14. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
15. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-992.
16. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-526.

17. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-942.
18. Benlloch S, Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Aguilera V, Berenguer J. Prediction of fibrosis in HCV-infected liver transplant recipients with a simple noninvasive index. *Liver Transpl* 2005;11:456-462.
19. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002;137:1-10.
20. Lichtinghagen R, Bahr MJ. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:715-726.
21. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-1362.
22. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1160-1174.
23. Imbert-Bismut F, Messous D, Thibault V, Myers RB, Piton A, Thabut D, Devers L, et al. Intra-laboratory analytical variability of biochemical markers of fibrosis (Fibrotest) and activity (Actitest) and reference ranges in healthy blood donors. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:323-333.
24. Menghini G. One-second biopsy of the liver--problems of its clinical application. *N Engl J Med* 1970;283:582-585.
25. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.

26. Bolognesi M, Sacerdoti D, Merkel C, Gerunda G, Maffei-Faccioli A, Angeli P, Jemmolo RM, et al. Splenic Doppler impedance indices: influence of different portal hemodynamic conditions. *Hepatology* 1996;23:1035-1040.
27. Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Angeli P, Gerunda G, Merenda R, Volpin R, et al. Splenic impedance indices: a useful method to monitor patients after liver transplantation? *Hepatology* 1998;27:674-678.
28. Piscaglia F, Zironi G, Gaiani S, Mazziotti A, Cavallari A, Gramantieri L, Valgimigli M, et al. Systemic and splanchnic hemodynamic changes after liver transplantation for cirrhosis: a long-term prospective study. *Hepatology* 1999;30:58-64.
29. Sacerdoti D, Gaiani S, Buonamico P, Merkel C, Zoli M, Bolondi L, Sabba C. Interobserver and interequipment variability of hepatic, splenic, and renal arterial Doppler resistance indices in normal subjects and patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:986-992.
30. Piscaglia F, Donati G, Serra C, Muratori R, Solmi L, Gaiani S, Gramantieri L, et al. Value of splanchnic Doppler ultrasound in the diagnosis of portal hypertension. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:893-899.
31. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.
32. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Ledinghen V, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:48-54.

33. Carrion JA, Navasa M, Bosch J, Bruguera M, Gilabert R, Forns X. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1791-1798.

TABELLE

Caratteristiche	<i>n</i> = 36	Ranges
Sesso (maschi)	30 (83.3)	
Età (anni)	58	47-62
BMI (Kg/m ²)	24.5	23-28
AST (U/L)	60	42-95
ALT (U/L)	72	50-108
ALP (U/L)	261.5	202-334
γ-GT (U/L)	88.5	43-261
Bilirubina (mg/dL)	1.1	0.6-1.7
PLT (10 ³ /μL)	119	79-154
Mesi trascorsi dal trapianto	19.4	4.6-39.2
Fibrosis score (METAVIR)		
F1	24 (67)	
F2	8 (22)	
F3	3 (8)	
F4	1 (3)	

Tabella 1. Caratteristiche dei 36 pazienti al momento dell'esecuzione della biopsia epatica. NB. Risultati espressi in mediana ed IQ (25^{mo} e 75^{mo} interquartile) o come numero di pazienti (%). [AST aspartate aminotransferasi; ALT alanine aminotransferasi; ALP fosfatasi alcalina; γ-GT -gamma-glutamyl transpeptidase; PLT conta piastrinica]

	Valori (KPa)	S	Sp	PPV	NPV
Fibrosi \geqF2	7.1	1	0.30	0.43	1
	8.7	1	0.68	0.6	1
	11.2	0.88	0.90	0.79	0.95
	12.5	0.88	0.95	0.83	0.92
	14.4	0.80	0.95	0.88	0.88

Tabella 2. Performances diagnostiche di differenti valori cut-off values di rigidità epatica per la diagnosi di fibrosi significativa (METAVIR Fibrosis Stages $F \geq 2$). I valori cut-off qui riportati corrispondono a quelli che forniscono la maggiore accuratezza nella nostra serie ed a quelli già pubblicati in letteratura.

Abbreviazioni: S, sensibilità; Sp, specificità; PPV, valore predittivo positivo; NPV, valore predittivo negativo.

Metodi	AUROC	<i>p</i>	95% CI	Cutoff	S	Sp	Ppv	Npv
Fibroscan	0.941	<0.001	0.846-1.036	11.2	0.88	0.90	0.79	0.95
Apri	0.822	0.009	0.638-1.006	1.4	0.88	0.53	0.45	0.81
Splenic Doppler	0.796	0.017	0.596-0.996	0.6	0.88	0.84	0.70	0.80
Benlloch	0.766	0.032	0.578-0.955	0.2	0.75	0.74	0.54	0.82
Forns index	0.737	0.056	0.543-0.931	9.0	0.75	0.68	0.50	0.80
Fibrotest	0.503	0.979	0.242-0.764	0.8	0.50	0.63	0.43	0.76

Tabella 3. AUROC (Area Under the Receiver Operating Curve) e 95% CI (Intervallo di Confidenza) per Fibroscan[®], Benlloch, Forns, APRI, Splenic Doppler Resistance Index e Fibrotest relativamente a METAVIR Fibrosis Stages F_{≥2} vs F1. Valori *p* <0.05 indicano performance diagnostiche statisticamente significative. I cut-off ottimali sono stati quelli che hanno dato la maggior sommatoria di specificità e sensibilità. Abbreviazioni: S, sensibilità; Sp, specificità; PPV, valore predittivo positivo; NPV, valore predittivo negativo.

FIGURE

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (PackBits)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

Figura 1

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (PackBits)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

Figura 2

QuickTime™ e un
decompressore TIFF (PackBits)
sono necessari per visualizzare quest'immagine.

Figura 3

TAVOLE RIASSUNTIVE

USE OF FIBROSCAN IN LIVER TRANSPLANTED RECIPIENT: A NEW NON-INVASIVE METHOD FOR ASSESSMENT OF HEPATIC FIBROSIS

F.Corradi

Department of Internal Medicine and Gastroenterology

Policlinico Universitario S.Orsola-Malpighi
University of Bologna

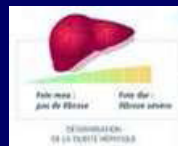
BACKGROUND

- Progression of recurrent hepatitis C is accelerated in liver transplant (LT) recipients compared with immunocompetent patients.
- Needle biopsy is the reference procedure to monitor the progression of liver damage and fibrosis, which are the main determinants of long-term graft survival.
- Because of the morbidity/mortality risk associated with needle biopsy and the pre-transplant alterations of some valuable parameters, such as platelet count, the need for new non-invasive methods has been recently advocated.

FIBROSCAN®

A new non-invasive technology (Fibroscan®, Echosens Co., Paris, France) has been developed to evaluate liver stiffness, which is related to the degree of liver fibrosis.

Fibroscan® employs transient elastography to measure the velocity of a low-frequency shear wave going through the organ, thus providing an estimate of its elasticity.



AIM

To compare the accuracies of Fibroscan®, Doppler and currently available biochemical markers in the assessment of fibrotic stage in LT recipients, using liver biopsy as gold standard.

PATIENTS

- 36 LT recipients with hepatitis C recurrence of various severities, studied within one month after liver biopsy.
- 27 healthy controls with normal liver biochemistry and presumably normal liver histology.

Inclusion criteria: LT with recurrent HCV (HCV-RNA +) with clinical indication for liver biopsy

Exclusion criteria: Concomitant HIV, HBV, HCC, uninterpretable LB results, rejection or autoimmune hepatitis, obesity (BMI>30), alcohol intake >20 mg/day, narrow spaces (<9 mm), ascitis.

MEASUREMENTS

- Elastometry by Fibroscan® (FS)
- Doppler resistance index (RI) of splenic arteries
- APRI (aspartate transaminase to platelets ratio index)
- Fibrotest (FT)
- Forns Index
- Benlloch Index

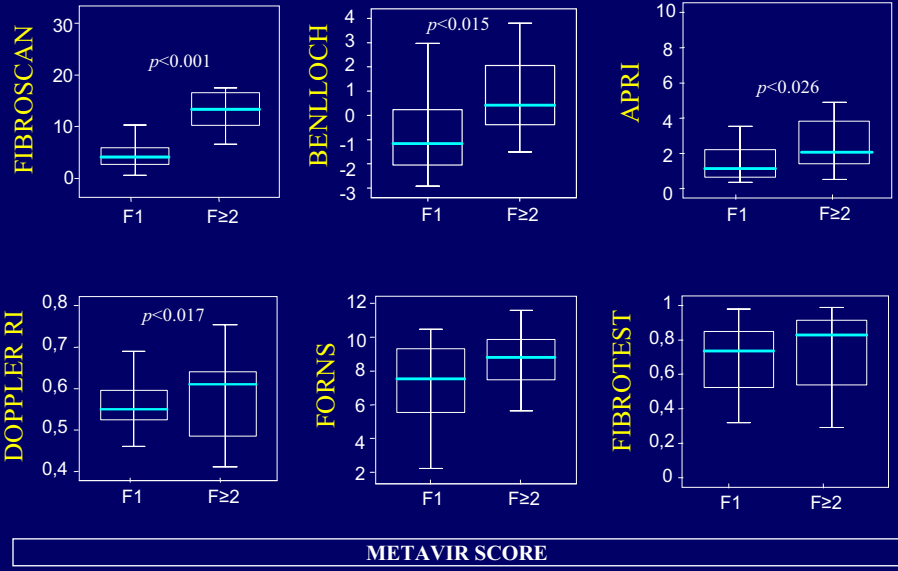
PATIENTS' CHARACTERISTICS

Sex (male/female)	30 / 6	
Age (yr)	55 ± 9	40 - 68
BMI (Kg/m ²)	24.7 ± 2.5	20.7 - 28.6
AST (U/L)	73 ± 43	18 - 203
ALT (U/L)	96 ± 74	20 - 310
ALP (U/L)	374 ± 333	61 - 1462
γ-GT (U/L)	174 ± 175	14 - 661
Bilirubin (mg/dL)	2 ± 2.4	0.36 - 9.84
PLT (10 ³ /mm ³)	137 ± 86	52 - 417
	Metavir stage	
F1	24	}
F2	8	
F3	3	
F4	1	

STATISTICS

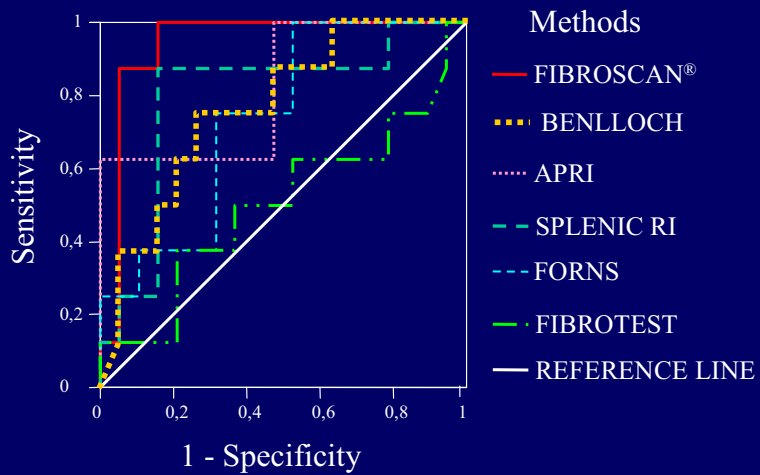
- Values are reported as **median with IQR** and tested for significance by non-parametric analysis (Mann-Whitney or Kruscal-Wallis).
- The best **cut-offs** for identifying significant fibrosis (F_≥2) were determined by **ROC** analysis.
- The area under the ROC (**AUROC**) was calculated for each parameter.
- **Diagnostic accuracy**: Comparison of AUROCs, sensitivity (**Sen**), specificity (**Spec**), positive predictive value (**PPV**), negative predictive value (**NPV**).

RESULTS



ROCs and METAVIR STAGE

F1 vs.F2-4



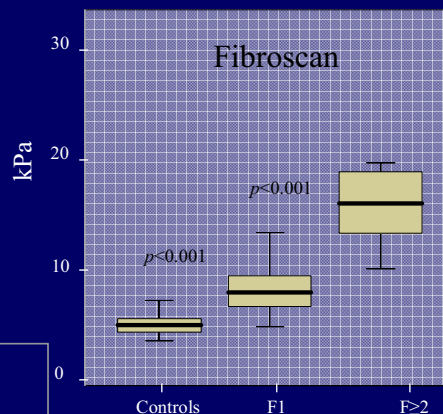
AUROC's

Method	Auroc	<i>p</i>	95% CI
FS	0.941	<0.001	0.846-1.036
Apri	0.822	0.009	0.638-1.006
Splenic RI	0.796	0.017	0.596-0.996
Benlloch	0.766	0.032	0.578-0.955
Forns	0.737	0.056	0.543-0.931
FT	0.503	0.979	0.242-0.764

CUT-OFFs

Method	<i>p</i>	Cutoff	S	Sp	Ppv	Npv
FS	<0.001	11.2	0.88	0.90	0.79	0.95
Benlloch	0.015	0.20	0.75	0.74	0.54	0.82
Splenic RI	0.017	0.61	0.88	0.84	0.70	0.80
Apri	0.026	1.43	0.88	0.53	0.45	0.81
Forns	0.065	9.01	0.75	0.68	0.50	0.80
FT	0.631	0.83	0.50	0.63	0.43	0.76

Diagnostic value of FS for different degrees of fibrosis (Metavir Score).



Metavir Score	Stiffness (Median)	Ranges	<i>p</i>
Control Group	4.4	2.7 - 6.9	<i>p</i> < 0.001
Patients (F1+F _{≥2})	9.5	4.2 - 31.6	
F < 2	7.75	4.2 - 28	<i>p</i> < 0.001
F ≥ 2	16.95	10.2 - 31.6	

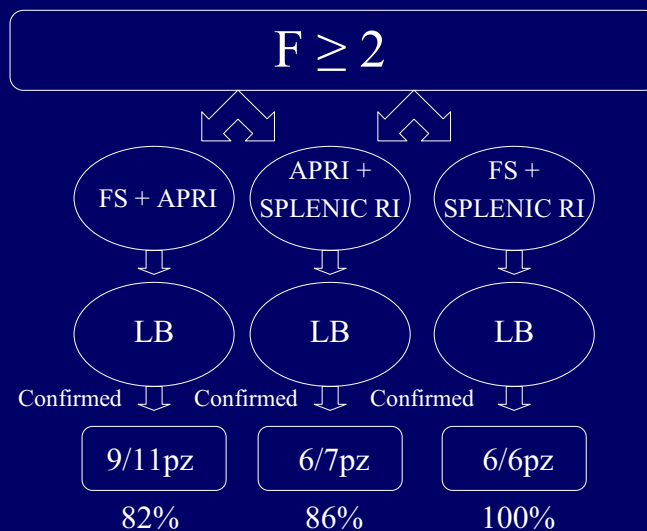
FIBROSCAN CUT-OFFS

	Values (kPa)	Sen	Spec	PPV	NPV
Fibrosis ≥ F2	7.1 (Castera L. Gastroenterol 2005)	1	0.30	0.43	1
	8.74 (Ziol M. Hepatology 2005)	1	0.68	0.6	1
	11.2 (present study)	0.88	0.90	0.79	0.95
	12.5 (Castera L. Gastroenterol 2005)	0.88	0.95	0.83	0.92
	14.4 (Ziol M. Hepatology 2005)	0.80	0.95	0.88	0.88

ACCURACY OF EACH METHOD ALONE OR IN COMBINATIONS

Method cut-offs	AUROC	Sen	Spec	PPV	NPV
FS ≥ 11.2 Kpa	0.89	0.92	0.88	0.79	0.95
FS+ Splenic RI	0.88	1	1	1	1
Splenic RI ≥ 0.61	0.86	0.64	0.84	0.7	0.8
APRI+ Splenic RI	0.85	0.88	0.89	0.88	0.89
APRI ≥ 1.43	0.70	0.75	0.54	0.45	0.81
FS+APRI	0.82	1	0.81	0.75	1

Agreement between FS, APRI and DOPPLER
SPLENIC RI combinations with LB examination for the
diagnosis of significant fibrosis ($F \geq 2$).



CONCLUSIONS

- Liver elastometry is an accurate non-invasive tool to identify LT recipients who develop significant fibrosis ($F \geq 2$).
- Among the various test combinations, the one of FS and Splenic Doppler RI provides the best diagnostic accuracy.
- These preliminary results should be confirmed in a larger prospective study