

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI**

TEZA DE DOCTORAT

EVALUAREA NONINVAZIVĂ A FIBROZEI, ACTIVITĂȚII INFLAMATORII ȘI STEATOZEI ÎN HEPATITELE CRONICE VIRALE

-REZUMAT-

**Doctorand,
Gherlan George Sebastian**

**Conducător științific,
Profesor Dr. Petre Iacob Calistru**

2013

Cuprins

I. Introducere	1
II. Obiective	3
III. Material și metodă	4
III.1. Loturile de pacienți și datele colectate	4
III.2. Metodologia colectării datelor	6
IV. Rezultate	7
IV.1. Capitolul I	7
IV.1.1. Identificarea corelațiilor dintre markerii biochimici/hematologici, indicii demografici/antropometrici, elasticitatea hepatică și rezultatele biopsiei hepatice	7
IV.1.2. Evaluarea metodelor neinvazive deja consacrate versus biopsia hepatică	13
IV.1.3. Concordanța tehnicilor neinvazive în aprecierea fibrozei, inflamației și steatozei hepatice	17
IV.1.4. Stabilirea unei combinații mixte de markeri neinvazivi pentru identificarea sau excluderea fibrozei semnificative și activității inflamatorii semnificative ..	21
IV.2. Capitolul II	23
IV.2.1. Monitorizarea unui lot de pacienți cu infecție cu VHC pe parcursul tratamentului antiviral și până la 24 de luni de la start	23
IV.2.2. Fibroscan – Variabilitatea normala între doua măsurători	24
V. Concluzii	26
Bibliografie	29

I. Introducere

Indiferent de etiologia afecțiunilor hepatice cronice, evoluția la nivel celular este aceeași: inflamație, apoi necroză, vindecare (cu defect – fibroză), reparare extensivă (regenerare – cu evoluție spre ciroză), displazie și în cele din urmă hepatocarcinom. În practica curentă, în afecțiunile cronice hepatice evaluarea severității afectării hepatice se face prin aprecierea gradului fibrozei hepatice. Fibroza hepatică este un proces dinamic, reversibil, caracterizat prin distrucția hepatocitelor, pierderea microarhitecturii hepatice, proliferarea miofibroblaștilor și depunerea în exces de componente ale matricei extracelulare (1).

Limitările biopsiei hepatice au făcut să existe începând cu anii 90 o mișcare în rândul hepatologilor ce avea ca scop dezvoltarea unor metode neinvazive pentru evaluarea severității afectării hepatice în bolile hepatice cronice, în primul rând a fibrozei.

Există două mari grupe de tehnici neinvazive de evaluare a fibrozei hepatice. Prima este cea a ”markerilor serici” și urmărește prezicerea stadiului fibrozei și pe cât posibil și a altor determinanți ai afectării hepatice (inflamația și steatoza) utilizând parametri serici măsurabili. Cea de-a doua grupă este cea a tehnicilor imagistice, în principal elastografice, indiferent de aparatura folosită (dedicată – Fibroscan, sau nu – ARFI (ultrasonografie) și RMN).

Grupa markerilor serici are două subcategorii: markeri direcți și indirecți. Markerii indirecți sunt scoruri bazate pe teste de rutină: APRI (AST, trombocite) (2), FIB-4 (vârsta, TGP, TGO, trombocite) (3), Forns (vârsta, trombocite, GGT, colesterol) (4), Fibroindex (AST, trombocite, gama globuline) (5), indexul lui Bonacini (trombocite, raportul ALT/AST, INR) (6), etc. În această categorie, o mențiune aparte trebuie făcută pentru Fibrotest, un test patentat și comercializat, bazat pe alfa 2 macroglobulină, haptoglobulină, apolipoproteina A1, bilirubina totală, GGT și ALT (7). Acest din urmă test evaluează și activitatea inflamatorie și este parte a Fibromax, care apreciază și steatoza hepatică.

Markerii serici direcți se bazează pe dozarea componentelor matricei extracelulare în ser (laminină, acid hialuronic, collagen IV, pro-collagen III, metaloproteinaze și inhibitori celulari ai metaloproteinazelor), precum și pe determinarea citokinelor implicate în procesul de fibrogeneză (TGF beta 1, TNF) (8). Aceste investigații sunt mai puțin accesibile și mai costisitoare comparativ cu cele ce compun testele indirecte. Markerii direcți au fost folosiți fie separat (9,10), fie în combinații (de exemplu Fibrospect: acid hialuronic, TIMP – 1, alfa 2 macroglobulina (11), ELF (acid hialuronic, procolagen III, PIIINP și TIMP – 1 (12)).

Unele scoruri biochimice combină teste directe și indirecte (de exemplu Fibrometer – trombocite, timp quick, AST, alfa 2 macroglobulina, vârsta, uree, acid hialuronic (13)).

Studii prospective au arătat că utilizarea a două teste simultan crește acuratețea rezultatului și poate conduce la eliminarea necesității biopsiei hepatice în peste 50% dintre cazuri (14).

Cea de-a doua grupă de tehnici neinvazive este *grupa tehnicilor imagistice*. Aceasta cuprinde ecografia (US), tomografia computerizată (CT) și rezonanța magnetică nucleară (RMN) – metode utilizate oarecum de rutină când se suspicionează o suferință cronică hepatică, dar care nu pot stadializa fibroza sau detecta inflamația, fiind însă relativ utile pentru detecția cirozei și steatozei hepatice. Ecografia simplă poate fi diagnostică pentru ciroză în până la 90% dintre cazuri folosind doi sau trei parametri cantitativi (dimensiunea splinei, ficatului, venei porte) sau calitativi (suprafața ficatului, contur, ecostructură, prezența/absența ascitei) și examen Doppler (15-18).

În această a doua grupă se află și tehnicile elastografice. Elastografia tranzitorie unidimensională (Fibroscan) este o metodă bazată pe ultrasonografie și care utilizează o undă mecanică pentru a măsura elasticitatea ficatului (19-21). Peste 692 lucrări publicate (19) susțin sensibilitatea, specificitatea și reproductibilitatea metodei. Utilizarea simultană (în algoritmi de tip ”pas cu pas”) a Fibroscan și Fibrotest a demonstrat creșterea acurateții față de oricare dintre cele două metode utilizată separat (20, 22).

Existența a numeroase tehnici neinvazive de evaluare a severității hepatice se datorează faptului că niciuna dintre acestea nu are o performanță diagnostică suficientă deocamdată. Astfel, pentru oricare dintre tehnici, luate separat sau în baterii de teste, în algoritmi diagnostici rămân pacienți nediagnosticsați (nediagnosticabili) și în majoritatea cazurilor există situații identificate în care performanța testelor este influențată de anumiți factori. Mai mult, majoritatea testelor neinvazive sunt axate pe prezicerea gradului fibrozei, pierzând însă din vedere aspecte importante precum inflamația și steatoza, elemente cu valoare semnificativă pentru predicția progresiei fibrozei (23-25). Majoritatea tehnicilor neinvazive sunt ineficiente în discriminarea exactă a stadiilor fibrozei, cu deosebire a gradelor mici sau intermediare (2, 3, 4, 7, 22, 26-28). Diferențierea între F0/F1 și stadiile mai mari poate fi utilă în decizia inițierii tratamentului antiviral, iar identificarea fibrozei semnificative ($F \geq 2$) poate declanșa procedurile specifice de screening pentru hipertensiunea portală iar mai apoi pentru hepatocarcinom (29).

În detecția fibrozei avansate sau cirozei, majoritatea tehnicilor au dovedit o acuratețe diagnostică rezonabilă (2, 3, 4, 7, 22, 26-28, 30). Pentru detecția cirozei este utilă și ecografia abdominală simplă, însă deși foarte specifică atunci când parametrii calitativi sau cantitativi mai sus menționați sunt identificați, este insuficient de sensibilă (15). Mai multe studii au găsit utilizând acești parametri o acuratețe de 82-88% în diagnosticul cirozei hepatice prin ultrasonografie simplă (16, 31, 32). După cum se știe, ecografia este o tehnică destul de subiectivă și necesită un observator cu experiență pentru a avea o eficiență maximă. Adăugarea mai recentă pe unele aparate a posibilității măsurării vitezei de propagare a unei unde acustice (ARFI) prin țesutul hepatic aduce o notă de obiectivitate examenului.

Atunci când evaluăm o tehnică neinvazivă este foarte important să stabilim clar de la început ce anume dorim să aflăm: cât e de utilă în excluderea sau confirmarea cirozei? Sau cât e de utilă în

excluderea sau confirmarea fibrozei semnificative ($F \geq 2$) sau severe ($F \geq 3$)? Sau dorim stadializarea exactă a fibrozei pe o scară corespondentă unui scor histologic de fibroză (METAVIR sau altul)? Aceste end-point-uri diferite vor duce la concluzii diferite în ceea ce privește valorile predictive pozitive sau negative, a sensibilității respectiv specificității fiecărei metode. Alt aspect de menționat este că a compara efectiv stadiul prezis al fibrozei cu stadiul obținut prin biopsie nu este același lucru cu a evalua puterea discriminatorie a metodei (curba ROC), care depinde de sensibilitatea și specificitatea metodei (curba ROC este o reprezentare grafică a sensibilității (adevărat pozitiv) funcție de rata de fals pozitiv (1-specificitate) și este dependentă de prevalența relativă a stadiilor de fibroză (30). Măsurarea curbei ROC pentru diferite circumstanțe permite oarecum o standardizare și ierarhizare a metodelor, astfel încât ele să devină comparabile. "Discriminarea" poate fi și ea foarte bună dacă se dorește evaluarea "ciroză versus normal", dar aceleași teste au capacitate scăzută dacă se dorește evaluarea F0/F1 versus F2.

După cum observa profesorul Burroughs în editorialul său pentru Journal of Hepatology din 2007 (29), scorurile neinvazive sunt toate variabile continue obținute din compararea cu variabile categoriale (scorurile histologice) care sunt doar descriptive, și nu au nicidecum o progresie aritmetică (de exemplu stadiul 2 METAVIR nu este de două ori mai sever decât stadiul 1 sau nu are jumătate din severitatea F4). Aceasta explică parțial corelația insuficientă între tehnicile neinvazive și histologie. O abordare metodologică mai corectă ar fi probabil raportarea la scoruri histologice de fibroză cantitative (cum ar fi cuantificarea digitală a colagenului).

II. Obiective

În *prima parte a lucrării* de față mi-am propus:

1. Să evaluez corelația dintre rezultatul puncției hepatice (fibroză, inflamație, steatoză) pe de o parte și testele biochimice simple (ALT, AST, GGT, bilirubina totală, alfa 2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteina A1, colesterol, trigliceride, glicemie, trombocite), factorii demografici și antropometrici (vârstă, sex, înălțime, greutate) și elasticitatea hepatică (Fibroscan) pe de altă parte.

2. Să apreciez sensibilitatea și specificitatea mai multor teste neinvazive: Fibroscan, Fibrotest, APRI, FIB-4 și Forns - singure sau grupate - pentru identificarea corectă a fibrozei, inflamației și steatozei considerând ca standard de aur puncția hepatică și totodată să evaluez și concordanța dintre aceste teste.

3. Să obțin scoruri mixte (imagistice și biochimice) pentru evaluarea severității afectării hepatice destinate îmbunătățirii diagnosticului în cazurile în care performanțele testelor deja existente sunt insuficiente.

Obiectivele pe care le-am urmărit în *cea de-a doua parte a lucrării* au fost:

4. Evaluarea utilității testelor neinvazive în monitorizarea evoluției afectării hepatice la un lot de pacienți tratați pentru hepatita C (în timpul și după tratamentul etiologic al infecției) și

5. Măsurarea *variabilității intrinseci* a elastografiei tranzitorii unidimensionale (Fibroscan) pentru a stabili care este diferența între două măsurători care ar trebui luată în seamă ca și semnificativă în sensul agravării sau ameliorării fibrozei hepatice în timp.

III. Material și metodă

III.1. Loturile de pacienți și datele colectate

Lotul utilizat în *primul capitol* este constituit din 230 de pacienți (100 cu infecție cu VHB, 130 cu infecție cu VHC). Deoarece începând cu anul 2010, protocolul pentru tratamentul hepatitelor cu VHC sau VHB nu a mai impus necesitatea efectuării biopsiei hepatice, numărul acestor manevre ulterior apariției și aplicării acestui protocol a scăzut dramatic. Din această cauză, lotul cuprinde pacienți care aveau disponibile biopsie hepatică, elastografie (Fibroscan) și Fibromax începând cu martie 2007 (incluși retrospectiv) și apoi până în februarie 2013 (incluși prospectiv din octombrie 2009).

Criteriile de includere au fost:

1. Infecție cu VHB sau VHC
2. Disponibilitatea Fibrotest, Fibromax și hemogramă efectuate în aceeași zi (\pm biopsie hepatică efectuată la distanță de maxim 7 zile înainte sau după testele neinvazive).
3. Pacient cu vârsta peste 18 ani, de sex feminin sau masculin

Criteriile de excludere au fost:

1. Existența unei duble infecții (VHB+VHC, VHB+VHD sau coinfectie HIV)
2. Existența unei patologii care să interfereze cu rezultatul Fibrotest (conform specificațiilor Biopredictive)
3. Test Fibroscan invalid (nu îndeplinește criteriile de validitate ale producătorului)

Baza de date a cuprins: datele de identificare ale pacientului (nume, prenume, data nașterii), vârsta, sexul, înălțimea, greutatea, etiologia hepatitei (VHB sau VHC), rezultatul biopsiei hepatice (fibroza, inflamație, steatoza – scor METAVIR), operatorul și rezultatul Fibroscan (elasticitate, IQR, măsurători valide, rata de succes), Fibromax (rezultatele numerice și interpretarea producătorului pentru fibroză, inflamație, steatoză, rezultatele analizelor: alfa 2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteina A1, bilirubina totală, ALT, AST, GGT, glicemie, colesterol, trigliceride), număr de trombocite. Rezultatul puncției hepatice a fost disponibil doar la 147 dintre pacienți. Includerea în lot s-a făcut prin analiza retrospectivă a bazei de date exportate din Fibroscan, comparată apoi cu baza de date electronică a Centrului de Diagnostic și Tratament ”Dr. Victor Babeș” pentru identificarea

pacienților la care s-a efectuat și Fibromax. Ulterior am recuperat rezultatele biopsiilor hepatice ale pacienților la care această investigație a fost disponibilă din baza de date a Spitalului Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale "Dr. Victor Babeș" sau din dosarul personal al pacienților, având în vedere criteriul temporal menționat. Începând cu luna octombrie 2009, includerea s-a făcut prospectiv pentru toți pacienții cărora li s-au efectuat în centrul nostru, la recomandarea medicului curant Fibroscan și Fibromax și care s-au încadrat în criteriile de includere și excludere menționate. Consimțământul informat al pacienților a fost luat în cadrul evaluării pentru afecțiunea pentru care pacientul era investigat.

În *al doilea capitol* am analizat două loturi de pacienți, un lot de 202 pacienți incluși prospectiv între Octombrie 2009 și Octombrie 2011 - cu etiologii variate cărora le-am efectuat câte două măsurători elastografice (Fibroscan) complete (a câte 10 determinări valide), consecutive, în același spațiu intercostal, în încercarea de a evalua variabilitatea intrinsecă a metodei și un alt lot de 32 de pacienți tratați cu interferon pegilat și ribavirină pentru hepatită cronică cu VHC, monitorizați prin metode neinvazive pe parcursul tratamentului și încă 12 luni posttratament (prospectiv).

Criteriile de includere:

Lotul de 202 pacienți: toți pacienții care s-au adresat pentru efectuarea elastografiei hepatice în Centrul de Diagnostic și Tratament "Dr. Victor Babeș" după 01.10.2009 și până în 31.10.2011, indiferent de etiologia suferinței hepatice și cărora li s-au putut efectua câte 2 examinări complete (valide conform specificațiilor producătorului).

Lotul de 32 de pacienți monitorizați: Pacienți cu infecție cu VHC care au început tratamentul specific antiviral (Peg-INF + RBV) după 01.01.2010, cu vârsta peste 18 ani și care au consimțit în scris să fie monitorizați în cadrul acestui studiu. A fost stabilit ca și criteriu de excludere – pacienții cu orice tip de non-răspuns care reinițiază un tratament antiviral în perioada de urmărire (nu a existat însă niciun astfel de caz).

Pentru lotul de 202 pacienți am reținut și analizat următoarele date: datele de identificare (nume, prenume, data nașterii), vârsta, sexul, înălțimea, greutatea, minimul și maximul fiecărui set complet de măsurători valide, IQR pentru fiecare set. Pentru lotul monitorizat 24 de luni am reținut datele la inițierea tratamentului, la 12, 18 și 24 luni de la inițiere (indiferent de răspunsul la tratament sau durata tratamentului): date de identificare ale pacientului (nume, prenume, data nașterii), vârsta, sex, înălțime, greutate, biopsie hepatică (scor METAVIR) (doar la start), ALT, AST, GGT, colesterol, număr de trombocite, ARN VHC, elasticitate hepatică (Fibroscan).

III.2. Metodologia colectării datelor

Toate elastografiile hepatice au fost efectuate pe același aparat (Fibroscan 502, Echosens Paris) în Centrul de Diagnostic și Tratament ”Dr. Victor Babeș”, având în permanență sonda (M) calibrată conform cerințelor producătorului. Măsurătorile au fost efectuate de către 2 operatori (subsemnatul și coordonatorul acestui proiect, Prof. Dr. Petre Calistru) pentru primul lot, iar pentru ultimele două de către un singur operator (subsemnatul) pentru a evita orice variabilitate inter-operator. Spațiul în care s-au efectuat măsurătorile a fost pe linia medioaxilară dreaptă, imediat sub matitatea hepatică maximă, cu pacientul în decubit dorsal. Pentru fiecare pacient am luat în calcul doar rezultatele considerate valide conform următoarelor criterii specificate de producător: minim 10 măsurători valide, rata de succes peste 60%, IQR sub 1/3 din valoarea obținută. Am utilizat pentru departajarea în stadii METAVIR următoarele cut-off-uri: 5.5 KPa, 7.1 KPa, 9.5 KPa, 14.5 KPa pentru respectiv F1, F2, F3 și F4 (22).

Testele biochimice au fost lucrate după cum urmează: ARN VHC pe Cobas Ampliprep/Cobas Taqman (Roche), alfa2 macroglobulina, apolipoproteina A1 și haptoglobina pe BN ProSpec (Dade Behring), colesterolul și trigliceridele pe Vitros 350 (Ortho Clinical Diagnostics), ALT, AST, GGT, BT și glicemia pe Architect ci4100 (Abbott) iar hemograma pe Cell-Dya 3700 (Abbott). Toate testele biochimice au fost efectuate în cadrul laboratorului Centrului de Diagnostic și Tratament ”Dr. Victor Babeș”. Recoltarea probelor de sânge s-a realizat în condiții ”a jeun”.

Valorile normale ale parametrilor biochimici sunt redate în tabelul 1

Tabelul 1. Valorile normale ale parametrilor biochimici analizați

Test	Minim	Maxim	Unitatea de măsură
Alfa 2 macroglobulina	1.3	3	g/l
Apolipoproteina A1	1.25	2.15	g/l
Haptoglobina	0.3	2	g/l
Colesterol	0	5.7	mmol/l
Trigliceride	0	2.26	mmol/l
ALT (TGP)	0	55	U/l
AST (TGO)	5	34	U/l
GGT	8	43	U/l
BT (bilirubina totală)	0	22.2	μmol/l
Glicemia	4.2	6.1	mmol/l
Număr de trombocite	150000	400000	număr/μl
ARN VHC	0	0	UI/ml

Rezultatul Fibromax a fost obținut de pe site-ul Biopredictive (contra cost), iar rezultatele celorlalte scoruri biochimice au fost calculate conform formulelor:

$$\text{APRI} = (\text{AST}/\text{limita superioară a AST}) * 100 / \text{numărul trombocitelor}. \quad (2)$$

$$\text{FIB-4} = [\text{Vârsta (ani)} * \text{AST (U/l)}] / [\text{număr trombocite (10}^9/\text{l)} * \text{ALT}^{1/2} \text{ (U/l)}]. \quad (3)$$

$$\text{FORNS} = 7.811 - 3.131 \times \ln [\text{numărul trombocitelor (10}^9/\text{l)}] + 0.781 \times \ln [\text{GGT (U/L)}] + 3.467 \times \ln [\text{vârsta (ani)}] - 0.014 [\text{colesterol (mg/dl)}]. \quad (4)$$

Interpretarea acestor ultime 3 scoruri a fost făcută conform recomandărilor din articolele în care acestea au fost prezentate inițial de către autorii lor:

APRI: sub 0.5 = fără fibroză semnificativă, 0.5-1.5 F2/F3, peste 1.5 = F4 (2)

FIB-4: sub 1.45 = fără fibroză semnificativă, 1.45-3.25 F2/F3, peste 3.25 = F4. (3)

FORNS: sub 4.2 – fără fibroză semnificativă. (4)

Am colectat toate aceste date în programul de calcul tabelar Microsoft Office Excel, iar prelucrarea statistică a informațiilor am efectuat-o cu același program și cu SPSS versiunea 16.0.

IV. Rezultate

IV.1. Capitolul I

IV.1.1. Identificarea corelațiilor dintre markerii biochimici/hematologici, indicii demografici/antropometrici, elasticitatea hepatică și rezultatele biopsiei hepatice

Am analizat 15 parametri – unul imagistic/fizic (elastografia tranzitorie unidimensională (Fibroscan)), 3 demografici (vârsta, indicele de masă corporală și sexul), unul hematologic (numărul trombocitelor) și 10 biochimici (ALT, AST, GGT, alfa2 macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteina A1, bilirubina totală, glicemia, colesterolul și trigliceridele), parametri care separat sau grupați sunt folosiți deja pentru aprecierea severității hepatice după cum am arătat în partea teoretică a acestei lucrări. Rezultatele au fost următoarele:

- **Pentru fibroză** prezintă corelație cu rezultatul biopsiei hepatice: ALT, AST, GGT, alfa2macroglobulina, haptoglobina, bilirubina totală, glicemia, colesterolul total, trombocitele, vârsta și elastografia.
- **Pentru inflamație** sunt corelate cu rezultatul biopsiei hepatice: ALT, AST, GGT, alfa2 macroglobulina, apolipoproteina A1, haptoglobina, bilirubina totală, colesterolul total, trombocitele, vârsta și elastografia
- **Pentru steatoză** sunt corelate cu rezultatul PBH: GGT, trigliceridele, glicemia, BMI, elastografia.

Aceste date sunt centralizate în tabelul 2.

Parametru	Fibroza	Inflamația	Steatoza
ALT	$r_s=0.365, p<0.001$	$r_s=0.599, p<0.001$	/-/-/
AST	$r_s=0.551, p<0.001$	$r_s=0.788, p<0.001$	/-/-/
GGT	$r_s=0.505, p<0.001$	$r_s=0.522, p<0.001$	$r_s=0.381, p<0.001$
Alfa2 macroglobulina	$r_s=0.508, p<0.001$	$r_s=0.599, p<0.001$	/-/-/
Haptoglobina	$r_s=-0.326, p<0.0$	$r_s=-0.397, p<0.001$	/-/-/
Apolipoproteina A1	/-/-/	$r_s=-0.229, p=0.005$	/-/-/
Bilirubina totala	$r_s=0.288, p<0.001$	$r_s=0.333, p<0.001$	/-/-/
Glicemia	$r_s=0.355, p<0.001$	$r_s=0.248, p<0.001$	$r_s=0.211, p=0.027$
Colesterol total	$r_s=-0.264, p=0.006$	$r_s=-0.276, p=0.004$	/-/-/
Trigliceride	/-/-/	/-/-/	$r_s=0.401, p<0.001$
Trombocite	$r_s=-0.423, p<0.001$	$r_s=-0.336, p<0.001$	/-/-/
Vârsta	$r_s=0.321, p<0.001$	$r_s=0.366, p<0.001$	/-/-/
BMI	/-/-/	/-/-/	$r_s=0.656, p<0.001$
Elasticitate hepatică	$r_s=0.818, p<0.001$	$r_s=0.647, p<0.001$	$0.286, p<0.001$

Tabelul 2. Coeficienții de corelație și semnificația statistică pentru parametrii analizați cu fibroza, inflamația și steatoza hepatică (conform PBH). (/-/-/ nu se corelează)

În tabelele 3, 4 și 5 și în figurile 1, 2 și 3, am centralizat rezultatele analizei curbei ROC pentru identificarea fibrozei semnificative ($F \geq 2$), severe ($F \geq 3$) și respectiv cirozei ($F=4$).

Parametru	AUROC ($F \geq 2$)	P (Sig)	CI 95%
ALT	0.664	<0.001	0.576 – 0.752
AST	0.753	<0.001	0.663 – 0.843
GGT	0.707	<0.001	0.624 – 0.791
Alfa2 macroglobulina	0.764	<0.001	0.685 – 0.843
Haptoglobina	0.350	0.002	0.261 – 0.438
Bilirubina totala	0.643	0.003	0.553 – 0.734
Glicemia	0.664	0.003	0.562 – 0.766
Colesterol total	0.338	0.004	0.235 – 0.442
Trombocite	0.313	0.001	0.210 – 0.417
Vârsta	0.657	0.001	0.569 – 0.746
Elasticitate hepatică	0.880	<0.001	0.829 – 0.925

Tabelul 3. Analiza curbelor ROC pentru identificarea $F \geq 2$.

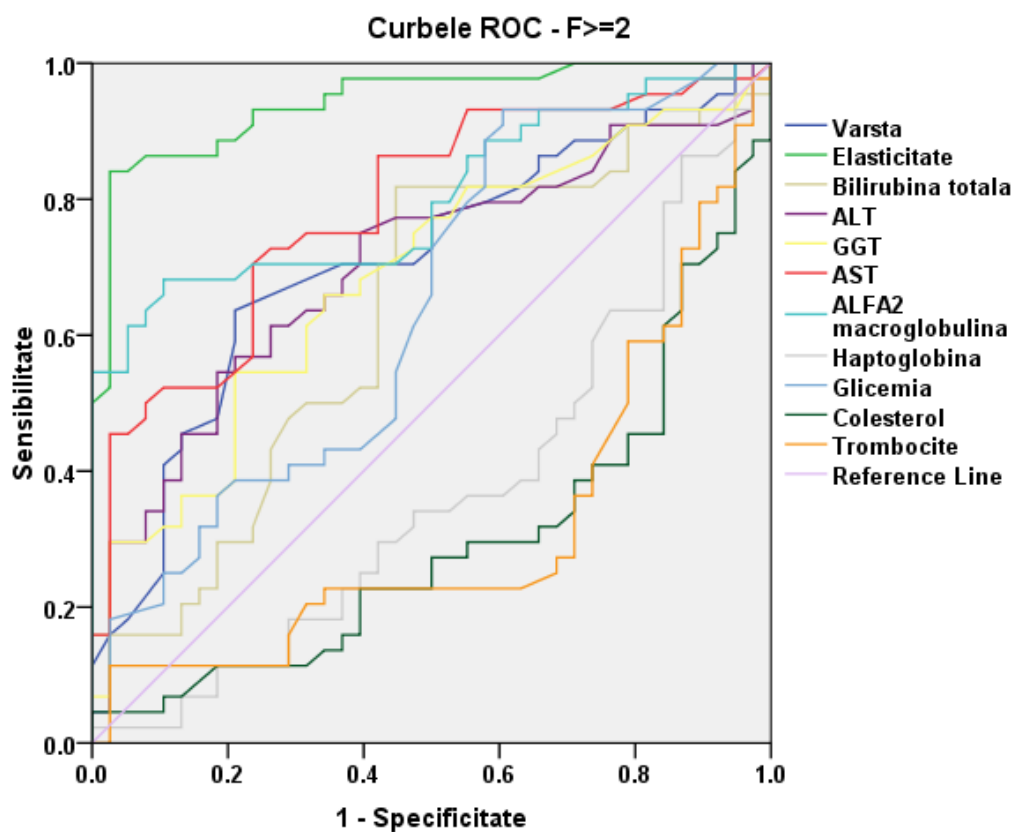


Fig. 1. Curbele ROC pentru parametri analizați în identificarea F \geq 2

Parametru	AUROC (F \geq 3)	P (Sig)	CI 95%
ALT	0.723	<0.001	0.635 – 0.811
AST	0.799	<0.001	0.711 – 0.888
GGT	0.756	<0.001	0.676 – 0.836
Alfa2 macroglobulina	0.777	<0.001	0.696 – 0.836
Haptoglobina	0.325	<0.001	0.235 – 0.415
Bilirubina totala	0.653	0.003	0.560 – 0.744
Glicemia	0.659	0.006	0.551 – 0.768
Colesterol total	0.311	0.001	0.208 – 0.415
Trombocite	0.261	<0.001	0.157 – 0.364
Vârsta	0.657	0.002	0.567 – 0.748
Elasticitate hepatică	0.912	<0.001	0.865 – 0.963

Tabelul 4. Analiza curbelor ROC pentru identificarea F \geq 3.

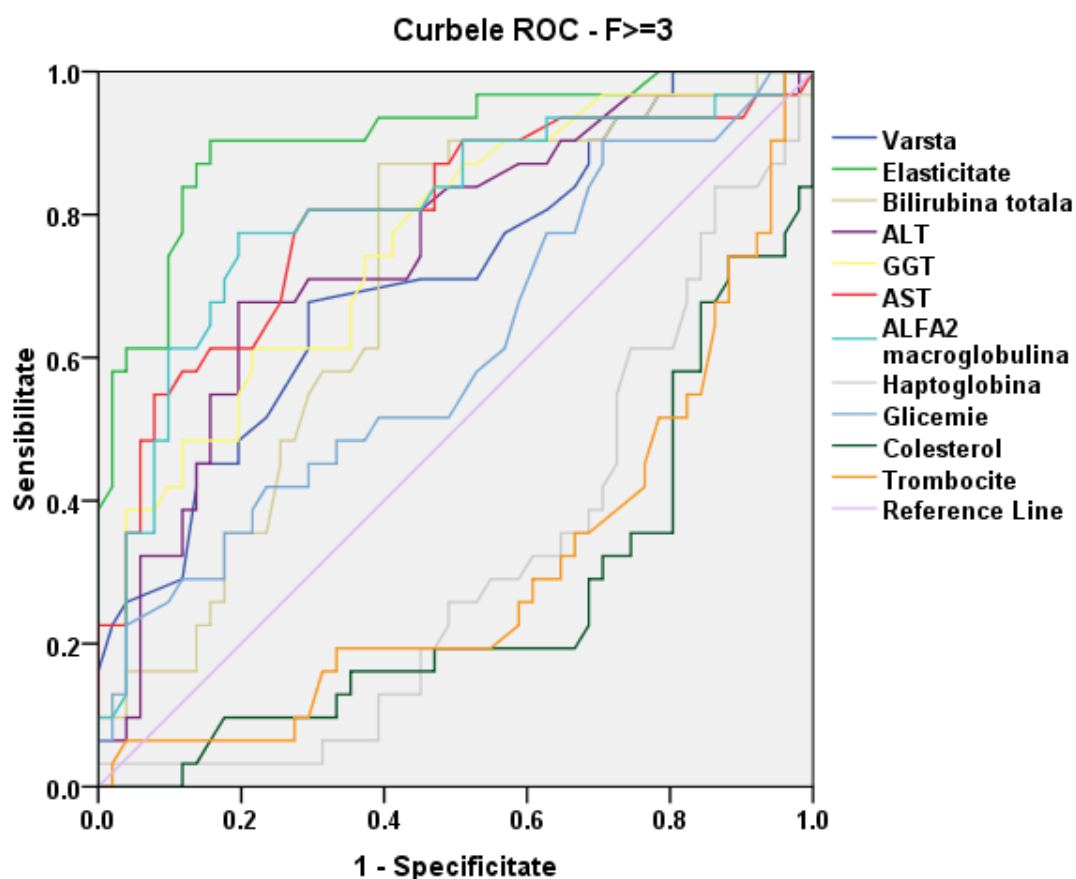


Fig. 2. Curbele ROC pentru parametrii analizați în identificarea F≥3

Parametru	AUROC (F=4)	P (Sig)	CI 95%
ALT	0.653	0.028	0.531 – 0.773
AST	0.753	0.003	0.612 – 0.896
GGT	0.814	<0.001	0.710 – 0.917
Alfa2 macroglobulina	0.746	<0.001	0.634 – 0.853
Haptoglobina	Nesemnificativ	0.334	-
Bilirubina totala	0.699	0.004	0.586 – 0.812
Glicemia	0.714	0.016	0.560 – 0.868
Colesterol total	Nesemnificativ	0.135	-
Trombocite	0.197	<0.001	0.060 – 0.334
Vârsta	0.673	0.013	0.563 – 0.783
Elasticitate hepatică	0.938	<0.001	0.876 - 1

Tabelul 5. Analiza curbelor ROC pentru identificarea F=4.

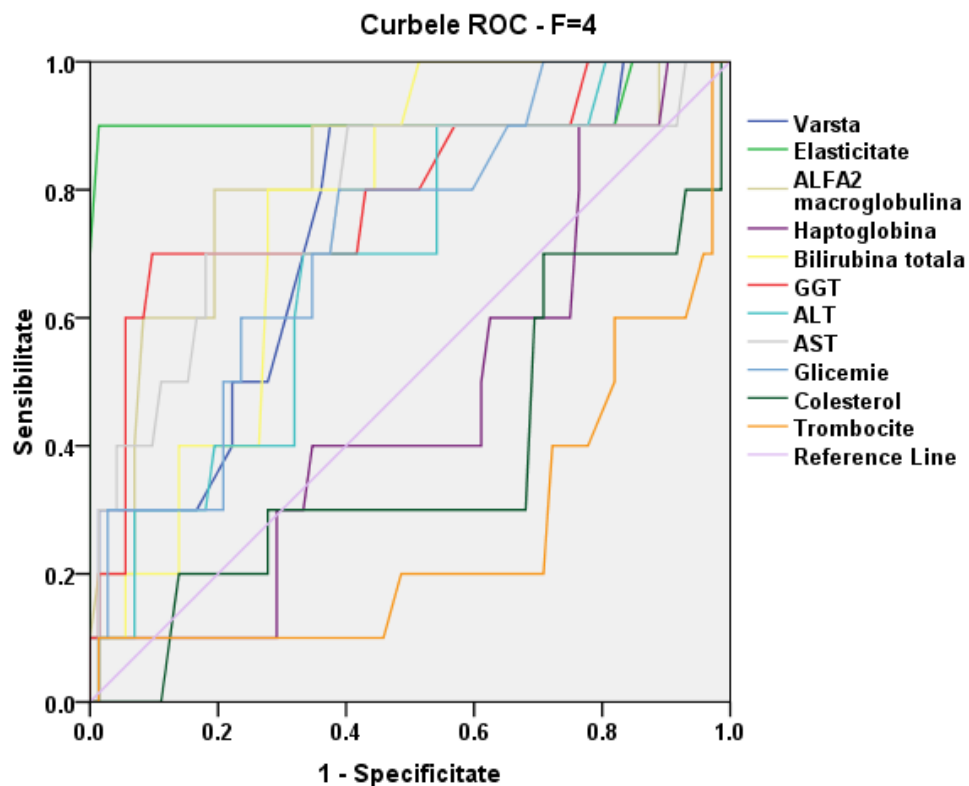


Fig. 3. Curbele ROC pentru parametrii analizați în identificarea F=4

În tabelele 6, 7, 8 și 9 am centralizat datele cu privire la curbele ROC ale parametrilor care ar putea fi utilizați în stadializarea activității inflamatorii și steatozei hepatice

Parametru	AUROC ($A \geq 2$)	P (Sig)	CI 95%
ALT	0.842	<0.001	0.755 – 0.929
AST	0.878	<0.001	0.799 – 0.958
GGT	0.742	<0.001	0.635 – 0.849
Alfa2 macroglobulina	0.814	<0.001	0.716 – 0.911
Bilirubina totala	0.705	0.001	0.592 – 0.817
Glicemia	0.583	0.194	0.459 – 0.708
Colesterol total	0.397	0.109	0.273 – 0.521
Trombocite	0.348	0.018	0.227 – 0.470
Vârsta	0.717	0.001	0.609 – 0.830
Elasticitate hepatică	0.848	<0.001	0.766 – 0.929

Tabelul 6. Analiza curbelor ROC pentru identificarea $A \geq 2$.

Parametru	AUROC (A=3)	P (Sig)	CI 95%
ALT	0.836	<0.001	0.761 – 0.910
AST	0.918	<0.001	0.851 – 0.984
GGT	0.774	<0.001	0.696 – 0.852
Alfa2 macroglobulina	0.846	<0.001	0.776 – 0.915
Bilirubina totala	0.666	0.001	0.574 – 0.757
Glicemia	0.644	0.021	0.526 – 0.761
Colesterol total	0.355	0.020	0.234 – 0.476
Trombocite	0.244	<0.001	0.141 – 0.347
Vârsta	0.717	<0.001	0.631 – 0.803
Elasticitate hepatică	0.859	<0.001	0.788 – 0.931

Tabelul 7. Analiza curbelor ROC pentru identificarea A=3 .

Parametru	AUROC (S≥2)	P (Sig)	CI 95%
GGT	0.704	0.013	0.564 – 0.844
Glicemia	0.763	0.001	0.625 – 0.902
Trigliceride	0.755	0.002	0.616 – 0.895
BMI	0.855	<0.001	0.742 – 0.967
Elasticitate hepatică	0.654	0.062	0.496 – 0.811

Tabelul 8. Analiza curbelor ROC pentru identificarea S≥2 .

Parametru	AUROC (S=3)	P (Sig)	CI 95%
GGT	0.758	<0.001	0.652 – 0.865
Glicemia	0.720	0.004	0.588 – 0.852
Trigliceride	0.764	0.001	0.639 – 0.889
BMI	0.798	0.001	0.655 – 0.941
Elasticitate hepatică	0.658	0.023	0.528 – 0.788

Tabelul 9. Analiza curbelor ROC pentru identificarea S=3 .

În urma analizei corelației simple și a curbelor ROC, următorii parametri vor fi incluși în regresia logistică:

- **Pentru fibroză:** ALT, AST, GGT, alfa2macroglobulina, bilirubina totală, glicemia, trombocitele, vârsta și elastografia.
- **Pentru inflamație:** ALT, AST, GGT, alfa2 macroglobulina, apolipoproteina A1, bilirubina totală, colesterolul total, trombocitele, vârsta și elastografia
- **Pentru steatoză:** GGT, trigliceridele, glicemia, BMI, elastografia.

IV.1.2. Evaluarea metodelor neinvazive deja consacrate versus biopsia hepatică

Datele privitoare la performanța testelor neinvazive în evaluarea fibrozei, inflamației și steatozei hepatice versus PBH sunt centralizate în cele ce urmează:

✚ FIBROZA

○ Identificarea $F \geq 2$

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.880	<0.001	0.829 – 0.925
Fibrotest	0.799	<0.001	0.724 – 0.874
APRI	0.806	<0.001	0.713 – 0.900
FIB-4	0.805	<0.001	0.698 – 0.888
Forns	0.824	<0.001	0.604 – 0.807

Tabelul 10. Analiza curbelor ROC pentru identificarea $F \geq 2$.

Curbele ROC pentru metodele neinvazive analizate în identificarea fibrozei semnificative

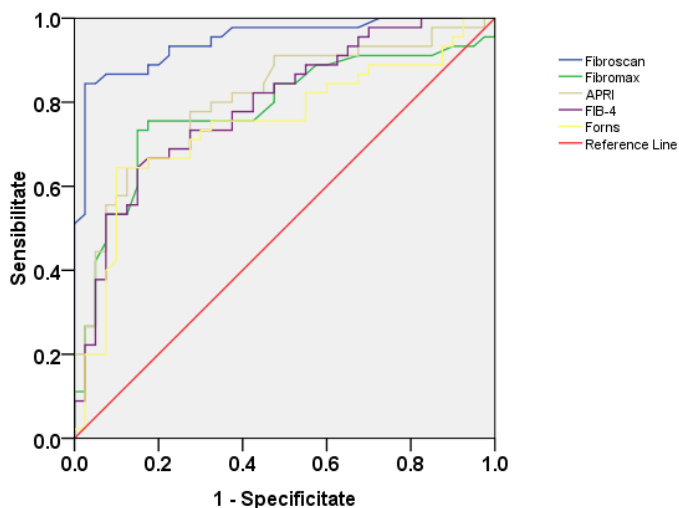


Fig. 4. Curbele ROC pentru elastografie, Fibromax, APRI, FIB-4, Forns în identificarea $F \geq 2$

○ **Identificarea $F \geq 3$**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.912	<0.001	0.865 – 0.963
Fibrotest	0.845	<0.001	0.777 – 0.913
APRI	0.821	<0.001	0.727 – 0.916
FIB-4	0.805	<0.001	0.704 – 0.907
Forns	0.768	<0.001	0.674 – 0.862

Tabelul 11. Analiza curbelor ROC pentru identificarea $F \geq 3$

Curbele ROC pentru metodele neinvazive analizate in identificarea fibrozei severe ($F >= 3$)

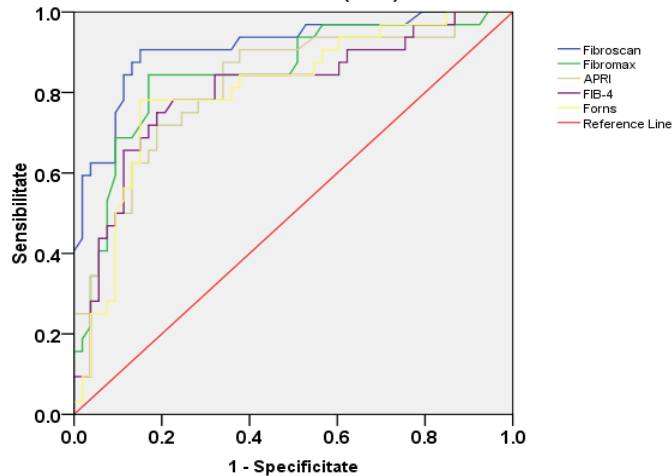


Fig. 5. Curbele ROC pentru elastografie, Fibromax, APRI, FIB-4, Forns în identificarea $F \geq 3$

○ **Identificarea cirozei (F4)**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.938	<0.001	0.876 – 1
Fibrotest	0.806	<0.001	0.699 – 0.912
APRI	0.815	0.001	0.663 – 0.967
FIB-4	0.864	<0.001	0.712 – 1
Forns	0.768	<0.001	0.696 – 0.952

Tabelul 12. Analiza curbelor ROC pentru identificarea F4.

Curbele ROC pentru metodele neinvazive analizate in identificarea cirozei hepatice

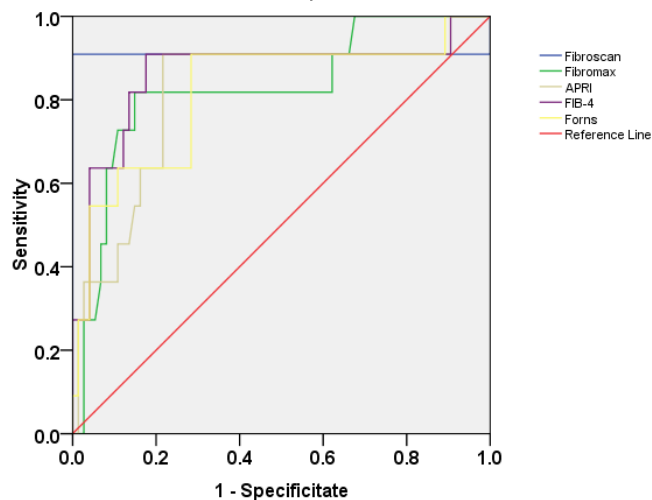


Fig. 6. Curbele ROC pentru elastografie, Fibromax, APRI, FIB-4, Forns în identificarea F4

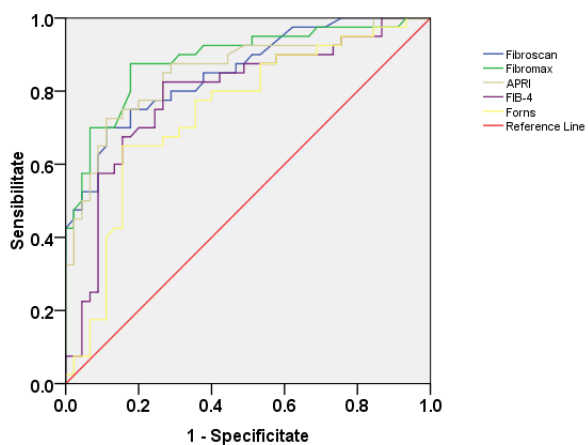
Inflamația

○ **Identificarea A_{≥2}**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.757	<0.001	0.676 – 0.838
Fibrotest	0.848	<0.001	0.699 – 0.912
APRI	0.815	<0.001	0.772 – 0.938
FIB-4	0.793	<0.001	0.693 – 0.893
Forns	0.712	<0.001	0.613 – 0.812

Tabelul 13. Analiza curbelor ROC pentru identificarea A_{≥2}

Curbele ROC pentru metodele neinvazive analizate in identificarea A_{≥2}



Curba ROC pentru metodele neinvazive analizate in identificarea A3

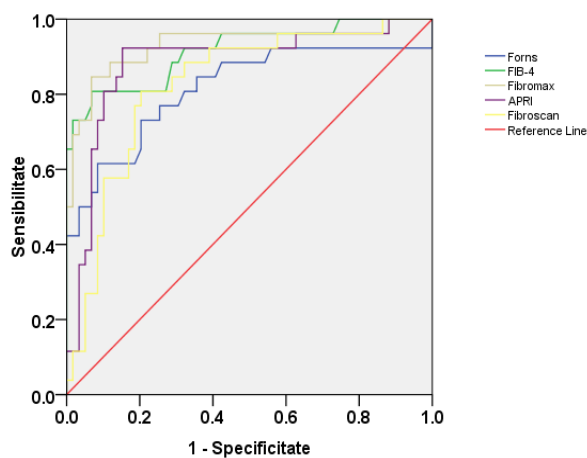


Fig. 7. Curbele ROC pentru elastografie, Fibromax, APRI, FIB-4, Forns în identificarea A_{≥2} și A3

○ **Identificarea A3**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.859	<0.001	0.788 – 0.931
Fibrotest	0.891	<0.001	0.831 – 0.951
APRI	0.870	<0.001	0.840 – 0.980
FIB-4	0.883	<0.001	0.795 – 0.971
Forns	0.806	<0.001	0.719 – 0.894

Tabelul 14. Analiza curbelor ROC pentru identificarea A3

✚ **Steatoza**

○ **Identificarea S_{≥2}**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.693	<0.001	0.601 – 0.785
Fibromax	0.915	<0.001	0.862 – 0.967

Tabelul 15. Analiza curbelor ROC pentru identificarea S_{≥2}

○ **Identificarea S=3**

Test	AUROC	p	CI95%
Fibroscan	0.658	0.023	0.528 – 0.788
Fibromax	0.930	<0.001	0.883 – 0.977

Tabelul 16. Analiza curbelor ROC pentru identificarea S3

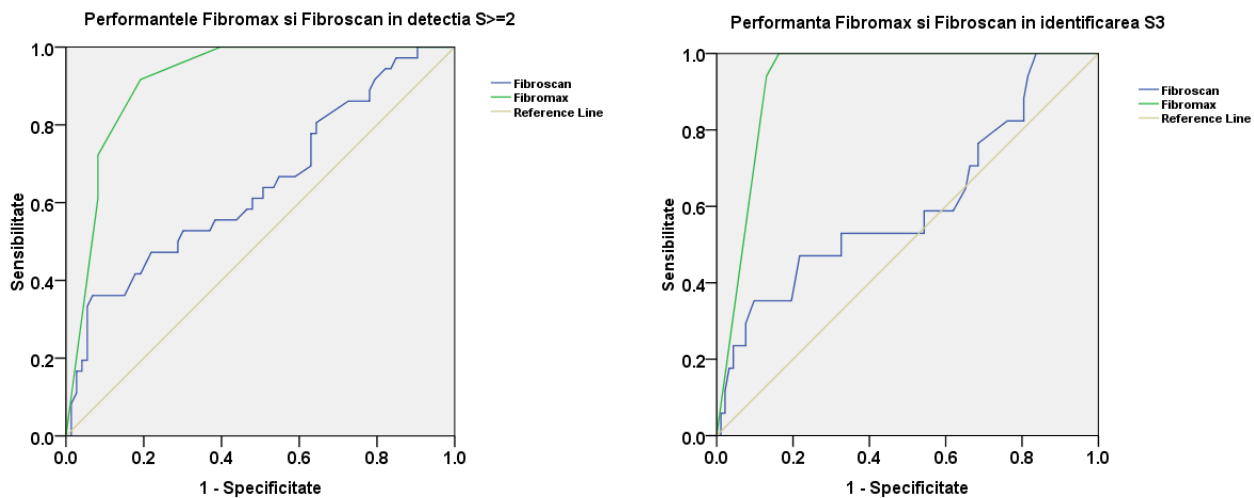


Fig. 8. Curbele ROC pentru elastografie și Fibromax pentru identificarea S_{≥2} și S3

IV.1.3. Concordanța tehnicilor neinvazive în aprecierea fibrozei, inflamației și steatozei hepatice

În tabelele 17 și 18 sunt analizate corelațiile bivariante simple între metodele neinvazive de evaluare a afectării hepatice.

	Fibroscan	Fibrotest	Actitest	Steatotest	APRI	Fib-4	Forns
Fibroscan	1	0.391	0.277	0.251	0.386	0.492	0.493
Fibrotest	0.391	1	0.665	<i>0.168</i>	0.647	0.782	0.643
Actitest	0.277	0.665	1	0.276	0.807	0.561	0.389
Steatotest	0.251	<i>0.168</i>	0.276	1	<i>0.247</i>	<i>0.132</i>	<i>0.125</i>
APRI	0.386	0.647	0.807	<i>0.247</i>	1	0.702	0.505
Fib-4	0.492	0.782	0.561	<i>0.132</i>	0.702	1	0.842
Forns	0.493	0.643	0.389	<i>0.125</i>	0.505	0.842	1

Tabelul 17. Tabelul concordanțelor între tehnicile neinvazive la pacienții cu biopsie hepatică efectuată (cu caractere italice și roșii = lipsă semnificație statistică)

	Fibroscan	Fibrotest	Actitest	Steatotest	APRI	Fib-4	Forns
Fibroscan	1	0.422	0.320	0.272	0.413	0.497	0.455
Fibrotest	0.422	1	0.686	<i>0.169</i>	0.663	0.761	0.621
Actitest	0.320	0.686	1	0.321	0.819	0.555	0.415
Steatotest	0.272	<i>0.169</i>	0.321	1	<i>0.290</i>	<i>0.141</i>	<i>0.146</i>
APRI	0.413	0.663	0.819	<i>0.290</i>	1	0.711	0.526
Fib-4	0.497	0.761	0.555	<i>0.141</i>	0.711	1	0.824
Forns	0.455	0.621	0.415	<i>0.146</i>	0.526	0.824	1

Tabelul 18. Tabelul concordanțelor între tehnicile neinvazive la tot lotul (230 pacienți cu/fără biopsie hepatică) (cu caractere italice și roșii = lipsă semnificație statistică)

Întrucât Fibroscan și Fibromax sunt singurele care își propun o stadializare a fibrozei pe grade corespunzătoare strict scorului Metavir (0, 1, 2, 3 și 4), celelalte teste analizate împărțind fibroza în ne semnificativă, semnificativă, severă și ciroză, pentru a permite o analiză cât mai omogenă din punct de vedere al concordanței am ales să folosesc această din urmă clasificare, ce poate fi aplicată tuturor metodelor (invazive și neinvazive analizate). Aceeași considerație se aplică și pentru analiza activității inflamatorii și steatozei hepatice.

Am evaluat testele neinvazive singure sau grupate câte două sau câte trei din punct de vedere al sensibilității și specificității acestora în identificarea corectă a parametrilor urmăriți.

În tabelele de mai jos am centralizat datele rezultate din analiza concordanțelor testelor neinvazive între ele și cu rezultatul PBH pentru fibroză și inflamație (pentru testele analizate singure, concordanța cu PBH este calculată procentual din totalul de 147 de cazuri cu biopsie disponibilă):

Tabelul 19. Concordanța testelor neinvazive pentru F \geq 2

Test/Teste	Concordanța testelor în lotul cu PBH (%)	Conformitatea cu PBH a testelor concordante (%)	Concordanța testelor în tot lotul % (230 pac)
Fibroscan	NA	78.2	NA
Fibrotest	NA	70.7	NA
APRI	NA	64.6	NA
FIB-4	NA	61.9	NA
Forns	NA	63.2	NA
FS/FT	61.9	90.1	65.6
FS/APRI	64.6	83.1	68.2
FS/FIB-4	63.2	81.7	65.2
FS/Forns	64.6	82.1	64.3
FT/APRI	80.2	72	77.3
FT/FIB-4	82.9	69.6	82.1
FT/Forns	81.6	70.8	82.1
APRI/FIB-4	82.3	66.1	80
APRI/Forns	76.8	68.1	76.9
FIB-4/Forns	83.6	65	80
FS/FT/APRI	55.1	97.5	56.9
FS/FT/FIB-4	56.4	96.3	59.1
FS/FT/Forns	56.4	97.5	60.8
FS/APRI/FIB-4	55.1	91.3	51.7
FS/APRI/Forns	53	96.1	56
FS/FIB-4/Forns	56.4	95.1	53.9
FT/APRI/FIB-4	72.7	80.3	73
FT/FIB-4/Forns	68	66	65.6
APRI/FIB-4/Forns	71.4	79	73.9

Tabelul 20. Concordanța testelor neinvazive pentru F4

Test/Teste	Concordanța testelor în lotul cu PBH (%)	Conformitatea cu PBH a testelor concordante (%)	Concordanța testelor în tot lotul % (230 pac)
Fibroscan	NA	92.5	NA
Fibrotest	NA	78.9	NA
APRI	NA	80.2	NA
FIB-4	NA	83.6	NA
Forns	NA	79.5	NA
FS/FT	80.9	94.1	87.3
FS/APRI	83.6	93.4	81.3
FS/FIB-4	87	93.7	86
FS/Forns	84.3	92.7	81.3
FT/APRI	82.3	85.9	83.9
FT/FIB-4	76.1	91	78.2
FT/Forns	85.7	84.1	83.9
APRI/FIB-4	89.1	86.1	87.8
APRI/Forns	77.5	88.5	76
FIB-4/Forns	83.6	87.8	82.6
FS/FT/APRI	70.7	100	72.1
FS/FT/FIB-4	76.1	100	75.2
FS/FT/Forns	77.5	100	78.6
FS/APRI/FIB-4	80.2	100	76.5
FS/APRI/Forns	70.7	98	72.1
FS/FIB-4/Forns	77.5	100	76
FT/APRI/FIB-4	76.1	95.5	77.8
FT/FIB-4/Forns	75.5	97.2	79.1
APRI/FIB-4/Forns	77.5	92.1	74.7

Tabelul 21. Concordanța testelor neinvazive pentru A≥2

Test/Teste	Concordanța testelor în lotul cu PBH (%)	Conformitatea cu PBH a testelor concordante (%)	Concordanța testelor în tot lotul % (230 pac)
Fibrotest	NA	80.9	NA
FS/FT	67.3	90.9	65.6
FS/APRI	65.9	89.6	60.8
FS/FIB-4	67.3	87.8	66
FS/Forns	68	86	62.1
FT/APRI	85	86.4	86.9
FT/FIB-4	71.4	93.3	71.7
FT/Forns	72.7	89.7	69.1
APRI/FIB-4	85	80.8	83.4
APRI/Forns	78.9	83.6	73.4
FIB-4/Forns	85	75.2	86.5

Tabelul 22. Concordanța testelor neinvazive pentru A3

Test/Teste	Concordanța testelor în lotul cu PBH (%)	Conformitatea cu PBH a testelor concordante (%)	Concordanța testelor în tot lotul % (230 pac)
Fibrotest	NA	93.8	NA
FS/FT	72.7	100	70
FS/APRI	72.7	86.9	66.5
FS/FIB-4	71.4	83.8	65.2
FS/Forns	71.4	77.1	70
FT/APRI	85.7	100	87.8
FT/FIB-4	80.2	100	79.5
FT/Forns	70.7	100	76.5
APRI/FIB-4	91.8	85.9	87.8
APRI/Forns	82.3	84.2	82.1
FIB-4/Forns	80.9	81.5	83

Pentru steatoză, asocierea singurei metode care a dovedit o corelație semnificativă cu gradul steatozei (Fibroscan) cu singurul test special conceput (Steatotest/Fibromax) pentru identificarea steatozei nu aduce beneficii.

IV.1.4 Stabilirea unei combinații mixte de markeri neinvazivi pentru identificarea sau excluderea fibrozei semnificative și activității inflamatorii semnificative

În ceea ce privește identificarea corectă sau excluderea cirozei, activității inflamatorii severe (A3) și respectiv steatozei hepatice semnificative și celei severe, testele special concepute pentru aceasta au sensibilitatea și specificitatea suficient de bune astfel încât unul dintre ele să poată fi utilizat eficient individual (conform celor prezentate până aici) pentru clasificarea corectă a respectivei caracteristici a ficatului bolnav, după cum urmează:

- Pentru diagnosticul **cirozei**: **Elastografia hepatică** (Fibroscan) a identificat corect ca ciroză/non-ciroză 92.5% dintre cazurile care aveau și biopsie efectuată, având AUROC = 0.938, $p < 0.001$, CI95% = 0.876 – 1. O valoare peste 15.65 KPa are o sensibilitate de 90% și o specificitate de 98%. Asocierea a două sau 3 teste neinvazive pentru această stadializare, deși poate în majoritatea cazurilor crește specificitatea metodei, scade mult specificitatea, fapt care duce la identificarea corectă a unui număr mai redus de pacienți și conduce la necesitatea utilizării mai frecvente a tehnicilor invazive.
- Pentru diagnosticul **A3** : metoda cu cea mai bună rată de confirmare/infirmare este **Fibrotest (Actitest)**, ce identifică corect 93.8% dintre cazurile analizate, având AUROC = 0.891, $p < 0.001$, CI95% = 0.831 – 0.951. La fel ca și în cazul cirozei, asocierea mai multor teste neinvazive crește specificitatea, însă reduce semnificativ numărul pacienților care ar fi identificați corect (scade sensibilitatea).
- Pentru diagnosticul **S_{≥2}** : **Fibromax** - AUROC = 0.915, $p < 0.001$, CI95% = 0.862 – 0.967, Steatotest identifică 86.3% dintre pacienți.
- Pentru diagnosticul **S3** : **Fibromax** - AUROC = 0.930, $p < 0.001$, CI95% = 0.883 – 0.977, Steatotest identifică corect 87.7% dintre cazuri.

Am constatat așadar că pentru identificarea fibrozei hepatice semnificative, cea mai bună rată de identificare/excludere corectă o are elastografia hepatică, însă performanța acesteia este insuficientă, testul Fibroscan clasificând corect doar 78.2% dintre pacienții analizați. Utilizarea a două sau trei metode neinvazive crește specificitatea însă cu prețul scăderii marcate a specificității. Analiza curbei ROC pentru Fibromax a arătat AUROC = 0.880, $p < 0.001$, CI95% = 0.829 – 0.925, iar pentru o valoare de peste 7.35 KPa are o sensibilitate de 86.7% și o specificitate de 81.9% în identificarea $F \geq 2$.

Identificarea corectă a poziționării față de reperul F2 este esențială în momentul de față pentru a lua decizia inițierii sau temporizării inițierii tratamentului.

Pentru identificarea activității inflamatorii, metoda cu cea mai bună performanță este Fibromax, care identifică corect 80.9% dintre pacienți în legătură cu gradul inflamației A2. Analiza

curbei ROC arată, AUROC = 0.848, $p < 0.001$, CI95% = 0.784 – 0.912, iar o valoare a Actitest peste 0.43 are o sensibilitate de 80% și o specificitate de 80% pentru identificarea $A \geq 2$. Identificarea corectă a activității inflamatorii constituie de asemenea un factor ce poate influența decizia de inițiere a tratamentului și frecvența și tipul de monitorizare a evoluției suferinței hepatice.

Prin urmare, pentru aceste ultime două stadializări ($F \geq / < 2$ și $A \geq / < 2$) voi analiza în continuare prin regresie logistică binară cele mai bune combinații de markeri.

Pentru fibroză ($F \geq / < 2$) ecuația de regresie pe care am obținut-o este:

$$\text{Log}(p/(1-p)) = -29.426 + 1.531 \times \text{Elasticitate} + 11.605 \times \text{ApolipoA1} - 0.062 \times \text{TGP} + 0.171 \times \text{AST} + 0.308 \times \text{BT} - 1.35 \times \text{Colesterol},$$

$$\text{De unde } p = \text{Exp}(-29.426 + 1.531 \times \text{Elasticitate} + 11.605 \times \text{ApolipoA1} - 0.062 \times \text{TGP} + 0.171 \times \text{AST} + 0.308 \times \text{BT} - 1.35 \times \text{Colesterol}) / (1 + \text{Exp}(-29.426 + 1.531 \times \text{Elasticitate} + 11.605 \times \text{ApolipoA1} - 0.062 \times \text{TGP} + 0.171 \times \text{AST} + 0.308 \times \text{BT} - 1.35 \times \text{Colesterol})).$$

p reprezintă în această ecuație probabilitatea ca în cazul pacientului respectiv, fibroza să fie semnificativă ($F \geq 2$).

Pentru inflamație ($A \geq / < 2$) ecuația de regresie pe care am obținut-o este:

$$\text{Log}(p/(1-p)) = -16.258 + 0.569 \times \text{Elasticitatea hepatică} + 1.372 \times \text{Alfa2Macroglobulina} + 0.184 \times \text{Bilirubina totală} + 0.033 \times \text{ALT} + 0.011 \times \text{Trombocite}$$

$$\text{De unde } p = \text{Exp}(-16.258 + 0.569 \times \text{Elasticitatea hepatică} + 1.372 \times \text{Alfa2Macroglobulina} + 0.184 \times \text{Bilirubina totală} + 0.033 \times \text{ALT} + 0.011 \times \text{Trombocite}) / (1 + \text{Exp}(-16.258 + 0.569 \times \text{Elasticitatea hepatică} + 1.372 \times \text{Alfa2Macroglobulina} + 0.184 \times \text{Bilirubina totală} + 0.033 \times \text{ALT} + 0.011 \times \text{Trombocite})).$$

p reprezintă în această ecuație probabilitatea ca în cazul pacientului respectiv, inflamația să fie semnificativă ($A \geq 2$).

Selecția parametrilor pentru includerea în ecuația de regresie a fost făcută pe baza datelor rezultate la analiza corelațiilor dintre markerii biochimici/hematologici, indicii demografici/ antropometrici, elasticitatea hepatică și rezultatele biopsiei hepatice.

IV.2. Capitolul II

Cel de-al doilea capitol este dedicat monitorizării prin tehnici noninvazive a hepatopatiilor cronice și a avut două subcapitole, fiind bazat pe două loturi de pacienți, un lot de 32 de pacienți tratați cu interferon pegilat și ribavirină pentru hepatită cronică cu VHC, monitorizați prin metode neinvazive pe parcursul tratamentului și încă 12 luni posttratament (prospectiv) și un alt lot de 202 pacienți incluși prospectiv între Octombrie 2009 și Octombrie 2011 - cu etiologii variate cărora le-am efectuat câte două măsurători elastografice (Fibroscan) complete (a câte 10 determinări valide), consecutive, în același spațiu intercostal, în încercarea de a evalua variabilitatea intrinsecă a metodei.

IV.2.1. Monitorizarea unui lot de pacienți cu infecție cu VHC pe parcursul tratamentului antiviral și până la 24 de luni de la start

Primul subcapitol se bazează pe un lot echilibrat, format din pacienți cu infecție cu VHC, având un raport pe sexe M/F = 15/17, cu vârste între 22 - 63 de ani, media de 47.88 ± 13.043 ani, cu un BMI de la 18.36 până la 32 (medie 23.9 ± 4.54) și repartiția pe grade de fibroză relativ uniformă.

Urmărirea în dinamică a acestor pacienți a evidențiat diferențe în ceea ce privește comportamentul markerilor (între aceștia) în tot lotul, dar și diferențe între pacienți în funcție de tipul de răspuns virusologic.

În tot lotul monitorizat am observat următoarele:

- evoluția elasticității hepatice măsurată prin elastografie tranzitorie unidimensională a fost cea scontată, cu reducerea semnificativă statistic a valorilor elasticității medii/grup între momentul inițierii tratamentului și sfârșitul perioadei de tratament (T1 – 12 luni) și sfârșitul perioadei de monitorizare (T3 – 24 luni).

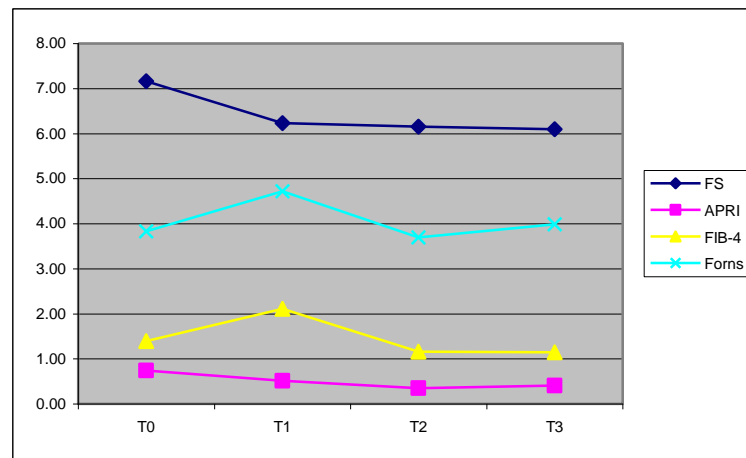


Fig. 9. Evoluția în timp a elasticității (FS), APRI, FIB-4, Forns

- Scorul APRI a fost singurul dintre scorurile biochimice care a avut o evoluție aproape paralelă cu elasticitatea: a înregistrat valori medii/grup semnificativ mai mici la 12 și 24 luni de la debutul monitorizării.

- Scorurile FIB-4 și Forns au avut o evoluție contrar așteptării la 12 luni, înregistrând o creștere medie/grup care s-a datorat probabil influenței directe a tratamentului antiviral asupra rezultatelor unora dintre testele biochimice ce intră în componența acestora (având în vedere că probele biologice la T1 au fost recoltate în prima săptămână după încheierea tratamentului cu Peg-Interferon și Ribavirină). Ulterior, la 24 de săptămâni, tendința de scădere față de T0, paralel cu ameliorarea medie a tuturor celorlalți indicatori (teste biochimice individuale, elasticitate) este evidentă doar în cazul FIB-4, în vreme ce scorul Forns nu pare a reflecta evoluția favorabilă în timp la acest moment.

Analiza separată, pe responderi/non-responderi a evidențiat faptul că evoluția favorabilă a elasticității este de fapt apanajul responderilor, în grupul de non-responderi scăderea nefiind semnificativă statistic.

Și în acest caz, APRI are o evoluție similară cu Fibroscan, prezentând ameliorare statistic semnificativă atât la T1 cât și la T3 față de T0, dar și la T3 față de T1 doar în cazul responderilor.

FIB-4 scade de la T0 la T1 în ambele grupuri, însă variația sa este semnificativă la T3 față de T0 doar în cazul pacienților cu SVR.

Dintre factorii analizați în cadrul acestui subcapitol, am identificat prin comparația medianelor celor două grupuri (responderi/non-responderi) - ANOVA - 4 caracteristici bazale ale lotului ca factori predictori ai SVR, anume BMI, GGT, Numărul de trombocite și scorul Forns. Analiza de regresie logistică bazată pe aceștia a dus la selectarea a doar doi dintre ei – BMI și GGT ce au valoare predictivă independentă în prezicerea tipului de răspuns. Am obținut o ecuație de regresie pe baza căreia se poate calcula probabilitatea de a obține SVR bazat pe acești factori. În grupul nostru, această ecuație clasifică corect 93.8% dintre pacienți.

Trebuie menționate însă și anumite limitări în ceea ce privește acest sub-studiu: numărul mic de pacienți, lipsa biopsiilor seriate și perioada destul de scurtă de monitorizare.

IV.2.2. Fibroscan – Variabilitatea normală între doua măsurători

Cel de-al doilea subcapitol are ca scop măsurarea variabilității intrinsece (intraoperator) a tehnicii elastografiei tranzitorii unidimensionale. Pentru atingerea acestui scop am folosit un lot de 202 pacienți cu sau fără suferințe hepatice (și indiferent de tipul suferinței dacă aceasta a fost prezentă), cărora le-am efectuat personal consecutiv la același moment și în același loc câte două seturi complete a câte 10 măsurători elastografice valide, fiecare set fiind în continuare validabil

conform criteriilor precizate de producător (IQR sub 1/3 din valoarea obținută și rata de succes peste 60%).

Din cei 202 pacienți, 98 (48.5%) au fost de sex masculin. Media celor două valori elastografice obținute pentru fiecare din pacienți a plasat 30 de pacienți în F0, 27 în F1, 42 în F2, 60 în F3 și 43 de cazuri în F4. Pacienții au avut vârste cuprinse între 19 și 73 de ani, cu o mediană de 45.32 ± 12.34 ani și BMI cuprinse între 18.4 și 28.3, cu o mediană de 22.8 ± 3.7 .

Diferențele între cele două măsurători consecutive au variat între **0** și **5.3 KPa** (**0 – 54%** dintr-una dintre valori). Am găsit astfel o variație medie între două măsurători de **13 procente**, cu o deviație standard de 0.122 (**12.2%**). Rezultă, așadar o variație independentă de orice alți factori în afară de aparat și tehnica în sine de **25.2%** care trebuie avută în vedere atunci când dorim ca pe baza unor măsurători elastografice succesive să stabilim tendința evolutivă a unei hepatopatii cronice spre agravare sau dimpotrivă spre ameliorare. Discordanța între măsurători este corelată cu BMI, IQR și gradul fibrozei (exprimat prin media celor două măsurători convertită în Metavir conform valorilor cut-off menționate).

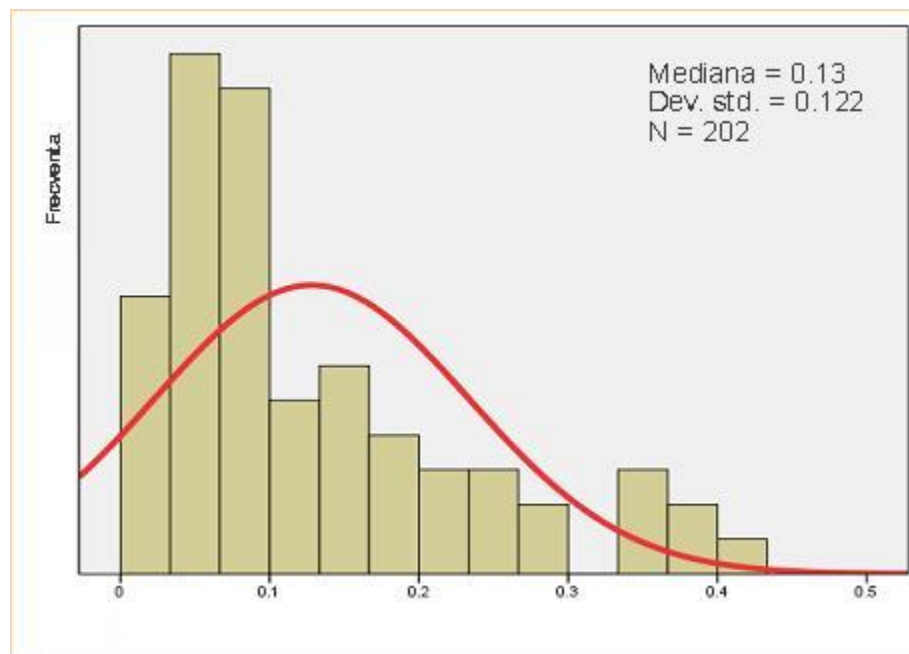


Fig. 10. Variația între cele două măsurători exprimată procentual

În încercarea de a stadializa exact corespunzător Metavir pe stadii de fibroză, 63 (31.1%) dintre pacienți au fost clasificați prin cele două măsurători în două stadii diferite (3 pentru F3/F4, 11 pentru F2/F3, 19 pentru F2/F1, 30 pentru F0/F1). Acest aspect este concordant cu datele din literatură care arată o precizie net superioară a fibroscan în a identifica corect stadiile severe ale fibrozei comparativ cu F0/F1/F2 (20, 33-36).

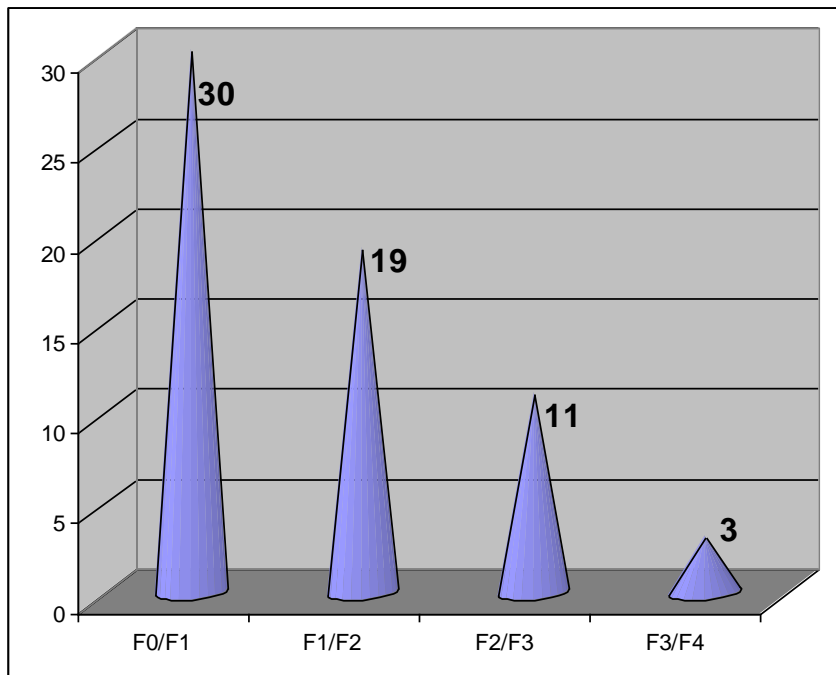


Fig. 11. Pacienți clasificați diferit prin cele două măsurători (Stadiu Metavir corespunzător)

Pentru clasificarea fibrozei ca și semnificativă sau nesemnificativă, prin situarea peste sau respectiv sub limita de 7.1 KPa, doar 24 (11.8%) pacienți au fost clasificați diferit prin cele două măsurători.

V. Concluzii:

1. Există o corelație semnificativă statistic între rezultatul puncției biopsii hepatice și:
 - a. ALT, AST, GGT, alfa2macroglobulina, bilirubina totală, glicemia, trombocitele, vârsta și elastografia **pentru fibroză**
 - b. ALT, AST, GGT, alfa2 macroglobulina, apolipoproteina A1, bilirubina totală, colesterolul total, trombocitele, vârsta și elastografia **pentru inflamație**
 - c. GGT, trigliceridele, glicemia, BMI, elastografia **pentru steatoză**.
- fapt care face din aceste investigații posibile candidate pentru stabilirea de scoruri mixte pentru identificarea respectivelor caracteristici ale afectării hepatice.

2. Testele neinvazive de evaluare a severității afectării hepatice deja consacrate au o valoare diagnostică ridicată și identifică satisfăcător majoritatea caracteristicilor afectării hepatice, cele mai performante fiind:
 - a. Pentru **fibroză**:
 - i. $F \geq 2$ – Fibroscan (AUROC = 0.880)
 - ii. $F \geq 3$ – Fibroscan (AUROC = 0.912)
 - iii. F4 – Fibroscan (AUROC = 0.938)
 - b. Pentru **inflamație**:
 - i. $A \geq 2$ – Fibromax (Actitest) (AUROC = 0.848)
 - ii. A3 – Fibromax (actitest) (AUROC = 0.891)
 - c. Pentru **steatoză**:
 - i. $S \geq 2$ – Fibromax (Steatotest) (AUROC = 0.915)
 - ii. S3 – Fibromax (Steatotest) (AUROC = 0.930).
3. Scorurile neinvazive analizate sunt corelate semnificativ statistic între ele în ceea ce privește destinația lor, iar suplimentar, scorurile de fibroză sunt corelate și cu scorul de inflamație parte a Fibromax (Actitest)
4. Utilizarea de combinații de scoruri ”consacrate” duce la creșterea specificității comparativ cu utilizarea izolată a uneia dintre metode, însă conduce la scăderea marcată a sensibilității.
5. Pentru identificarea $F \geq 2$, ecuația

$$p = \text{Exp}(-29.426 + 1.531x\text{Elasticitatea hepatică} + 11.605x\text{ApolipoproteinaA1} - 0.062x\text{TGP} + 0.171x\text{AST} + 0.308x\text{Bilirubina Totală} - 1.35x\text{Colesterol}) / (1 + \text{Exp}(-29.426 + 1.531x\text{Elasticitatea hepatică} + 11.605x\text{ApolipoproteinaA1} - 0.062x\text{TGP} + 0.171x\text{AST} + 0.308x\text{Bilirubina Totală} - 1.35x\text{Colesterol}))$$

clasifică corect 92.6% dintre pacienții din lotul nostru, iar AUROC = 0.956. (p reprezintă probabilitatea ca un pacient să aibă fibroză semnificativă).

6. Pentru identificarea $A \geq 2$, ecuația

$$p = \text{Exp}(-16.258 + 0.569x\text{Elasticitatea hepatică} + 1.372x\text{Alfa2Macroglobulina} + 0.184x\text{Bilirubina totală} + 0.033x\text{ALT} + 0.011x\text{Trombocite}) / (1 + \text{Exp}(-16.258 + 0.569x\text{Elasticitatea hepatică} + 1.372x\text{Alfa2Macroglobulina} + 0.184x\text{Bilirubina totală} + 0.033x\text{ALT} + 0.011x\text{Trombocite}))$$

clasifică corect 88.2% dintre pacienții din lot, iar AUROC = 0.954. (p reprezintă probabilitatea ca un pacient să aibă inflamație $A \geq 2$).

7. Fibroscan este util în monitorizarea hepatitelor cronice sub tratament și în afara tratamentului, având evoluția scontată atât pe parcursul cât și după tratament. Elasticitatea hepatică are tendința de scădere în cazul unei evoluții favorabile (din punct de vedere virusologic și biochimic) probabil inițial prin reducerea inflamației apoi a fibrozei.
8. APRI are o evoluție paralelă cu Fibroscan, sugerând că ar putea fi un instrument util pentru monitorizarea hepatitelor cronice.
9. Scorurile Forns și FIB-4 sunt influențate de tratamentul antiviral și au tendința paradoxală de a crește în timpul tratamentului în pofida unei evoluții biologice și virusologice evident favorabile. La distanță de tratament, FIB-4 urmează patternul scontat indicând o ameliorare doar atunci când evoluția pacientului este favorabilă, scorul Forns însă nu confirmă acest lucru în intervalul de timp monitorizat.

10. Ecuația:

$$p = \text{Exp}(11.37 - 0.304x\text{BMI} - 0.054x\text{GGT}) / (1 + \text{Exp}(11.37 - 0.304x\text{BMI} - 0.054x\text{GGT}))$$

ar putea indica probabilitatea ca un pacient să răspundă la tratamentul antiviral standard.

11. Elastografia hepatică tranzitorie are o variabilitate intrinsecă de aproximativ **25%**, astfel încât trebuie să considerăm semnificative variațiile între două măsurători efectuate în scop de monitorizare (în sensul creșterii sau scăderii ca și expresie a agravării respectiv a ameliorării suferinței hepatice) doar atunci când depășesc această valoare.

Bibliografie:

1. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008, 88(1):125-72.
2. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleish JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok ASF. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2003; 38: 518–526.
3. Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., S. Sulkowski, M., Torriani, F. J., Dieterich, D. T., Thomas, D. L., Messinger, D. and Nelson, M. (2006), Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/VHC coinfection. *Hepatology*, 43: 1317–1325.
4. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *J. Hepatology*. 2002 Oct;36(4 Pt 1):986-92.
5. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. Fibroindex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297–306.
6. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1302–1304.
7. Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratziu, Laurence Pieroni, Frederic Charlotte, Yves Benhamou, Thierry Poynard, Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study, *THE LANCET* • Vol 357 • April 7, 2001, 1069-75.
8. Sebastiani G, Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006;12:3682–3694.
9. Pares A, Deulofeu R, Gimenez A, Caballeria L, Bruguera M, Caballeria J, et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996;24:1399–1403.
10. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:779–786.
11. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, 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.
12. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology*. 2004; 127:1704-13.

13. Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, Gallois Y, Ternisien C, Chevaller A, Lunel F: A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005, 42:1373-1381.
14. Sebastiani G., Vario A., Guido M., Noventa F., Plebani M., Pistis R., Ferrari A., Alberti A. Stepwise combination algorithms of noninvasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006, 44(4):686-93.
15. Pinzani M. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005, 42 (Suppl 1): S22-S36.
16. Aube C, Oberti F, Korali N, Namour MA, Loisel D, Tanguy JY, et al. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol* 1999;30:472-478.
17. Aube C, Winkfield B, Oberti F, Vuillemin E, Rousselet MC, Caron C, et al. New Doppler ultrasound signs improve the noninvasive diagnosis of cirrhosis or severe liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:743-751.
18. Iacobellis A, Fusilli S, Mangia A, Clemente R, Festa V, Giacobbe A, et al. Ultrasonographic and biochemical parameters in the non-invasive evaluation of liver fibrosis in hepatitis C virus chronic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:769-774.
19. <http://www.echosens.com/?lang=en&site=pro&sp=1> – Site-ul oficial al producătorului Fibroscan (Echosens)
20. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:48-54.
21. Foucher J., Castera L., Bernard P. H., Adhoute X., Laharie D., Bertet J., Couzigou P. & de Ledinghen V. (2006). Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, Vol.18, No.4, (Apr), pp. 411-412
22. 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;128:343-350.
23. Castera L, Hezode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, et al. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003;52:288-292.
24. Gordon A, McLean CA, Pedersen JS, Bailey MJ, Roberts SK. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B and C: predictors, distribution and effect on fibrosis. *J Hepatol* 2005;43:38-44.
25. Perumalswami P, Kleiner DE, Lutchman G, Heller T, Borg B, Park Y, et al. Steatosis and progression of fibrosis in untreated patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006;43:780-787

26. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrech D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de Ledinghen V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease.. *BMC Gastroenterol.* 2007 Oct 15;7:40.
27. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Rosenberg W. Performance of serum marker panels for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:462–474.
28. de Franchis R, Dell’era A. Non-invasive diagnosis of cirrhosis and the natural history of its complications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:3–18.
29. Burroughs AK, Cholongitas E. Non-invasive tests for liver fibrosis: encouraging or discouraging results? *J Hepatol.* 2007 May;46(5):751-5. Epub 2007 Mar 9.
30. Halfon P, Bacq Y, De Muret A, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V: Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007, 46:395-402
31. Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D’Errico A, et al. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy *J Hepatol* 1997; 27:979–985.
32. Colli A, Fraquelli M, Andreoletti M, Marino B, Zuccoli E, Conte D. Severe liver fibrosis or cirrhosis: accuracy of US for detection—analysis of 300 cases. *Radiology* 2003;227:89–94
33. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédighen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005 Feb;128(2):343-50.
34. Colletta C, Smirne C, Fabris C, et al. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among VHC carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005;42:838–845.
35. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006;55:403–408.
36. Sánchez-Conde M, Montes-Ramírez ML, Miralles P, Alvarez JM, Bellón JM, Ramírez M, Arribas JR, Gutiérrez I, López JC, Cosín J, Alvarez E, González J, Berenguer J. Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers, *J Viral Hepat.* 2010 Apr;17(4):280-6.