



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di Ricerca in Tecnologie Avanzate in Chirurgia XXIX Ciclo**

**Patologia degli Organi del Collo e Biocompatibilità**

Coordinatore: Prof. Vito D'Andrea

**Tesi di Dottorato**

***“L' agoaspirato tiroideo sotto guida elastosonografica:  
studio prospettico randomizzato e revisione della Letteratura”***

***Relatore***

Prof. Vito D'Andrea

**Dottorando**

Dott. Domenico Giannotti

**ANNO ACCADEMICO 2017-2018**

# INDICE

• <b>INTRODUZIONE</b>	3
• <b>ELASTOSONOGRAFIA TIROIDEA</b>	
○ Principi di funzionamento	5
○ Metodi quasi-statici	7
○ Metodi dinamici	12
• <b>AGOASPIRATO TIROIDEO</b>	
○ Note di tecnica ed indicazioni	15
○ Linee Guida della Società' Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica	19
• <b>STUDIO PROSPETTICO RANDOMIZZATO SULL' APPLICAZIONE DELLA TECNOLOGIA ELASTOSONOGRAFICA ALL' AGO- ASPIRATO TIROIDEO</b>	
○ Premessa	26
○ Materiali e metodi	27
○ Risultati	30
○ Discussione	32
• <b>CONCLUSIONI</b>	36
• <b>BIBLIOGRAFIA</b>	38

## INTRODUZIONE

L'agoaspirato ecoguidato tiroideo (FNA) rappresenta ad oggi il gold standard per la diagnosi della patologia nodulare tiroidea. L'esame è caratterizzato da un basso tasso di complicanze e da una buona tollerabilità da parte del paziente. Nonostante l'agoaspirato presenti una elevata sensibilità e specificità, è tuttavia gravato da una certa percentuale di campioni non diagnostici che si attesta a seconda delle varie casistiche tra il 10 ed il 30% (1,2). Un prelievo non diagnostico può portare a procedure ripetute, aumentando la morbilità del paziente, il costo, la probabilità di complicanze ed il ritardo nella diagnosi.

La classificazione dell'agoaspirato tiroideo è stata standardizzata sulla base del sistema Bethesda (3), secondo cui un campione adeguato deve contenere almeno sei gruppi di cellule follicolari, con ogni gruppo composto da almeno 10 cellule ciascuna. I prelievi non diagnostici sono caratterizzati dalla scarsità di tireociti, determinata da errori di prelievo che possono essere causati dall'inesperienza dell'operatore, dalla contaminazione ematica, da un campionamento inadeguato o da errori di processazione del campione, come la ritardata o inadeguata fissazione, strisci mal eseguiti e difetti di colorazione.

Secondo le linee guida dell' American Society for Clinical Pathology (ASCP) la percentuale di campioni non diagnostici dovrebbe idealmente essere limitata a non più del 10% di tutti i prelievi citologici (3). Dal momento che la percentuale di agoaspirati tiroidei non diagnostici riportata in Letteratura è superiore a quanto sopra raccomandato (1,2), è maturata l'istanza di sviluppare ulteriori metodi per migliorare l'efficacia del prelievo citologico. Si tratta infatti di una procedura operatore-dipendente, eseguita a mano libera e dunque difficilmente standardizzabile sia negli aspetti meramente tecnici del prelievo che nella scelta dell'area nodulare da campionare.

Un altro importante limite dell'esame citologico è rappresentato dai prelievi "indeterminati", classificati come TIR 3, per i quali i soli criteri citologici non sono sufficienti a definire la benignità o malignità della lesione. I noduli tiroidei TIR 3 risultano infatti maligni all'istologia in una percentuale compresa tra il 10 e il 30% a seconda delle diverse casistiche (4).

Le linee guida della Società italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica sulla classificazione citologica dell'agoaspirato tiroideo suddividono questa categoria in due sottocategorie, TIR 3A, con un rischio di malignità atteso del 5-10%, e la categoria TIR 3B con un rischio del 15-30% (4). Le linee guida indicano la chirurgia come trattamento di scelta solo per la categoria TIR 3B, mentre per la categoria a rischio minore è consigliabile il follow-up clinico e l'eventuale ripetizione dell'esame a distanza. Tuttavia, nonostante lo sforzo classificativo, la categoria TIR3 rischia spesso di configurarsi, sia per il patologo che per il clinico, come una vera e propria "zona grigia".

Recentemente l'elastosonografia ha attirato notevole interesse per la sua capacità di discriminare, in base alle caratteristiche di elasticità dei tessuti, tra patologia nodulare tiroidea benigna e maligna, con una sensibilità del 92% ed una specificità del 90% (5-8).

Le lesioni nodulari tiroidee infatti possono presentare diversi livelli di rigidità, a seconda della cellularità e della composizione del nodulo stesso.

Dal momento che tale metodica è in grado di definire, anche all'interno dello stesso nodulo, aree con maggiore o minore rigidità, abbiamo ipotizzato che ottenere una mappa elastosonografica della formazione nodulare, potesse guidare il prelievo citologico sulla zona ottimale da campionare.

Oggetto di questa tesi è stata la ricerca di nuove metodiche per incrementare l'accuratezza diagnostica dell'agoaspirato tiroideo, basata sull'analisi sistematica delle più recenti evidenze scientifiche inerenti l'elastosonografia e la citoaspirazione tiroidea.

# ELASTOSONOGRAFIA TIROIDEA

## PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO

Nonostante l'evoluzione tecnologica abbia fornito strumenti diagnostici sempre più sensibili e sofisticati, ancora oggi l'esame clinico riveste un ruolo fondamentale nella valutazione della patologia tiroidea permettendo, con la palpazione del collo, una preliminare identificazione e caratterizzazione di eventuali lesioni nodulari.

L'esame palpatorio consente di definire alcune caratteristiche dei noduli tiroidei quali la consistenza, i margini, le dimensioni, la mobilità nonché la presenza di eventuali linfadenopatie cervicali.

L'iter diagnostico successivo prevede, oltre alla valutazione degli indici di funzionalità tiroidea, l'esecuzione dell'esame ecografico.

L'ecografia tiroidea fornisce una accurata valutazione della lesione nodulare in termini di ecogenicità, dimensioni, profili nodulari e pattern di vascolarizzazione.

L'elastosonografia realizza sotto certi aspetti un'integrazione del potenziale diagnostico della palpazione manuale con l'esame ecografico, fornendo dati misurabili e dunque più oggettivi sulle caratteristiche di elasticità dei tessuti e configurandosi dunque come una vera e propria "palpazione elettronica" delle lesioni nodulari tiroidee.

Descritta per la prima volta nel 1987 da Krouskop ed introdotta nella pratica clinica nel 1991 da Ophir(9), questa metodica non invasiva ha presentato nell'ultimo decennio una rapida e crescente diffusione.

L'esame elastosonografico si fonda su un principio di base: alcune condizioni, sia fisiologiche che patologiche, possono indurre notevoli cambiamenti delle proprietà strutturali di un tessuto.

In particolare è possibile registrare una variazione significativa di elasticità tra parenchima ghiandolare normale, lesioni nodulari benigne e lesioni nodulari maligne, essendo queste ultime fino a 10 volte più rigide ed incompressibili.

Secondo la legge di Hooke, quando viene creata una deformazione elastica in un materiale (strain) da una forza esterna (stress), l'energia accumulata (elastic potential energy) permette al materiale di tornare, dopo la compressione, alla sua originale forma.

Tale principio è descritto analiticamente dal modulo di elasticità di Young:  $E = \sigma/\varepsilon$  dove  $\sigma$  rappresenta la compressione esterna (stress) ed  $\varepsilon$  la deformazione del tessuto in risposta alla compressione (strain), che viene accuratamente calcolato da un software.

La sonda dell'ecografo di fatto comprimendo il tessuto esaminato, determina una deformazione, valutata come variazione della distanza tra due punti. Tale deformazione presenta una variazione a seconda del grado di comprimibilità, maggiore nei tessuti soffici e minore nei tessuti duri, in relazione al diverso coefficiente di elasticità. Quest'ultimo è determinato dalle caratteristiche anatomico-istologiche del tessuto considerato e può essere rilevato e quantificato attraverso l'utilizzo di software dedicati.

La continua evoluzione tecnologica ha reso disponibili diverse metodiche elastosonografiche. Il principio fisico che le accomuna è quello descritto dal modulo di elasticità di Young, mentre differiscono i metodi impiegati per determinare e registrare la deformazione tessutale.

Una prima fondamentale distinzione deve essere effettuata tra le metodiche quasi-statiche e quelle dinamiche (10).

## METODI QUASI-STATICI

L'elastasonografia quasi-statica si basa sull'applicazione di una pressione costante della sonda sulla superficie del tessuto esaminato. Tramite l'esecuzione di misurazioni eseguite prima e dopo la compressione, viene analizzata la deformazione (strain) prodotta sul tessuto stesso.

Le due metodiche quasi-statiche più diffuse sono rappresentate dalla Strain Elastography (SE) e dalla Strain-Rate Imaging (SRI).

Mentre quest'ultima trova il suo campo di applicazione prevalente nello studio della motilità gastrointestinale (11,12), la SE, conosciuta anche come real-time elastography (RTE) o free-hand elastography, presenta un ampio utilizzo clinico con particolare impiego della diagnostica della patologia nodulare tiroidea.

Durante l'esecuzione della Strain Elastography la compressione viene esercitata dall'operatore a mano libera, imprimendo con il trasduttore ecografico delle leggere compressioni ritmiche sull'organo esaminato. Dal momento che la modalità delle compressioni manuali effettuate può essere una variabile operatore-dipendente, esistono diversi software in grado di valutarne la qualità, guidando l'operatore attraverso la visualizzazione di scale numeriche o grafici ampiezza-tempo a seconda della strumentazione impiegata. L'operatore seleziona quindi la ROI (region of interest) oggetto di studio inquadrandola in un box. Quest'ultimo deve essere centrato sul nodulo in modo da includere anche un'area sufficiente di parenchima tiroideo normale circostante. A questo punto è possibile effettuare sia una valutazione qualitativa che semi-quantitativa dell'elasticità tessutale della lesione nodulare studiata. La valutazione qualitativa consiste nell'elaborazione di un'immagine elastasonografica (elastasonogramma), ovvero una mappa cromatica dell'elasticità del parenchima esaminato che viene visualizzata sul monitor dell'ecografo, sovrapposta all'immagine in B-mode.

Inizialmente la processazione dei dati ottenuti prima e dopo la compressione veniva effettuata "off-line", con un notevole ritardo nell'elaborazione. Più recentemente sono state sviluppate delle metodiche in grado di determinare in tempo reale la

distorsione tissutale, come il Combined Autocorrelation Method (CAM), con il risultato di ottenere una significativa riduzione del tempo dell'esame ed una maggiore facilità di esecuzione (13).

L'elastasonogramma viene sintetizzato graficamente mediante una scala di colori, variabile a seconda dello strumento impiegato, ma che generalmente varia dal rosso-verde per gli elementi dotati di una maggior distorsione (tessuti soffici) al blu per quelli con minima o nulla distorsione (tessuti duri ed anelastici).

Le immagini così ottenute sono state classificate in pattern distinti in relazione alle differenze di elasticità.

I due sistemi classificativi di riferimento per la ghiandola tiroidea sono stati elaborati da Rago (14) e da Asteria (15).

Il primo è basato su una precedente classificazione introdotta nel 2004 da Ueno-Itoh per i noduli della mammella (16). Sono previste per i noduli tiroidei cinque diverse classi associate a distinti pattern elastosonografici, distinguendo tra pattern benigni (Classe 1,2,3) e pattern sospetti per malignità (Classe 4 e 5).

La classificazione di Asteria distingue invece quattro classi di durezza o elasticità (Elasticity Score, ES): ES1 ovvero noduli che presentano elasticità in tutta l'area esaminata (nodulo omogeneamente verde); ES2: noduli che presentano elasticità nella maggior parte dell'area esaminata (nodulo prevalentemente verde); ES3: noduli che presentano durezza nella maggior parte dell'area esaminata (nodulo prevalentemente blu); ES4: noduli completamente anelastici (nodulo omogeneamente blu).

Secondo tale sistema vengono distinti pattern benigni (ES1, ES2) e pattern sospetti per malignità (ES3, ES4).

Nel 2009 la classificazione di Rubaltelli et al. ha apportato alcune modifiche alla precedente di Asteria con particolare riferimento alla classe ES3 (17).

E' prevista una suddivisione in quattro classi e due sottoclassi:

-Score 1 (ES 1): Elasticità sull'intero nodulo (verde).

-Score 2 (ES 2): Noduli prevalentemente elastici con zone anelastiche (verde con piccoli spot blu).



-Score 3 (ES 3): Presenza di ampie aree anelastiche (blu) localizzate in periferia (A) o centrali (B).

-Score 4 (ES 4): Nodulo completamente anelastico (blu), con ombreggiatura periferica (azzurra).

Similmente a quanto descritto per la classificazione di Asteria i primi due score (ES1,ES2) corrispondono a pattern suggestivi di benignità, mentre gli ultimi due (ES3,ES4) individuano lesioni sospette per malignità.

L'applicazione di tale sistema di punteggio ha prodotto nell'esperienza degli Autori valori di sensibilità, specificità e accuratezza globale rispettivamente di 82%, 87,5% e 86,2% ed un valore predittivo negativo e positivo rispettivamente di 90 % e 64%, con risultati superiori a quelli dell'ecografia convenzionale, sebbene vi sia stato il riscontro, in un gruppo di 51 pazienti, di due falsi negativi per malignità, entrambi con pattern 2, imponendo dunque cautela nel trarre conclusioni definitive (17).

Una metanalisi pubblicata nel 2013 da Razavi et al. comprendente 24 studi, per un totale di 3531 noduli tiroidei (2604 benigni e 927 maligni), ha evidenziato migliori risultati in termini di sensibilità e specificità per l' Elasticity score (82% , 82%), posto a confronto con alcune caratteristiche nodulari registrabili con l' ecografia convenzionale come l' ipoecogenicità (78%, 55%), le microcalcificazioni (50%, 80%), le irregolarità dei margini (66%, 81%), l' assenza di alone periferico (56%, 57%), lo sviluppo verticale del nodulo (46%, 77%), la vascolarizzazione intranodulare (40%, 61%) (18).

Contrariamente ai precedenti, uno studio retrospettivo condotto da Moon et al su 703 noduli (19), applicando sia i criteri di Asteria che di Rago, ha mostrato risultati inferiori dell' elastosonografia rispetto all' esame ecografico in termini di sensibilità e valore predittivo negativo (65,4% e 79,1% versus 91.7%, 94.7%).

Tutte le diverse classificazioni proposte presentano infatti dei limiti, legati alla variabilità di interpretazione dei pattern elastosonografici da parte dei diversi operatori e soprattutto alla mancanza di una quantificazione numerica, e quindi oggettiva, dell'elasticità delle lesioni nodulari tiroidee.

Nel tentativo di superare queste limitazioni, la valutazione semi-quantitativa dell'elasticità tessutale ha introdotto un nuovo parametro, lo strain ratio (SR), in grado di definire numericamente l'effettiva rigidità del nodulo esaminato (20).

Attraverso infatti la selezione di due ROI, la prima centrata sulla lesione nodulare, la seconda su parenchima tiroideo non patologico, lo strain ratio consente di ottenere in tempo reale un rapporto numerico tra la differente elasticità delle aree esaminate, quantificando di fatto la rigidità di un determinato nodulo.

In uno studio condotto da Cantisani et al. su 97 noduli tiroidei, è stata analizzata l'accuratezza diagnostica dello SR, ottenendo risultati eccellenti in termini di sensibilità (97,3%), specificità (91,7%), e valore predittivo per malignità utilizzando un valore di  $SR \geq 2$  (21).

Uno studio prospettico più recente, pubblicato dagli stessi Autori, ha confrontato l'accuratezza diagnostica dello strain ratio con quella dell'esame ecografico con valutazione ColorDoppler, in un campione di 344 noduli tiroidei.

I dati ottenuti sono stati comparati con i risultati degli esami istologici e citologici.

L'esame elastosonografico, condotto da un operatore esperto, ha dimostrato una sensibilità ed una specificità rispettivamente del 93% e del 92%, superiori all'esame ecografico, dimostrando peraltro un ottimo accordo interoperatore (22).

Dalla metanalisi di 24 studi di Razavi et al. (23), si evince che l'accuratezza diagnostica dello strain ratio, espressa in termini di sensibilità e specificità, si attesta su valori superiori non solo rispetto all' ecografia convenzionale ma anche rispetto all' elastosonografia qualitativa, ovvero all' Elasticity score (sensibilità SR: 89%, specificità SR: 82% versus sensibilità ES: 82%, specificità ES: 82%).

In disaccordo con tali dati, secondo l'esperienza di Chong et al., riportata in uno studio prospettico condotto su 142 noduli tiroidei, il calcolo dello strain ratio non apporterebbe sostanziali vantaggi rispetto all' elastosonografia qualitativa (24).

Nonostante infatti lo strain ratio sia un' analisi semiquantitativa dell' elasticità tessutale, tale metodica risulta ancora gravata da alcuni limiti, come la dipendenza dall'esperienza e dalla capacità dell'operatore di compiere compressioni efficaci, la

mancanza di standardizzazione univoca della tecnica, la necessità di sufficiente parenchima sano da poter confrontare con la lesione nodulare.

Con l'intento di superare tali limitazioni Bae et al. hanno presentato in uno studio preliminare una nuova tecnica, in grado di sfruttare le pulsazioni dell'arteria carotide comune come una vera e propria sorgente di compressioni in vivo (25). La tiroide infatti si espande e si comprime in sincronia con la pulsazione della carotide. Durante la sistolia la pressione arteriosa più alta nel lume dell'arteria comprime la tiroide contro la trachea in direzione medio-laterale. La compressione in questa direzione determina l'espansione del parenchima in direzione antero-posteriore.

In fase diastolica, quando si verifica la riduzione della pressione nel lume arterioso, l'espansione della ghiandola aumenta in senso medio-laterale e si riduce in senso antero-posteriore.

La sonda viene applicata dall'operatore sulla regione anteriore del collo e, senza la necessità di effettuare alcuna compressione, facendo restare il paziente in apnea per circa 4 secondi, il trasduttore registra i movimenti antero-posteriori di espansione e compressione del parenchima tiroideo esaminato fornendo, grazie all'elaborazione di software dedicati, un indice di contrasto dell'elasticità (ECI), calcolato confrontando l'elasticità della lesione e il normale tessuto nella regione di interesse (ROI).

Diversi studi presenti in Letteratura hanno confermato l'accuratezza diagnostica e la riproducibilità di questa metodica (26,27,28).

In particolare Cantisani et al. hanno condotto uno studio prospettico su 154 noduli tiroidei (124 benigni, 30 maligni), impiegando la tecnologia Elastoscan, con l'obiettivo non solo di valutare la variabilità inter-osservatore e l'accuratezza diagnostica della metodica, ma di definire anche la migliore tecnica di misurazione.

I dati ottenuti, posti a confronto con i risultati dell'esame istologico e citologico, hanno dimostrato un eccellente accordo tra i tre diversi operatori (92,2% tra operatore 1 e operatore 2, 89,6% tra operatore 1 e operatore 3, 88,3% tra operatore 2 e operatore 3), una elevata sensibilità e specificità, individuando il piano assiale con valutazione peri-intranodulare come migliore tecnica di misurazione, con un valore di cut-off ottimale per l'ECI pari a 3 (29).

## METODI DINAMICI

I metodi dinamici sfruttano gli stessi principi biomeccanici che sono alla base dell'elastosonografia quasistatica ma differiscono da quest'ultima per la modalità di applicazione delle forze che determinano la deformazione tessutale.

Nell' elastosonografia dinamica viene infatti impiegata una forza di radiazione acustica per studiare l'elasticità del tessuto esaminato. La propagazione delle onde acustiche nei mezzi attenuanti, come i parenchimi, è soggetta al fenomeno dell'assorbimento. Per frequenze al di sopra di una certa soglia il tessuto non riesce ad assecondare le variazioni di pressione che si susseguono troppo rapidamente, determinando il trasferimento di energia nel mezzo sotto forma di una certa quantità di moto. Tale fenomeno causa il riscaldamento del tessuto e la generazione di una forza che a sua volta produce degli spostamenti nell'area circostante.

Le varie tecnologie impiegate nell'elastosonografia dinamica differiscono per la modalità di produzione della forza di radiazione acustica e per i modi utilizzati per valutare la deformazione prodotta nei tessuti.

Le due tecnologie più applicate nello studio della patologia nodulare tiroidea sono rappresentate dall' Acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) e dalla Shear Wave Elastography (SWE) (30).

L' ARFI-imaging (Virtual-Touch™-Tissue-Quantification, Siemens-ACUSON-S2000) prevede che l'operatore posizioni in tempo reale, durante la registrazione di immagini in B-mode, una ROI (Region-of-Interest) sulla lesione nodulare di cui si vuole valutare l'elasticità. A questo punto il tessuto all'interno della ROI viene eccitato meccanicamente usando impulsi acustici emessi dal trasduttore e determinando uno spostamento del tessuto di pochi micron nella direzione dell' asse del fascio di ultrasuoni. Tale spostamento viene misurato ad un determinato intervallo di tempo dalla fine degli impulsi, fornendo una valutazione qualitativa dell'elasticità della lesione nodulare sintetizzata da un' immagine elastosonografica (31). Sebbene tale metodica sia caratterizzata da una minore dipendenza

dall'operatore rispetto all'elastasonografia free-hand e da una riduzione degli artefatti, non è in grado di fornire una misurazione quantitativa dell'elasticità tessutale.

Per tale motivo è stata sviluppata la Point Shear Wave Elastography (pSWE), conosciuta anche come ARFI (Acoustic radiation force impulse) Quantification, una tecnologia che sfrutta come la precedente la forza di radiazione acustica, ma che è in grado di misurare la velocità delle onde di taglio, fornendo un dato quantitativo, espresso in m/s, relativo alla porzione tissutale compresa in una ROI selezionata dall'immagine ecografica B-mode (32).

Una recente metanalisi di Zhan et al. condotta su 16 studi, per un totale di 2436 noduli tiroidei, ha evidenziato come la pSWE sia una metodica estremamente accurata nella diagnosi differenziale tra patologia nodulare tiroidea benigna e maligna, attestandosi su valori medi di sensibilità e specificità rispettivamente pari a 80% e 85% (33).

Risultati sovrapponibili, con valori di sensibilità e specificità pari a 86,3% e 89,5%, sono stati registrati da una seconda metanalisi condotta da Dong et al., comprendendo un totale di 13 studi e 1617 noduli tiroidei (34).

Nonostante la pSWE si configuri come una metodica in grado di fornire una valutazione quantitativa e quindi oggettiva dell'elasticità tessutale, alcuni studi presenti in Letteratura non ne hanno evidenziato un sostanziale vantaggio rispetto all'elastasonografia real-time (RTE) (35,36).

In particolare Bojunga et al. confrontando le due metodiche nello studio di 157 noduli tiroidei (137 benigni, 21 maligni), non hanno registrato differenze statisticamente significative in termini di accuratezza diagnostica (0.74 vs. 0.69,  $p=0.54$ ). Quest'ultima peraltro non viene incrementata, rispetto ai valori registrati con l'utilizzo esclusivo dell'elastasonografia qualitativa (RTE), neppure dall'impiego combinato delle due tecniche (RTE + ARFI) (35).

Più recentemente è stata sviluppata un'altra metodica dinamica, la Two-Dimensional Shear Wave Elastography (2D SWE), basata sempre sullo studio dell'elasticità nodulare attraverso l'analisi delle onde di taglio, ma che impiega la forza di radiazione acustica in modo diverso rispetto alla pSWE e all'ARFI.

Mentre infatti queste due ultime tecniche prevedono che il fascio di impulsi acustici sia focalizzato su un singolo punto del tessuto studiato, la 2D SWE e la 3D SWE interrogano con la radiazione acustica multiple aree in rapida successione, ad una velocità superiore rispetto a quella delle onde trasversali di taglio (10).

L'acquisizione dei dati relativi alla propagazione dell'onda trasversale risulta molto rapida, inferiore ai 30 millisecondi, rendendo la metodologia eccellente per indagini quantitative.

Inoltre i tempi di acquisizione estremamente bassi, rendono trascurabili i movimenti del paziente, garantendo la diagnosi in tempo reale e in vivo.

Nonostante gli incoraggianti risultati ottenuti dall'applicazione della 2D SWE in studi preliminari (37), una recente metanalisi di Nattabi et al., condotta su 14 studi, per un totale di 2851 noduli tiroidei (1092 maligni, 1759 benigni), ha riportato per questa nuova metodica valori subottimali in termini di sensibilità e specificità, rispettivamente pari a 66% e 78% (38).

# **AGOASPIRATO TIROIDEO**

## **NOTE DI TECNICA ED INDICAZIONI**

L' agoaspirato tiroideo (Fine Needle Aspiration, FNA) è una metodica minimamente invasiva che consente una diagnosi di natura dei noduli tiroidei. Ad oggi il prelievo citologico rappresenta il gold standard per la diagnosi di carcinoma tiroideo, con una sensibilità compresa tra il 65% e il 98% ed una specificità compresa tra il 72% il 100% (5-8). Si tratta di un esame a basso costo, di semplice esecuzione, solitamente ben tollerato dal paziente e con un tasso di complicanze estremamente basso. La complicanza più frequente è rappresentata dalla formazione di un ematoma a livello della zona di aspirazione, che può essere prevenuto con l' applicazione di ghiaccio per alcuni minuti. La percentuale di successo della metodica dipende essenzialmente dall'esperienza dell'operatore e da quella del citopatologo. L'esecuzione dell'agoaspirato tiroideo prevede l'utilizzo di un ago sottile (calibro di 20-27 G) che può essere connesso o meno ad una siringa a seconda che si utilizzi la tecnica di aspirazione o si effettui un prelievo per capillarità. Il prelievo dura solitamente solo pochi secondi e dato il calibro ridotto dell'ago utilizzato solitamente non richiede l'impiego di anestetici locali. Nella comune pratica clinica l'agoaspirato viene eseguito sotto guida ecografica. La guida ecografia consente di prelevare cellule anche da noduli clinicamente non palpabili e quindi non altrimenti esaminabili e di scegliere, in base alle caratteristiche ecografiche, quale nodulo o quale parte di nodulo sottoporre a campionamento citologico. La procedura è eseguita in regime ambulatoriale: il paziente viene disteso sul lettino a collo scoperto ed iperesteso, viene eseguita la disinfezione della superficie cutanea in regione anteriore del collo ed una volta individuato ecograficamente il nodulo da tipizzare si procede con l'inserimento dell'ago sottile sotto guida ecografica. Posizionato quindi l'ago all'interno del nodulo si provvede ad aspirare materiale fino a riempire il cono

dell'ago. Solitamente è consigliabile effettuare diversi passaggi ed aspirazioni, muovendo l'ago internamente al nodulo per incrementare l'accuratezza diagnostica della procedura (39-42).

Una volta effettuato il prelievo si passa alla fase di allestimento del materiale citologico che viene immediatamente strisciato su vetrino e fissato. In alternativa il prelievo può essere inserito in un contenitore con soluzione a base di metanolo e quindi centrifugato, emolizzato e trasferito su strato sottile da parte di un sistema automatizzato (43). Si tratta di una metodica che può ridurre gli errori legati all'allestimento dei vetrini ma che risulta più costosa e meno codificata, non consentendo peraltro di valutare appieno l'architettura cellulare e le caratteristiche della colloide. Per quanto riguarda invece la tecnica del cell-block, questa prevede invece l'immersione dei campioni citologici in fissativo e la loro processazione mediante inclusione in paraffina (44). Dal momento che i dettagli citomorfologici appaiono differenti rispetto a quelli tradizionalmente analizzati per gli strisci su vetrino, la tecnica del cell-block non sostituisce ma piuttosto è complementare agli strisci citologici, offrendo la possibilità di eseguire indagini immunocitochimiche o molecolari.

Le indicazioni ad eseguire l' agoaspirato tiroideo hanno subito nel tempo diverse modificazioni sia con l'obiettivo di incrementare la sensibilità e la specificità diagnostica della metodica sia di ottimizzare il rapporto costi/benefici.

Nel Maggio del 2016 sono state pubblicate le ultime linee guida AACE/ACE/AME 2016 (American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), American College of Endocrinology (ACE), Associazione Medici Endocrinologi (AME)) per la diagnosi e la gestione del nodulo tiroideo (45).

Secondo tali linee guida , i noduli tiroidei possono essere suddivisi in tre classi di sospetto per malignità in base alle loro caratteristiche ecografiche.

Vengono definiti infatti noduli a basso rischio (rischio atteso di malignità 1%) i noduli prevalentemente cistici (> 50%) ed i noduli spongiformi, isoecogeni, confluenti o con alone regolare.



I noduli a rischio intermedio (rischio atteso di malignità 5-15%) si presentano invece modicamente ipoecogeni o isoecogeni, con forma ovalare o rotonda, margini lisci o mal definiti. Sono caratterizzati da vascolarizzazione intranodulare, elevata rigidità elastosonografica, macrocalcificazioni, spots iperecogeni di incerto significato.

I noduli ad alto rischio (rischio atteso di malignità 50-90%) devono presentare almeno una delle seguenti caratteristiche:

- marcata ipoecogenicità;
- margini microlobulati o spiculati;
- microcalcificazioni;
- forma "taller than wide";
- estensione extratiroidea;
- evidenza di metastasi linfonodali.

Alla luce di tale classificazione ed in base alle dimensioni delle lesioni nodulari tiroidee, le linee guida AACE/ACE/AME 2016 indicano i criteri di selezione dei noduli da sottoporre ad esame citoaspirativo.

I noduli con diametro < 5 mm, in considerazione del basso rischio clinico, non dovrebbero essere tipizzati con l' agoaspirato, a prescindere dal loro aspetto ecografico, anche se ecograficamente sospetti, ma solamente sottoposti a follow-up clinico-strumentale.

In presenza di noduli con diametro compreso tra 5 e 10 mm, l' agoaspirato deve essere considerato solo in caso di lesione ad alto rischio di malignità.

Per quanto concerne invece i noduli di diametro maggiore di 10 mm, l'agoaspirato va eseguito in caso di rischio elevato di malignità, mentre nei noduli di diametro maggiore di 20 mm in presenza di rischio di malignità intermedio.

Per i noduli della tiroide a basso rischio di malignità (spongiformi, iso-iperecogeni, prevalentemente cistici senza caratteri sospetti) si pone indicazione all'esame citologico solo se le dimensioni superano i 20 mm e se risultano in progressivo aumento volumetrico, in caso di storia clinica sospetta per patologia neoplastica o in previsione di un intervento chirurgico o termoablattivo.

Nel caso di un nodulo della tiroide ad ecostruttura complessa (misto), si consiglia di prelevare la componente solida della lesione, preferibilmente dalle aree vascolarizzate e di campionare sia la componente solida sia la componente liquida per l'esame citologico.

I noduli caldi alla scintigrafia, ma privi di caratteristiche ecografiche di sospetto, non devono essere sottoposti ad agoaspirato mentre è sempre consigliabile eseguire l'esame citologico di un nodulo della tiroide riscontrato incidentalmente che risulta captante alla PET con 18F-fluorodeossiglucosio (18FDG), in considerazione dell'elevato rischio di malignità.

## LINEE GUIDA DELLA SOCIETÀ' ITALIANA DI ANATOMIA PATOLOGICA E CITOLOGIA DIAGNOSTICA

Le linee guida della Società italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica sulla classificazione citologica dell'agoaspirato tiroideo si fondano sull' "Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology", pubblicato nel 2014 sul Journal of Endocrinological Investigation (JEI) dai membri del Comitato italiano SIAPEC-AIT (Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia diagnostica – Associazione Italiana della Tiroide). Lo scopo di tale classificazione è stato di standardizzare al meglio le indicazioni terapeutiche, indicando l'intervento chirurgico solo in caso di lesioni con forte probabilità di malignità e trattando con terapia farmacologica e follow-up le restanti lesioni che rappresentano peraltro la maggior parte delle formazioni nodulari tiroidee (45).

La precedente classificazione italiana SIAPEC-IAP presentata nel 2007, pubblicata ed inclusa nel 2008 nelle Linee Guida Italiane per la Gestione delle Lesioni Nodulari Tiroidee, prevedeva cinque categorie diagnostiche, ognuna delle quali caratterizzata da un differente approccio terapeutico (Tab 1).

Rispetto a tale versione, le modifiche apportate dalla nuova classificazione riguardano fondamentalmente due aspetti (Tab 2). Il primo è l'inserimento di un "rischio di malignità atteso" per ciascuna categoria diagnostica, analogamente a quanto descritto nella classificazione americana del 2008 denominata Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (TBSRTC) (3).

Il secondo, che rende la classificazione italiana assimilabile sia a quella americana che a quella britannica (aggiornata nel 2010 dal Royal College of Pathologists) è la suddivisione della categoria TIR 3 (indeterminato) in due sottocategorie (TIR 3A e TIR 3B) che presentano un rischio di malignità diverso e che richiedono dunque un approccio terapeutico differente.

Nel dettaglio le categorie previste dalla nuova classificazione sono le seguenti (Tab 2):

TIR 1 (Non diagnostica). Comprende prelievi ‘inadeguati’ (per contaminazione ematica o per artefatti) e ‘non rappresentativi’ (assenza di almeno 6 gruppi di 10 tireociti). In presenza di atipie citologiche significative il campione viene incluso in una categoria di sospetto indipendentemente dal numero di cellule. Se nei prelievi da lesioni cistiche sono presenti solo eritrociti, detriti e macrofagi con emosiderina, in assenza di colloide, la lesione è sottoclassificata come TIR 1C (cistica).

La categoria TIR 1 non consente una diagnosi ed è quindi raccomandata la ripetizione di una FNA ecoguidato dopo almeno un mese.

Per quanto riguarda invece la categoria TIR 1C, in assenza di reperti clinici e ecografici di sospetto queste lesioni devono essere considerate come benigne. In caso di sospetto clinico, vi è indicazione a ripetere la FNA per escludere la presenza di un carcinoma papillifero cistico.

Rispetto alla classificazione precedente, nella categoria TIR1 (“non diagnostico”) sono state introdotte fondamentalmente tre modifiche:

1. In presenza di atipie citologiche significative il campione viene incluso in una categoria di sospetto indipendentemente dal numero delle cellule che lo compongono, in analogia con le classificazioni americana e inglese.
2. I campioni citologici ottenuti da lesioni cistiche che non raggiungono i limiti minimi di adeguatezza cellulare sono classificati come TIR1C (cistico). Sono escluse le cisti colloidee, che vengono invece incluse nella categoria TIR2.
3. Nell'eventualità di agoaspirati ripetutamente non diagnostici può essere eseguita una core needle biopsy (CNB) per una valutazione microistologica. Tale procedura si è dimostrata efficace nella riduzione del numero di casi “inadeguati”.

TIR 2 (Non maligna/Benigna). Si riferisce a prelievi citologici eseguiti su noduli colloidali o iperplastici, tiroiditi e altre condizioni non neoplastiche. In tutti questi casi è indicato follow-up clinico ed ecografico. La ripetizione del prelievo citologico è indicata qualora si dovessero osservare crescita o modificazioni ecografiche del nodulo ed in tutti quei pazienti candidati a trattamenti ablativi non chirurgici. Il rischio di malignità stimato per la categoria TIR 2 risulta essere inferiore al 5%.

La categoria TIR 3 (proliferazione follicolare) è stata oggetto di diverse modifiche nelle ultime classificazioni. Si tratta di una categoria indeterminata, per la quale i soli criteri citologici non sono sufficienti a definire la benignità o malignità della lesione. I noduli tiroidei TIR 3 risultano maligni all'istologia in una percentuale compresa tra il 10 e il 30% a seconda delle diverse casistiche. La classificazione italiana 2014 suddivide questa categoria in due sottocategorie: TIR 3A, con un rischio di malignità atteso del 5-10%, e la categoria TIR 3B con un rischio del 15-30%. Sulla base di questa suddivisione la chirurgia diventa il trattamento di scelta solo per la categoria TIR 3B mentre per la categoria a rischio minore è consigliabile il follow-up clinico e l'eventuale ripetizione dell'esame a distanza di sei mesi dal primo.

Per quanto concerne invece la categoria TIR 4, ovvero esame citologico sospetto per carcinoma papillare, la chirurgia rappresenta il trattamento di scelta dal momento che la probabilità di malignità nelle diverse casistiche è compresa tra 60 e 80% dei casi.

La categoria TIR 5 si riferisce a prelievi citologici positivi per cellule neoplastiche. Si tratta di una categoria piuttosto disomogenea comprendendo diverse tipologie di neoplasie con netta prevalenza dei carcinomi differenziati derivati dalle cellule follicolari tiroidee (oltre 95% di tutte le neoplasie tiroidee), la terapia è chirurgica.

Indubbiamente la categoria TIR 3 è quella più soggetta a diverse definizioni nelle varie classificazioni.

Il Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (TBSRTC) (3) ha rappresentato per anni il sistema di riferimento per la classificazione citologica dell'agoaspirato tiroideo, non solo in Nord America ma anche nella maggior parte dei paesi europei ed asiatici (46).

Il sistema individua fondamentalmente 6 classi diagnostiche (Tab 3) e nel dettaglio le categorie III e IV, corrispondenti di fatto al TIR 3 della classificazione italiana SIAPEC, vengono descritte rispettivamente come "AUS/FLUS", ovvero "atypia of undetermined significance/follicular neoplasm of undetermined significance" e "FN/SFN", ovvero "follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm".

Trascendendo i dettagli di nomenclatura è interessante notare come vengano indicati per le due categorie atteggiamenti diagnostico-terapeutici differenti.

Mentre infatti i noduli tipizzati all'esame citologico come "AUS/FLUS" richiedono o la ripetizione dell'agoaspirato o l'esecuzione di esami immunocitochimici come l'utilizzo del HBME-1 (human mesothelial cell antibody-1) o altri test molecolari come l' Afirma test (Veracyte, South San Francisco, Calif), il miRInform test (Asuragen, Austin, Tex), o il sequenziamento dei microRNA (47), la categoria IV, ovvero quella definita come " neoplasia follicolare/sospetta per neoplasia follicolare", richiede un approccio terapeutico di tipo chirurgico.

La classificazione inglese invece, originariamente presentata nel 2002 dalla British Thyroid Association e dal Royal College of Physicians e successivamente modificata nel 2009 dal Royal College of Pathologists (48), individua due sottocategorie per la categoria TIR 3, distinguendo i prelievi Thy3a, definiti letteralmente come "potenzialmente neoplastici- presenza di atipia/non diagnostici", dai prelievi Thy3f, definiti come "potenzialmente neoplastici - suggestivi per neoplasia follicolare". L'indicazione terapeutica per le sottocategorie Thy3a e Thy3f è sostanzialmente analoga a quella proposta dalla classificazione nordamericana (Bethesda System) rispettivamente per la categoria III (ripetizione dell' agoaspirato o esecuzione di ulteriori esami) e per la categoria IV (approccio di tipo chirurgico) anche se le linee guida inglesi enfatizzano come in entrambi i casi si debba procedere ad una preliminare valutazione in ambito multidisciplinare.

Nonostante lo sforzo classificativo è evidente come non vi sia una netta distinzione tra le due sottocategorie del gruppo Thy3 che rischia spesso di configurarsi, sia per il patologo che per il clinico, come una vera e propria "zona grigia".

Sicuramente le linee guida italiane, presentate nel 2014, hanno contribuito a definire con maggiore chiarezza la categoria TIR 3 che per definizione continua a risultare "indeterminata", ma che comunque viene suddivisa in una classe "a basso rischio" (TIR3A) ed in una "ad alto rischio" (TIR3B), limitando così i dubbi interpretativi per il clinico.

Dal punto di vista anatomo-patologico i prelievi TIR3A presentano un aumento della cellularità, numerosi microfollicoli e scarsa colloide. La stima del rischio di malignità è approssimativamente del 10% e dunque, analogamente a quanto suggerito dal Bethesda System per la categoria III, vi è indicazione a ripetere l'agoaspirato.

I prelievi TIR3B sono invece caratterizzati da un aspirato altamente cellulare, contenente una popolazione microfollicolare monotona, con scarsa o assente colloide che suggerisce la presenza di una neoplasia follicolare. Tale categoria comprende anche le neoplasie a cellule di Hurthle. Il rischio di malignità atteso varia dal 20% al 30% e l'indicazione terapeutica suggerita è quella chirurgica.

**TABELLA 1 Classificazione italiana SIAPEC-IAP 2007**

TIR1 Non diagnostico
TIR2 Negativo per cellule maligne
TIR3 Indeterminato (proliferazione follicolare)
TIR4 Sospetto di malignità
TIR5 Positivo per cellule maligne

**TABELLA 2 Consensus Statement AIT, AME, SIE & SIAPEC-IAP for the Classification and Reporting of Thyroid Cytol**

<b>Codice</b>	<b>Categoria diagnostica</b>	<b>Rischio di malignità atteso (%)</b>	<b>Azione clinica suggerita</b>
TIR1	Non diagnostico	Non definito	Ripetere FNA con guida ecografica
TIR1C	Non diagnostico cistico	Basso, variabile in base al quadro clinico	Valutare nel contesto clinico eventualmente ripetere FNA
TIR2	Non maligno/benigno	< 3	Follow up
TIR3A	Lesione indeterminata a basso rischio	< 10	Ripetere FNA/follow up
TIR3B	Lesione indeterminata ad alto rischio	15-30	Exeresi chirurgica
TIR4	Sospetto di malignità	60-80	Exeresi chirurgica con eventuale esame intraoperatorio
TIR5	Maligno	95	Exeresi chirurgica Approfondimento diagnostico in casi selezionati



**TABELLA 3 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (TBSRTC)**

<b>DIAGNOSTIC CATEGORY</b>	<b>CLINICAL MANAGEMENT</b>
I. Nondiagnostic/unsatisfactory	Repeat US-guided FNA
II. Benign	Follow-up
III. AUS/FLUS	Low TSH: radioisotope scan; Repeat US-guided FNA; Consider ancillary techniques
IV. Follicular neoplasm/ Suspicious for a follicular neoplasm	Surgical consultation or ancillary studies
V. Suspicious for malignancy	Surgical consultation with or without ancillary studies
VI. Malignant	Surgical consultation

# **STUDIO PROSPETTICO RANDOMIZZATO SULL' APPLICAZIONE DELLA TECNOLOGIA ELASTOSONOGRAFICA ALL' ESAME CITOASPIRATIVO TIROIDEO.**

## **PREMESSA**

Nonostante i significativi tassi di falsi negativi e di campioni inadeguati, ad oggi l'agoaspirato e l'analisi citopatologica rappresentano due capisaldi nella diagnosi precoce del carcinoma tiroideo.

Dal momento che il 10-20% degli agoaspirati tiroidei risulta non diagnostico (1,2) e che la categoria "indeterminata" TIR 3 rappresenta ancora oggi una "zona grigia" nella pratica clinica, è maturata l'istanza di sviluppare ulteriori metodi per migliorare l'efficacia del prelievo citologico. Recentemente l'elastosonografia ha attirato notevole interesse per la sua capacità di differenziare la patologia nodulare tiroidea benigna da quella maligna, in base alle caratteristiche di elasticità dei tessuti. Dal momento che tale metodica è in grado di definire, anche all'interno dello stesso nodulo, aree con maggiore o minore 'rigidità', abbiamo ipotizzato che ottenere una mappa della lesione nodulare potesse 'guidare' il prelievo citologico sulla zona ottimale da campionare.

Abbiamo quindi condotto uno studio prospettico randomizzato sull'applicazione della tecnologia elastosonografica all'esame citoaspirativo tiroideo.

## MATERIALI E METODI

Lo studio prospettico ha inizialmente compreso un totale di 91 pazienti, arruolati tra Settembre 2014 e Giugno 2015 nel Dipartimento di Scienze Chirurgiche e candidati ad essere sottoposti ad agoaspirato tiroideo. Tutti i pazienti sono stati studiati con dosaggio degli ormoni tiroidei, ecografia tiroidea con valutazione Color-Doppler ed elastosonografia tiroidea con calcolo dell' Elasticity Score (ES) secondo Asteria (15), utilizzando l'ecografo MYLAB 70 XVG (Esaote Company).

Sono stati registrati inoltre il peso (Kg) e l'altezza (m) dei partecipanti con lo scopo di calcolarne il BMI ( $\text{kg} / \text{m}^2$ ). Dal momento infatti che lo spessore del tessuto adiposo sottocutaneo può interferire sia con il calcolo dell'elasticità del parenchima tiroideo che con l'esecuzione dell'agoaspirato, al fine di standardizzare tale spessore, abbiamo incluso nello studio pazienti con valore di BMI inferiore a  $30 \text{ kg} / \text{m}^2$ . Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecografia tiroidea con valutazione ColorDoppler che ha individuato il nodulo "dominante" da sottoporre ad agoaspirato secondo i criteri riconosciuti in Letteratura (44): ipoecogenicità marcata, irregolarità dei margini (spiculazioni o microlobulazioni), alone periferico irregolare, microcalcificazioni, vascolarizzazione intralesionale al Color-Doppler, diametro antero-posteriore superiore al diametro trasversale.

In presenza di più noduli con caratteristiche sospette nello stesso paziente, è stato scelto il nodulo di maggiori dimensioni per effettuare l'agoaspirato.

I criteri di esclusione sono stati: noduli di dimensioni inferiori al centimetro, noduli cistici, noduli cistici con aree solide di dimensione insufficiente da campionare, la presenza di una calcificazione grossolana all'interno di un nodulo, noduli ES 1 secondo Asteria all' elastosonografia tiroidea.

Nel gruppo dei 91 pazienti inizialmente arruolati sono stati individuati 62 casi che rispettavano i criteri di inclusione ed esclusione. I 62 pazienti (50 F, 12 M, età media  $40,1 \pm 5,2$  anni, range: 28-68 anni) sono stati quindi randomizzati in due gruppi: Gruppo A (31 pazienti) con nodulo tiroideo da sottoporre a FNA tiroideo

convenzionale (ecoguidato), Gruppo B (31 pazienti) con nodulo tiroideo da sottoporre a FNA tiroideo con selezione dell'area da campionare mediante esame elastosonografico.

Prima di eseguire l'agoaspirato, in tutti i pazienti è stata ripetuta un' ecografia della ghiandola tiroidea con valutazione Color-Doppler in posizione supina e con collo in iperestensione, utilizzando l'ecografo MYLAB 70 XVG (Esaote Company) con sonda lineare.

Una volta riconosciuto il nodulo sospetto, identificato nel corso della prima valutazione, i pazienti sono stati sottoposti ad agoaspirato ecoguidato (Gruppo A) ed agoaspirato con selezione dell'area da campionare mediante esame elastosonografico con tecnica real- time freehand (Gruppo B).

L'esecuzione degli agoaspirati sotto guida elastosonografica ha previsto inizialmente la selezione da parte dell'operatore della ROI (region of interest) oggetto di studio. La selezione del box elastosonografico, centrato sul nodulo da sottoporre ad esame citoaspirativo, è stata condotta lasciando un'area di almeno 8-10 mm di tessuto tiroideo esente da alterazioni.

Per ogni nodulo esaminato, durante il ciclo di compressione-rilassamento, sono state acquisite e registrate le immagini elastosonografiche, visualizzate sul monitor dell'ecografo, simultaneamente all'immagine in B-mode.

Nell'impossibilità di eseguire l'agoaspirato in tempo reale, a causa dei movimenti generati dalla compressione della sonda, l'elastosonogramma è stato acquisito e visualizzato sul monitor in parallelo all'immagine in B-mode. A questo punto l'inserimento dell'ago per il prelievo citologico è stato seguito sotto guida ecografica, campionando le aree nodulari che nella mappa elastosonografica, visualizzata in parallelo sul monitor, si presentavano come anelastiche (colore blu) (Fig.1).

L'agoaspirato in entrambi i gruppi è stato eseguito da due operatori esperti (>300 FNA eseguiti) con un ago da 23 gauge connesso ad una siringa da 20 ml eseguendo due aspirazioni per ogni nodulo di ogni gruppo.

Al fine di ridurre al minimo la variabilità interoperatore, ciascun esame è stato condotto con l'operatore 1 impegnato nell'esecuzione del prelievo citologico e l'operatore 2 dedicato invece al posizionamento della sonda ecografica.

L'adeguatezza delle aspirazioni è stata definita secondo le Linee Guida della Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica (45).

In particolare sono stati definiti TIR 1 i prelievi 'inadeguati' (per contaminazione ematica o per artefatti) e quelli 'non rappresentativi' (assenza di almeno 6 gruppi di 10 tireociti).

In presenza di atipie citologiche significative il campione è stato incluso in una categoria di sospetto indipendentemente dal numero di cellule.

Se nei prelievi da lesioni cistiche sono stati evidenziati solo eritrociti, detriti e macrofagi con emosiderina, in assenza di colloide, la lesione è stata sottoclassificata come TIR 1C (cistica).

**Figura 1. Agoaspirato con selezione dell'area da campionare mediante esame elastosonografico con tecnica real- time freehand**

## **ANALISI STATISTICA**

Il Mann-Whitney test ed il Chi-square test sono stati utilizzati per verificare l'omogeneità dei due gruppi e per confrontare le due diverse metodiche diagnostiche applicate.

Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il software SPSS 16.0 (Chicago,IL, USA) e valori  $P < 0.05$  sono stati considerati come statisticamente significativi.

## **RISULTATI**

Non è stata registrata alcuna complicanza relativa all'esecuzione degli agoaspirati, ove si eccettui un modesto ematoma sottocutaneo comparso post-procedura in un paziente del gruppo A, trattato con crioterapia.

Il follow-up medio dei pazienti è stato di  $12,1 \pm 3,2$  mesi, senza osservare differenze statisticamente significative tra i due gruppi ( $p=0.8$ ).

Il BMI medio dei pazienti è stato pari a  $25.50 \pm 2.37$  kg/m<sup>2</sup>, in assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi ( $p=0.2$ ).

La distanza media del nodulo dal piano cutaneo è stata pari a  $15.9 \pm 4,9$  mm ed il diametro medio dei noduli analizzati è stato pari a  $16 \pm 5$  mm, senza differenze statisticamente significative tra i due gruppi (rispettivamente  $p=0.17$  e  $p=0.1$ ).

Il pattern di vascolarizzazione al ColorDoppler è stato di tipo II in 25 noduli (11 Gruppo A, 14 Gruppo B) e di tipo III in 37 (20 Gruppo A, 17 Gruppo B) ( $p=0.4$ ).

Il pattern elastosonografico calcolato in base all' Elasticity Score (ES) secondo Asteria è stato di tipo 2 in 42 noduli (19 Gruppo A, 23 Gruppo B) e di tipo 3 in 20 noduli (12 Gruppo A, 8 Gruppo B) ( $p=0.3$ ).

Sebbene 17 noduli (10 Gruppo A, 7 Gruppo B) presentassero una componente cistica al loro interno, in entrambi i gruppi l'agoaspirato è stato condotto sulle aree nodulari di aspetto solido.

Un totale di 10 pazienti è stato sottoposto ad intervento chirurgico di tiroidectomia totale. In 5 casi l' esame istologico definitivo ha deposto per carcinoma papillifero della tiroide (2 Gruppo A: 2 pT1N0M0, 3 Gruppo B: 2 PT1NOMO, 1 pT2N0M0).

Il campionamento effettuato sotto guida elastosonografica delle aree caratterizzate da maggior rigidità (colore blu) ha prodotto una percentuale di prelievi non diagnostici pari al 6.4 % (2 TIR1) mentre la percentuale di agoaspirati non diagnostici eseguiti sotto guida ecografica (9 TIR 1) è stata del 29 % ( $p=0.02$ ) (Tab 4).

La distribuzione nei Gruppi A e B delle altre categorie diagnostiche, riportata nella tabella 5, non ha presentato differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ).

La sensibilità e la specificità delle due diverse metodiche citoaspirative sono risultate sostanzialmente sovrapponibili. Nel nostro campione infatti l'agoaspirato ecoguidato ha presentato una sensibilità ed una specificità rispettivamente del 100% e 95%, l'agoaspirato elastosono-guidato una sensibilità del 100% ed una specificità del 96%.

**TABELLA 4. Diagnostic-rate delle due metodiche a confronto**

	<b>FNA NON DIAGNOSTICI</b>	<b>FNA DIAGNOSTICI</b>	<b>TOTALE FNA</b>
<b>GRUPPO A</b> Agoaspirato ecoguidato	9 (29%)	22 (71%)	31
<b>GRUPPO B</b> Agoaspirato elastosonoguidato	2 (6.4%)	29 (93.6%)	31

**TABELLA 5. Categorie diagnostiche dell'agoaspirato nei due gruppi**

	<b>GRUPPO A</b> Agoaspirato ecoguidato	<b>GRUPPO B</b> Agoaspirato elastosono-guidato
TIR1	9 (29%)	2 (6.4%)
TIR1C	0 (0%)	0 (0%)
TIR2	18 (58%)	23 (74.2%)
TIR3A	1 (3.2%)	2 (6.4%)
TIR3B	3 (9.7%)	3 (9.7%)
TIR4	0 (0%)	1 (3.2%)
TIR5	0 (0%)	0 (0%)

## DISCUSSIONE

L'agoaspirato tiroideo rappresenta ad oggi il gold standard per la diagnosi dei noduli tiroidei maligni.

Nonostante sia ampiamente diffuso nella pratica clinica, la sua efficacia è limitata da un significativo tasso di risultati falsi positivi e negativi, con una percentuale di prelievi non diagnostici che può arrivare al 30% (1,2).

Per ovviare a tali limitazioni è possibile eseguire aspirazioni ripetute (49, 50) ma la reiterazione dell' esame, seppur minimamente invasivo, può aumentare il rischio di complicanze, richiedendo peraltro al paziente di rivivere lo stesso trauma, con perdita di tempo e costi aggiuntivi.

L'agoaspirato ecoguidato non richiede solo abilità ed esperienza, ma anche attenzione ai fattori che influenzano l'adeguatezza del materiale (51-55), tra cui la possibilità di eseguire l'esame citopatologico in tempo reale. L'applicazione di tale accorgimento non ha tuttavia prodotto una riduzione statisticamente significativa del numero di campioni non diagnostici, determinando peraltro un incremento dei costi dovuto alla necessità della presenza di un anatomopatologo in sede (56).

Una lesione nodulare tiroidea può presentare diversi livelli di rigidità del tessuto intralesionale a seconda della cellularità e della composizione del nodulo stesso. Lo studio elastografico fornisce informazioni non solo sulla rigidità della lesione rispetto al parenchima tiroideo circostante, ma può costruire una vera e propria mappa dell'elasticità del tessuto all'interno del nodulo (57).

All'inizio di questo studio abbiamo ipotizzato che aree nodulari caratterizzate da maggiore rigidità all'esame elastosonografico, potessero rappresentare delle zone target per l'agoaspirato, in quanto più probabilmente sede di alterazioni degenerative.

La compressione del tessuto esaminato con la sonda dell'ecografo produce una deformazione, valutata come variazione della distanza tra due punti, differente a seconda del grado di "comprimibilità", minore nei tessuti duri e maggiore nei tessuti soffici, in relazione al loro diverso coefficiente di elasticità. Quest'ultimo dipende a sua volta dalle caratteristiche anatomo-istologiche del tessuto considerato e può



essere rilevato e quantificato attraverso software dedicati. Generalmente le lesioni benigne tendono ad avere un coefficiente maggiore rispetto al tessuto normale, ma sostanzialmente minore rispetto ai noduli maligni.

La metodica elastosonografica si fonda sul principio espresso dal modulo di elasticità di Young, descritto dalla seguente funzione:  $E = \sigma/\varepsilon$ , dove  $\sigma$  è la compressione esterna (stress) ed  $\varepsilon$  è la deformazione del tessuto in risposta alla compressione (strain), che viene accuratamente calcolato da un software dedicato.

Nell'ecografia B-mode, non esiste una stretta correlazione tra il pattern ecografico ed il modulo di Young: lesioni con differente consistenza possono presentare analoga ecogenicità. L'elastosonografia invece pone le sue basi proprio sulla capacità di evidenziare tale differenza.

Sulla base di queste evidenze abbiamo ipotizzato un possibile ruolo dell'esame elastosonografico nella guida del prelievo citologico sulla zona nodulare ottimale da campionare, ovvero quella a maggior rischio di malignità.

Nel 2013 Yildirim et al. hanno analizzato in uno studio prospettico le percentuali di prelievi citologici non diagnostici eseguiti su aree intranodulari a bassa versus alta rigidità, studiate con esame elastosonografico. Dall'analisi di 96 casi è emerso un incremento statisticamente significativo dell'adeguatezza diagnostica per i prelievi effettuati su aree intranodulari caratterizzate da minore elasticità all'elastogramma (57). Alla luce di tali risultati il nostro studio si è proposto di confrontare direttamente l'agoaspirato sotto guida elastosonografica con il tradizionale agoaspirato ecoguidato. I risultati dello studio hanno evidenziato come il campionamento effettuato sotto guida elastosonografica abbia prodotto un diagnostic-rate del 93.6% contro il 71% degli agoaspirati condotti invece sotto guida ecografica (Tab 7).

Tale differenza è risultata statisticamente significativa ( $p=0.02$ ) e l'applicazione della metodica elastosonografica ha determinato nel nostro campione una riduzione degli agoaspirati non diagnostici del 22,6%.

La percentuale di prelievi non diagnostici classificati come TIR1 (6.4%), osservata nel gruppo di pazienti sottoposti ad agoaspirato sotto guida elastosonografica (Gruppo B), rispetta di fatto le raccomandazioni dell' American Society for Clinical

Pathology (ASCP) secondo cui la percentuale di campioni non diagnostici dovrebbe idealmente essere limitata a non più del 10% di tutti i prelievi citologici (3).

Analizzando invece la distribuzione nei Gruppi A e B delle altre categorie diagnostiche, compresi i prelievi classificati come TIR 3A e TIR 3B, è possibile evidenziare una sostanziale sovrapposibilità delle percentuali registrate (Tab 5), in assenza di differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ).

Per quanto riguarda il follow-up dei pazienti con FNA risultato non diagnostico (9 Gruppo A, 2 Gruppo B), la ripetizione dell'esame è stata eseguita a distanza in 8 casi (6 Gruppo A, 2 Gruppo B), applicando la stessa metodica impiegata per effettuare il primo prelievo. Il secondo agoaspirato elastosono-guidato nei pazienti appartenenti al Gruppo B ha diagnosticato 2 TIR2, mentre la ripetizione dell'agoaspirato ecoguidato nel Gruppo A ha prodotto 3 TIR2, 1 TIR3A e nuovamente 2 TIR1 (non diagnostici).

L'inadeguatezza del prelievo può essere determinata dalla scarsità di tireociti: quest'ultima può derivare o da errori di prelievo dovuti all'inesperienza dell'operatore, contaminazione ematica, campionamento inadeguato o da errori di processazione del campione come la ritardata o inadeguata fissazione, strisci mal eseguiti o difetti di colorazione.

Considerato che nei due gruppi da noi confrontati sono state applicate metodiche omogenee di aspirazione, di allestimento e lettura dei vetrini e che gli agoaspirati sono stati eseguiti sempre dagli stessi due operatori, la differenza in termini di campioni non diagnostici è stata probabilmente determinata dalla capacità dell'elastosonografia di individuare con precisione aree solide e quindi con maggiore cellularità.

Per quanto riguarda invece l'analisi della categoria TIR 3, la ridotta numerosità campionaria rende difficile trarre delle conclusioni. La categoria TIR 3 (proliferazione follicolare) rappresenta una categoria indeterminata, per la quale i soli criteri citologici non sono sufficienti a definire la benignità o malignità della lesione. La sottocategoria TIR 3A presenta un rischio di malignità atteso del 5-10%, mentre la categoria TIR 3B un rischio del 15-30%. Sulla base di questa suddivisione la

chirurgia diventa il trattamento di scelta solo per la categoria TIR 3B mentre per la categoria a rischio minore è consigliabile il follow-up clinico e l'eventuale ripetizione dell'esame a distanza di sei mesi dal primo.

Confrontando i prelievi risultati TIR3A e TIR3B nei due gruppi del nostro studio, considerati come omogenei, non si sono osservate differenze statisticamente significative tra le due metodiche ( $p > 0.05$ ).

Allo stesso modo se si confrontano i risultati degli esami citologici con quelli istologici definitivi ottenuti in 10 pazienti, si nota come i 2 carcinomi papilliferi presenti nel gruppo A, siano stati classificati all'agoaspirato ecoguidato come TIR3B, mentre per i 3 carcinomi papilliferi del gruppo B la diagnosi preoperatoria eseguita con l'agoaspirato elastosono-guidato sia stata TIR3B in 2 casi e TIR4 in un caso, non evidenziando dunque differenze significative in termini di sensibilità e specificità tra le due diverse metodiche citoaspirative.

## CONCLUSIONI

Nonostante l'agoaspirato rappresenti il gold standard per la diagnosi della patologia nodulare tiroidea, il primo sospetto di malignità può già scaturire dall'esame clinico, mediante la palpazione della tiroide e la valutazione della sua consistenza. Infatti la consistenza aumentata e l'ipomobilità di una lesione nodulare rappresentano generalmente reperti suggestivi di malignità.

L'esame ecografico convenzionale fornisce informazioni riguardanti le caratteristiche del nodulo correlabili ad un aumentato rischio di malignità: ecogenicità, margini, microcalcificazioni e pattern vascolare.

Tuttavia nessuna delle caratteristiche ecografiche presenta elevate sensibilità e specificità, né l'ecografia è in grado di fornire informazioni direttamente correlabili alla durezza del nodulo, senza dimenticare che il risultato dell'esame è fortemente correlato all'esperienza dell'operatore.

La metodica che attualmente permette di valutare la consistenza di un tessuto, intesa come coefficiente di elasticità, è l'elastasonografia.

La tecnica elastasonografica si basa sul principio fisico secondo cui l'azione di una forza di compressione esterna determina una più agevole deformazione delle porzioni maggiormente elastiche (molli) di un parenchima rispetto alle parti più dure (anelastiche). Mediante una misurazione diretta della quota di deformabilità del fascio ultrasonoro, l'elastasonografia fornisce informazioni sulle proprietà elastiche dell'organo in esame che ne riflettono la composizione e l'organizzazione strutturale.

Negli ultimi anni si sono intensificate le ricerche su tale metodica ed è aumentato il numero di organi analizzati: tiroide, mammella, fegato, linfonodi.

Numerosi studi presenti in Letteratura hanno fornito risultati fortemente incoraggianti sulla possibilità di introdurre l'elastasonografia come metodica diagnostica valida nella differenziazione tra lesioni nodulari tiroidee benigne e maligne. Tuttavia, nonostante le potenzialità diagnostiche dell'elastasonografia siano state ampiamente dimostrate, il suo possibile ruolo nella guida del prelievo citologico risulta ancora poco studiato. Un solo studio condotto nel 2013 da Yildirim ha analizzato le

percentuali di prelievi citologici non diagnostici eseguiti su aree intranodulari a bassa ed alta rigidità definite con esame elastosonografico, dimostrando un incremento statisticamente significativo dell'adeguatezza diagnostica per i prelievi effettuati su aree intranodulari caratterizzate da minore elasticità.

Il nostro studio si è proposto di confrontare direttamente l' agoaspirato sotto guida elastosonografica con il tradizionale agoaspirato ecoguidato. L' applicazione della metodica elastosonografica ha determinato una riduzione degli agoaspirati non diagnostici (TIR 1) del 22,6%, supportando l'ipotesi che una mappa elastosonografica della formazione nodulare possa guidare efficacemente il prelievo citologico sulla zona ottimale da campionare, riducendo i costi, le complicanze e soprattutto il discomfort per il paziente derivante dalla reiterazione dell' esame.

Sebbene tali risultati siano supportati da una ridotta numerosità campionaria, aprono nuove prospettive nella ricerca e nello sviluppo di metodiche innovative, capaci di incrementare l'accuratezza diagnostica dell'agoaspirato tiroideo.

Studi futuri dovranno sicuramente comprendere campioni più ampi e l'applicazione di tecniche elastografiche caratterizzate da maggiore riproducibilità e capacità di fornire misurazioni quantitative.

## BIBLIOGRAFIA

1. Danese D, Sciacchitano S, Farsetti A, Andreoli M, Pontecorvi A. Diagnostic accuracy of conventional versus sonography guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Thyroid*. 1998;8:15–21.
2. Moon WJ, Baek JH, Jung SL, Korean Society of Thyroid Radiology (KSThR), Korean Radiological Society, et al. Ultrasonography and ultrasound-based management of thyroid nodules: consensus Statement and Recommendations. *Korean J Radiol*. 2011;12:1–14.
3. Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol*. 2009 Nov;132(5):658-65. doi: 10.1309/AJCPPHLWMI3JV4LA. Review.
4. Nardi F, Basolo F, Crescenzi A, Fadda G, Frasoldati A, Orlandi F, Palombini L, Papini E, Zini M, Pontecorvi A, Vitti P. Italian consensus for the classification and reporting of thyroid cytology. *J Endocrinol Invest*. 2014 Jun;37(6):593-9.
5. Porterfield JR, Grant CS, Dean DS, et al. Reliability of benign fine-needle aspiration cytology of large thyroid nodules. *Surgery* 2008;144(6):963-969.
6. Carrillo JF, Frias-Mendivil M, Ochoa-Carrillo FJ, Ibarra M. Accuracy of fine-needle aspiration biopsy of the thyroid combined with an evaluation of clinical and radiologic factors. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122(6):917-921.
7. Tee Y, Lowe A, Brand C, Judson R. “ Fine-needle aspiration may miss a third of all malignancy in palpable thyroid nodules: a comprehensive literature review”. *Am Surg* 2007; 246:714-20.
8. Cap J, Ryska A, rehorkova P, et al. Sensitivity and specificity of the fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view. *Clin Endocrinol* 1999;51:509-515.
9. Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic Imaging* 1991;13:111–34.
10. Bamber J, Cosgrove D, Dietrich CF, Fromageau J, Bojunga J, Calliada F, Cantisani V, Correas JM, D'Onofrio M, Drakonaki EE, Fink M, Friedrich-Rust M, Gilja OH, Havre RF, Jenssen C, Klauser AS, Ohlinger R, Saftoiu A, Schaefer F, Sporea I, Piscaglia F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use

- of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. *Ultraschall Med.* 2013 Apr;34(2):169-84. doi: 10.1055/s-0033-1335205. Epub 2013 Apr 4
11. Gilja OH, Heimdal A, Hausken T et al. Strain during gastric contractions can be measured using Doppler ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 1457–1465.
  12. Ahmed AB, Matre K, Hausken T et al. Rome III subgroups of functional dyspepsia exhibit different characteristics of antral contractions measured by strain rate imaging – a pilot study. *Ultraschall in Med* 2012; 33: E233–E240.
  13. Shiina T, Nitta N, Ueno E et al. Real time tissue elasticity imaging using the combined autocorrelation method. *Journal of Medical Ultrasonics* 2002 29:119-28.
  14. T. Rago, F. Santini, M. Scutari, A. Pinchera, and P. Vitti, “Elastography: new developments in ultrasound for predicting malignancy in thyroid nodules,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 92, no. 8, pp. 2917–2922, 2007.
  15. C. Asteria, A. Giovanardi, A. Pizzocaro et al., “US-elastography in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules,” *Thyroid*, vol. 18, no. 5, pp. 523–531, 2008.
  16. Ueno E., Itoh A. et al. Diagnosis of breast cancer by elasticity imaging. *Eizo Joho Medical* 2004.
  17. Rubaltelli L, Corradin S, Dorigo A, Stabilito M, Tregnaghi A, Borsato S, Stramare R. Differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules at elastosonography. *Ultraschall Med.* 2009 Apr;30(2):175-9.
  18. S. A. Razavi, T. A. Hadduck, G. Sadigh, and B. A. Dwamena, “Comparative effectiveness of elastographic and b-mode ultrasound criteria for diagnostic discrimination of thyroid nodules: a meta-analysis,” *American Journal of Roentgenology*, vol. 200, no. 6, pp. 1317–1326, 2013.
  19. H. J. Moon, J. M. Sung, E.-K. Kim, J. H. Yoon, J. H. Youk, and J. Y. Kwak, “Diagnostic performance of gray-scale US and elastography in solid thyroid nodules,” *Radiology*, vol. 262, no. 3, pp. 1002–1013, 2012.
  20. J. Ding, H. D. Cheng, J. Huang, Y. Zhang, and J. Liu, “An improved quantitative measurement for thyroid cancer detection based on elastography,” *European Journal of Radiology*, vol. 81, no. 4, pp. 800–805, 2012.
  21. Cantisani V, D'Andrea V, Biancari F et al. Prospective evaluation of multiparametric ultrasound and quantitative elastosonography in the differential

diagnosis of benign and malignant thyroid nodules: Preliminary Experience. *Eur J Radiol* 2012; 81: 2678–2683.

22. V. Cantisani, H. Grazhdani, P. Ricci et al., “Q-elastosonography of solid thyroid nodules: assessment of diagnostic efficacy and interobserver variability in a large patient cohort,” *European Radiology*, vol. 24, no. 1, pp. 143–150, 2014.

23. S. A. Razavi, T. A. Hadduck, G. Sadigh, and B. A. Dwamena, “Comparative effectiveness of elastographic and b-mode ultrasound criteria for diagnostic discrimination of thyroid nodules: a meta-analysis,” *American Journal of Roentgenology*, vol. 200, no. 6, pp. 1317–1326, 2013.

24. Y. Chong, J. H. Shin, E. S. Ko, and B.-K.Han, “Ultrasonographic elastography of thyroid nodules: is adding strain ratio to colour mapping better?” *Clinical Radiology*, vol. 68, no. 12, pp. 1241–1246, 2013.

25. Bae U, Dighe M, Dubinsky T, Minoshima S, Shamdasani V, Kim Y. Ultrasound thyroid elastography using carotid artery pulsation: preliminary study. *J Ultrasound Med.* 2007 Jun;26(6):797-805.

26. M. Dighe, U. Bae, M. L. Richardson, T. J. Dubinsky, S. Minoshima, and Y. Kim, “Differential diagnosis of thyroid nodules with US elastography using carotid artery pulsation,” *Radiology*, vol. 248, no. 2, pp. 662–669, 2008.

27. M. Dighe, J. Kim, S. Luo, and Y. Kim, “Utility of the ultrasound elastographic systolic thyroid stiffness index in reducing fineneedle aspirations,” *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 29, no. 4, pp. 565–574, 2010.

28. S. Luo, E.-H. Kim, M. Dighe, and Y. Kim, “Screening of thyroid nodules by ultrasound elastography using diastolic strain variation,” in *Proceedings of the IEEE Annual International Conference of Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '09)*, pp. 4420–4423, IEEE, Minneapolis, Minn, USA, September 2009.

29. Cantisani V, Lodise P, Di Rocco G, Grazhdani H, Giannotti D, Patrizi G, Medvedyeva E, Olive M, Fioravanti C, Giacomelli L, Chiesa C, Redler A, Catalano C, D'Ambrosio F, Ricci P. Diagnostic accuracy and interobserver agreement of Quasistatic Ultrasound Elastography in the diagnosis of thyroid nodules. *Ultraschall Med.* 2015 Apr;36(2):162-7. doi: 10.1055/s-0034-1366467. Epub 2014 Jun 23.

30. Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, Bojunga J, Correias JM, Gilja OH, Klauser AS, Sporea I, Calliada F, Cantisani V, D'Onofrio M, Drakonaki EE, Fink M, Friedrich-Rust M, Fromageau J, Havre RF, Jenssen C, Ohlinger R, Săftoiu A, Schaefer F, Dietrich CF; EFSUMB. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 2: Clinical applications. *Ultraschall Med.* 2013 Jun;34(3):238-53. doi: 10.1055/s-0033-1335375. Epub 2013 Apr 19.



31. Nightingale K, Soo MS, Nightingale R et al. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 227–235.
32. Nightingale K, Palmeri M, Trahey G. Analysis of contrast in images generated with transient acoustic radiation force. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32: 61–72.
33. Zhan J, Jin JM, Diao XH, Chen Y. Acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) for differentiation of benign and malignant thyroid nodules-A meta-analysis. *European journal of radiology*. 2015; 84: 2181-6.
34. Dong FJ, Li M, Jiao Y, Xu JF, Xiong Y, Zhang L, et al. Acoustic Radiation Force Impulse imaging for detecting thyroid nodules: a systematic review and pooled meta-analysis. *Medical ultrasonography*. 2015; 17: 192-9.
35. Bojunga J, Dauth N, Berner C et al. Acoustic radiation force impulse imaging for differentiation of thyroid nodules. *PLoS One* 2012; 7: e42735
36. Friedrich-Rust M, Romenski O, Meyer G et al. Acoustic Radiation Force Impulse-Imaging for the evaluation of the thyroid gland: a limited patient feasibility study. *Ultrasonics* 2012; 52: 69–74.
37. Lin P, Chen M, Liu B, Wang S, Li X. Diagnostic performance of shear wave elastography in the identification of malignant thyroid nodules: a meta-analysis. *Eur Radiol*. 2014 Nov;24(11):2729-38. doi: 10.1007/s00330-014-3320-9. Epub 2014 Aug 12. Review.
38. Nattabi HA, Sharif NM, Yahya N, Ahmad R, Mohamad M, Zaki FM, Yusoff AN. Is Diagnostic Performance of Quantitative 2D-Shear Wave Elastography Optimal for Clinical Classification of Benign and Malignant Thyroid Nodules?: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acad Radiol*. 2017 Oct 17. pii: S1076-6332(17)30369-0. doi: 10.1016/j.acra.2017.09.002.
39. Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol*. 1987;31:587-90.
40. Atkinson BF. Fine needle aspiration of the thyroid. *Monogr Pathol*. 1993;35:166-99.
41. Solomon D. Fine needle aspiration of the thyroid: an update. *Thyroid today*. 1993;16:1-9.
42. Oertel YC. Fine-needle aspiration and the diagnosis of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996;25:69-91.

43. Rossi ED, Zannoni GF, Monceli S, et al. Application of Liquid-Based Cytology to Fine-Needle Aspiration Biopsies of the Thyroid Gland. *Frontiers in Endocrinology*. 2012;3:57. doi:10.3389/fendo.2012.00057.
44. Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(4):599-606.
45. Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, Paschke R, Valcavi R, Vitti P; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi. Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 Update. *Endocr Pract*. 2016 May;22(5):622-39. doi: 10.4158/EP161208.GL.
46. Baloch ZW, Cibas ES, Clark DP, et al. The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of the science conference: a summation. *Cytojournal*. 2008; 5:6.
47. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012; 367:705–715.
48. British Thyroid Association, Royal College of Pathologists: Guidelines for reporting of thyroid cytology specimens. 2009.  
<http://www.rcpath.org/resources/pdf/g089guidanceonthereportingofthyroidcytologyfinal.pdf>.
49. Castro MR, Gharib H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. *Endocr Pract*. 2003;9:128–36.
50. Oertel YC, Miyahara-Felipe L, Mendoza MG, Yu K. Value of repeated fine needle aspirations of the thyroid: an analysis of over ten thousand FNAs. *Thyroid*. 2007;17:1061–6.
51. Degirmenci B, Haktanir A, Albayrak R, et al. Sonographically guided fine-needle biopsy of thyroid nodules: the effects of nodule characteristics, sampling technique, and needle size on the adequacy of cytological material. *Clin Radiol*. 2007;62:798–803.
52. Baloch ZW, Tam D, Langer J, Mandel S, LiVolsi VA, Gupta PK. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: role of on-site assessment and multiple cytologic preparations. *Diagn Cytopathol*. 2000;23:425–9.

53. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1941–6.
54. O'Malley ME, Weir MM, Hahn PF, Misraji J, Wood BJ, Mueller PR. US-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: adequacy of cytologic material and procedure time with and without immediate cytologic analysis. *Radiology.* 2002;222:383–7.
55. Papanicolaou Society of Cytopathology Task Force on Standards of Practice. Guidelines of the Papanicolaou Society of Cytopathology for fine-needle aspiration procedure and reporting. *Diagn Cytopathol.* 1997;17:239–47.
56. Rausch P, Nowels K, Jeffrey RB Jr. Ultrasonographically guided thyroid biopsy: a review with emphasis on technique. *J Ultrasound Med.* 2001;20:79–85.
25. Gao L, Parker KJ, Lerner RM, Levinson SF. Imaging of the elastic properties of tissue: a review. *Ultrasound Med Biol.* 1996;22:959–77.
57. Yildirim D, Gurses B, Gurpinar B, Ekci B, Colakoglu B, Sahin M, Kaur A, The value of ultrasound elastography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules in reducing nondiagnostic results. *J Med Ultrasonics* (2013) 40:169–174.

