



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESI DOCTORAL:

**FACTORS DETERMINANTS DE L'APLICABILITAT I LA
FIABILITAT DIAGNÒSTICA DELS MÈTODES NO
INVASIUS EN L'AVALUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA**



Universitat Autònoma de Barcelona

MARC PUIGVEHÍ BADOSA

BARCELONA, 2017

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina



Universitat Autònoma de Barcelona

"FACTORS DETERMINANTS DE L'APLICABILITAT I LA FIABILITAT DIAGNÒSTICA DELS
MÈTODES NO INVASIUS EN L'AVUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA"

Tesi presentada per

MARC PUIGVEHÍ BADOSA

per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la direcció del Dr. José A. Carrión Rodríguez i del Dr.
Ricard Solà Lamoglia del Servei de Digestiu de l'Hospital del Mar

Tesi adscrita al Programa de Doctorat en Medicina de la Facultat de Medicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Marc Puigvehí Badosa Dr. José A. Carrión Rodríguez

Dr. Ricard Solà Lamoglia

Doctorand

Director de la tesi

Director de la tesi

Barcelona, maig de 2017



Universitat Autònoma de Barcelona

El Dr. JOSÉ A. CARRIÓN RODRÍGUEZ, Cap de Secció d'Hepatologia del Servei de Digestiu de l'Hospital del Mar de Barcelona, i el Dr. RICARD SOLÀ LAMOGLIA, Professor Titular de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cap de Secció del Servei de Digestiu de l'Hospital del Mar de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que la Tesi Doctoral titulada "FACTORS DETERMINANTS DE L'APLICABILITAT I LA FIABILITAT DIAGNÒSTICA DELS MÈTODES NO INVASIUS EN L'AVUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA", presentada per MARC PUIGVEHÍ BADOSA, per accedir al títol de Doctor en Medicina, s'ha realitzat sota la seva direcció, considerant que reuneix els requisits formals i científics adequats per la seva preceptiva lectura i defensa públiques.

I per tal que consti, als efectes oportuns, signen la present certificació a Barcelona, el dia 10 de Maig de 2017

Dr. José A. Carrión Rodríguez

Dr. Ricard Solà Lamoglia

Als meus pares

A la Joana

Aquesta tesi és el fruit de moltes, incomptables hores de feina, però també i sobretot de la meva relació amb les persones que d'una o altra manera han fet possible que tirés endavant.

Al José Carrión, per la seva supervisió constant, pel seu enorme rigor, i per haver cregut en mi des del principi. Gràcies per ensenyar-me a estimar la ciència i a veure que la nostra feina no és res si no ens ho plantegem tot.

Al Ricard Solà, per haver-me ajudat en un període molt difícil, el final de la residència, i per haver plantat la llavor del que avui tenim, la secció d'Hepatologia. Sense la feina d'aquests 30 anys aquesta tesi no seria el que és. La continuarem regant.

Als meus companys i companyes del servei de Digestiu, adjunts, residents, infermeria, auxiliars i personal administratiu, i molt especialment a tot l'equip de la secció d'Hepatologia, per dedicar-me el vostre temps i coneixements sempre que ho he necessitat. Al Xavi Bessa, per ser un referent des que vaig entrar a l'Hospital del Mar l'any 2008, i haver-me demostrat que una altra manera de fer les coses no és només possible, sinó necessària. A la Susanna Coll, per aportar sempre aquest altre punt de vista i ser la millor consellera. A la Tere Broquetas, per estar al meu costat, literalment, i per ajudar-me a superar els moments on tot queia. A la Dolo Giménez, per tenir energia per fer aquesta i deu tesis més si fos necessari, gràcies pel bon humor i la feina dura. A la Rosa Fernández, per la feina minuciosa del dia a dia, que ha permès bona part d'aquest treball.

A tota la gent que, moltes vegades sense saber-ho, ha estat important per fer que no perdés el meu camí. Gràcies també als que mai podreu llegir això i avui em faríeu sentir encara més orgullós.

A tots els meus amics, pels molts moments de catarsi necessària. A en Sergi, per haver estat al meu costat des de ja ni recordo quan. Al Miguel, pels moments de simbiosi durant tots aquests anys, fins i tot per presentar la tesi. A l'Alejandro, per aportar-me tranquil·litat i ser allà quan les coses van ser difícils. Al Tarek, perquè mai hagués pensat tenir un amic com ell. A l'Ignasi, per ensenyar-me a viure fora dels convencionalismes. Al Dani, perquè una altra manera de pensar és molt necessària. Als meus amics de la universitat, i de forma molt especial al Jaume, per fer-me viure l'amistat perenne. Al Lluís i la Laia, per fer-me veure que la ment, la reflexió i l'autoconeixement no tenen límits.

Als meus pares i a la meva germana, simplement per ser allà, per ensenyar-me el valor de les coses, la cultura de l'esforç i sobretot per estimar-me amb tots els meus defectes.

I per últim (*last but not least*), a la Joana, per ser sempre la meitat de tot, per l'orgull i l'admiració mutus, la meva mà esquerra. Cap paraula és suficient. Aquesta tesi, com tot el que tinc, també és teva.

ÍNDEX

1. RELACIÓ D'ARTICLES PUBLICATS	1
2. ABREVIATURES	5
3. INTRODUCCIÓ	9
3.1. Fibrosi hepàtica	11
3.2. Biòpsia hepàtica	14
3.2.1. Característiques generals	14
3.2.2. Estandardització de la biòpsia hepàtica	15
3.3. Mètodes no invasius d'avaluació de la fibrosi hepàtica	18
3.4. Mètodes serològics o biològics	19
3.4.1. Característiques generals	19
3.4.2. Criteris de qualitat	21
3.4.3. Aplicabilitat i limitacions	21
3.4.4. Fiabilitat diagnòstica	22
3.4.5. Fiabilitat pronòstica	23
3.5. Mètodes radiològics	25
3.5.1. Radiologia clàssica	25
3.5.2. Elastografia i mètodes elastogràfics	26
3.5.3. Elastografia de transició	30
3.5.3.1. Característiques generals	30
3.5.3.2. Mesura i criteris de qualitat	31
3.5.3.3. Aplicabilitat i limitacions	33
3.5.3.4. Fiabilitat diagnòstica	35
3.5.3.5. Fiabilitat pronòstica	36
4. HIPÒTESI	39
5. OBJECTIUS	43

6. MATERIAL I MÈTODES	47
6.1. Primer estudi	49
6.1.1 Disseny de l'estudi	49
6.1.2. Sèrums i biòpsies hepàtiques	49
6.1.3 Anàlisi bioquímica de les mostres congelades	50
6.2. Segon estudi	51
6.2.1. Disseny de l'estudi	51
6.2.2. Determinació de la rigidesa hepàtica (comú per estudi 2 i 3)	52
6.2.3. Biòpsies hepàtiques (comú per estudi 2 i 3)	52
6.2.4. Variables clíniques i pell-càpsula (comú per estudi 2 i 3)	52
6.3. Tercer estudi	53
6.3.1. Disseny de l'estudi	53
7. ARTICLES ORIGINALS	55
7.1. Article 1: <i>"Diagnostic Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF®) Score Using HCV-Infected Serum Samples Cryopreserved for up to 25 Years"</i>	57
7.2. Article 2: <i>"Applicability and accuracy improvement of transient elastography using the M and XL probes by experienced operators"</i>	69
7.3. Article 3: <i>"Impact of Anthropometric Features on the Applicability and Accuracy of FibroScan® (M and XL) in Overweight/Obese Patients"</i>	79
8. DISCUSSIÓ GENERAL	103
9. CONCLUSIONS	111
10. BIBLIOGRAFIA	115

1. RELACIÓ D'ARTICLES PUBLICATS

1. RELACIÓ D'ARTICLES PUBLICATS

ARTICLE 1: Diagnostic Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF®) Score Using HCV-Infected Serum Samples Cryopreserved for up to 25 Years

Autors: Puigvehí M, Hernández J, Broquetas T, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, Giménez MD, Garcia M, Bory F, Salvadó M, Solà R, Carrión JA

PLoS One. 2016 Dec 16;11(12): e0164883. doi: 10.1371 /journal.pone.0164883

Factor d'impacte: 3.057

ARTICLE 2: Applicability and accuracy improvement of transient elastography using the M and XL probes by experienced operators

Autors: Carrión JA, Puigvehí M, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, Fernández R, Márquez C, Giménez MD, Garcia M, Bory F, Solà R.

J Viral Hepat. 2015 Mar;22(3):297-306. doi: 10.1111/jvh.12296

Factor d'impacte: 4.179

ARTICLE 3: Impact of Anthropometric Features on the Applicability and Accuracy of FibroScan® (M and XL) in Overweight/Obese Patients

Autors: Puigvehí M, Broquetas T, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, Fernández R, Gimeno J, Sanchez J, Bory F, Pedro-Botet J, Solà R, Carrión JA.

J Gastroenterol Hepatol. 2017 Feb 15. doi: 10.1111/jgh.13762

Factor d'impacte: 3.322

Factor d'impacte total: 10.558

2. ABREVIATURES

2. ABREVIATURES

MCF: Malalties Cròniques del Fetge

HC: Hepatitis Crònica

VHC: Virus de l'Hepatitis C

VHB: Virus de l'Hepatitis B

FGNA: Fetge Gras No Alcohòlic

MEC: Matriu Extracel·lular

GPVH: Gradient de Pressió Venosa Hepàtica

RH: Rigidesa Hepàtica

VIH: Virus de la Immunodeficiència Humana

GGT: Gamma Glutamil Transpeptidasa

VPP: Valor Predictiu Positiu

VPN: Valor Predictiu Negatiu

AST: Aspartat Aminotransferasa

INR: *International Normalized Ratio*

ELF®: *Enhanced Liver Fibrosis*

AH: Àcid Hialurònic

PIIINP: Propèptid amino-terminal del Procol·lagen tipus III

TIMP-1: Inhibidor Tissular de Metal·lo Proteïnases tipus 1

AUROC: Àrea sota la corba

ALT: Alanina Aminotransferasa

IMC: Índex de Massa Corporal

TAC: Tomografia Axial Computeritzada

ET: Elastografia de Transició

kPa: kiloPascals

ARFI: *Acute Radiation Force Impulse*

m/s: metres/segon

R: Rati

RIQ: Rang Interquartil

HTPCS: Hipertensió Portal Clínicament Significativa

DPC: Distància Pell-Càpsula

CAP: *Controlled Attenuation Parameter*

dB/m: decibels/metre

HBeAg: Antigen e del VHB

3. INTRODUCCIÓ

3. INTRODUCCIÓ

3.1. FIBROSI HEPÀTICA

La fibrosi hepàtica és un procés comú a totes les malalties cròniques del fetge (MCF), com a resposta al dany mantingut provocat per l'agent etiològic responsable. Les MCF més freqüents tenen una alta prevalença al nostre medi. L'hepatitis crònica (HC) pel virus de l'hepatitis C (VHC) i pel virus de l'hepatitis B (VHB) afecten el 0.13-3.26% i el 0.3-0.5% de la població europea, respectivament, mentre que més d'un 20% de les persones majors de 15 anys reconeixen un consum perjudicial d'alcohol (≥ 50 grams) almenys un cop per setmana. D'altra banda, la prevalença de fetge gras no alcohòlic (FGNA), relacionat amb la síndrome metabòlica, a la vegada lligada a l'obesitat i a la diabetis mellitus, s'estima que pot sobrepassar el 40% de la població. Actualment, la cirrosi hepàtica és causa d'almenys 170,000 morts a l'any a Europa ¹ (**Figura 1**).

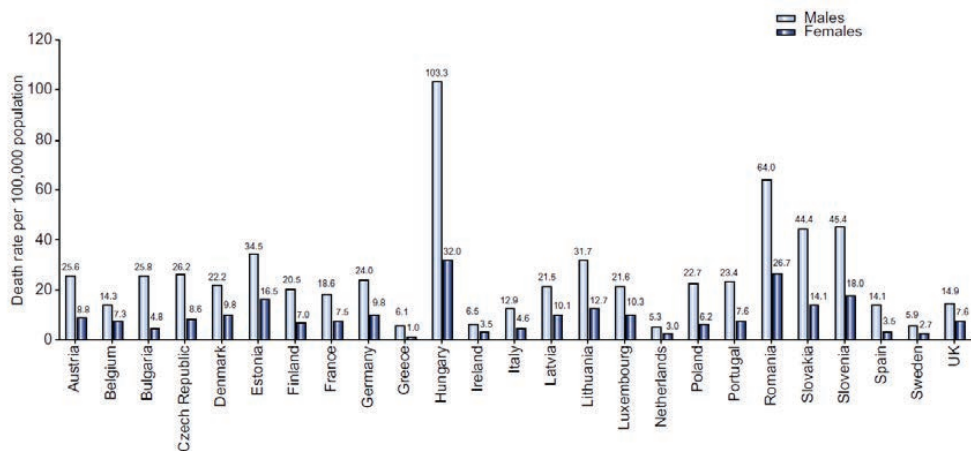


Figura 1. Mortalitat secundària a cirrosi hepàtica a Europa (morts per 100,000 habitants) ¹

El fetge és un òrgan amb capacitat regenerativa, i després d'un dany agut pot restaurar la seva massa i arquitectura inicial en pocs mesos. D'altra banda, si aquest dany es manté amb inflamació al llarg del temps, s'altera la capacitat de regeneració i s'inicia un procés de fibrogènesi basat en l'acumulació de proteïnes i l'expansió de la matriu extracel·lular (MEC), que de forma progressiva substitueix el parènquima hepàtic normal per teixit cicatricial. La principal cèl·lula implicada en aquest procés és la cèl·lula estrellada, un tipus de cèl·lula quiescent similar a un miòcit, que en resposta a

l'agressió s'activa i és capaç de transformar-se fenotípicament en miofibroblast ². La principal proteïna de la MEC és el col·lagen. Amb l'activació de la cèl·lula estrellada es modifica la composició de la MEC, des d'una forma inicial amb col·lagen tipus IV, proteoglicans i laminina, a una altra amb col·làgens formadors de fibra, particularment de tipus I i de tipus III ³. La transició de la cèl·lula estrellada a miofibroblast està condicionada per diversos tipus cel·lulars (sobretot macròfags hepàtics, i en menor mesura, cèl·lules de l'endoteli i limfòcits) però el punt crític és la destrucció crònica d'hepatòcits via apoptosi o necrosi. La lesió hepatocitària implica l'alliberació de contingut cel·lular i radicals lliures d'oxigen, que porten a l'activació dels macròfags (cèl·lules de Kupffer), que a la vegada condueixen a l'alliberació de factors pro-inflamatoris com TNF- α , IL-1 β i IL-6, i factors pro-fibrogènics, especialment TGF- β (**Figura 2**). El pas final és l'augment de producció i dipòsit de proteïnes de la MEC, que modificaran l'arquitectura hepàtica i la seva funció orgànica. Les cèl·lules de Kupffer juguen un paper fonamental, ja que en cas de resoldre's la situació que provocava aquesta cadena de reaccions (per exemple, la curació del VHC) canvien el seu fenotip inflamatori per un altre de "resolució", que perd l'habilitat per estimular els miofibroblasts. Com a conseqüència, els miofibroblasts poden regressar a cèl·lules estrellades novament, o morir via apoptosi, amb el que s'atura la producció excessiva de MEC ².

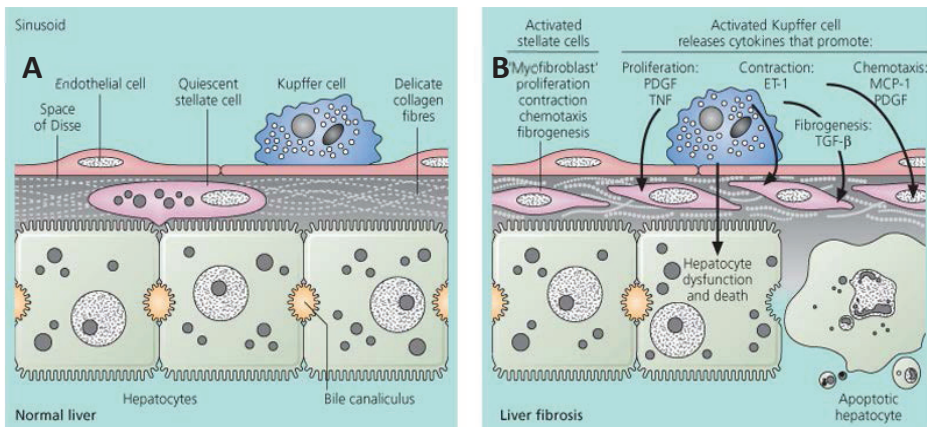


Figura 2. Procés de fibrosi hepàtica: (A) Estat quiescent. (B) Activació de la cèl·lula estrellada ³

El procés de fibrosi és progressiu i generalment es produeix al llarg de dècades, tot i que algunes situacions, com la coexistència de diverses etiologies, el sexe masculí, el consum d'alcohol, l'esteatosi o la immunosupressió poden accelerar-ne l'evolució ⁴⁻⁶. L'acumulació progressiva de la MEC condiciona una alteració progressiva de l'estructura hepàtica amb la formació de ponts entre espais porta i l'aparició de nòduls de regeneració. Aquest estadi avançat rep el nom de cirrosi i és responsable de l'augment de la pressió al sistema venós portal. Els pacients que desenvolupen cirrosi i hipertensió portal poden presentar descompensació clínica (ascites, encefalopatia o hemorràgia per varices) o carcinoma hepatocel·lular. Per tant, l'estadi de fibrosi hepàtica i la pressió al territori portal són les variables amb millor capacitat pronòstica en l'avaluació de les MCF ^{7,8}.

Tot i que nous tractaments dirigits a la regressió de la fibrosi estan en desenvolupament, a dia d'avui el tractament es basa en actuar sobre el factor causal. El control de la noxa i l'absència de necrosi cel·lular permetran un predomini dels sistemes de fibrinòlisi i remodelació de la MEC, amb l'objectiu de degradar l'excés de proteïnes de la MEC i la restitució de la massa hepatocitària, millorant l'estructura hepàtica, la pressió al territori portal i la funció hepatocel·lular. Per tant, malgrat la cronicitat de les MCF, l'acumulació de la MEC no és un procés constant ni previsible, ja que la relació entre els mecanismes de fibrogènesi i de fibrinòlisi condueixen a un procés molt dinàmic que pot accelerar-se segons els factors associats però també es pot frenar o fins i tot revertir si es controlen els factors etiològics ⁹.

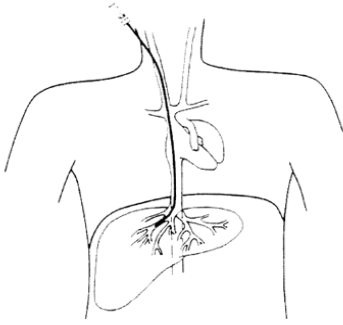
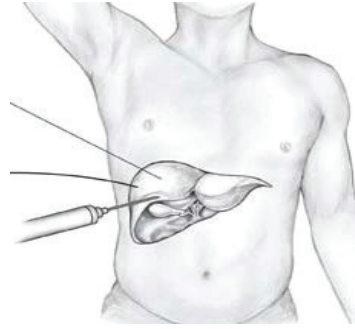
Per tant, l'avaluació i el seguiment de la fibrosi hepàtica són cabdals pel diagnòstic i el tractament dels pacients amb MCF.

3.2. BIÒPSIA HEPÀTICA

3.2.1. Característiques generals

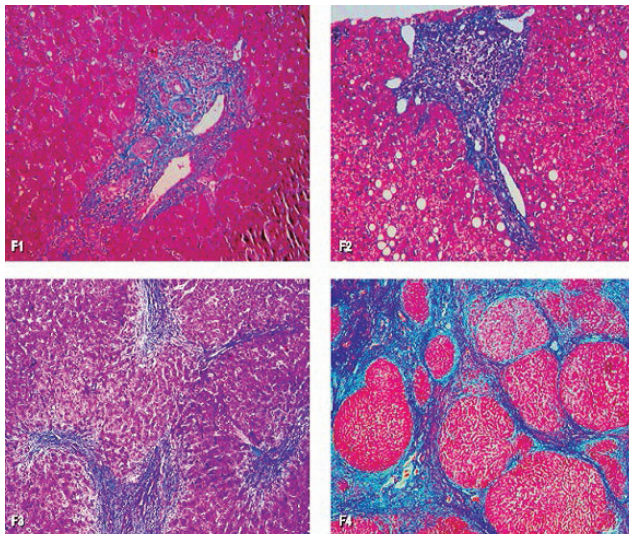
La forma clàssica d'avaluar la fibrosi hepàtica ha estat mitjançant la realització de biòpsies del fetge. L'estandardització de la tècnica de biòpsia per via percutània va facilitar la seva realització com a mètode de referència per avaluar l'estadi de fibrosi durant la segona meitat del segle XX i els inicis del XXI ¹⁰. La biòpsia no només permet una avaluació semi quantitativa de la fibrosi, sinó també el diagnòstic histològic de les MCF ¹¹, però té limitacions importants. D'una banda proporciona només informació sobre una petita part del parènquima hepàtic (1/50,000); per tant, en els casos on existeixi una distribució heterogènia de la fibrosi, pot no ser representativa ¹². La qualitat de la mostra (mida de la biòpsia, número d'espais porta i grau de fragmentació) també és important. Es considera adequada una mostra no fragmentada d'almenys 15 mm, essent ideal si aquesta arriba a 25 mm, sobretot per a l'estadiatge de la fibrosi ¹³, i que contingui almenys 11 espais porta ¹⁴. Una altra limitació és que requereix de personal format per a realitzar la seva avaluació, i per tant pot existir variabilitat en la seva interpretació malgrat s'utilitzin classificacions estandarditzades ¹⁵. A més, la biòpsia hepàtica és una tècnica cruenta, que implica un risc de complicacions poc freqüents però potencialment greus, com l'hemorràgia ¹⁶, i que requereix, a més, d'estada hospitalària.

La forma més habitual d'obtenir la biòpsia hepàtica és per via percutània, guiada per ecografia, utilitzant una agulla Tru-cut d'almenys 16 Gauge ¹⁷. Una alternativa és la biòpsia hepàtica per via transjugular, que utilitza un agulla més fina de 18 Gauge a través de la vena jugular, amb resultats similars a la biòpsia percutània pel que fa a mida de la mostra i fragmentació, però que implica un nombre menor de complicacions, sobretot d'hemorràgia, i per aquest motiu es pot utilitzar de forma segura en pacients amb alteracions greus de la coagulació o ascites ¹⁸. A més, l'abordatge transjugular permet la mesura concomitant del gradient de pressió venosa hepàtica (GPVH), que és directament proporcional a la pressió del sistema venós portal (**Figura 3**), però aquesta tècnica requereix de personal i material específics no presents en molts hospitals.

BIÒPSIA TRANSJUGULAR**BIÒPSIA PERCUTÀNIA****Figura 3.** Biòpsia hepàtica. Abordatge transjugular i abordatge percutani

3.2.2. Estandardització de la biòpsia hepàtica

La preparació de la mostra histològica amb tincions especials com el tricòmic o el vermell Sirius permet avaluar la fibrosi en estadis de forma semi quantitativa ¹⁹. Existeixen diferents classificacions segons l'etiologia. Les més utilitzades en pacients amb hepatitis víriques són les de Metavir ²⁰ i Ishak ²¹. L'escala de Metavir, consta de 5 estadis de fibrosi: F0, absència de fibrosi; F1, fibrosi portal; F2, fibrosi periportal; F3, ponts de fibrosi entre espais porta i F4, cirrosi (**Figura 4**).

**Figura 4.** Estadis de fibrosi hepàtica segons la classificació de Metavir ²⁰

L'escala d'Ishak inclou 7 estadis i aporta més informació ja que utilitza 2 estadis de transició (un per fibrosi lleu-moderada i un altre en fibrosi avançada-cirrosi) (**Figura 5**). Es considera fibrosi significativa, amb necessitat de realitzar tractaments dirigits, aquells estadis amb fibrosi moderada o avançada (Metavir F2-4 o Ishak F3-6) i cirrosi com a Metavir F4 o Ishak F5-6. Les classificacions histològiques més utilitzades per les hepatitis víriques, pel consum d'alcohol ²² i pel FGNA ²³ són molt similars pel que es refereix a la valoració de l'estadi de fibrosi.

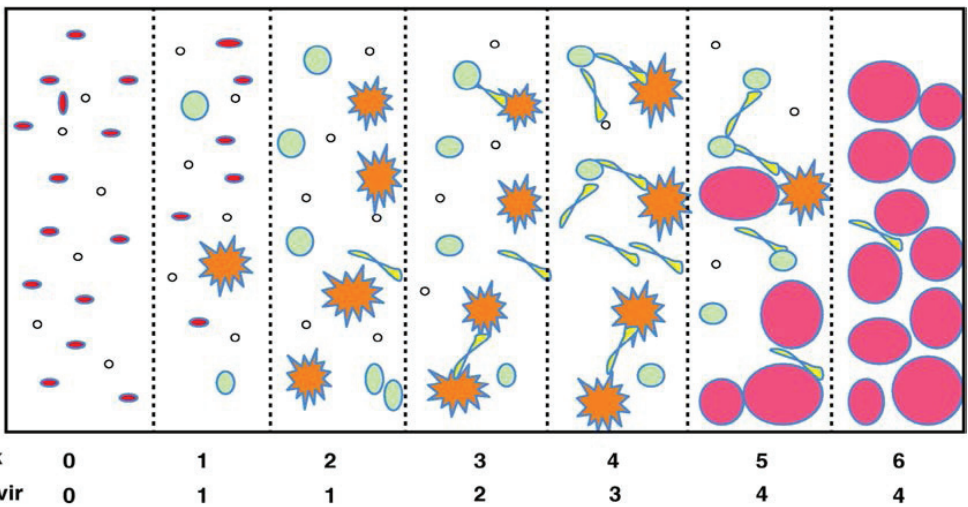


Figura 5. Comparació dels estadis de fibrosi a les classificacions d'Ishak ²¹ i Metavir ²⁰

La biòpsia requereix ser repetida al llarg del seguiment dels pacients si volem detectar canvis durant la història natural de la malaltia o la resposta als tractaments específics, i per tant no permet un seguiment longitudinal dels pacients de manera rutinària ²⁴. Tanmateix, el seu valor pronòstic es veu limitat al desenvolupament de la cirrosi, sense informar del grau d'hipertensió portal ni del risc de descompensació clínica ¹⁷. Un cop el pacient ha desenvolupat cirrosi hepàtica i presenta signes d'hipertensió portal, el GPVH ofereix més informació que la biòpsia, ja que es correlaciona amb el desenvolupament de varices esofàgiques, el risc de sagnat d'aquestes, la descompensació clínica i el pronòstic del pacient ²⁵, però a l'igual que la biòpsia és un mètode invasiu limitat a alguns centres especialitzats (**Figura 6**).

Histologia	Metavir F4 (Cirrosi)			
	Metavir F1-F3	6-10	11-12	>12
GPVH (mmHg)	≤5	6-10	11-12	>12
Clínica	No cirrosi	Compensada	Compensada	Descompensada
Síntomes	No	No	Varices esofàgiques	Ascites, encefalopatia
Biologia	Fibrogènesi	Cicatriu establerta	Cicatriu gruixuda i nòduls	Fibra insoluble

Figura 6. Avaluació de la cirrosi hepàtica. Avantatges del GPVH. Adaptada de Friedman i cols. ³

Per tant, la biòpsia hepàtica, malgrat ser el mètode de referència en l'avaluació de la fibrosi hepàtica ("gold standard"), ha deixat d'utilitzar-se de manera rutinària en algunes malalties com les hepatitis víriques ²⁶.

3.3. MÈTODES NO INVASIUS D'AVALUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA

Aquestes limitacions de la biòpsia hepàtica han determinat durant els últims 20 anys el desenvolupament de diversos mètodes no invasius d'avaluació de la fibrosi ²⁷. Aquests mètodes es poden classificar en "biològics", basats en la determinació de marcadors serològics, o "físics", basats en l'avaluació radiològica i elastogràfica del fetge. Aquests dos mètodes d'avaluació són molt diferents però cal considerar-los complementaris. D'una banda, els índexs serològics són paràmetres relacionats directa o indirectament amb la funció hepàtica i les conseqüències de la cirrosi i la hipertensió portal, i els marcadors biològics són marcadors directament relacionats amb el procés de fibrogènesi/fibrinòlisi de la MEC. D'altra banda, els mètodes radiològics clàssics es basen en detectar canvis en la morfologia del fetge o la melsa, i l'elastografia hepàtica es basa en quantificar una propietat física intrínseca dels teixits com és la rigidesa, ja sigui hepàtica (RH) o de la melsa ²⁸.

3.4. MÈTODES SEROLÒGICS O BIOLÒGICS

3.4.1. Característiques generals

Durant els últims anys s'han proposat un gran nombre d'índexs i marcadors serològics per a l'estadiatge de la fibrosi hepàtica, la gran majoria desenvolupats en pacients amb HC pel VHC ²⁹, però també en pacients amb coinfecció pel virus de la immunodeficiència humana (VHC-VIH), en la HC pel VHB i en el FGNA ³⁰⁻³². Aquests índexs són fórmules matemàtiques que utilitzen diferents variables analítiques que s'han relacionat amb la fibrosi hepàtica, utilitzant sempre la biòpsia com a patró de referència per a la seva validació ³³. Alguns d'ells es troben protegits per patents comercials ³³⁻³⁶, però la majoria utilitzen fórmules estandarditzades d'accés públic ³⁷⁻⁴². Es poden diferenciar en indirectes, quan utilitzen paràmetres analítics que s'obtenen de manera rutinària a la pràctica clínica habitual (transaminases, recompte de plaquetes, índex de protrombina, colesterol, entre d'altres), o directes, basats en les proteïnes implicades en la síntesi i degradació de la MEC (glicoproteïnes com àcid hialurònic, laminina i YKL-40; i col·làgens com procol·lagen III, col·lagen tipus IV, i col·lagenases i els seus inhibidors). A la **Taula 1** es mostren els índexs més utilitzats.

Índex	Etiologia	Components	Punts de tall per F2 i/o F4	AUROC
Imbert-Bismut	VHC	α 2-macroglobulina, haptoglobina, GGT, gammaglobulina, bilirubina i apolipoproteïna A1	n.d.	0.84
Forns	VHC	GGT, colesterol, plaquetes i edat	<4.2 >6.9	0.81
APRI	VHC	AST i plaquetes	\leq 0.5 >1.5	0.80
HALT-C	VHC	Plaquetes, rati AST/ALT i INR	<0.2 \geq 0.5	0.81
ELF®	VHC	AH, PIIINP i TIMP-1	<7.7 \geq 11.3	0.89
Fibrotest®	VHC	Haptoglobina, α 2-macroglobulina, GGT, bilirubina i apolipoproteïna A1	>0.48	0.87
Fibrometer®	VHC	Gènere, α 2 macroglobulina, TP, GGT, urea, edat, plaquetes, AST i ALT	n.d.	0.89
Hui	VHB	Plaquetes, bilirubina i albúmina	\leq 0.15 >0.5	0.79
FIB-4	VHC - VIH	Plaquetes, AST, ALT i edat	<1.45 >3.25	0.76
NFS	FGNA	IMC, diabetis mellitus, plaquetes, edat, albúmina i rati AST/ALT	<-1.455 >0.676	0.82

Taula 1. Índexs serològics més utilitzats en pràctica clínica. Adaptada de les guies de pràctica clínica de l'EASL²⁸

3.4.2. Criteris de qualitat

Un dels grans avantatges dels mètodes serològics és que es poden calcular de manera retrospectiva utilitzant mostres de sèrum congelades, procediment habitual en centres hospitalaris terciaris en l'àmbit de la recerca biomèdica. Així, alguns estudis que han avaluat la fiabilitat diagnòstica dels mètodes serològics s'han realitzat utilitzant mostres congelades ⁴³. És important remarcar, però, que l'estabilitat d'aquests marcadors de fibrosi després de períodes llargs de congelació no està ben establerta i cal confirmar-la de manera individual. D'una banda, els processos de degradació de les proteïnes podrien comportar pèrdua d'estabilitat durant el procés de congelació, i per tant observar nivells més baixos un cop analitzats després d'un emmagatzematge prolongat ⁴⁴. A més, la temperatura més òptima de congelació no està clara. Mentre que alguns estudis han demostrat una correcta estabilitat de diferents biomarcadors preservats a -75°C i -80°C ^{45,46}, altres estudis mostren una estabilitat molt variable a temperatures superiors ^{44,47}. A més, nombrosos estudis han demostrat que els cicles de congelació i descongelació de les mostres alteren la seva estabilitat ⁴⁸. Tanmateix, els escassos estudis que han avaluat l'estabilitat de mostres després de períodes llargs de congelació utilitzen majoritàriament tests d'estabilitat accelerada, com l'equació d'Arrhenius, una fórmula matemàtica que relaciona la cinètica d'una reacció química amb la velocitat a la que es produeix, per tal d'obtenir resultats en un període de temps més curt. Així, per calcular l'estabilitat d'una reacció, la variable temperatura cal que sigui constant, cosa que no sempre passa en els processos biològics ⁴⁹.

Per tant, l'avaluació de l'estabilitat d'aquests marcadors en mostres congelades és crucial en estudis que avaluen la progressió de la fibrosi després de períodes llargs d'emmagatzematge donat que la seva degradació podria induir a resultats erronis.

3.4.3. Aplicabilitat i limitacions

Aquests índexs són el mètode més senzill i aplicable per monitoritzar els pacients de forma ambulatoria, degut a la seva facilitat d'obtenció a través d'una mostra de sang i per tant a la seva elevada aplicabilitat, superior al 95% ⁵⁰. A més, la majoria d'índexs es basen en mètodes ben estandarditzats, amb elevada reproductibilitat entre laboratoris. La facilitat d'obtenció i l'estandardització del mètode permeten avaluar els

resultats durant el seguiment i comparar-los entre diferents centres ⁵¹. El problema principal dels índexs serològics, directes o indirectes, és que utilitzen marcadors no específics de les MCF, donat que fins i tot el procés de fibrogènesi/fibrinòlisi es pot donar en altres òrgans com el cor, el pàncrees o el ronyó. Així, es poden obtenir falsos positius en casos d'hepatitis aguda, malalties que cursen amb colèstasi, malalties inflamatòries cròniques, hematològiques, reumatològiques o processos fibròtics extrahepàtics ^{52,53}.

3.4.4. Fiabilitat diagnòstica

En referència a l'HC pel VHC, l'any 2001, Imbert-Bismut i cols. van descriure que una combinació de 6 marcadors directes i indirectes ($\alpha 2$ macroglobulina, haptoglobina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), gammaglobulina, bilirubina i apolipoproteïna A1) permetia identificar pacients amb fibrosi significativa (F2-4) de forma acurada (sensibilitat 0.70 i valor predictiu positiu (VPP) del 92%), i permetia estalviar gairebé la meitat de biòpsies per indicar l'inici del tractament ³³. Aquesta fórmula es va patentar amb el nom comercial de FibroTest®. Entre els índexs no patentats Forns i cols. ³⁷ van ser els primers en utilitzar una fórmula senzilla amb marcadors indirectes (GGT, colesterol, plaquetes i edat), amb un valor predictiu negatiu (VPN) del 96% per excloure fibrosi significativa en més d'una tercera part dels pacients. Altres índexs utilitzats són l'APRI ⁴², que es basa en el quocient entre aspartat aminotransferasa (AST) i plaquetes, que identifica fibrosi significativa amb un VPP del 88% i descarta cirrosi amb un VPN del 93%; i el HALT-C ⁴¹, que inclou la xifra de plaquetes, la rati AST/ALT i l'INR (*International Normalized Ratio*), i que prediu cirrosi amb un VPP del 86% i un VPN del 75%. Entre les fórmules patentades destaquen el FibroTest® i l'ELF® (Enhanced Liver Fibrosis) ⁵⁴, que inclou una combinació de marcadors de síntesi i degradació de la MEC (àcid hialurònic, AH; propèptid amino-terminal del procol·lagen tipus III, PIIINP; i inhibidor tissular de metal·lo proteïnases tipus 1, TIMP-1) i que té una fiabilitat molt bona per identificar fibrosi significativa, amb una àrea sota la corba (AUROC) de 0.85.

En el cas de la coinfecció VHC-VIH, l'índex FIB-4 ³⁰, que combina plaquetes, AST, alanina aminotransferasa (ALT) i edat ha demostrat una fiabilitat diagnòstica elevada

per identificar i excloure fibrosi avançada (Metavir F3-4 o Ishak F4-6), amb VPP i VPN del 65% i 90%, respectivament. Respecte a les fórmules patentades, com el FibroTest[®], l'Hepascore[®] o el FibroMeter[®], han mostrat bona fiabilitat classificant correctament fins el 62%, 68% i 71% dels pacients, respectivament ⁵⁵. Però, cal tenir en compte que els resultats poden ser menys precisos que en pacients monoïnfectats, ja que el nombre de falsos positius pot ser més alt degut a la trombocitopènia induïda pel VIH o a l'augment de bilirubina provocat pels antiretrovirals.

En pacients amb HC pel VHB la dificultat per desenvolupar índexs és major, degut a la fluctuació dels nivells de transaminases, que tradueixen l'activitat necroïnflamatòria, però sense relació directa amb l'estadi de fibrosi. Hui i cols. van dissenyar un índex amb variables senzilles (plaquetes, bilirubina, albúmina i l'índex de massa corporal, IMC), amb bona fiabilitat per descartar fibrosi significativa (VPN del 92%) ³¹.

En pacients amb FGNA el "*NAFLD fibrosis score*" és el més utilitzat per descartar fibrosi avançada (AUROC de 0.88) i inclou l'IMC, la diabetis mellitus, les plaquetes, l'edat, l'albúmina i la rati AST/ALT), ³². En aquest cas, alguns marcadors patentats dissenyats per l'HC pel VHC, com l'ELF[®] o el FibroTest[®], han mostrat resultats similars ⁵⁶.

En general, els índexs serològics tenen bona sensibilitat i especificitat per identificar o excloure fibrosi significativa/avançada o cirrosi, però la limitació general és la fiabilitat insuficient per classificar els pacients amb estadis intermedis de fibrosi ⁵⁷. D'altra banda, donat que la fiabilitat diagnòstica dels índexs serològics directes o indirectes, tant patentats com no patentats, és molt similar, les guies clíniques recomanen la seva utilització per al seguiment dels pacients però sense fer una recomanació específica ²⁸.

3.4.5. Fiabilitat pronòstica

A banda d'identificar o excloure la fibrosi, els mètodes serològics han demostrat bon valor predictiu per identificar esdeveniments clínics o mort relacionats amb la malaltia hepàtica. Ghany i cols. van demostrar, a la cohort de 1050 pacients amb HC pel VHC recollida per realitzar el marcador HALT-C, que la fórmula incloent la xifra de plaquetes, la rati AST/ALT, la bilirubina i l'albúmina permetia estratificar la probabilitat de descompensació als 3 anys de seguiment des d'un 2% (quan el valor era per sota del

percentil 50) a un 65% (quan el valor era per sobre del percentil 90) ⁵⁸ (Figura 7). Un segon estudi dels mateixos autors i avaluant la mateixa cohort va demostrar que els canvis al cap de 2 anys respecte al basal (incloent a nivell basal plaquetes, rati AST/ALT i bilirubina; i empitjorament de les plaquetes, bilirubina i albúmina en el seguiment) permetia discriminar els pacients amb risc més elevat de descompensació. Així doncs, tan sols el 12% dels pacients amb < 150,000 plaquetes basals i < 5% de descens durant el seguiment van presentar descompensació clínica, comparat amb un 42% dels pacients amb el mateix rang de plaquetes basals però amb un descens > 15% ⁵⁹. Però, manquen estudis que avaluïn la capacitat predictiva dels índexs serològics a llarg termini.

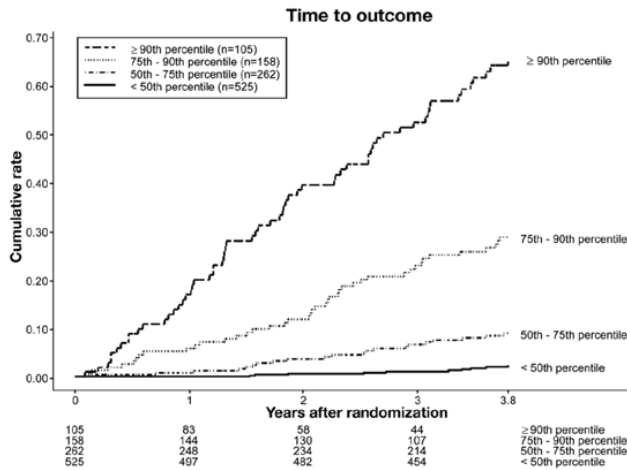


Figura 7. Probabilitat de descompensació clínica segons el percentil basal de ALT-C ⁵⁸

3.5. MÈTODES RADIOLÒGICS

3.5.1. Radiologia clàssica

L'àmplia disponibilitat de l'ecografia abdominal, i en menor mesura de la tomografia axial computeritzada (TAC) i la ressonància magnètica, faciliten la seva utilització en la pràctica clínica diària per l'avaluació dels pacients amb MCF. La visualització d'una superfície hepàtica nodular és el signe radiològic més fiable per detectar cirrosi, amb una AUROC de fins a 0.88, amb sensibilitat del 89% i especificitat del 82% ⁶⁰. Altres signes habituals són un patró ecogràfic irregular i la hipertròfia del lòbul caudat o del lòbul hepàtic esquerre, signes molt específics (especificitat del 100%) però amb sensibilitats variables al voltant del 50%, pel que la seva visualització és infreqüent i depèn sempre de l'explorador. A més, el problema principal dels mètodes radiològics clàssics és que es veuen limitats al diagnòstic de malaltia avançada o cirrosi. De manera similar, la dilatació de la vena porta > 13 mm, la inversió del flux portal o la presència de col·laterals porto sistèmiques permeten el diagnòstic d'hipertensió portal amb una especificitat alta, propera al 100%, però amb sensibilitat variable. D'altra banda, la presència d'esplenomegàlia és el signe radiològic més sensible, però la seva especificitat és baixa (36%) ⁶¹. A la **Taula 2** es mostra la fiabilitat diagnòstica dels diferents signes radiològics.

Signe	Sensibilitat	Especificitat
Signes de cirrosi hepàtica		
• Superfície hepàtica nodular	55-91%	82-95%
• Lòbul esquerre / lòbul dret > 1.3	74%	100%
• Hipertròfia del lòbul caudat	43-84%	100%
Signes d'hipertensió portal		
• Dilatació de vena porta > 13 mm	<50%	90-100%
• Reducció del flux portal < 13 cm/seg	80-88%	80-96%
• Col·laterals portosistèmiques	83%	100%
• Esplenomegàlia > 12.5 cm	93%	36%

Taula 2. Signes radiològics de cirrosi hepàtica i hipertensió portal. Adaptada de Berzigotti i cols. ⁶¹

3.5.2. Elastografia i mètodes elastogràfics

L'elastografia és el principi físic que avalua l'elasticitat dels teixits. L'elasticitat és inversament proporcional a la rigidesa i es mesura a partir del desplaçament del teixit (ona de propagació) que genera una força mecànica ⁶². La velocitat de propagació d'aquesta ona és proporcional a la rigidesa del teixit (segons una fórmula coneguda o mòdul de Young) i es pot mesurar mitjançant ultrasons o ressonància magnètica.

Existeixen dos tipus diferents d'ones de propagació: una longitudinal o de compressió, i una transversal o de cisallament. En base a això es poden diferenciar dues maneres de mesurar aquestes ones, i per tant dos tipus d'elastografia: elastografia qualitativa o de pressió i elastografia quantitativa o de cisallament ⁶³.

L'elastografia per ona de cisallament és la més utilitzada. El mètode elastogràfic més senzill que mesura l'ona de cisallament és l'elastografia de transició (ET). El desenvolupament de l'ET l'any 2003 va demostrar que la quantificació de la RH en pacients amb HC pel VHC era proporcional a l'estadi de fibrosi ⁶⁴, mentre que estudis posteriors han demostrat que en pacients amb cirrosi el valor de RH també és proporcional al grau de pressió portal ⁶⁵. El FibroScan® (Echosens™, París, França) és l'aparell que utilitza l'ET per mesurar la RH d'una manera estandarditzada i senzilla, i en el moment actual és el mètode elastogràfic de referència per al diagnòstic de fibrosi significativa/cirrosi i pel seguiment de les diferents MCF ²⁸ (**Figura 8**). L'ET utilitzant la sonda M mesura la RH mitjançant la propagació d'una ona vibratòria de baixa freqüència (50 Hz) a través del parènquima hepàtic, i el seu desplaçament (velocitat) és mesurat per una ona d'ultrasons; a major rigidesa del teixit, major és la velocitat de propagació. El mòdul de Young o mòdul d'elasticitat ($E=3\rho v^2$) permet quantificar l'elasticitat (E) en kilopascals (kPa) coneixent la densitat del teixit (ρ), que pel fetge es considera constant i propera a "1", i la velocitat de l'ona de cisallament (v).



Figura 8. Aparell de FibroScan® (Echosens™, París, França). Adaptada de www.fibroscan.com ¹⁰⁹

A banda de l'ET s'han desenvolupat altres tècniques d'avaluació elastogràfica, la majoria d'elles incorporades a un ecògraf convencional, i basades en la visualització i quantificació d'ones de cisallament ⁶⁶. L'ARFI (*Acute Radiation Force Impulse*, Siemens Healthcare, Alemanya) ⁶⁷ i l'ElastPQ™ (Philips, Holanda) ⁶⁸ es basen en la transmissió d'ones d'ultrasons de curta freqüència sobre el teixit hepàtic (elastografia per quantificació de punts o *pSWE* en anglès). En l'ARFI la velocitat de l'ona de cisallament es mesura en metres/segon (m/s), amb l'avantatge que l'explorador pot seleccionar l'àrea exacta a mesurar mitjançant la visió ecogràfica. La seva taxa de mesures inadequades és menor que l'ET, sobretot en pacients amb ascites o obesitat ⁶⁹, però els seus valors es veuen afectats pels mateixos factors que afecten la fiabilitat de l'ET (sobretot manca de dejú i nivell de transaminases) ^{70,71}. A més, els valors s'obtenen en un rang molt curt (0.5-4.4 m/s), pel que els punts de tall són més estrets. Un altre mètode molt recent d'avaluació elastogràfica és l'ElastPQ™, que ha demostrat en estudis inicials una fiabilitat similar a l'ARFI i a l'ET pel diagnòstic de la fibrosi, però els seus valors són més baixos, i a més no estan suficientment validats ^{72,73}.

Un tercer sistema d'avaluació és l'Aixplorer™ (Supersonic Imagine, França), que utilitza també la transmissió d'ones d'ultrasons de curta freqüència sobre el teixit hepàtic però en dues dimensions (amplada i profunditat) (2D-SWE), generant un “con acústic” en diferents profunditats, i amb una velocitat de “refresc” de la imatge ultra ràpida que dóna la sensació de visualitzar la RH en temps real ⁷⁴. També permet la selecció de l'àrea de mesura, i els resultats s'expressen tant en kPa com en m/s. La taxa de valors inadequats és similar a l'ET i l'ARFI ^{75,76}, i igual que passa amb l'ElastPQ™ els estudis publicats fins al moment són preliminars i els seus criteris de qualitat no estan ben definits.

Respecte a l'elastografia mesurada per ressonància magnètica (MR-Touch®), utilitza un sistema hidràulic col·locat a sobre de l'hipocondri dret per generar l'ona mecànica i un software per visualitzar l'ona de cisallament ⁷⁷. La RH es quantifica en kPa. Aquesta tècnica permet una visualització de tot el fetge i una bona aplicabilitat en pacients obesos o amb ascites, però és una tècnica cara i que requereix el processament de les imatges, limitant el seu ús de manera rutinària ⁷⁸. A la **Taula 3** es resumeixen les característiques principals de les diferents tècniques elastogràfiques.

Tècnica	Avantatges	Limitacions	Zona de mesura	Àrea de mesura	Freqüència de l'ona
Elastografia de transició	Ràpida, senzilla, tècnica millor definida i validada	Limitada en pacients obesos o amb ascites, no imatge real del fetge	Espai intercostal dret	4 cm ³	40-50 Hz
Elastografia per quantificació de punts (pSWE)	Visualització directa del fetge, capacitat de mesura de la melsa	Escassa validació	Segment VI-VIII del fetge	0,5-1 cm ³	100-500 Hz
Elastografia en temps real (2D-SWE)	Visualització directa del fetge, capacitat de mesura de la melsa	Escassa validació	Segment VI-VIII del fetge	20 cm ³	100-500 Hz
Elastografia per ressonància	Mesura del fetge sencer, millor correlació amb la biòpsia, aplicable en pacients obesos / ascites	Preu alt, disponible només en l'àmbit de la investigació	Lòbul hepàtic dret	250 cm ³	-

Taula 3. Característiques principals de les diferents tècniques elastogràfiques. Adaptada de Barr i cols.⁶⁶

3.5.3. Elastografia de transició

3.5.3.1. Característiques generals

Tal com s'ha comentat, l'ET és la tècnica més avaluada i utilitzada per al diagnòstic de la fibrosi hepàtica. Els grans avantatges de l'ET són que és una tècnica totalment incruenta i indolora, ràpida en l'exploració (menys de 5 minuts), immediata en els resultats, i fàcil de realitzar en pacients ambulatoris. La seva fiabilitat és excel·lent per identificar fibrosi significativa (VPP 88%) i per descartar la presència de cirrosi o

hipertensió portal (VPN 97%)⁷⁹. A més, mostra una bona concordança tant intra com inter observador que permet repetir la prova durant el seguiment sense perdre fiabilitat⁸⁰.

Per tant, l'ET és un bon mètode per identificar o excloure fibrosi significativa o cirrosi hepàtica. En general es considera que l'ET i els mètodes serològics són equivalents pel diagnòstic de fibrosi significativa⁸¹⁻⁸³, però l'ET és superior pel diagnòstic de cirrosi^{84,85}. A l'igual però que aquests, no aconsegueix diferenciar els pacients amb estadis intermedis de fibrosi^{24,86}.

3.5.3.2. Mesura de l'ET i criteris de qualitat

L'àrea mesurada són uns 4 cm³ situats entre 25-65 mm sota la superfície de la pell, i la representació d'aquesta mesura és el que s'anomena elastograma. Les unitats són els kPa i el seu rang de detecció va de 2.5 a 75 kPa. Sempre cal realitzar l'ET en dejú d'almenys 2 hores, ja que la ingesta provoca un augment significatiu dels valors de RH, especialment en aquells pacients amb cirrosi^{87,88}. D'altra banda, algunes situacions clíniques com la insuficiència cardíaca (fetge d'estasi), les hepatitis agudes (necrosi hepatocel·lular), les malalties colestàsiques (congestió biliar)⁸⁹⁻⁹¹ i el consum agut d'alcohol (esteatosi i necrosi)⁹² poden sobreestimar els valors de RH sense relació amb la fibrosi, observant-se un ràpid descens dels valors amb la resolució del problema com per exemple després de l'abstinència a l'alcohol⁹³. Uns espais intercostals molt estrets o la presència d'ascites no permeten l'obtenció de valors⁶⁴.

En realitzar l'exploració, cada mesura individual dóna un valor numèric en kPa. El valor de RH és la mediana de 10 mesures vàlides. Cal considerar també la Rati (R) o percentatge de mesures vàlides sobre el total, i el rang interquartil (RIQ) que mostra la dispersió de les mesures entre els percentils 25 i 75 sobre la mediana. En base a les recomanacions del fabricant es considera que una mesura de RH és inadequada quan no s'aconsegueixen mesures vàlides, la R és < 60% i/o la relació RIQ/RH és > 0.3⁹⁴. Estudis posteriors han suggerit que la variable de major importància a l'hora d'avaluar un valor d'ET com a fiable és la dispersió de les determinacions (RIQ), i la no influència del nombre de determinacions adequades sobre el total (R)^{95,96}. Recentment Boursier i cols. han proposat uns criteris nous⁹⁷, basats en la major importància del RIQ i del

valor de RH, i la no rellevància de la R. Els autors van demostrar en una cohort que incloïa 1165 pacients amb MCF (68.5% amb HC pel VHC) que la proporció de pacients ben classificats només depenia del RIQ en aquells amb valors més alts de RH. Així, s'estableixen 3 nivells de fiabilitat: molt fiable, quan el RIQ/RH és ≤ 0.1 ; fiable, quan el RIQ/RH és ≤ 0.3 o el valor de RH és < 7.1 kPa; i no fiable, quan el RIQ/RH és > 0.3 i el valor de RH és > 7.1 kPa (**Figura 9**). Aquests criteris permeten augmentar el nombre de determinacions fiables (del 75.7% al 90.9%) ($p < 0.001$) i la seva precisió diagnòstica per identificar F2-4 o F4 (AUROC del 0.835 o 0.913 al 0.886 o 0.970, respectivament) ($p < 0.001$). Recentment aquests criteris han estat validats en una segona cohort de 226 pacients amb MCF (83.2% de resultats fiables vs 71.6% amb els criteris clàssics), sense impacte d'aquest major nombre de resultats respecte a la fiabilitat diagnòstica (AUROCs) per identificar cirrosi o hipertensió portal clínicament significativa (HTPCS) (0.852 i 0.962 comparat amb 0.863 i 0.957 pels criteris nous i clàssics, $p=ns$)⁹⁸.

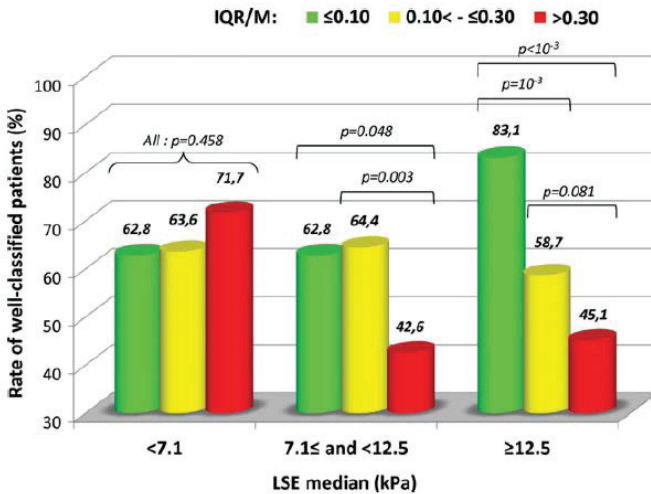


Figura 9. Criteris de Boursier basats en la importància del valor del RIQ⁹⁷

3.5.3.3. Aplicabilitat i limitacions

Tal com s'ha comentat, la probabilitat d'obtenir un resultat inadequat d'ET és d'un 20% (2.7-3.1% sense cap mesura vàlida i 11.6%-15.8% amb resultat inadequat). Per tant, la seva aplicabilitat és inferior a la dels marcadors serològics, tot i la utilització dels nous criteris de qualitat. Els factors que s'han relacionat de forma independent amb l'obtenció de mesures inadequades són l'obesitat del pacient (IMC > 28-30 kg/m²) (**Figura 10**) i la baixa experiència de l'explorador (< 500 exploracions)^{99,100}. Però, cap estudi previ ha demostrat que l'augment de l'experiència de l'explorador o disminuir l'IMC del pacient permeti augmentar la fiabilitat diagnòstica de l'ET per identificar el grau de fibrosi.

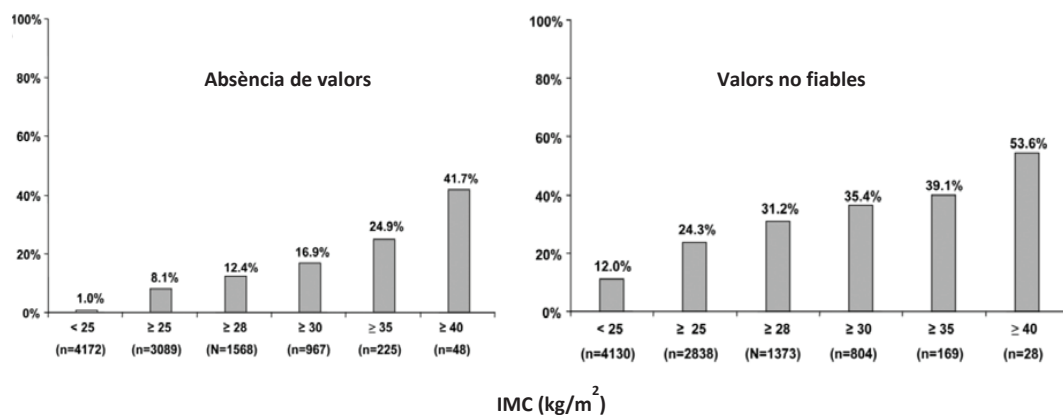


Figura 10. Relació entre l'IMC del pacient i la probabilitat d'obtenir mesures inadequades d'ET⁹⁹

Per tal de millorar l'aplicabilitat de l'ET en pacients amb obesitat, EchosensTM ha dissenyat una sonda (Sonda XL[®], EchosensTM, París, França) amb una major penetració sota la superfície cutània (35-75 mm), i que ha demostrat obtenir una major nombre de mesures fiables que la sonda M en aquells pacients amb una distància entre la pell i la càpsula hepàtica o de Glisson (distància pell-càpsula, DPC) de més de 25 mm¹⁰¹⁻¹⁰³. A l'estudi de Myers i cols.¹⁰² es van avaluar pacients amb IMC > 28 Kg/m² i es va obtenir un valor fiable amb sonda XL en el 60% de pacients on la sonda M no l'havia obtingut, amb una aplicabilitat en pacients obesos del 73% comparada amb el 50% de

la sonda M ($p < 0.001$). Però, la sonda XL té diverses limitacions: 1) D'una banda, el seu cost és elevat i limita la disponibilitat en molts centres; 2) Obté una aplicabilitat baixa en pacients amb obesitat mòrbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$)¹⁰⁴; 3) La validació dels punts de tall per al diagnòstic de la fibrosi hepàtica s'han realitzat amb la sonda M¹⁰⁵; i 4) els estudis de referència han mostrat valors més baixos amb la sonda XL que els obtinguts amb la sonda M obligant a la cerca de nous punts de tall (**Figura 11**)¹⁰² o a la utilització de fórmules de correcció per derivar el valor obtingut amb la sonda XL a un valor teòric amb la sonda M¹⁰⁶. D'altra banda, la sonda M mostra valors més alts en individus obesos sense fibrosi hepàtica¹⁰⁷ i en pacients amb FGNA i IMC elevat¹⁰⁸.

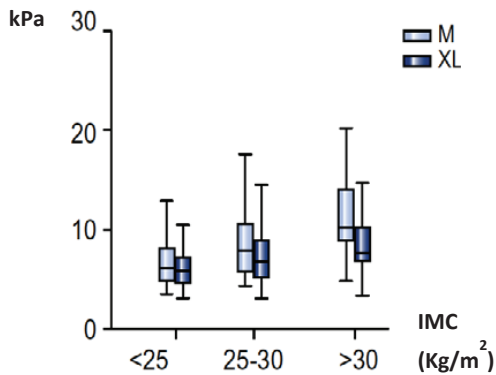


Figura 11. Diferències entre els valors amb Sonda M i XL segons l'IMC. Adaptada de de Lédinghen i cols.¹⁰³

D'acord amb les instruccions del fabricant, la decisió d'utilitzar la sonda M o la sonda XL cal fer-la en base a la DPC (inferior o superior a 25 mm, respectivament). Tanmateix, l'aparell de FibroScan® realitza aquesta recomanació de forma automatitzada en base al número de mesures no vàlides amb la sonda M i una anàlisi qualitativa de l'elastograma¹⁰⁹. D'altra banda, les guies clíniques actuals recomanen utilitzar la sonda XL en pacients amb $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$ ^{28,103}, però la relació entre IMC i DPC és moderada com s'ha demostrat en estudis previs en pacients obesos on la mediana de la DPC va ser $< 25 \text{ mm}$, tot i que la relació entre aquestes variables no està ben definida^{102,110}. Per tant, és molt important identificar aquells pacients amb sobrepès o obesitat que es poden avaluar correctament amb la sonda M i aquells que en canvi requeriran la sonda XL.

Un altre factor molt important a tenir en compte és l'esteatosi hepàtica. L'obesitat és un problema global de salut pública. L'associació de l'obesitat amb la resistència a la insulina ha augmentat la incidència de síndrome metabòlica i de FGNA ¹¹¹. Per tant, el nombre de pacients amb obesitat i malalties hepàtiques ha augmentat de forma important ¹¹². Els estudis que avaluen els valors de RH en pacients amb esteatosi hepàtica son discordants, donat que hi ha estudis que mostren valors més alts independentment de l'estadi de fibrosi ^{113,114}, i d'altres que no ^{115,116}. Això ha fet que EchosensTM validés un sistema per l'avaluació no invasiva de l'esteatosi anomenat CAP (*Controlled Attenuation Parameter*). El CAP mesura el grau d'atenuació de l'ona de cisallament en el fetge amb greix en el mateix moment que s'obté el valor de RH. Les unitats que utilitza són decibels/metre (dB/m), i ha demostrat una bona correlació amb l'esteatosi avaluada a la biòpsia (Rho de Spearman=0.81) ¹¹⁷. Així, un punt de tall de 283 dB/m permet identificar pacients amb $\geq 10\%$ d'esteatosi amb un VPP del 87% i un VPN del 64% ¹¹⁸. D'altra banda, dades publicades en un metanàlisi recent suggereixen que la seva mesura es veu afectada per la presència de FGNA, de l'IMC i de la diabetis, i que aquests pacients podrien requerir d'un ajust dels valors del CAP (restar 10 dB/m al valor de CAP en pacients amb FGNA i diabetis, i restar 4.4 dB/m per cada unitat per sobre dels 25 Kg/m² d'IMC, respectivament) ¹¹⁹.

3.5.3.4. Fiabilitat diagnòstica

De forma similar al que passa amb els marcadors serològics, l'ET no permet diferenciar els estadis de fibrosi consecutius, i tal com passa amb la biòpsia hepàtica pot mostrar solapament entre estadis. Tanmateix, l'ET és un mètode molt fiable per excloure cirrosi hepàtica (VPN del 95%) i adequat per identificar-la (VPP del 55%) ^{81,82}.

Els estudis han mostrat valors al voltant de 5.5 kPa en població general sense malaltia hepàtica ¹²⁰, i els metanàlisis suggereixen valors de 7.6 kPa i 14.6 kPa per identificar fibrosi significativa i cirrosi, respectivament ^{121,122}, i valors de 18-21 kPa per predir la presència o absència d'hipertensió portal ^{123,124}. Tot i això, aquests valors es veuen influenciats per l'etiologia de la malaltia hepàtica i els factors prèviament comentats.

Igual que passa amb els marcadors serològics, la majoria d'estudis que han avaluat la fiabilitat diagnòstica de l'ET s'han realitzat en pacients amb HC pel VHC. L'estudi més

ampli publicat en pacients amb VHC (N=1202) mostra una fiabilitat excel·lent (VPP i VPN) per identificar fibrosi significativa (90.1% i 70.2%) amb un valor de 7.4 kPa i cirrosi (86.5% i 97%) amb un valor de 13.2 kPa, respectivament ¹²⁵, mentre que els valors suggerits en un metanàlisi recent per identificar fibrosi significativa i cirrosi són 7.1 kPa i 12.5 kPa, respectivament ⁸³. En pacients coinfectats VHC-VIH normalment s'apliquen els mateixos punts de tall que en pacients monoïnfectats pel VHC ⁵⁵.

En l'HC pel VHB, Viganò i cols. van proposar un sistema basat en 3 punts de tall: 6.2 kPa per excloure fibrosi significativa, 9.4 kPa per identificar fibrosi significativa i a la vegada per excloure cirrosi, i 13.1 kPa per identificar cirrosi, tots ells amb sensibilitat i especificitat > 90% i bona fiabilitat diagnòstica ¹²⁶.

En el cas del FGNA, valors de 7.9 kPa i 10.3 kPa permeten identificar pacients amb risc elevat de tenir fibrosi avançada i cirrosi, respectivament ¹¹⁵.

3.5.3.5. Fiabilitat pronòstica

L'ET ha demostrat una capacitat pronòstica excel·lent per predir esdeveniments clínics o mortalitat en pacients amb HC pel VHC. Un valor d'ET < 9.5 kPa mostra un risc de mortalitat als 5 anys inferior al 5%, mentre que un valor d'ET > 40 kPa confereix una probabilitat propera al 50% ¹²⁷ (**Figura 12**).

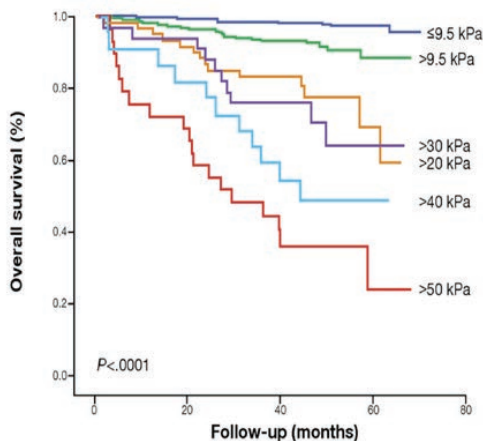


Figura 12. Mortalitat estratificada segons el valor basal d'ET en pacients amb VHC ¹²⁷

De manera similar, en pacients coinfectats, un valor d'ET > 40 kPa permet diferenciar aquells pacients amb alta probabilitat de descompensació clínica als 4 anys. Així, la probabilitat de mantenir-se lliure de descompensació en una cohort de 239 pacients va ser del 97%, 93% i 81% o del 80%, 74% i 63% a 1, 2 i 3 anys en pacients amb un valor d'ET inferior o superior a 40 kPa, respectivament ($p < 0.001$)¹²⁸.

En pacients amb HC pel VHB, en un estudi recent en una cohort amb alta prevalença d'antigen e positiu (HBeAg), en tractament antiviral amb entecavir, un valor de 12 kPa permet diferenciar aquells pacients amb risc de descompensació clínica (2% vs 16% als 2 anys)¹²⁹.

4. HIPÒTESI

4. HIPÒTESI

L'aplicabilitat i la fiabilitat diagnòstica dels mètodes no invasius d'avaluació de la fibrosi hepàtica (serològics i elastogràfics) es poden veure afectades per factors relacionats amb la tècnica utilitzada, la qualitat de les mesures i les característiques del pacient.

5. OBJECTIUS

5. OBJECTIUS

1. Avaluar la fiabilitat diagnòstica de l'ELF® per identificar fibrosi significativa en mostres de sèrum congelades durant 25 anys de pacients amb HC pel VHC.
2. Avaluar l'aplicabilitat i la fiabilitat diagnòstica d'una segona avaluació d'ET realitzada per personal experimentat (> 500 exploracions) en aquells pacients amb un primer resultat inadequat.
3. Avaluar l'aplicabilitat i la fiabilitat diagnòstica de la sonda M i la sonda XL d'ET en una cohort de pacients amb sobrepès i obesitat ($IMC \geq 28 \text{ Kg/m}^2$).

6. MATERIAL I MÈTODES

6. MATERIAL I MÈTODES

6.1. PRIMER ESTUDI

6.1.1 Disseny de l'estudi

Estudi retrospectiu per valorar l'estabilitat de marcadors directes de fibrosi (PIIINP, TIMP-1, AH) i l'ELF en mostres criopreservades, mitjançant la comparació dels resultats en períodes de temps de 5 anys per diferenciar pacients amb fibrosi lleu (Metavir F0-1) vs. significativa (Metavir F2-4).

La precisió diagnòstica va ser definida com la capacitat per identificar pacients amb fibrosi significativa (Metavir F2-4). La interpretació de l'estadi de fibrosi hepàtica es va realitzar segons els valors de referència publicats per l'ELF com: ELF < 7.7, no fibrosi (o lleu); ELF 7.7-9.8, fibrosi moderada; ELF > 9.8: fibrosi avançada; ELF \geq 11.3: cirrosi ¹³⁰.

El seguiment dels pacients inclosos es va realitzar utilitzant dades de la història clínica electrònica. La presència de cirrosi es va definir com l'aparició d'una de les següents variables durant el seguiment: trombocitopènia (plaquetes < 130×10^9) amb esplenomegàlia (melsa > 13 cm) durant almenys 6 mesos sense cap altra etiologia; alteració de l'arquitectura hepàtica a l'ecografia abdominal; presència de signes endoscòpics d'hipertensió portal (varices esofàgiques o gastropatia) a la gastroscòpia; o Metavir F4 en aquells pacients amb una segona biòpsia hepàtica. Els esdeveniments clínics es van definir com el desenvolupament de descompensació clínica (ascites, encefalopatia hepàtica, peritonitis bacteriana espontània o sagnat relacionat amb hipertensió portal), carcinoma hepatocel·lular o mort de causa hepàtica durant el seguiment.

6.1.2 Sèrums i biòpsies hepàtiques

Es van considerar per a l'estudi mostres de sèrum criopreservades de 1990 a 2014, i biòpsies hepàtiques aparellades de pacients infectats pel VHC. Totes les mostres de sèrum van ser extretes amb el pacient en dejú i centrifugades a 3000 rpm abans de ser conservades a -30°C dins de la col·lecció privada pròpia (C.0000956) a l'IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques). Totes les mostres de sèrum havien estat

identificades amb un número i tabulades en una base de dades amb un codi d'accés per garantir la confidencialitat del pacient. El protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la nostra Institució (Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) - Parc de Salut Mar), amb número de referència 2015/6161/I, de conformitat amb les directrius ètiques de la Declaració de 1975 de Hèlsinki.

Les mostres van ser seleccionades d'acord amb la data de recollida. Es van considerar períodes de cinc anys (1990-94, 1995-99, 2000-2004 2005-2009 i 2010-2014), i es van seleccionar 50 mostres a l'atzar de cada període, amb l'excepció del primer període (1990-94), on només es van seleccionar 25 mostres degut a la baixa disponibilitat de biòpsies hepàtiques. Es van excloure aquelles mostres de sèrum que s'havien sotmès a un cicle de descongelat, aquelles recollides després de 24 mesos des de la data de la biòpsia hepàtica, i aquelles amb una biòpsia hepàtica fragmentada o amb menys de 6 espais porta o menys de 10 mm de longitud. Un únic patòleg expert, "cec" a la resta de dades, va revisar totes les biòpsies i va classificar la fibrosi hepàtica d'acord amb la classificació de METAVIR.

6.1.3 Anàlisi bioquímica de les mostres congelades

Les mostres de sèrum congelades es van transportar utilitzant gel sec, i el procés de descongelació es va dur a terme al "Laboratori de Referència de Catalunya S.A, Barcelona". Els 3 marcadors directes que componen l'ELF (AH, PIIIINP i TIMP-1) van ser analitzats per assajos heterogenis de quimio-luminescència utilitzant partícules paramagnètiques i parells d'anticossos monoclonals per capturar i quantificar PIIIINP i TIMP1, o proteïna d'unió a AH (HABP) per a l'anàlisi d'AH. Els coeficients de variació estandarditzats al llarg de tot el rang analític no van excedir el 7.4% per l'AH, el 6.5% pel PIIIINP i el 7.3% pel TIMP-1. Els rangs de detecció van ser: 1.6-1.000 ng/ml per l'AH, 0.5-150 ng/ml pel PIIIINP i 3.5-1300 ng/ml pel TIMP-1. L'ELF fou generat automàticament amb un analitzador immuno-químic (XP i CP SIEMENS ADVIA CENTAUR, Siemens Healthcare Diagnostics) utilitzant l'equació proporcionada pel fabricant:

$$\text{ELF} = (2494 + 0.846 \ln [\text{AH ng/ml}] + 0.735 \ln [\text{PIIINP ng/ml}] + 0.391 \ln [\text{TIMP-1 ng/ml}])$$

6.2. SEGON ESTUDI

6.2.1. Disseny de l'estudi 2

Estudi de cohorts, prospectiu, per avaluar l'aplicabilitat de l'ET en pacients amb una primera determinació inadequada, després d'una segona avaluació per exploradors experts i una tercera avaluació amb la sonda XL. L'objectiu secundari va ser avaluar la milloria en la fiabilitat diagnòstica entre exploradors entrenats i experts per identificar fibrosi significativa.

Des del març de 2011 a l'abril de 2012 es van incloure tots els pacients (n=868) amb MCF, avaluats a la nostra unitat amb ET (n=924). En aquells pacients amb més d'una determinació d'ET només es va incloure la primera. Es van avaluar les taxes d'exploracions adequades amb la sonda M per part d'exploradors entrenats (LSM1) i l'increment després d'una segona avaluació (LSM2) per exploradors experts. En aquells pacients amb LSM2 inadequat es va realitzar una tercera exploració amb la sonda XL (LSMXL), per part d'exploradors experts.

Les exploracions d'ET amb la sonda M o la sonda XL van ser realitzades per 3 exploradors diferents (R.F., M.P. i J.A.C.). Es va definir l'experiència de l'explorador segons el nombre d'ET realitzades prèviament: exploradors entrenats (50-500 exploracions) i exploradors experts (més de 500 exploracions).

Atès que els estudis anteriors havien demostrat una excel·lent reproductibilitat entre exploradors utilitzant la mateixa sonda M⁸⁰, només es van re-avaluar aquells pacients amb una primera exploració inadequada. Els criteris d'exclusió van ser: trasplantament de fetge, cirurgia hepàtica, ascites o embaràs.

L'objectiu secundari de l'estudi va ser avaluar la milloria en la fiabilitat diagnòstica entre exploradors entrenats (LSM1) i experts (LSM2) per identificar fibrosi significativa en aquells pacients amb biòpsia hepàtica o cirrosi clínica (n=334, 38%).

El protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la nostra Institució (Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) - Parc de Salut Mar), de conformitat amb les directrius

ètiques de la Declaració de 1975 d'Hèlsinki. Tots els pacients van donar el seu consentiment informat per escrit. L'estudi es va registrar a <http://clinicaltrials.gov> (NCT01900808).

6.2.2. Determinació de la RH (comú per estudi 2 i 3)

Es van considerar els criteris de qualitat del fabricant del FibroScan® 502 (FibroScan®, Echosens™, París, França). Totes les exploracions es van realitzar en condicions de dejú⁸⁷. Els resultats d'ET es van expressar com la mediana de totes les mesures de RH vàlides. Es va considerar un resultat fiable quan incloïa almenys 10 mesures vàlides amb una taxa d'èxit $\geq 60\%$ i una RIQ/RH $\leq 30\%$; i no fiable quan no es van obtenir valors o la R era $< 60\%$ i/o el RIQ/RH $> 30\%$. En el tercer estudi es van utilitzar els criteris de Boursier et al, per tal d'augmentar el nombre d'exploracions fiables⁹⁷: molt fiable (RIQ/RH ≤ 0.1); fiable (RIQ/RH ≤ 0.3 o > 0.3 amb RH < 7.1 kPa); i no fiable (RIQ/RH > 0.3 amb RH ≥ 7.1 kPa).

6.2.3. Biòpsies hepàtiques (comú per estudi 2 i 3)

Les biòpsies hepàtiques es van realitzar per via percutània mitjançant Tru-Cut de 14 Gauge. Les mostres es van processar al Departament de Patologia i es van tenyir amb hematoxilina-eosina i tri-cròmic de Masson. Un únic patòleg, "cec" a les dades clíniques, va classificar la fibrosi hepàtica. En l'estudi 2 es va utilitzar la classificació d'Ishak, mentre que en l'estudi 3 es va utilitzar la de METAVIR en pacients amb hepatitis víriques i la classificació de NAS (NAFLD activity score) en pacients amb FGNA²³. Els pacients amb biòpsies de menys de 15 mm i/o ≤ 6 tractes portals o realitzades més de 12 mesos abans de l'ET van ser exclosos.

6.2.4. Variables clíniques i DPC (comú per estudi 2 i 3)

Les característiques dels pacients van ser recollides a través de la història clínica electrònica, incloent dades de laboratori, demogràfiques, etiològiques, antropomètriques i bioquímiques. El perímetre abdominal (PA) es va mesurar a la línia mitja de la circumferència abdominal i el perímetre toràcic (PT) a la línia mitja esternal. La síndrome metabòlica es va definir d'acord amb les directrius de l'American Heart Association and National Heart, Lung and Blood Institute¹³¹. La DPC es va mesurar

utilitzant un ecògraf portàtil (DMMA-380; WELLD Ultrasound Scanner, Shenzhen, Xina).

6.3. TERCER ESTUDI

6.3.1. Disseny de l'estudi 3

Estudi de cohorts, prospectiu, per avaluar l'aplicabilitat i la utilitat de la sonda M i la sonda XL per determinar la rigidesa hepàtica en una cohort de pacients amb sobrepès / obesitat ($IMC \geq 28 \text{ Kg/m}^2$). L'objectiu secundari va ser avaluar la fiabilitat diagnòstica de la sonda M i XL per detectar fibrosi en pacients amb sobrepès / obesitat i biòpsia hepàtica.

Totes les mesures d'ET van ser realitzades per un sol explorador (R.F.) amb elevada experiència (> 5000 exploracions prèvies).

Des del maig de 2013 fins al març de 2015 es van avaluar de manera prospectiva tots els pacients amb MCF i $IMC \geq 28 \text{ kg/m}^2$ a qui es realitzés una ET. Els criteris d'exclusió van ser: trasplantament de fetge, cirurgia hepàtica, ascites o embaràs. De maig a desembre de 2013 els pacients van ser avaluats amb la sonda M, i aquells amb un resultat no fiable van ser re-avaluats amb la sonda XL. Per tal d'avaluar la correlació de les sondes M i XL, des de gener de 2014 fins al març de 2015 es va realitzar l'avaluació de tots els pacients amb les dues sondes.

El protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de la nostra Institució (Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) - Parc de Salut Mar), número de referència (2015/6283/I), de conformitat amb les directrius ètiques de la Declaració de 1975 d'Hèlsinki. Tots els pacients van donar el seu consentiment informat per escrit.

7. ARTICLES ORIGINALS

RESEARCH ARTICLE

Diagnostic Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) Score Using HCV-Infected Serum Samples Cryopreserved for up to 25 Years

Marc Puigvehí^{1,2}, Juanjo Hernández³, Teresa Broquetas^{1,2}, Susanna Coll^{1,2}, Montserrat Garcia-Retortillo^{1,2}, Nuria Cañete^{1,2}, Maria Dolors Giménez^{1,2}, Mar Garcia⁴, Felipe Bory¹, Margarita Salvadó³, Ricard Solà^{1,2}, José A. Carrión^{1,2*}

1 Liver Section, Gastroenterology Department, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, **2** IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain, **3** Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain, **4** Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

* 95565@parcsalutmar.cat



OPEN ACCESS

Citation: Puigvehí M, Hernández J, Broquetas T, Coll S, Garcia-Retortillo M, Cañete N, et al. (2016) Diagnostic Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) Score Using HCV-Infected Serum Samples Cryopreserved for up to 25 Years. PLoS ONE 11 (12): e0164883. doi:10.1371/journal.pone.0164883

Editor: Pavel Strnad, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, GERMANY

Received: June 14, 2016

Accepted: October 3, 2016

Published: December 16, 2016

Copyright: © 2016 Puigvehí et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Siemens Healthcare Diagnostics Spain provided the automatic analyzer Siemens ADVIA CENTAUR and the reagents, calibrators and controls to quantify PIIINP, TIMP1 and HA, generating the Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) score.

Abstract

Introduction & Aims

Cryopreservation of serum samples is a standard procedure for biomedical research in tertiary centers. However, studies evaluating the long-term biological stability of direct liver fibrosis markers using cryopreserved samples are scarce.

Methods

We compared the stability of hyaluronic acid (HA), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) and amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) in 225 frozen serum samples of HCV-infected patients with a paired liver biopsy for up to 25 years (1990–2014). Moreover, we assessed the diagnostic accuracy (AUROC) of the Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) score to identify significant fibrosis (F2-4) and its predictive capacity to identify clinical events during follow-up.

Results

Seventy-six patients (39,8%) had mild fibrosis (F0-1) and 115 (60,2%) significant fibrosis (F2-4). HA, PIIINP and TIMP-1 values remained stable during the period from 1995 to 2014 while those of 1990–94 were slightly higher. We did not find significant differences in the median ELF[®] values during the 20-year period from 1995–2014 in patients with mild (from 8,4 to 8,7) and significant fibrosis (from 9,9 to 10,9) ($p = ns$ between periods and fibrosis stages). The AUROCs of ELF[®] to identify significant fibrosis were high in all the periods (from 0,85 to 0,91). The ELF[®] score showed a good predictive capability to identify clinical events during follow-up.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HA, hyaluronic acid; PIIINP, amino-terminal propeptide of type III procollagen; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases; ELF, enhanced liver fibrosis; HABP, hyaluronic acid binding protein; ALT, alanine aminotransferase; Hb, hemoglobin; INR, International Normalized Ratio; APRI, AST to platelet ratio index; AUROC, Area Under the Receiver Operator Curve; PPV, Positive Predictive Value; NPV, Negative Predictive Value; Se, Sensitivity; Sp, Specificity; LR, Likelihood Ratio; SVR, sustained virological response; NRs, non-responders.

Conclusions

The biological stability of direct serum markers (HA, PIIINP and TIMP-1) using HCV-infected samples cryopreserved for 20 years is good. Therefore, the diagnostic accuracy of the ELF[®] score to identify significant fibrosis and clinical events during follow-up is very high.

Introduction

Non-invasive methods involving serum markers or radiological techniques are an essential diagnostic tool to assess liver fibrosis during patient's follow-up [1]. In patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection, significant fibrosis (F2-4) requires the need to start antiviral therapy [2]. Although transient elastography has shown high applicability when performed by experienced operators using the most adequate probe [3], serum markers have the highest applicability. Indirect serum markers are widely used in clinical practice for monitoring patients during follow-up. Moreover, serum markers have demonstrated a good correlation with liver fibrosis stage [4], showing a high diagnostic accuracy to predict histological progression and clinical outcomes [5].

During the last 15 years many fibrosis markers showing good precision to identify or to exclude significant (F2-4) or advanced fibrosis (F3-4) or cirrhosis (F4) have been proposed. Direct serum markers are proteins involved directly in the synthesis or degradation of hepatic extracellular matrix [6]. Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan produced by hepatic stellate cells involved in fibrogenesis; Amino-terminal propeptide of type-III-procollagen (PIIINP) is a marker of inflammation and early fibrogenesis, and tissue inhibitor of metalloproteinase type-1 (TIMP-1) inhibits matrix metalloproteinase, thereby worsening fibrogenesis. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) score is a panel combining these three direct markers (HA, TIMP-1 and PIIINP) that have demonstrated a good correlation with liver fibrosis stage [7-9]. The serum samples used to calculate these markers are often cryopreserved for biomedical research in tertiary centers. However, biomarkers may potentially lose stability due to protein degradation during the storing procedure, which may lead to the observation of lower levels when analyzed after several years [10]. This is crucial in studies evaluating fibrosis progression. Moreover, the recommended storage temperature remains unclear.

Frozen serum samples have demonstrated good stability to identify different biochemical parameters when preserved at -30°C to -80°C [11, 12]. Indeed, storage at -25°C produces a large variation in the stability of different serum components, and is thus considered an unsuitable temperature [13]. Therefore, the stability of serum biomarkers cryopreserved in long-term storage remains controversial. The scarce studies that have evaluated the long-term stability of proteins used tests analyzing accelerated stability, such as the Arrhenius equation [10], to obtain results in a short period of time. Another variable to take into account before analyzing cryopreserved serums is the number of freezing/thawing cycles the samples undergo since freezing/thawing can modify the stability of high molecular weight proteins and polysaccharides.

Thus, the primary aim of our study was to determine the reliability of serum samples of HCV-infected patients cryopreserved over a long period of time to assess significant fibrosis using HA, PIIINP, TIMP-1 and the Enhanced Liver Fibrosis (ELF[®]) score. The secondary aim of our study was to confirm the diagnostic accuracy of the ELF[®] score to identify clinical events during a follow-up of 25 years.

Patients and Methods

Serum samples & liver biopsies

Serum samples and paired liver biopsies of HCV-infected patients cryopreserved from 1990 to 2014 were considered for the study. All the serum samples had been extracted in fasting conditions and centrifuged at 3000 rpm before preservation at -30°C . Serum samples were part of our private collection (C.0000956) of the IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute). The serum samples were identified with a number, and all the data were collected and tabulated in a database with an access code to ensure patient confidentiality. The study protocol was approved by the Ethical Committee of our institution "Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC)- Parc de Salut Mar", study reference 2015/6161/I, in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Patients enrolled from 1990 to May 2006 gave oral informed consent for the use of serum samples in biomedical research, and it was collected in clinical history and electronic medical records. Those enrolled from May 2006 to 2014 provided written informed consent.

The samples were selected according to the date of collection. We considered 5-year periods (1990–94, 1995–99, 2000–2004, 2005–2009 and 2010–2014). Fifty samples were randomly selected from each period with the exception of the first period from which only 25 samples were selected due to the low availability of liver biopsies. The serum samples excluded were: those which had undergone a thawed cycle, those collected later than 24 months after the date of liver biopsy, and those with a fragmented liver biopsy or with less than 6 portal tracts or 10 mm in length.

A single blinded expert pathologist (M.G) revised all the biopsies and scored liver fibrosis stage according to the Metavir classification [14].

Biochemical analysis

Frozen serum samples were transported in frozen conditions using dry ice, and the thawing process was performed in the "Laboratori de Referència de Catalunya S.A, Barcelona". The ELF[®] score is a panel combining three direct markers (HA, TIMP-1 and PIIIINP) [9]. These three markers were analysed by heterogeneous chemiluminescent sandwich-type immunoassays using paramagnetic particles and pairs of monoclonal antibodies with acridinium ester labels and FITC respectively, to capture and quantify PIIIINP and TIMP1, or HA binding protein (HABP) for HA analysis. Automatic XP and CP analysers were used to analyse quality reagents, calibrators and control materials manufactured and marketed, by Siemens Healthcare Diagnostics and Siemens ADVIA CENTAUR. Total standardized variation coefficients (intra- and interserial) along the entire analytical range did not exceed 7,4% for HA, 6,5% for PIIIINP, and 7,3% for TIMP1. The detection ranges were: 1,6–1000 ng/mL for HA, 0,5–150 ng/mL for PIIIINP and 3,5–1300 ng/mL for TIMP1. ELF[®] was automatically generated with an immunochemical analyser (XP and CP SIEMENS ADVIA CENTAUR) using the equation provided by the manufacturer ($2,494 + \text{Index } 0,846 \ln [\text{HA ng/mL}] + 0,735 \ln [\text{PIIINP ng/mL}] + 0,391 \ln [\text{TIMP1 ng/mL}]$).

Bilirubin, alanine aminotransferase (ALT), hemoglobin (Hb), albumin, platelets and international normalized ratio (INR) values, as well as validated indices to assess liver fibrosis [the AST to platelet ratio index (APRI) [15], Forns index [16] and FIB-4 [17]] were calculated using data from fresh blood samples and that obtained from electronic medical records according to previously published formulas, and in all cases from blood analysis within ± 3 months from the date of biopsy.

Study design and end points

The stability of the cryopreserved samples was assessed by comparing the fibrosis markers in different periods and in patients with mild (F0-1) and significant fibrosis (F2-4). The

interpretation of the liver fibrosis stage was performed based on previously published values according to the manufacturer's recommendations: ELF <7,7: no fibrosis (or mild); ELF \geq 7,7 to <9,8: moderate fibrosis; ELF \geq 9,8: severe fibrosis. A new cutoff of ELF \geq 11,3 has recently been described to discriminate cirrhosis [8], and was also analysed. Diagnostic accuracy was defined as the capacity to identify significant fibrosis (METAVIR F2-4).

Follow-up of the patients included was performed using data from electronic medical records. Cirrhosis during follow-up was diagnosed with the appearance of one of the following: thrombocytopenia < 130.000 and splenomegaly during at least 6 months with no other etiology; altered liver structures on abdominal ultrasound; the presence of oesophageal varices or portal hypertensive gastropathy on upper endoscopy; or METAVIR F4 on histological evaluation. Clinical events during follow-up were defined as clinical decompensation (ascites, hepatic encephalopathy, spontaneous bacterial peritonitis or portal hypertension-related bleeding), hepatocellular carcinoma or liver-related death.

Statistical analysis

The sample size to evaluate differences between the diagnostic accuracy of indirect serum markers was estimated on statistical assumptions based on previous data [4, 15, 16, 17]; 186 patients were necessary to achieve significant differences between the AUROCs with an alpha risk of 0,05, a beta risk of 0,10 and a 10% missing rate of data, assuming a correlation with the positive and negative groups of 0,70. Quantitative variables are expressed as medians (range). Differences between qualitative variables were assessed with the Fisher exact test and quantitative variables were analyzed with a non-parametric test (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis for independent samples) in the different study periods and stages of fibrosis. The diagnostic accuracy of ELF[®], Forns Index, APRI and FIB-4 to identify significant fibrosis in different periods was assessed with the Area Under the Receiver Operator Curve (AUROC) and their previously validated cutoffs according to sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and likelihood ratio (LR). *Comparison between ELF[®] and indirect fibrosis markers (Forns, APRI and FIB-4) was performed to show non-inferiority of ELF[®].* The predictive capacity of ELF[®] for previously published cutoffs [8] to identify clinical events during follow-up was calculated using Kaplan-Meier curves. Differences in the baseline characteristics between patients with or without clinical events during follow-up were evaluated by univariate analysis. Variables showing a p value < 0.05 were included in a multivariate forward stepwise logistic regression analysis to identify the independent predictors of clinical events during follow-up. Comparisons between AUROCs were made using the method of Hanley and McNeil [18] and calculated with MedCalc[®] v12.5.0 (MedCalc Software, Maria-kerke, Belgium). The remaining statistical analyses were performed with SPSS[®] 19.0 (SPSS Inc., Chicago IL). All data necessary to reproduce the results of this study have been provided within the manuscript and supporting information files (S1 Database).

Results

Baseline characteristics of the patients included

Two hundred and twenty-five samples from HCV-infected patients were considered for the study (50 samples from five-year periods between 1995 and 2014, and 25 samples from the 1990–94 period). Seven (3,1%) samples were excluded because of the low-quality of liver biopsy and 27 (12%) for having more than 2 years between serum collection and liver biopsy. Thus, 191 samples were finally included. The baseline characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Patients were divided according to the presence or absence of significant fibrosis, considering the importance of this classification in clinical practice. Seventy-six patients (n = 76,

Table 1. Characteristics according to fibrosis stage in HCV-infected patients (N = 191).

	METAVIR 0–1 (Mild fibrosis) (n = 76, 39,8%)	METAVIR 2–4 (Significant fibrosis) (n = 115, 60,2%)	p
Age (years)	40,5 (18,1–67,2)	47,7 (23,5–73,1)	<0,001
Gender (male, %)	47 (61,8)	80 (69,6)	ns
Bilirubin (mg/dL)	0,7 (0,1–2)	0,8 (0,3–2,2)	0,024
ALT (IU)	56 (15–845)	115 (13–553)	<0,001
Albumin (g/dL)	4,4 (3,5–5,1)	4,3 (3–5)	0,002
Platelets (10 ⁹)	222 (71–373)	165 (48–385)	<0,001
INR	1,01 (0,82–1,25)	1,04 (0,9–1,65)	<0,001
Hb (g/dl)	14,8 (10,7–18)	14,9 (10,2–17,7)	ns
ELF® score	8,5 (7,2–12,1)	10,3 (8–14,1)	<0,001
Forns index	3,8 (-0,2–9)	6,5 (2,1–11,4)	<0,001
APRI	0,5 (0,2–12)	1,3 (0,2–6,6)	<0,001
FIB-4	0,97 (0,3–13,1)	2,4 (0,6–16,8)	<0,001
Length of LB (mm)	20 (13–40)	16 (10–34)	<0,001

HCV, hepatitis C virus; ALT, alanine aminotransferase; INR, International Normalized Ratio; Hb, hemoglobin; ELF, Enhanced Liver Fibrosis; APRI, AST to platelet ratio index; LB, liver biopsy

doi:10.1371/journal.pone.0164883.t001

39,8%) had mild fibrosis (METAVIR F0-1) and 115 (60,2%) significant fibrosis (METAVIR F2-4). Patients with significant fibrosis were older, had lower albumin levels and platelet counts, and higher bilirubin, ALT, and INR values and fibrosis markers compared to those with mild fibrosis ($p < 0,05$ all). We did not find significant differences in the proportion of patients for each fibrosis stage (F0-4) in the different periods (Table 2).

Bio-stability of direct fibrosis markers and the ELF® score during long periods

The median values of the serum biomarkers (HA, PIIINP, TIMP-1) and the ELF® score according to the fibrosis stage in each 5-year time period are depicted in Table 3. Among patients with mild fibrosis (n = 76, 39,8%) the median HA (from 20,2 to 24,4), PIIINP (from 6,1 to 7,5) and TIMP-1 values (from 182,1 to 215,1) were stable in the periods from 1995 to 2014 (all $p = ns$). Moreover, the median values of the ELF® score were nearly equal (from 8,4 to 8,7) in 1995–2014 periods ($p = ns$). The median HA and TIMP-1 values in the first period studied (1990–94) were similar, with only PIIINP (13,9) differing ($p = 0,009$). However, the ELF® score remained stable in the first period (9,6; $p = ns$).

Among patients with significant fibrosis (n = 115, 60,2%) the median HA (from 73,5 to 135,6), PIIINP (from 9,9 to 11,9), and TIMP-1 values (from 285,9 to 356,8) and ELF® (from

Table 2. Distribution of HCV-infected patients in every single fibrosis stage (N = 191).

PERIOD N (%) METAVIR N (%)	1990–94 (n = 18, 9,4%)	1995–99 (n = 37, 19,4%)	2000–04 (n = 44, 23%)	2005–09 (n = 45, 23,6%)	2010–14 (n = 47, 24,6%)	p
F0 (n = 36, 18,8%)	1 (5,6)	8 (21,6)	9 (20,5)	8 (17,8)	10 (21,3)	ns
F1 (n = 40, 20,9%)	4 (22,2)	8 (21,6)	8 (18,2)	10 (22,2)	10 (21,3)	ns
F2 (n = 43, 22,5%)	4 (22,2)	10 (27)	8 (18,2)	10 (22,2)	11 (23,4)	ns
F3 (n = 34, 17,8%)	4 (22,2)	5 (13,5)	10 (22,7)	10 (22,2)	5 (10,6)	ns
F4 (n = 38, 19,9%)	5 (27,8)	6 (16,2)	9 (20,5)	7 (15,6)	11 (23,4)	ns

doi:10.1371/journal.pone.0164883.t002

Table 3. Serum markers (HA, PIIINP, TIMP-1) and ELF[®] values according to fibrosis stage in each 5-year time period.

	1990–94 (n = 18, 9,4%)	1995–99 (n = 37, 19,4%)	2000–04 (n = 44, 23%)	2005–09 (n = 45, 23,6%)	2010–14 (n = 47, 24,6%)	p ¹	p ²
Mild Fibrosis (F0-1) (n = 76, 39,8%)	N = 5	N = 16	N = 17	N = 18	N = 20		
HA	43,1 (31,7–128,2)	24,4 (8–535,5)	21,5 (8,3–300,1)	20,2 (7,6–258,6)	23,6 (10,5–106,3)	ns	ns
PIIINP	13,9 (9,9–20,2)	7,5 (4,1–15,2)	6,1 (3,7–21,8)	6,5 (4,2–10,3)	6,6 (4,1–11,8)	0,009	ns
TIMP-1	190,6 (159,3–296,8)	212,4 (83,8–339,3)	215,1 (96,6–389,9)	184,7 (64,6–277,1)	182,1 (63,5–349,9)	ns	ns
ELF	9,6 (9,2–11)	8,7 (7,2–12,1)	8,5 (7,4–11,9)	8,4 (7,2–10,5)	8,5 (7,5–10,2)	ns	ns
Significant Fibrosis (F2-4) (n = 115, 60,2%)	N = 13	N = 21	N = 27	N = 27	N = 27		
HA	356,8 (31,7–2179,6)	83,2 (26,3–895,4)	84,2 (14,8–979,7)	73,5 (15,3–1066,6)	135,6 (26,5–780)	0,047	ns
PIIINP	13,3 (10–44,2)	10,2 (4,2–29,5)	11,9 (4,6–25,7)	9,9 (5,7–32,7)	11,2 (4,7–30,1)	0,041	ns
TIMP-1	370 (213,7–869,3)	285,9 (109,2–408,9)	356,8 (198,6–550,1)	290,4 (127,9–624,9)	353,2 (123,6–484,9)	0,054	ns
ELF	11,7 (9,2–14,1)	10,1 (8,6–13)	10,3 (8–13,1)	9,9 (8,5–12,8)	10,9 (8,6–12,6)	0,027	ns

doi:10.1371/journal.pone.0164883.t003

9,9 to 10,9) were stable from 1995 to 2014 (p = ns all). Samples from the first period (1990–94) showed higher median HA (356,8; p = 0,047), PIIINP (13,3; p = 0,041) and TIMP-1 values (370; p = 0,054), and ELF[®] (11,7; p = 0,027).

Diagnostic accuracy of ELF[®] to identify significant fibrosis (F2-4) using cryopreserved serum samples

We calculated the AUROC of the ELF[®] score to identify significant fibrosis (METAVIR F2-4) in cryopreserved serums. Including all the study periods (n = 191) the AUROC to identify significant fibrosis was 0,868 (Fig 1). No significant differences were observed between the AUROCs (95% CI) of indirect serum markers in any period of time (Table 4). Moreover, on comparing the AUROCs of the ELF[®] score among the different periods no significant differences were found ranging from 0,853 to 0,911 (p = ns). The AUROCs of the Forns Index, APRI and FIB-4 including all the periods were 0,852, 0,845 and 0,858, respectively (Fig 1). On the other hand, the AUROCs of the Forns Index for the different periods ranged from 0,786 to 0,883, being from 0,769 to 0,887 for the APRI; and from 0,805 to 0,906 for FIB-4.

Using the previously validated cutoffs of ELF[®] score, we found a good diagnostic accuracy of frozen serum samples to identify significant fibrosis with a positive predictive value (PPV) of 84% and specificity (Sp) of 80,3% similar to FIB-4 calculated with fresh blood samples (87% and 82,9%, respectively) (p = ns in both cases) (Table 5). In contrast, Forns Index showed good negative predictive value (NPV) and sensitivity (Se) (78,3% and 88,7%) similar to APRI (75,5% and 88,7%, respectively) (p = ns in both cases).

Predictive capacity of the ELF[®] score to identify clinical events during follow-up

One hundred and seventy patients (n = 170, 89%) received HCV-antiviral treatment during follow-up. Among the treated patients, 104 (61,2%) achieved sustained virological response (SVR) and 66 (38,8%) were non-responders (NRs). On multivariate analysis, only SVR [OR = 0,06 (0,01–0,33), p = 0,002] was related to the absence of clinical events. Only 2 patients with SVR presented a clinical event during follow-up, with both patients developing hepatocellular carcinoma and having a high ELF[®] score ≥ 11,3 (Fig 2).

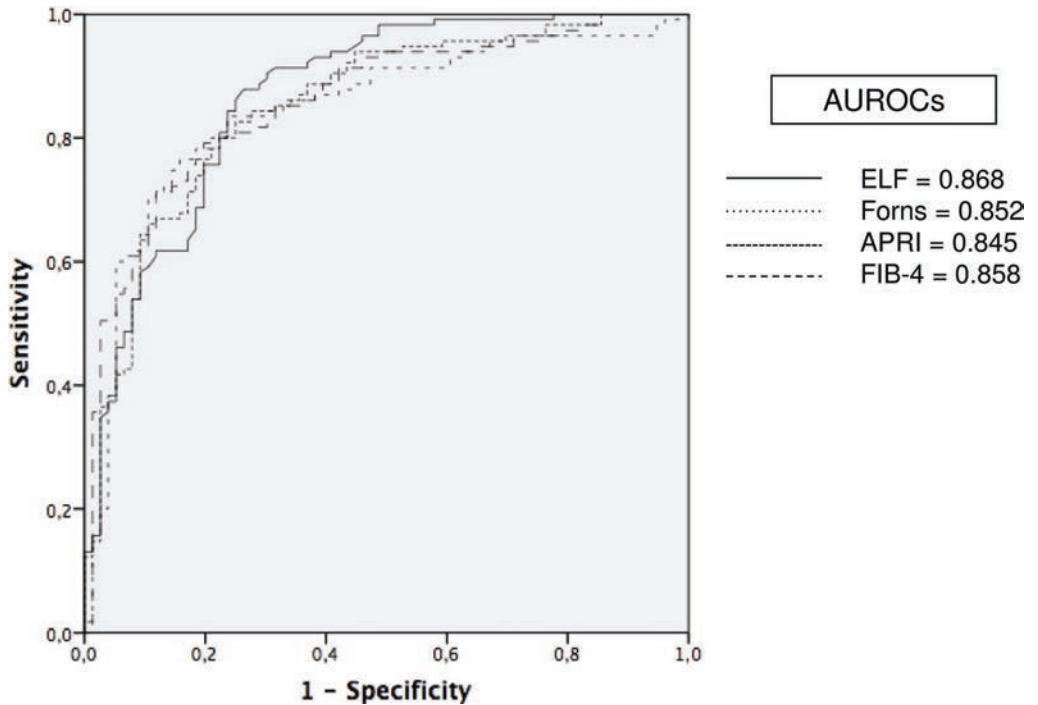


Fig 1. Diagnostic accuracy (AUROCs) of indirect (Forns, APRI, FIB-4) and direct (ELF) scores to identify significant fibrosis (F2-4).

doi:10.1371/journal.pone.0164883.g001

As SVR was the only variable related with the development of clinical events, we divided the cohort into patients with or without SVR. Among NRs and non-treated patients (n = 87), 22 (25,3%) developed at least one clinical event during a median follow-up of 6,2 years. On multivariate analysis, the ELF[®] score [OR = 2,31 (1,39–3,85), p = 0.001] and FIB-4 [OR = 2,09 (1,46–2,98), p = 0,001] were the only variables independently related to the probability of developing a clinical event during follow-up. According to the previously published cutoffs (8), only 3,2% (n = 1/31) patients with a low ELF[®] score < 9.7 (n = 31, 35,6%) presented clinical events while 17,2% (n = 5/29) of the patients with intermediate ELF[®] scores 9,8–11,2 (n = 29, 33,3%) presented events, and nearly 3 out of 4 cases (73,7%, n = 16/27) with a high ELF[®] score ≥ 11,3 (n = 27, 31%) developed clinical events. Moreover, the event-free survival

Table 4. Diagnostic accuracy (AUROCs, 95% CI) of indirect (Forns, APRI, FIB-4) and direct (ELF) scores (N = 191) to identify significant fibrosis in each 5-year time period.

AUROC n (%)	ELF [®]	FORNS	FIB-4	APRI	p
1990–94 18 (9,4)	0,854 (0,676–1)	0,815 (0,574–1)	0,831 (0,529–1)	0,769 (0,424–1)	ns
1995–99 37 (19,4)	0,869 (0,739–0,999)	0,786 (0,636–0,935)	0,863 (0,744–0,982)	0,887 (0,773–1)	ns
2000–04 44 (23)	0,866 (0,740–0,992)	0,882 (0,785–0,980)	0,906 (0,814–0,998)	0,869 (0,760–0,979)	ns
2005–09 45 (23,6)	0,853 (0,739–0,967)	0,842 (0,722–0,962)	0,805 (0,672–0,940)	0,800 (0,660–0,940)	ns
2010–14 47 (24,6)	0,911 (0,831–0,992)	0,883 (0,781–0,986)	0,822 (0,705–0,939)	0,819 (0,696–0,941)	ns

doi:10.1371/journal.pone.0164883.t004

Table 5. Diagnostic accuracy (PPV, NPV, Se, Sp) of indirect (Forns, APRI, FIB-4) and direct (ELF) scores (N = 191) to identify significant fibrosis according to their previously validated cutoffs.

Validated cutoffs to identify F2-4 n (%)	F0-1 76 (39,8)	F2-4 115 (60,2)	PPV	NPV	Se	Sp	LR+
ELF $\geq 9,8$ ^[9] 94 (49,2)	15 (16)	79 (84)	84	62,9	68,7	80,3	3,5
Forns $\geq 4,2$ ^[16] 131 (68,6)	29 (22,1)	102 (77,9)	77,9	78,3	88,7	61,8	2,3
FIB-4 $\geq 1,45$ ^[17] 100 (52,4)	13 (13)	87 (87)	87	69,2	75,6	82,9	4,4
APRI $\geq 0,5$ ^[15] 138 (72,3)	36 (26,1)	102 (73,9)	73,9	75,5	88,7	52,6	1,9

PPV, Positive Predictive Value; NPV, Negative Predictive Value; Se, Sensitivity; Sp, Specificity; LR+, Positive Likelihood Ratio

doi:10.1371/journal.pone.0164883.t005

rate at 10 and 20-years of follow-up was 100% and 95% in patients with ELF[®] scores < 9,7, 95% and 30% in patients with intermediate ELF[®] (9,8–11,2), and 30% and 20% in those with high ELF[®] scores $\geq 11,3$ (Log Rank: $p < 0,001$) (Fig 2).

Discussion

To our knowledge this is the first study to describe the stability of direct fibrosis markers (HA, PIIINP and TIMP-1) in samples cryopreserved for more than 20 years. Moreover, we found

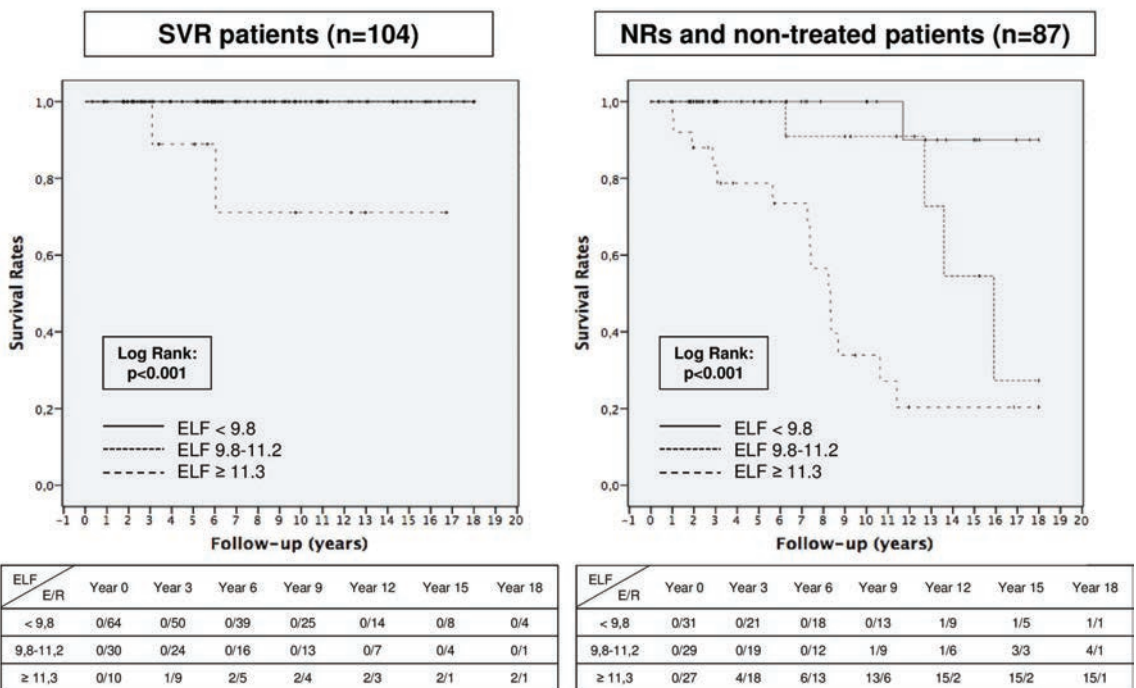


Fig 2. Predictive capacity of the ELF[®] score to identify clinical events during follow-up using cryopreserved samples according to HCV-antiviral treatment response (n = 191). Data of number of events (E) and patients at risk (R) in every 3 years time period.

doi:10.1371/journal.pone.0164883.g002

that the diagnostic accuracy and predictive capacity of these cryopreserved samples remained unaltered following long-term storage. This is especially important for reference centers assessing fibrosis progression using retrospective samples.

In the present study we selected frozen samples from our biobank according to the date of cryopreservation rather than using an accelerated stability test [10] in order to evaluate the bio-stability of serum markers stored for up to 25 years. The median values of HA, PIIINP and TIMP-1 in patients with mild fibrosis remained highly stable over a period of 20 years. Moreover, HA, PIIINP and TIMP-1 values were higher in patients with significant fibrosis according to fibrosis stage. However, we observed increased HA and PIIINP values in the first period (1990–1994), while TIMP-1 values and the ELF[®] score remained stable. Since a lack of stability during cryopreservation leads to sample degradation and decreased values [10], the differences in the first period are probably due to the low number of samples included. A larger number of samples is therefore necessary to make solid conclusions regarding stability after 20 years of cryopreservation. Importantly, the diagnostic accuracy of the ELF[®] score was high (AUROC = 0,868), without differences in identifying significant fibrosis among the different periods, with AUROCs ranging from 0,853 to 0,911. Moreover, we did not find significant differences when compared ELF[®] with indirect serum markers (Forns, FIB-4 and APRI) obtained from electronic medical records and calculated from fresh blood samples. Thus, a high diagnostic accuracy was observed, thereby confirming the stability of the biomarkers analysed (HA, PIIINP and TIMP-1) in frozen serum samples stored for up to 25 years.

Our secondary aim was to assess the predictive capacity of the ELF[®] score using cryopreserved samples to identify patients at risk of developing clinical events during follow-up. The ELF[®] score and FIB-4 were the only independent variables related to the probability of developing clinical events in NRs and non-treated patients. In our study, patients with a low ELF[®] score < 9,7 showed no risk of developing clinical decompensation and the event-free rate was nearly 100% at 10 and 20 years of follow-up. However, intermediate values of the ELF[®] score (9,8–11,2) showed high event-free rates during the first 10–15 years, but an acceleration of liver disease progression after this period. On the other hand, the low number of patients at risk, especially after 6–9 years of follow-up, limits solid decision making. These findings should be confirmed in prospective studies including a larger number of patients. Importantly, patients with a high ELF[®] score $\geq 11,3$ presented a high proportion of clinical events even during the first 5 years of follow-up. These results confirm the need for antiviral treatment in patients with ELF[®] values > 9,7 and urgent treatment and close monitoring in those with an ELF[®] score $\geq 11,3$. Moreover, 2 out of 10 (20%) patients with SVR and an ELF[®] score $\geq 11,3$ developed hepatocellular carcinoma, thereby demonstrating the need for follow-up despite achieving SVR.

In conclusion, our study shows that analysis of high molecular weight substances such as direct fibrosis markers in frozen serum samples remain stable for at least 20 years. Moreover, the ELF[®] score showed very good diagnostic accuracy to identify significant fibrosis in cryopreserved samples, being similar to or even better than the other indirect markers [15, 16, 17] analyzed in fresh samples. Finally, the predictive capacity of the ELF[®] score to identify patients at risk of progression of liver disease is very high, being useful to recommend treatment initiation or close monitoring in HCV-infected patients.

Supporting Information

S1 Database. Database. Minimal necessary data to reproduce the study results. (XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: MP JH JAC.

Data curation: MP JAC.

Formal analysis: MP JH JAC.

Funding acquisition: JAC.

Investigation: MP JH MDG MS RS JAC.

Methodology: MP JAC.

Supervision: JAC.

Writing – original draft: MP JH TB SC MGR NC MG FB MS RS JAC.

Writing – review & editing: MP JH JAC.

References

1. Castera L, Bedossa P. How to assess liver fibrosis in chronic hepatitis C: serum markers or transient elastography vs. liver biopsy? *Liver Int* 2011; 31 Suppl 1:13–17.
2. European Association for the Study of the L. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014. *J Hepatol* 2014; 61:373–395. doi: [10.1016/j.jhep.2014.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.001) PMID: [24818984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818984/)
3. Carrion JA, Puigvehi M, Coll S, Garcia-Retortillo M, Canete N, Fernandez R, Marquez C, et al. Applicability and accuracy improvement of transient elastography using the M and XL probes by experienced operators. *J Viral Hepat* 2014.
4. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann Intern Med* 2013; 158:807–820. doi: [10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00005](https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00005) PMID: [23732714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23732714/)
5. Vergniol J, Foucher J, Terrebbonne E, Bernard PH, le Bail B, Merrouche W, Couzigou P, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140:1970–1979, 1979 e1971-1973. doi: [10.1053/j.gastro.2011.02.058](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.058) PMID: [21376047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376047/)
6. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127:1704–1713. PMID: [15578508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15578508/)
7. Parkes J, Guha IN, Roderick P, Harris S, Cross R, Manos MM, Irving W, et al. Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test accurately identifies liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2011; 18:23–31. doi: [10.1111/j.1365-2893.2009.01263.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01263.x) PMID: [20196799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20196799/)
8. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol* 2013; 59:236–242. doi: [10.1016/j.jhep.2013.03.016](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.016) PMID: [23523583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23523583/)
9. Xie Q, Zhou X, Huang P, Wei J, Wang W, Zheng S. The performance of enhanced liver fibrosis (ELF) test for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9:e92772. doi: [10.1371/journal.pone.0092772](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092772) PMID: [24736610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24736610/)
10. Kisand K, Kerna I, Kumm J, Jonsson H, Tamm A. Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:229–235. doi: [10.1515/CCLM.2011.049](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.049) PMID: [21118050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118050/)
11. DiMagno EP, Corle D, O'Brien JF, Masnyk IJ, Go VL, Aamodt R. Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. *Mayo Clin Proc* 1989; 64:1226–1234. PMID: [2593713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2593713/)
12. Reed AB, Ankerst DP, Leach RJ, Vipraio G, Thompson IM, Parekh DJ. Total prostate specific antigen stability confirmed after long-term storage of serum at -80C. *J Urol* 2008; 180:534–537; discussion 537–538. doi: [10.1016/j.juro.2008.04.021](https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.04.021) PMID: [18550121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550121/)
13. Gislefoss RE, Grimsrud TK, Morkrid L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:596–603. doi: [10.1515/CCLM.2009.121](https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.121) PMID: [19290843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19290843/)

14. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24:289–293. doi: [10.1002/hep.510240201](https://doi.org/10.1002/hep.510240201) PMID: [8690394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8690394/)
15. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:518–526. doi: [10.1053/jhep.2003.50346](https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346) PMID: [12883497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12883497/)
16. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36:986–992. doi: [10.1053/jhep.2002.36128](https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36128) PMID: [12297848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12297848/)
17. Sterling R, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Cassia Correa M, Montaner J, Sulkowski M, et al. Development of a Simple Noninvasive Index to Predict Significant Fibrosis in Patients With HIV/HCV Coinfection. *Hepatology*. 2006 Jun; 43(6):1317–25 doi: [10.1002/hep.21178](https://doi.org/10.1002/hep.21178) PMID: [16729309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16729309/)
18. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983; 148:839–843. doi: [10.1148/radiology.148.3.6878708](https://doi.org/10.1148/radiology.148.3.6878708) PMID: [6878708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6878708/)

8. DISCUSSIÓ GENERAL

8. DISCUSSIÓ GENERAL

Les importants limitacions de la biòpsia hepàtica han promogut l'avaluació de marcadors no invasius, tant serològics com radiològics, per identificar els pacients amb fibrosi hepàtica. Un dels principals avantatges dels marcadors serològics és la facilitat per emmagatzemar mostres de sèrum congelades per la seva utilització en recerca biomèdica, però la seva estabilitat a llarg termini no ha estat ben avaluada. D'altra banda, l'ET ha suposat un canvi molt significatiu en l'avaluació dels pacients amb MCF, permetent una avaluació no invasiva, senzilla i amb una fiabilitat diagnòstica molt bona, però la seva aplicabilitat depèn de l'experiència de l'explorador i del grau d'obesitat del pacient.

El primer estudi de la tesi ha demostrat l'estabilitat de marcadors directes de fibrosi (AH, PIIIINP i TIMP-1) en mostres criopreservades durant més de 20 anys segons la seva fiabilitat diagnòstica per identificar pacients amb fibrosi significativa, en lloc d'utilitzar un mètode d'estabilitat accelerada ⁴⁹. L'estudi ha demostrat que la fiabilitat diagnòstica i la capacitat predictiva de l'ELF en mostres criopreservades van romandre inalterades després de períodes llargs de congelació. En aquest estudi els valors d'AH, PIIIINP i TIMP-1 en pacients amb fibrosi lleu es van mantenir molt estables durant un període de 20 anys. A més, els valors d'AH, PIIIINP i TIMP-1 van ser més alts en pacients amb fibrosi significativa d'acord amb l'estadi de fibrosi. És important destacar que la fiabilitat diagnòstica de l'ELF va ser alta (AUROC=0.868), sense diferències en la identificació de fibrosi significativa entre els diferents períodes, amb AUROCs que van ser des de 0.853 a 0.911.

Respecte als valors d'AH i PIIIINP elevats observats en el primer període (1990-1994), amb valors estables de TIMP-1 i ELF, es podrien deure al nombre limitat de mostres incloses en aquest període, donat que una falta d'estabilitat durant la criopreservació hagués implicat una major degradació i per tant la disminució dels valors ⁴⁴. Per tant, l'estudi no pot demostrar de manera sòlida una estabilitat de les mostres més enllà dels 20 anys de criopreservació.

L'objectiu secundari del primer estudi va ser avaluar la capacitat predictiva de l'ELF per identificar pacients en risc de desenvolupar esdeveniments clínics durant el seguiment utilitzant mostres criopreservades. Per fer-ho, es va dividir la cohort entre pacients curats (RVS) o no curats (NRs) del VHC, considerant la importància capital que té la resposta viral sostinguda en l'evolució d'aquests pacients ¹³². En pacients NRs, aquells amb un ELF < 9.8 no van mostrar risc de descompensació clínica i la proporció d'esdeveniments adversos va del 0% i 5% als 10 i 20 anys de seguiment. En canvi, els pacients amb valors intermedis d'ELF (9.8-11.2) no van presentar esdeveniments durant els primers 10-15 anys, però posteriorment s'observà una acceleració de la progressió de la malaltia hepàtica, tot i que el nombre de pacients va ser limitat (proporció d'esdeveniments clínics del 5% i 70% als 10 i 20 anys, respectivament). D'altra banda, els pacients amb ELF \geq 11.3 van presentar una alta proporció d'esdeveniments clínics, fins i tot durant els primers 5 anys de seguiment (70% i 80% als 10 i 20 anys, respectivament). Aquests resultats confirmen la necessitat de tractament antiviral en pacients amb valors ELF \geq 9.8 i tractament urgent i una estreta vigilància en aquells amb ELF \geq 11.3. D'altra banda, en pacients amb RVS, 2 dels 10 (20%) pacients que presentaven un ELF \geq 11.3 van desenvolupar carcinoma hepatocel·lular, reforçant les recomanacions de les guies internacionals sobre la necessitat de seguiment d'aquests pacients tot i assolir la curació del VHC ¹³³.

El segon estudi d'aquesta tesi va demostrar la importància de la re-avaluació d'ET, especialment en aquells pacients amb factors de risc (edat > 58 anys, IMC > 28 Kg/m² i PA > 98 cm) per obtenir un resultat inadequat amb la sonda M (LSM1), ja que una segona avaluació per exploradors experts (LSM2) no només va mostrar una milloria significativa de l'aplicabilitat, assolint un major nombre de resultats adequats, sinó també una fiabilitat diagnòstica millor, identificant un major nombre de pacients amb fibrosi significativa segons la biòpsia.

Les variables associades a l'obesitat (major IMC i major PA) i les relacionades amb malaltia hepàtica avançada (major edat, menors nivells d'albumina i valors d'ET més alts) es van relacionar amb la probabilitat d'obtenir un resultat inadequat amb la sonda M realitzada per exploradors entrenats (< 500 exploracions). A més, es va observar una

proporció creixent de variables relacionades amb l'obesitat entre aquells pacients amb una LSM1 adequada o aquells amb RIQ/RH > 30% en comparació amb aquells amb una Rati < 60% o sense valors. Els individus amb un RIQ/RH > 30% presentaven característiques basals similars a aquells amb una LSM1 adequada (IMC > 28 Kg/m² en 23% i PA > 98 en 22% dels casos), i aquells amb una Rati < 60% foren similars als pacients sense valors (IMC > 28 Kg/m² en 79% i PA > 98 en 80% dels casos) (p<0.001 en ambdós casos). Per tant, la re-avaluació amb la sonda M (LSM2) per exploradors experts dels pacients amb un RIQ/RH > 30% va aconseguir un 92% de valors adequats. Així, aquest segon estudi va demostrar la importància de l'experiència de l'explorador més que les pròpies característiques dels pacients en aquest subgrup, sense requerir per tant l'ús de la sonda XL. En aquesta línia, els criteris de fiabilitat de l'ET, basats en la importància del RIQ, han quedat redefinits ⁹⁷.

D'altra banda, tant una DPC com un PA elevats es van relacionar de forma independent amb l'obtenció d'un resultat inadequat per part d'exploradors experts en els pacients amb un primer resultat inadequat (LSM2). Això posa de manifest la necessitat de considerar la utilització de la sonda XL (veure conclusions del tercer estudi) en pacients amb obesitat. Donada la importància de la DPC per identificar els pacients en risc d'obtenir un resultat inadequat per part d'exploradors experts amb la sonda M, es van analitzar les variables antropomètriques relacionades de forma independent, que foren el PA i l'IMC.

Tot i l'associació directa entre la DPC i l'obtenció de mesures inadequades, el segon estudi de la tesi no va aconseguir demostrar que l'ús d'una ecografia abdominal portàtil per guiar la sonda M en pacients obesos obtingués una major aplicabilitat, però el nombre limitat de pacients avaluats i la milloria de l'experiència de l'operador durant el seguiment no permeten treure conclusions sòlides. D'altra banda, ja vam descriure que el 52.4% dels pacients amb un PA > 98 cm tenien una DPC < 25 mm, suggerint que un subgrup de pacients obesos es podia avaluar amb la sonda M.

El tercer estudi de la tesi ha demostrat que, malgrat avaluar una cohort de pacients amb sobrepès i obesitat (64.3% amb IMC > 30 Kg/m² i mediana de PA de 107 cm) la

proporció de pacients amb DPC > 25 mm va ser molt baixa, de tant sols el 13.6%. Aquest estudi ha demostrat una aplicabilitat molt alta de la sonda M en una cohort àmplia de pacients amb sobrepès i obesitat. Per tant, la sonda XL no és necessària en la immensa majoria dels pacients amb sobrepès i obesitat grau I ($IMC < 35 \text{ kg/m}^2$) si l'avaluació és realitzada per un explorador expert, en contra del que es recomana a les guies clíniques actuals, i que pot comportar infraestimació del grau de fibrosi ^{28,102}.

L'estudi va demostrar que si es pot determinar la DPC mitjançant un ecògraf, la sonda M és aplicable en el 89.2% dels pacients amb obesitat grau II-III quan la DPC és < 25 mm. Pel contrari, quan la DPC és > 25 mm l'aplicabilitat de la sonda M disminueix a menys del 50%, i per tant el seu ús no és recomanable ¹⁰². Així, donat que la mesura de la DPC no es realitza de manera rutinària en pràctica clínica, en el tercer estudi vam desenvolupar un arbre de decisió senzill utilitzant els resultats de dos variables antropomètriques (l'IMC i el PA) que permet identificar els pacients amb DPC < 25 mm, i per tant candidats a ser avaluats amb la sonda M. Aquest arbre de decisió va demostrar que la sonda M és aplicable a gairebé el 95% dels pacients amb sobrepès i obesitat grau I ($IMC \leq 35 \text{ kg/m}^2$ i $PA \leq 117 \text{ cm}$), que són el 75% dels pacients amb $IMC \geq 28 \text{ kg/m}^2$ del nostre estudi. A més, la sonda M va demostrar una fiabilitat diagnòstica alta per identificar esteatosi (AUROC 0.76), fibrosi significativa (AUROC 0.89) i cirrosi (AUROC 0.96) en aquest grup de pacients. D'altra banda, la sonda XL va demostrar una aplicabilitat excel·lent en pacients amb $IMC \geq 28 \text{ kg/m}^2$, amb una taxa de resultats inadequats de només el 2% malgrat el 64.3% eren obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) i 18.8% grau II-III ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$). Per tant, la sonda XL s'ha d'utilitzar en pacients amb obesitat grau II-III ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) o en aquells amb PA molt alt (> 117 cm).

L'alta aplicabilitat de la sonda M en pacient amb sobrepès i obesitat grau I descrita en aquest treball és similar a la descrita anteriorment en la població general ⁹⁹ i és millor que la descrita en altres estudis amb població similar ^{102,106,134}, probablement degut a la gran experiència adquirida a la nostra unitat. En aquesta línia, cal remarcar que es va assolir un valor molt fiable ($RIQ/RH \leq 0.10$) segons els nous criteris de fiabilitat en més de la meitat dels pacients del tercer estudi ($n=499$, 51.8%) malgrat ser una cohort de pacients amb alta prevalença d'obesitat.

Estudis previs han demostrat que els valors d'ET amb la sonda XL són més baixos que amb la sonda M, i que per tant cal validar nous punts de tall en les diferents malalties hepàtiques ¹⁰⁴ o utilitzar fórmules de correcció ¹⁰⁶. D'altra banda, un IMC > 30 kg/m² s'ha associat recentment amb valors més alts de RH amb la sonda M en pacients amb NAFLD independentment de l'estadi de fibrosi ¹⁰⁸. Però, el nostre estudi ha demostrat que en pacients amb obesitat grau II-III (IMC > 35 kg/m²) o en aquells amb PA molt alt (> 117 cm) els valors d'ET amb la sonda XL van ser similars als dels pacients amb un IMC ≤ 35 Kg/m² i PA ≤ 117 cm avaluats amb la sonda M un cop aparellats per nivells de fibrosi, esteatosi i ALT, confirmant la necessitat de l'avaluació amb sonda XL d'aquests pacients. Per tant, la correcció dels valors amb la sonda XL en pacients amb un IMC > 35 kg/m² podria sobreestimar l'estadi de fibrosi. D'altra banda, la major taxa de DPC > 25 mm en pacients amb IMC ≥ 35 kg/m² suggereix que l'avaluació amb la sonda XL aporta valors més reals en pacients amb obesitat grau II-III. No obstant això, el nombre baix de pacients inclosos amb biòpsia hepàtica no permet conclusions sòlides respecte a la fiabilitat diagnòstica amb la sonda XL, pel que seran necessaris estudis prospectius comparats amb biòpsia hepàtica per confirmar aquestes dades. Una altra limitació és la inclusió de pacients amb diferents etiologies de malaltia hepàtica, amb prevalences diferents de fibrosi i esteatosi, però tot i això la majoria dels pacients inclosos tenien hepatitis vírica o FGNA, pel que la gran població de l'estudi pot homogeneïtzar els resultats.

9. CONCLUSIONS

9. CONCLUSIONS

1. L'ELF mostra una bona precisió diagnòstica per identificar fibrosi significativa en mostres criopreservades durant almenys 20 anys. Això confirma que els marcadors directes de fibrosi (PIIINP, TIMP-1 i AH) es mantenen estables en mostres congelades.
2. La capacitat predictiva de l'ELF per identificar pacients amb risc de progressió de la malaltia hepàtica és bona, i per tant és útil per recomanar l'inici del tractament antiviral o la necessitat de vigilància en pacients infectats pel VHC.
3. La re-avaluació per exploradors experts (> 500 exploracions) permet augmentar la taxa d'exploracions adequades d'ET.
4. La re-avaluació per exploradors experts (> 500 exploracions) permet augmentar la fiabilitat diagnòstica per identificar pacients amb fibrosi significativa.
5. L'obtenció de mesures inadequades per part d'exploradors experts està relacionada amb l'obesitat (IMC i PA), i sobretot amb una DPC > 25 mm.
6. L'aplicabilitat de la sonda M en pacients amb obesitat grau I (IMC \leq 35 Kg/m²) i PA \leq 117 cm arriba al 95%.
7. La fiabilitat diagnòstica per identificar esteatosi, fibrosi significativa o cirrosi de la sonda M és molt bona en pacients amb obesitat grau I (IMC \leq 35 Kg/m²) i PA \leq 117 cm.
8. L'aplicabilitat de la sonda XL en pacients amb obesitat grau II-III (IMC > 35 Kg/m²) arriba al 98%.
9. Els valors de la sonda XL en pacients amb obesitat grau II-III (IMC > 35 Kg/m²) i/o PA > 117 cm són similars als obtinguts amb la sonda M en pacients amb obesitat grau I (IMC \leq 35 Kg/m²) i PA \leq 117 cm, però calen estudis amb un número major de biòpsies per comparar la fiabilitat diagnòstica d'ambdues sondes.

10. BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

1. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C. & Roudot-Thoraval, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* **58**, 593–608 (2013).
2. Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D. & Pinzani, M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J. Hepatol.* **62**, S15–S24 (2015).
3. Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655–1669 (2008).
4. Poynard, T., Bedossa, P. & Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* **349**, 825–832 (1997).
5. Shima, T. *et al.* Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J. Gastroenterol.* **48**, 515–525 (2013).
6. Wadhawan, M., Vij, V., Makki, K., Bansal, N. & Kumar, A. Early Acute Severe HCV Recurrence After Transplantation: From Universal Mortality to Cure. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **7**, 28–32 (2017).
7. Yano, M. *et al.* The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23**, 1334–1340 (1996).
8. Everhart, J. E. *et al.* Prognostic value of ishak fibrosis stage: Findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology* **51**, 585–594 (2010).
9. Campana, L. & Iredale, J. P. Regression of Liver Fibrosis. *Semin Liver Dis* **37**, 1–10 (2017).
10. Menghini G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* **35**, 190–9 (1958).
11. Bravo AA, Sheth SG, C. S. Liver biopsy. *NEJM* **344**, 495–500 (2001).
12. Regev, A. *et al.* Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 2614–2618 (2002).
13. Bedossa, P., Dargère, D. & Paradis, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 1449–1457 (2003).
14. Colloredo, G., Guido, M., Sonzogni, A. & Leandro, G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: The smaller the sample, the milder the disease. *J. Hepatol.* **39**, 239–244 (2003).
15. Rousselet, M. C. *et al.* Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* **41**, 257–264 (2005).
16. Myers, R. P., Fong, A. & Shaheen, A. A. M. Utilization rates, complications and costs of percutaneous liver biopsy: A population-based study including 4275 biopsies. *Liver Int.*

- 28**, 705–712 (2008).
17. Rockey, D. C., Caldwell, S. H., Goodman, Z. D., Nelson, R. C. & Smith, A. D. Liver biopsy. *Hepatology* **49**, 1017–1044 (2009).
 18. Ble, M., Procopet, B., Miquel, R., Hernandez-Gea, V. & García-Pagán, J. C. Transjugular liver biopsy. *Clin. Liver Dis.* **18**, 767–778 (2014).
 19. Jimenez, W. *et al.* Measurement of fibrosis in needle liver biopsies: evaluation of a colorimetric method. *Hepatology* **5**, 815–8
 20. Bedossa, P. & Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* **24**, 289–293 (1996).
 21. Ishak, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* **22**, 696–699 (1995).
 22. Duarte-rojo, A. *et al.* A Histologic Scoring System for Prognosis of Patients With Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* **146**, 1231–1239 (2015).
 23. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
 24. Carrión, J. A. Utilidad del Fibroscan® para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 415–423 (2009).
 25. Ripoll, C. *et al.* Hepatic Venous Pressure Gradient Predicts Clinical Decompensation in Patients With Compensated Cirrhosis. *Gastroenterology* **133**, 481–488 (2007).
 26. Bedossa, P. & Carrat, F. Liver biopsy: The best, not the gold standard. *J. Hepatol.* **50**, 1–3 (2009).
 27. Almpanis, Z., Demonakou, M. & Tiniakos, D. Evaluation of liver fibrosis: Something old, something new. *Ann. Gastroenterol.* **29**, 445–453 (2016).
 28. European Association for Study of Liver & Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J. Hepatol.* **63**, 237–64 (2015).
 29. Chou, R. & Ngoc, W. Blood Tests to Diagnose Fibrosis or Cirrhosis in Patients With Chronic. *Ann. Intern. Med.* **158**, 807–820 (2013).
 30. Sterling, R. K. *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* **43**, 1317–1325 (2006).
 31. Hui, A. Y. *et al.* Identification of chronic hepatitis B patients without significant liver fibrosis by a simple noninvasive predictive model. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 616–23 (2005).
 32. Angulo, P. *et al.* The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* **45**, 846–854 (2007).

33. Imbert-Bismut, F. *et al.* Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* **357**, 1069–1075 (2001).
34. Rosenberg, W. M. C. *et al.* Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology* **127**, 1704–1713 (2004).
35. Adams, L. A. *et al.* Hepascore: An accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin. Chem.* **51**, 1867–1873 (2005).
36. Calès, P. *et al.* A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* **42**, 1373–1381 (2005).
37. Forn, X. *et al.* Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* **36**, 986–992 (2002).
38. Vallet-Pichard, A. *et al.* FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. *Hepatology* **46**, 32–36 (2007).
39. Koda, M. *et al.* FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **45**, 297–306 (2007).
40. Fontana, R. J. *et al.* Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* **47**, 789–798 (2008).
41. Lok, A. S. F. *et al.* Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: Results of the HALT-C cohort. *Hepatology* **42**, 282–292 (2005).
42. Wai, C. T. *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 518–526 (2003).
43. Friedrich-Rust, M. *et al.* Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol.* **10**, 103 (2010).
44. Kisand, K., Kerna, I., Kumm, J., Jonsson, H. & Tamm, A. Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. *Clin. Chem. Lab. Med.* **49**, 229–235 (2011).
45. DiMagno, E. P. *et al.* Effect of Long-Term Freezer Storage, Thawing, and Refreezing on Selected Constituents of Serum. *Mayo Clin. Proc.* **64**, 1226–1234 (1989).
46. Reed, A. B. *et al.* Total Prostate Specific Antigen Stability Confirmed After Long-Term Storage of Serum at -80C. *J. Urol.* **180**, 534–538 (2008).
47. Gislefoss, R. E., Grimsrud, T. K. & Morkrid, L. Stability of selected serum hormones and lipids after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clin. Biochem.* **48**, 364–369 (2015).
48. Lee, J.-E. *et al.* Instability of Plasma and Serum Progastrin-Releasing Peptide During

- Repeated Freezing and Thawing. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* **7**, 351–355 (2016).
49. Peleg, M., Normand, M. D. & Corradini, M. G. The Arrhenius Equation Revisited. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52**, 830–851 (2012).
 50. Poynard, T. *et al.* Applicability and precautions of use of liver injury biomarker FibroTest. A reappraisal at 7 years of age. *BMC Gastroenterol.* **11**, 39 (2011).
 51. Calès, P. *et al.* Reproducibility of blood tests of liver fibrosis in clinical practice. *Clin. Biochem.* **41**, 10–18 (2008).
 52. Poynard, T. *et al.* Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chem.* **50**, 1344–1355 (2004).
 53. Volpi, N., Schiller, J., Stern, R. & Soltés, L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1718–45 (2009).
 54. Parkes, J. *et al.* Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test accurately identifies liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **18**, 23–31 (2011).
 55. Cacoub, P. *et al.* Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: The fibrovic study - ANRS HC02. *J. Hepatol.* **48**, 765–773 (2008).
 56. Castera, L. Noninvasive Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* **35**, 291–303 (2015).
 57. Calès, P. *et al.* Evaluating the accuracy and increasing the reliable diagnosis rate of blood tests for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int.* **28**, 1352–1362 (2008).
 58. Ghany, M. G. *et al.* Predicting Clinical and Histologic Outcomes Based on Standard Laboratory Tests in Advanced Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* **138**, 136–146 (2010).
 59. Ghany, M. G. *et al.* Predicting clinical outcomes using baseline and follow-up laboratory data from the hepatitis C long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology* **54**, 1527–1537 (2011).
 60. Berzigotti, A. *et al.* Ultrasonographic evaluation of liver surface and transient elastography in clinically doubtful cirrhosis. *J. Hepatol.* **52**, 846–853 (2010).
 61. Berzigotti, A., Ashkenazi, E., Reverter, E., Abraldes, J. G. & Bosch, J. Non-invasive diagnostic and prognostic evaluation of liver cirrhosis and portal hypertension. *Dis. Markers* **31**, 129–138 (2011).
 62. Doyley, M. M. Model-based elastography: a survey of approaches to the inverse elasticity problem. *Phys. Med. Biol.* **57**, R35–R73 (2012).
 63. Paparo, F. *et al.* Real-Time Elastography in the Assessment of Liver Fibrosis: A Review of Qualitative and Semi-quantitative Methods for Elastogram Analysis. *Ultrasound Med.*

- Biol.* **40**, 1923–1933 (2014).
64. Sandrin, L. *et al.* Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med. Biol.* **29**, 1705–1713 (2003).
 65. Vizzutti, F. *et al.* Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* **45**, 1290–1297 (2007).
 66. Barr, R. G. *et al.* Elastography Assessment of Liver Fibrosis: Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference Statement. *Radiology* **0**, 150619 (2015).
 67. Goertz, R. S. *et al.* Measurement of liver elasticity with acoustic radiation force impulse (ARFI) technology: An alternative noninvasive method for staging liver fibrosis in viral hepatitis. *Ultraschall der Medizin* **31**, 151–155 (2010).
 68. Ling, W., Lu, Q., Quan, J., Ma, L. & Luo, Y. Assessment of impact factors on shear wave based liver stiffness measurement. *Eur. J. Radiol.* **82**, 335–341 (2013).
 69. Bota, S. *et al.* Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. *Liver Int.* **33**, 1138–1147 (2013).
 70. Popescu, A. *et al.* The Influence of Food Intake on Liver Stiffness Values Assessed by Acoustic Radiation Force Impulse Elastography-Preliminary Results. *Ultrasound Med. Biol.* **39**, 579–584 (2013).
 71. Bota, S. *et al.* The influence of aminotransferase levels on liver stiffness assessed by Acoustic Radiation Force Impulse Elastography: A retrospective multicentre study. *Dig. Liver Dis.* **45**, 762–768 (2013).
 72. Sporea, I., Bota, S., Gradinaru-Tascau, O., Sirli, R. & Popescu, A. Comparative study between two point shear wave elastographic techniques: Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) elastography and ElastPQ. *Med. Ultrason.* **16**, 309–314 (2014).
 73. Fraquelli, M. *et al.* Liver stiffness measurement reliability and main determinants of point shear-wave elastography in patients with chronic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **44**, 356–365 (2016).
 74. Bavu, E. *et al.* Noninvasive In Vivo Liver Fibrosis Evaluation Using Supersonic Shear Imaging: A Clinical Study on 113 Hepatitis C Virus Patients. *Ultrasound Med. Biol.* **37**, 1361–1373 (2011).
 75. Poynard, T. *et al.* Liver fibrosis evaluation using real-time shear wave elastography: Applicability and diagnostic performance using methods without a gold standard. *J. Hepatol.* **58**, 928–935 (2013).
 76. Cassinotto, C. *et al.* Non-invasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: Comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and FibroScan. *J. Hepatol.* **61**, 550–557 (2014).
 77. Muthupillai, R. *et al.* Magnetic resonance elastography by direct visualization of

- propagating acoustic strain waves. *Science* (80-.). **269**, 1854–1857 (1995).
78. Singh, S. *et al.* Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 440–451 (2015).
 79. Ziol, M. *et al.* Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **41**, 48–54 (2005).
 80. Fraquelli, M. *et al.* Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* **56**, 968–73 (2007).
 81. Degos, F. *et al.* Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: A multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J. Hepatol.* **53**, 1013–1021 (2010).
 82. Zarski, J.-P. *et al.* Comparison of nine blood tests and transient elastography for liver fibrosis in chronic hepatitis C: The ANRS HCEP-23 study. *J. Hepatol.* **56**, 55–62 (2012).
 83. Castéra, L. *et al.* Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **128**, 343–350 (2005).
 84. Boursier, J. *et al.* A new combination of blood test and fibroscan for accurate non-invasive diagnosis of liver fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 1255–1263 (2011).
 85. Castéra, L. *et al.* Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: Comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J. Hepatol.* **50**, 59–68 (2009).
 86. Nguyen, D. & Talwalkar, J. A. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 325–335 (2011).
 87. Arena, U. *et al.* Liver stiffness is influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis C virus at different stages of fibrotic evolution. *Hepatology* **58**, 65–72 (2013).
 88. Berzigotti, A. *et al.* Effect of Meal Ingestion on Liver Stiffness in Patients with Cirrhosis and Portal Hypertension. *PLoS One* **8**, 1–5 (2013).
 89. Sagir, A., Erhardt, A., Schmitt, M. & Häussinger, D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* **47**, 592–595 (2008).
 90. Millonig, G. *et al.* Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (fibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* **48**, 1718–1723 (2008).
 91. Millonig, G. *et al.* Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure. *J. Hepatol.* **52**, 206–210 (2010).

92. Mueller, S. *et al.* Increased liver stiffness in alcoholic liver disease: Differentiating fibrosis from steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **16**, 966–972 (2010).
93. Trabut, J. B. *et al.* Rapid Decline of Liver Stiffness Following Alcohol Withdrawal in Heavy Drinkers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **36**, 1407–1411 (2012).
94. Castera, L., Forns, X. & Alberti, A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J. Hepatol.* **48**, 835–847 (2008).
95. Lucidarme, D. *et al.* Factors of accuracy of transient elastography (fibrosan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* **49**, 1083–1089 (2009).
96. Myers, R. P. *et al.* Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy. *Liver Int.* **30**, 1471–1480 (2010).
97. Boursier, J. *et al.* Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology* **57**, 1182–1191 (2013).
98. Schwabl, P. *et al.* New reliability criteria for transient elastography increase the number of accurate measurements for screening of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* **35**, 381–390 (2015).
99. Castera, L. *et al.* Pitfalls of liver stiffness measurement: A 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology* **51**, 828–835 (2010).
100. Wong, G. L. H. *et al.* Factors associated with unreliable liver stiffness measurement and its failure with transient elastography in the Chinese population. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 300–305 (2011).
101. Friedrich-Rust, M. *et al.* Transient elastography with a new probe for obese patients for non-invasive staging of non-alcoholic steatohepatitis. *Eur. Radiol.* **20**, 2390–2396 (2010).
102. Myers, R. P. *et al.* Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology* **55**, 199–208 (2012).
103. De Lédinghen, V. *et al.* Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: Comparison between M and XL probe of FibroScan®. *J. Hepatol.* **56**, 833–839 (2012).
104. Myers, R. P. *et al.* Discordance in fibrosis staging between liver biopsy and transient elastography using the FibroScan XL probe. *J. Hepatol.* **56**, 564–570 (2012).
105. Tsochatzis, E. A. *et al.* Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A meta-analysis of diagnostic accuracy. *J. Hepatol.* **54**, 650–659 (2011).
106. Wong, G. L. H. *et al.* Non-invasive assessment of liver fibrosis with transient elastography (FibroScan): applying the cut-offs of M probe to XL probe. *Ann. Hepatol.* **12**, 570–580 (2013).

107. Das, K. *et al.* 'Normal' liver stiffness measure (LSM) values are higher in both lean and obese individuals: A population-based study from a developing country. *Hepatology* **55**, 584–593 (2012).
108. Wong, G. L. H. *et al.* Association Between Anthropometric Parameters and Measurements of Liver Stiffness by Transient Elastography. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 295–302 (2013).
109. www.fibroscan.com.
110. Staugaard, B. *et al.* Feasibility of transient elastography versus real-time two-dimensional shear wave elastography in difficult-to-scan patients. *Scand. J. Gastroenterol.* **5521**, 1–6 (2016).
111. Cusi, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* **142**, 711–725.e6 (2012).
112. Kumar, N. & Choudhary, N. S. Treating morbid obesity in cirrhosis: A quest of holy grail. *World J. Hepatol.* **7**, 2819–2828 (2015).
113. Boursier, J. *et al.* Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.* **49**, 527–537 (2014).
114. Gaia, S. *et al.* Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and chronic viral hepatitis. *J. Hepatol.* **54**, 64–71 (2011).
115. Wong, V. W. S. *et al.* Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 454–462 (2010).
116. Arena, U. *et al.* Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* **57**, 1288–1293 (2008).
117. Sasso, M. *et al.* Controlled attenuation parameter (CAP): A novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: Preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med. Biol.* **36**, 1825–1835 (2010).
118. Myers, R. P. *et al.* Controlled Attenuation Parameter (CAP): A noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver Int.* **32**, 902–910 (2012).
119. Karlas, T. *et al.* Individual Patient Data Meta-Analysis of Controlled Attenuation Parameter (CAP) Technology for Assessing Steatosis. *J. Hepatol.* (2016). doi:10.1016/j.jhep.2016.12.022
120. Roulot, D. *et al.* Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J. Hepatol.* **48**, 606–13 (2008).

121. Friedrich-Rust, M. *et al.* Performance of Transient Elastography for the Staging of Liver Fibrosis: A Meta-Analysis. *Gastroenterology* **134**, 960–974 (2008).
122. Ganne-Carrie, N. *et al.* Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* **44**, 1511–1517 (2006).
123. Bureau, C. *et al.* Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 1261–1268 (2008).
124. Robic, M. A. *et al.* Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: A prospective study. *J. Hepatol.* **55**, 1017–1024 (2011).
125. Platon, M. L., Stefanescu, H., Feier, D., Maniu, A. & Badea, R. Performance of unidimensional transient elastography in staging chronic hepatitis C. results from a cohort of 1,202 biopsied patients from one single center. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **22**, 157–166 (2013).
126. Viganò, M. *et al.* Dual cut-off transient elastography to assess liver fibrosis in chronic hepatitis B: A cohort study with internal validation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 353–362 (2011).
127. Vergniol, J. *et al.* Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **140**, 1970–1979 (2011).
128. Merchante, N. *et al.* Liver stiffness predicts clinical outcome in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients with compensated liver cirrhosis. *Hepatology* **56**, 228–238 (2012).
129. Kim, M. N. *et al.* Risk assessment of liver-related events using transient elastography in patients with chronic hepatitis B receiving entecavir. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 272–278 (2014).
130. Litchinghagen, R. *et al.* The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: Normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J. Hepatol.* **59**, 236–242 (2013).
131. Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C. & Lenfant, C. Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition Clinical Outcomes of Metabolic Syndrome. *Arter. Thromb Vasc Biol* **24**, e13-8 (2004).
132. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J. Hepatol.* (2016). doi:10.1016/j.jhep.2016.09.001
133. Jacobson, I. M., Lim, J. K. & Fried, M. W. AGA Institute Clinical Practice Update: Care of Patients Who Have Achieved a Sustained Virologic Response (SVR) Following Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Infection. *Gastroenterology* (2017).

doi:10.1053/j.gastro.2017.03.018

134. de Ledinghen, V. *et al.* Feasibility of liver transient elastography with FibroScan using a new probe for obese patients. *Liver Int.* **30**, 1043–1048 (2010).