

EVALUAREA NON-INVAZIVĂ A FIBROZEI HEPATICE

Non-invasive assessment of hepatic fibrosis

Dr. Francisc Iohann Bach, Dr. Diana Laura Lupu, Prof. Dr. Dan Olteanu
Clinica Medicină Internă I, Spitalul Universitar de Urgență, București

REZUMAT

Managementul și prognosticul afecțiunilor hepatice cronice sunt puternic influențate de gradul/severitatea fibrozei hepatice.

Limitările biopsiei hepatice au stimulat cercetările pentru evaluarea non-invazivă a fibrozei hepatice la pacienții cu hepatite virale.

Au fost propuse diverse metode, incluzând măsurarea rigidității hepatice folosind elastografia tranzitorie și markeri serici. Combinația ambelor ar putea evita puncția biopsie hepatică pentru evaluarea fibrozei hepatice, mai ales la pacienții cu hepatită cronică cu VHC.

Cuvinte cheie: fibroză hepatică, puncție, biopsie hepatică, elastografie tranzitorie, FibroTest, APRI, alți markeri serici

ABSTRACT

The limitations of liver biopsy have stimulated the search for non-invasive approaches for the assessment of liver fibrosis in patients with viral hepatitis.

A variety of methods including the measurement of liver stiffness, using transient elastography and serum markers, have been proposed. Among serum indices, Fibrotest has been the most extensively studied and validated. Transient elastography appears as a promising method but has been mostly validated in chronic hepatitis C with performance equivalent to that of serum markers.

The combination of both approaches as first-line assessment of liver fibrosis could avoid the performance of liver biopsy in the majority of patients with chronic hepatitis C.

Key words: hepatic fibrosis, liver biopsy, transient elastography, Fibrotest, APRI, others serum markers

INTRODUCERE

Bolile hepatice cronice reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Cele mai importante etiologii sunt infecțiile cronice cu virusul hepatitic B (VHB) și C (VHC), dar și bolile hepatice alcoolice și non-alcoolice.

Progresia bolii hepatice determină formarea și acumularea de țesut fibros, ducând la dezvoltarea unei distorsiuni progresive a arhitecturii hepatice, care reprezintă semnul distinctiv al evoluției la ciroză. Fibroza hepatică este rezultatul injuriei cronice și pare să joace un rol direct în patogeniza disfuncției hepatocelulare și a hipertensiunii portale (1,2).

Dezvoltarea fibrozei este un proces progresiv care începe de la fibroză minimă limitată la tracturile portale, urmata de fibroză mai extinsă, cu septuri extinse în parenchimul hepatic, care pot forma punți de legătură între două tracturi portale sau tracturi portale și venele centrale, încheindu-se în cele din urmă în noduli cirofici.

La pacienții cu boală hepatică cronică, definirea precisă a stadiului de fibroză hepatică este de o importanță capitală, atât pentru evaluarea prognosticului și urmărirea bolii hepatice, cât și pentru a decide necesitatea tratamentului antiviral în infecțiile cronice cu VHB și VHC.

Mai multe sisteme semicantitative de stadializare au fost propuse pentru fibroză și pentru a stabili

Adresa de corespondență:

Dr. Francisc Iohann Bach, Spitalul Universitar de Urgență, Splaiul Independenței Nr. 169, București
e-mail: johann_f_bach@yahoo.com

gradul de necroinflamație în ficat. Sistemul Ishak este o versiune revizuită a vechiului index de activitate histologică (3,4). Acesta descrie grading și staging ca două elemente distincte, iar fibroza hepatică este clasificată ca fiind absentă (0), ușoară (1-2), moderată (3-4) și severă/ciroză (5-6).

Acest sistem de clasificare este în principal aplicat la hepatitele B și C.

Scorul METAVIR pentru stadializare a fost frecvent folosit în ultimii ani, în special pentru hepatita cronică C (5).

Clasificarea Brunt a fibrozei este în general folosită pentru NASH și include cinci stadii:

- stadiul 0 – fără fibroză;
- stadiul 1 – fibroză pericelulară/perisinusoidală în zona 3, focală sau extensivă;
- stadiul 2 – fibroză pericelulară/perisinusoidală în zona 3 cu fibroză periportală extensivă sau focală;
- stadiul 3 – fibroză pericelulară/perisinusoidală în zona 3 și fibroză portală cu septe fibroase focale sau extensive;
- stadiul 4 – ciroză (6).

Toate aceste sisteme de stadializare au unele limite, fiind semicantitative neliniare, predispuse la variații intra- și inter-observator și la variabilitatea de eșantionare.

Biopsia hepatică a fost timp îndelungat gold-standardul pentru stadializarea fibrozei hepatice în bolile hepatice cronice.

Biopsia hepatică este încă recomandată la majoritatea pacienților cu hepatită cronică virală pentru evaluarea fibrozei și indicații de tratament (7-9). Cu toate acestea, ea este o procedură dureroasă și invazivă (10), cu complicații rare, dar potențial amenințătoare de viață (5,6), și predispuse la erori de probe (11,12). Astfel mulți pacienți cu hepatită cronică virală sunt reticenți în a efectua biopsia hepatică și ar putea fi descurajați să înceapă terapia din acest motiv.

TABELUL 1. Pro și contra biopsiei hepatice în stadializarea fibrozei hepatice

<p>PRO</p> <p>Stadializarea fibrozei hepatice Grad de necroinflamație Steatoza (comună în hepatita C) Supraîncărcarea cu fier (comună în hepatita C) Comorbidități</p>
<p>CONTRA</p> <p>Invazivă (durere, sângerare) Cost (spitalizare) Erori de eșantionare Posibil refuzată de către pacient Reticiențe manifestate de medic Date statice, fără informații privind fibrogeneza.</p>

Biopsia hepatică are avantajul de a obține informații directe, nu doar despre fibroză, dar și despre mulți alți parametri utili, cum ar fi: inflamația, necroza, steatoza, depozitele de fier sau cupru. În plus, permite identificarea cofactorilor și comorbidităților suspectate sau neașteptate.

Cu toate acestea, biopsia este asociată cu potențial risc de morbiditate și mortalitate și are mai multe limitări (Tabelul 1). O singură biopsie furnizează date statice, fără informații cu privire la fibrogeneza și fibroliza care caracterizează procesele dinamice referitoare la metabolismul matricei extracelulare (ECM). Mai mult decât atât, multe studii recente indică în mod clar faptul că biopsia hepatică este predispusă la erori de prelevare și poate subestima gradul fibrozei hepatice. În 10-30% dintre cazuri, ciroza nu poate fi evidențiată printr-o singură biopsie (13,14). Când trei probe diferite de ficat au fost analizate, procentul diagnosticului corect a crescut de la 80% la 100% (15).

Dimensiunea eșantionului hepatic este foarte importantă, mai ales dacă luăm în considerare faptul că un eșantion hepatic de 15 mm lungimea reprezintă 1/50.000 din ansamblul parenchimului hepatic.

Alte studii au raportat că tipul și dimensiunea acului folosit sunt importante. Acul Tru-Cut s-a dovedit a fi superior acului Menghini, în special pentru diagnosticul de fibroză avansată (16).

Având în vedere toate deficiențele în ceea ce privește biopsia hepatică, în ultimul deceniu investigații clinici au căutat metode non-invazive pentru informații corecte în ceea ce privește fibrogeneza hepatică și stadiul fibrozei la pacienții cu boală hepatică cronică.

Fibroza este o modificare structurală în ficat, ce însoțește injuria cronică; fibrogeneza se referă la producerea ECM. Fibrogeneza crește ca răspuns la injurie și este esențială pentru repararea țesuturilor.

Pasul cheie în fiziopatologia fibrogenezei hepatice este reprezentat de balanță între depunerea și eliminarea ECM. Excesul de ECM produs după injurie stimulează fibroliza, care este mediată de metaloproteinaze specifice de matrice (MMPs). Celulele stelate hepatice (HSCs) sunt principala sursă de ECM (1).

Metodele non-invazive pentru detectarea fibrozei hepatice pot fi împărțite în două grupe principale: markeri măsuțați în sângele periferic, care pot fi parametri unici sau scoruri ce combină mai mulți parametri, și un dispozitiv tehnic care măsoară rigiditatea hepatică prin elastografia tranzitorie (FibroScan).

Markeri serici non-invazivi de fibroză hepatică

Printre markerii serici propusi în literatura de specialitate, unii sunt direct legați de modificări în turn-overul ECM ce apare în timpul fibrogenezei, așa-numiții „markeri direcți”, în timp ce alții reflectă modificări în funcția hepatică, așa-numiții „markeri indirecți” (1,2).

Markerii direcți ai fibrozei hepatice includ:

- mai multe glicoproteine (hialuronat, laminină). Hialuronatul este un polizaharid prezent în ECM și este crescut în serul pacienților cu fibroză hepatică;
- familia colagenilor (procolagenulul 3, colagen tip 4);
- collagenazele și inhibitori ai acestora
- citokine conectate cu procesul fibrogenetic (TGF-beta 1, TNF-alfa).

Ei pot fi folosiți nu numai pentru stadializarea fibrozei hepatice, dar și pentru a determina viteza fibrogenezei hepatice și prognosticul și, de asemenea, pentru a estima și monitoriza eficiența și răspunsul la tratamentul antifibrotic.

O limitare în utilizarea clinică a markerilor direcți de fibroză hepatică este aceea că nu sunt disponibili în mod curent în toate spitalele.

Markerii indirecți ai fibrozei hepatice sunt parametri biochimici, măsurabili în sângele periferic, cum ar fi:

- numărul de trombocite;
- AST, ALT;
- GGT;
- gamma globuline;
- albumina;
- timpul de protrombină.

Ei sunt expresia indirectă a injuriei hepatice și au o asociere statistică cu stadiul fibrozei hepatice.

Raportul AST/ALT (AAR) a fost unul dintre primii markeri non-invazivi propus. Valorile raportului > 1 sunt sugestive de ciroză hepatică. Aceste valori se datorează eliberării crescute de AST mitochondrial, scăderii clearance-ului AST și/sau afectării sintezei ALT în boala hepatică avansată. Raportul AST/ALT (AAR) este ușor de obținut, fără costuri suplimentare, dar a arătat o performanță extrem de variabilă în studiile efectuate pe pacienții infectați cu VHC: sensibilitatea a fost între 31,5% și 81,3%, specificitatea a fost între 55,3% și 97%, și acuratețea a variat de la 60-83,6% (17,18). O altă îngrijorare cu privire la acest test ar putea fi faptul că nu identifică fibroza semnificativă, ci numai ciroza.

Raportul AST/trombocite (APRI) este disponibil în practica clinică. El clasifică fibroza semnificativă și ciroza, dar aproximativ 50% dintre cazuri rămân

neclasificate. Performanța APRI este variabilă printre studiile privind hepatita C: sensibilitatea variază între 41% și 91%, specificitatea între 47% și 95% și acuratețea între 60% și 82,7% pentru fibroza semnificativă; pentru ciroza, sensibilitate variază între 38,4% și 65,8%, specificitatea între 86,7% și 93% și acuratețea între 60% și 88,4% (2,19,20).

Indicele Forns este un scor simplu ce rezultă din combinația vârstei, GGT, colesterol și trombocite. Acesta nu dă nici o informație cu privire la ciroză, ci doar despre fibroza semnificativă. În hepatita C, acuratețea raportată în diverse studii a fost variabilă (între 50% și 85%) (20,21).

O altă combinație de markeri simpli propusă recent este FIB-4 și utilizează trombocite, ALT, AST și vârsta. Acesta a arătat o bună performanță pentru detectarea fibrozei severe și chiar mai bine pentru diagnosticul de ciroză, în hepatită cronică C (22).

Fibrotest este un test patentat care combină GGT, bilirubina totală, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, apolipoproteina A1, vârsta și sexul (23). Acesta este cel mai validat procedeu non-invaziv pentru fibroza hepatică de diverse etiologii: VHC, VHB, ALD, NAFLD și co-infecție HIV/VHC. Acuratețea diagnostică a acestui test este limitată de hemoliză (scade haptoglobina), sindrom Gilbert (crește bilirubina) și infecții recente (crește alfa-2-macroglobulina și haptoglobina).

În general, între markerii serici propuși în literatura de specialitate, APRI și Fibrotest sunt cei mai validați în toate etiologiile.

Au fost propuși diverși indici serici pentru evaluarea non-invazivă a fibrozei hepatice (Tabelul 2).

Tabelul 2. Indici serici propuși pentru evaluarea non-invazivă a fibrozei în hepatite virale cronice

HCV
– Fibrotest (alfa-2-macroglobulina, GGT, apolipoproteinei A1, haptoglobina, bilirubina totală, vârsta și sexul)
– Indexul Forns (vârstă, număr de trombocite, colesterol, GGT)
– Raportul AST/trombocite (APRI) (AST, număr de trombocite)
– Index Lok (număr de trombocite, raport AST/ALT, INR)
– FibroSpect (alfa-2-macroglobulina, hialuronat, TIMP-1)
– MP3 (MMP-3, TIMP-1)
– Scorul ELF (vârstă, hialuronat, MMP-3, TIMP-1)
– Indexul de probabilitate fibroză (FPI) (vârstă, aportul de alcool în trecut, AST, colesterol, HOMA-IR)
– Indexul de ciroză al Universității Goteborg (GUCI) (AST, INR, număr de trombocite)
– Hepascore (Bilirubină, GGT, hialuronat, alfa-2-macroglobulina, vârstă, sex)
– Fibrometer (număr de trombocite, index de protrombină, AST, alfa-2-macroglobulină, hialuronat, uree, vârstă)
– Fibroindex (număr de trombocite, AST, gamma-globulină)

– Model Virahep-C (AST, număr de trombocite, fosfatază alcalină, vârstă)

VHB

– Zeng (vârstă, alfa-2-macroglobulina, hialuronat, GGT)

– Hui (BMI, bilirubină, număr de trombocite, albumină)

– Mohamadenjad (albumină, număr de trombocite, fosfatază alcalină, ADN-VHB)

HIV-VHC

– SHASTA (hialuronat, AST, albumină)

– FIB-4 (Vârstă, AST, ALT, număr de trombocite)

Fibroza semnificativă ar putea fi identificată cu o acuratețe diagnostică înaltă, > 94%, utilizând APRI ca test screening, urmată de fibrotest în cazurile neclasificate APRI și restricționând biopsia hepatică la pacienții clasificați F0-F1 prin testele non-invazive.

Ciroza ar putea fi identificată, de asemenea, cu acuratețe diagnostică de 95%, utilizând un algoritm similar care combină APRI și Fibrotest.

Limitări ale markerilor serici și indicilor

Una dintre principalele limitări a folosirii clinice a markerilor direcți de fibroza hepatică este aceea că ei nu sunt disponibili de rutină în cele mai multe spitale.

O altă limitare a acestor markeri este aceea că nici unul nu este specific hepatic și ei ar putea fi influențați de modificări în clearance-ul lor și în excreția lor. De exemplu, creșterea nivelului de hialuronat apare postprandial (24) sau la pacienții vârstnici cu procese inflamatorii cronice ca artrita reumatoidă.

FIBROSCAN (Elastografia tranzitorie)

Pe lângă markerii serici, o altă metodă non-invazivă pentru evaluarea fibrozei hepatice este măsurarea rigidității hepatice (25).

Elastografia tranzitorie este măsurată prin intermediul unui dispozitiv care se numește FibroScan (Echosens, Paris), care este compus dintr-un transductor de ultrasunete montat pe axa unui vibrator. Vibrații de amplitudine medie și de joasă frecvență sunt transmise prin transductor, inducând o undă care se propagă prin țesuturile subiacente. Captarea ultrasunetului este utilizată pentru a urmări propagarea undei și pentru a măsura viteza sa, care este direct legată de rigiditatea țesutului: cu cât țesutul este mai rigid, cu atât mai repede se propagă unda.

Elastografia tranzitorie măsoară rigiditatea hepatică într-un volum asemănător unui cilindru având 1 cm diametru și 4 cm înălțime, între 2,5 cm și 6,5 cm măsurat de la suprafața pielii. Acest volum este de cel puțin 100 de ori mai mare decât un eșanțon biptic.

Examinarea cu FibroScan este nedureroasă, rapidă (mai puțin de 5 min.) și ușor de efectuat la pat sau în ambulatoriu.

Rezultatele sunt exprimate în kilo-pascali (kPa). Valorile rigidității hepatice variază între 2,5-75 kPa. Rezultatele sunt disponibile imediat și independente de operator (26).

Rezultatul FibroScan-ului este dat în conformitate cu valori cut-off exprimate în kPa: conform diferitelor studii, prezența fibrozei semnificative este definită pentru o valoare cut-off între 7,1-8,7 kPa, iar ciroza este diagnosticată printr-o valoare cut-off între 12,5-14,5 kPa (27,28). În diverse studii, acuratețea rezultatelor FibroScan-ului au fost similare cu cele ale markerilor serici non-invazivi pentru diagnosticul de fibroză semnificativă. Pe de altă parte, FibroScan a arătat performanțe excelente pentru diagnosticul de ciroză (29).

Măsurarea rigidității hepatice poate fi dificilă la obezi sau la cei cu spațiu intercostal îngust și imposibilă la pacienții cu ascită (25).

Factorii asociați cu variabilitatea inter și intra-observator au fost: BMI > 25, steatoză hepatică grad ridicat și fibroza ușoară (F0-F1 de METAVIR) (26).

TABELUL 3. Limite ale FibroScan în practica clinică

- dificil de efectuat la pacienții obezi (rata eșec de 5%).
- variabilitate inter și intra-observator influențată de steatoză hepatică.
- influența nivelurilor ALT (reactivarea VHB).
- performanță mai mică pentru diagnosticul fibrozei semnificative.

Comparație a elastografiei tranzitorii cu markerii serici

Elastografia tranzitorie (TE) are anumite avantaje peste markerii serici de fibroză, prin faptul că asigură o măsurare mai directă a fibrozei, nu este influențată de afecțiuni intercurrente și este teoretic aplicabilă la toate bolile hepatice cronice.

Într-un studiu cu 183 de pacienți cu hepatită cronică C, în care TE a fost comparată cu markerii serici de fibroză (Fibrotest și APRI) și biopsia hepatică, s-a demonstrat că performanțele TE au fost similare cu acelea ale markerilor serici pentru diagnosticul de fibroză semnificativă (30).

Cu toate acestea, combinația TE și Fibrotest a oferit cea mai bună performanță diagnostică atât pentru fibroza semnificativă ($F \geq 2$), cât și pentru fibroza severă – ciroză (F3-F4). Când TE și Fibrotest sunt în acord, așa cum se întâmplă în 70-80% dintre cazuri, rezultatele, de asemenea, sunt în acord cu cele ale biopsiei hepatice în 84% dintre cazurile de fibroză semnificativă (Metavir $F \geq 2$), în 95% dintre

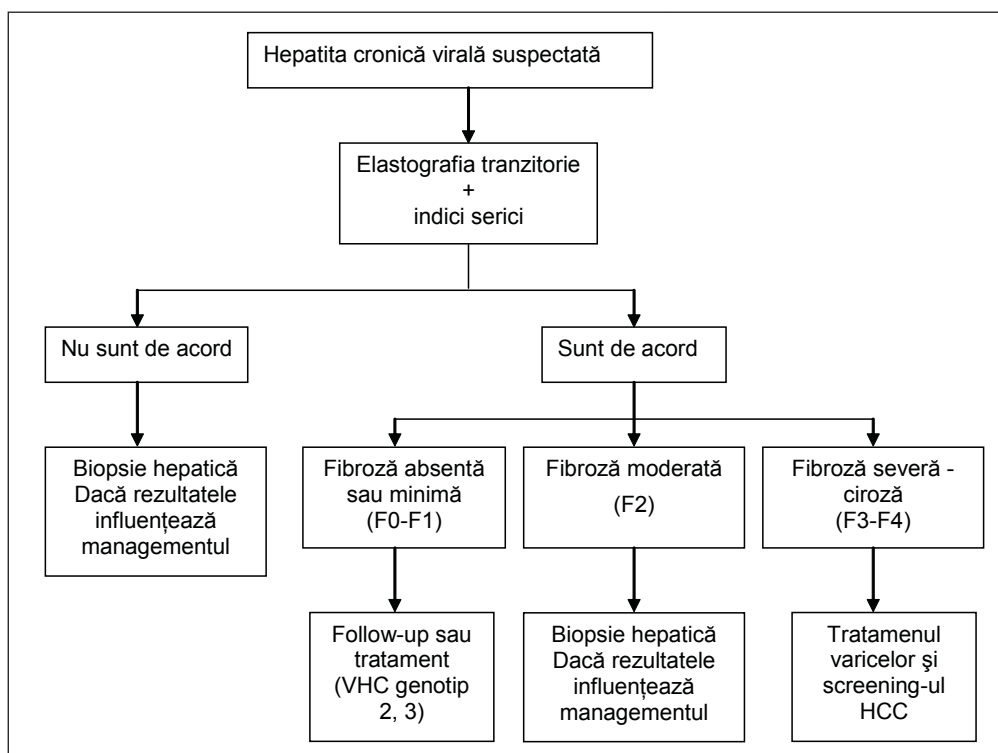


FIGURA 1. Propunere de algoritm care combină elastografia tranzitorie și indicii serici pentru evaluarea de primă linie non-invazivă a fibrozei hepatice la pacienții cu hepatite cronice virale (Adaptat de la Ref. 30).

cazurile de fibroză severă ($F \geq 3$) și în 94% de cazurile de ciroză ($F = 4$).

CONCLUZII

Un progres semnificativ a fost făcut în diagnosticul non-invaziv al fibrozei hepatice.

Un număr crescut de metode non-invazive certe sunt acum disponibile, validate mai ales la pacienții cu hepatită cronică C.

Elastografia tranzitorie este o metodă non-invazivă promițătoare pentru evaluarea fibrozei hepatice la pacienții cu boli hepatice cronice, cu performanțe diagnostice foarte bune pentru fibroza severă și ciroza hepatică.

Poate fi anticipat că metodele non-invazive vor deveni un instrument important în practica clinică în viitorul apropiat. Cu toate acestea, este, de asemenea, probabil că acești markeri vor reduce, dar nu vor desființa în totalitate biopsia hepatică (31).

BIBLIOGRAFIE

1. Friedman S.L. – Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53.
2. Sebastiani G., Alberti A. – Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3682-94.
3. Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C., et al. – Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-35.
4. Ishak K.G. – Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. *Mod Pathol* 1994; 7: 690-713.
5. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20: 15-20.
6. Brunt E.M., Janney C.G., Di Bisceglie A.M., et al. – Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
7. Strader D.B., Wright T., Thomas D.L., Seeff L.B. – Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39(4): 1147-71.
8. Alberti A., Clumeck N., Collins S. et al. – Short statement of the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *J Hepatol* 2005; 42(5): 615-24.
9. Hoofnagle J.H., Doo E., Liang T.J., Fleischer R., Lok A.S. – Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007; 45(4): 1056-75.
10. Castera L., Negro I., Samii K., Buffet C. – Pain experienced during percutaneous liver biopsy. *Hepatology* 1999; 30(6): 1529-30.
11. Bedossa P., Dargere D., Paradis V. – Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:1449-57.
12. Regev A., Berho M., Jeffers L.J. et al. – Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(10): 2614-18.

13. **Maharaj B., Maharaj R.J., Leary W.P., et al.** – Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986; 1:523-25.
14. **Poniachik J., Bernstein D.E., Reddy K.R., et al.** – The role of laparoscopy in the diagnosis of cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 1996; 43:568-71.
15. **Abdi W., Millan J.C., Mezey E.** – Sampling variability on percutaneous liver biopsy. *Arch Intern Med* 1979; 139:667-69.
16. **Colombo M., Del Ninno E., de Franchis R., et al.** – Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy: superiority of the Tru-Cut over the Menghini needle for diagnosis of cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95:487-89.
17. **Giannini E., Rizzo D., Botta F., et al.** – Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med* 2003; 163:218-24.
18. **Lackner C., Struber G., Liegl B., et al.** – Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41:1376-82.
19. **Wai C.T., Greenson J.K., Fontana R.J., et al.** – A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:518-26.
20. **Sebastiani G., Vario A., Guido M., et al.** – Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; 44:686-93.
21. **Forns X., Ampurdanes S., Llovet J.M., et al.** – Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36:986-92.
22. **Vallet-Pichard A., Mallet V., Nalpas B., et al.** – FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46:32-36.
23. **Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., et al.** – Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357:1069-75.
24. **Fraser J.R., Gibson P.R.** – Mechanisms by which food intake elevates circulating levels of hyaluronan in humans. *J Intern Med* 2005; 258(5): 460-66.
25. **Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph J.M., et al.** – Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29:1705-13.
26. **Fraquelli M., Rigamonti C., Casazza G., et al.** – Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56:968-73.
27. **Castera L., Vergniol J., Foucher J., et al.** – Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128:343-50.
28. **Ziol M., Handra-Luca A., Kettaneh A., et al.** – Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41:48-54.
29. **Castera L., Forns X., Alberti A.** – Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48:835-47.
30. **Castera L., Vergniol J., Foucher J. et al.** – Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 343-50.
31. **Sebastiani G., Alberti A.** – Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006; 12(23): 3682-94.