



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA POLICLINICO "P. GIACCONE"
DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA DIMIS

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLE MALATTIE DEL FEGATO

CICLO XXII

*Epatopatia cronica HCV correlata in soggetti con transaminasi
persistentemente normali:
aspetti clinici e risposta alla terapia*

*Tesi di Dottorato del
Dr. Emanuele La Spada*

*Relatore
Ch.mo Prof. Giuseppe Montalto*

Anni 2008-2010

INTRODUZIONE

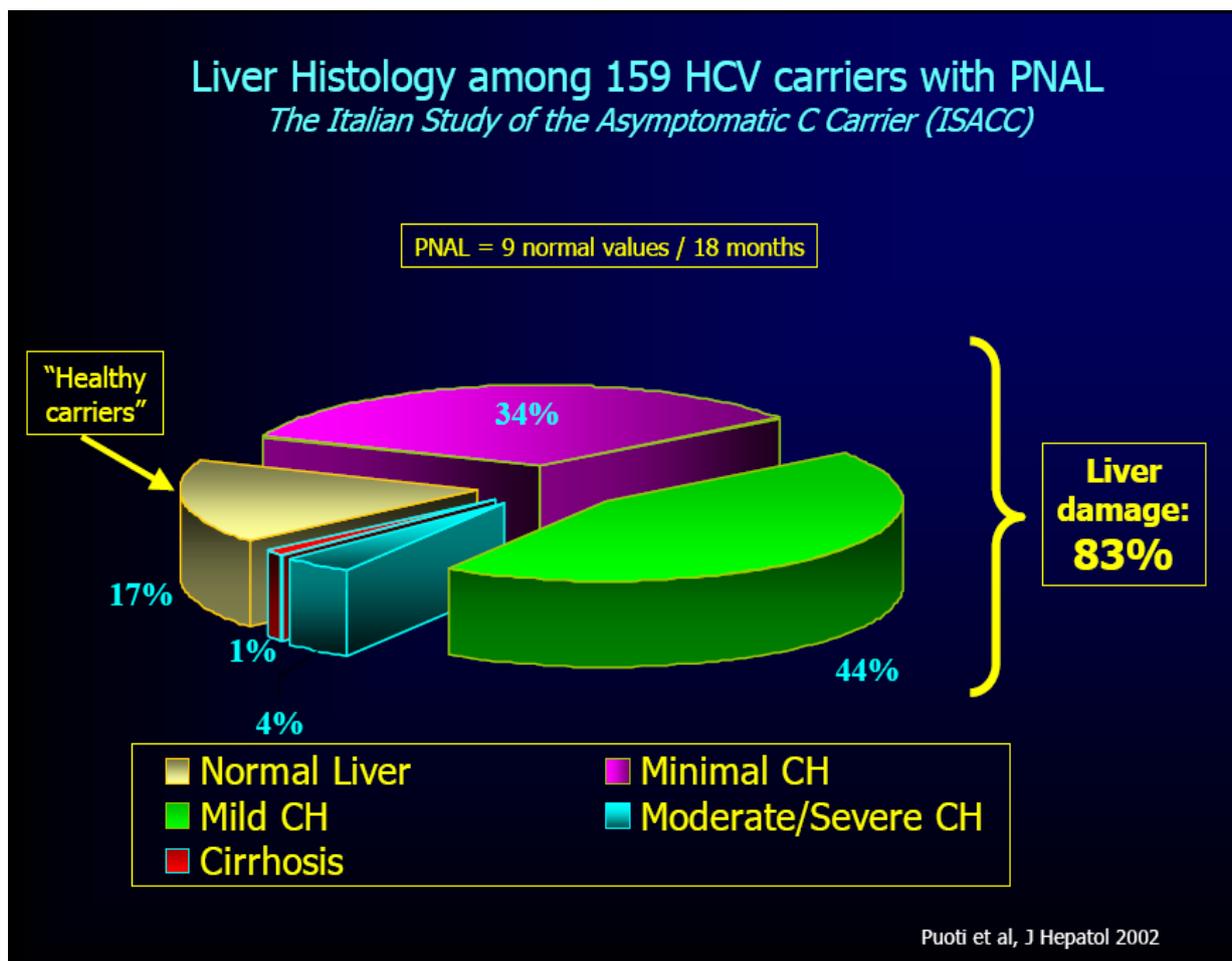
Il virus dell'epatite C (HCV), identificato nel 1989, filogeneticamente assimilabile in natura al genere delle flaviviridae, è estremamente eterogeneo sia nella sua organizzazione genetica che nella sua espressione clinica. E' apparso chiaro già dalla sua scoperta, che esistono soggetti con positività anticorpale anti HCV e normali livelli di transaminasi, nonostante il 70-80% di essi risulti HCV RNA positivo e, quindi, cronicamente infetto (1-4).

La definizione e il significato clinico delle transaminasi persistentemente normali sono stati rivisti alla luce delle recenti acquisizioni scientifiche sia in termini di aspetti clinici della malattia che di risposta alla terapia.

Definizione storia naturale e aspetti istologici

Le transaminasi AST (aspartato aminotrasferasi) e ALT (alanina aminotrasferasi) sono enzimi intracellulari. L'AST è presente in due forme, una citoplasmatica e l'altra mitocondriale, ed è contenuta nelle cellule di diversi tessuti umani (cuore, muscolo scheletrico, sangue periferico, oltre che nel fegato), mentre l'ALT è contenuta ad alte concentrazioni solo negli epatociti. Le transaminasi metabolizzano gli aminoacidi attraverso una catena biochimica che porta alla formazione di piruvato. Vengono rilasciate in circolo in quantità apprezzabili in caso di danno o morte cellulare, ed il loro dosaggio nel siero costituisce l'indicatore clinico più importante di citolisi epatica.

Il 30-40% dei pazienti cronicamente infettati dal virus della epatite C (HCV) presenta livelli normali di transaminasi (1-2). Inizialmente era opinione comune ritenere questi soggetti portatori sani o asintomatici dell'HCV(3), e pertanto esclusi da ogni ipotesi di trattamento antivirale con Interferone. In realtà, sembra che la storia naturale dell'infezione da HCV in pazienti anche con livelli persistentemente normali di ALT sia, in una minoranza di pazienti, meno benigna di quanto sin qui ritenuto. Infatti successivi studi hanno dimostrato che solo una piccola parte di questi soggetti mostra una istologia normale alla biopsia epatica: nella maggior parte dei casi, infatti, il danno epatico è in genere modesto, ma nel 20% circa può essere anche di entità più severa(fibrosi>F2)(4-9).



Pertanto, forse perché percepiti come sani, all'inizio fu prestata relativa scarsa attenzione a questo sottogruppo di pazienti. Solo in tempi più recenti un crescente numero di studi ha contribuito a chiarire gli aspetti più controversi di questa particolare popolazione di soggetti, per la quale rimangono tuttavia ancora diversi problemi aperti.

La definizione del limite superiore di normalità delle ALT nei pazienti con epatite cronica C rimane un punto di cruciale importanza.

Le transaminasi furono identificate alla fine degli anni 50 e il limite massimo di normalità fu definito in rapporto ai valori riscontrati in un gruppo di volontari allora considerati sani (2). E' probabile che data la mancanza in quegli anni delle attuali tecniche diagnostiche, nel gruppo di controllo fossero stati inclusi anche soggetti non propriamente sani (portatori di HCV, soggetti affetti da steatosi o NASH, ecc.). Inoltre, non era allora chiaro quanto i livelli di ALT possano dipendere dal sesso, dall'età, da alterazioni del metabolismo lipidico o glucidico, dal BMI, ecc. (10).

Pertanto, probabilmente gli attuali limiti superiori delle transaminasi sono troppo elevati per definire la reale normalità nei pazienti con infezione da HCV; in effetti, in uno studio condotto su 6835 candidati alla donazione di sangue da Prati et al., l'esclusione dal campione di riferimento dei soggetti con fattori di rischio per epatopatia ha portato alla definizione di soglie ideali per l'identificazione del danno epatico proponendo un ricollocamento del limite superiore da 40 a 30 U/L per gli uomini e da 30 a 19 U/L per le donne (11).

Un altro punto critico è il periodo ottimale di osservazione per definire come “persistentemente” normali i livelli di ALT.

Nel 1997, nell’ambito dell’NIH Consensus Conference, si è ritenuto di definire come PNAL i pazienti con valori di transaminasi che non eccedevano i limiti della normalità in almeno 3 determinazioni eseguite in un periodo di 6 mesi a due mesi di distanza uno dall’altro (12,13). E’ noto, tuttavia, che nel corso dell’infezione da HCV non è raro osservare ampie fluttuazioni delle ALT, che possono rimanere normali per molti mesi o anche anni, per poi incrementarsi improvvisamente (2). Studi recenti hanno dimostrato che non meno del 30% dei pazienti con ALT inizialmente normali secondo i criteri definiti dall’EASL e dall’NIH mostrano incrementi di ALT durante il follow-up (6, 14). Tali incrementi, particolarmente frequenti nei pazienti infettati con genotipo 2, sono caratterizzati da un peggioramento istologico e da una progressione della fibrosi (15).

Non è chiaro quanto questi flares di ALT siano dovuti alla insorgenza di cofattori e quanto alla storia naturale della malattia (2). E’ comunque probabile che nei pazienti con andamento oscillante delle transaminasi la storia naturale sia meno benigna di quella osservata nei pazienti con livelli persistentemente normali di ALT (6).

Infine, non sono chiari i criteri che consentano di predire quali pazienti svilupperanno una riattivazione di malattia durante il follow-up (6), né è chiaro se fluttuazioni delle ALT nell’ambito del range di cosiddetta normalità debbano essere considerati come veri e propri flares in grado di modificare la storia naturale di malattia (10).

Per tale motivo, la Commissione AISF ha proposto che il periodo ottimale di osservazione per la definizione di portatore di HCV con livelli normali di transaminasi (PNALT) non deve essere inferiore a 18 mesi con determinazione delle transaminasi ogni 2 mesi per un totale di 9 determinazioni. Anche una sola alterazione del range di normalità implica la fuoriuscita del paziente da questa particolare categoria di soggetti (10).

La prevalenza di soggetti con fegato normale alla biopsia (i veri “portatori sani”), come già segnalato da Montalto et al. nel 1997 e successivamente da altri studi più recenti non supera il 20% dei portatori con ALT normali (2, 6-10, 16). Nella maggior parte dei casi esiste una qualche forma di danno epatico, in genere lieve: la fibrosi è usualmente modesta o assente (16), e l’istologia è meno severa rispetto ai pazienti con ALT elevate o con fluttuanti (1, 2, 7, 16). Questi dati, unitamente alla osservazione che nella maggior parte di questi pazienti la fibrosi, valutata in biopsie seriate a distanza di 3,5-5 anni (14, 17) o attraverso modelli matematici di stima (18), sembra non evolvere o progredire in tempi estremamente lunghi anche nei soggetti che sviluppano un rialzo improvviso delle transaminasi durante il follow-up, hanno rafforzato la percezione di questi pazienti come soggetti sani o tutt’al più affetti da forme assai lievi di malattia epatica, considerandone la storia naturale come benigna e in genere non evolutiva. In realtà studi più recenti hanno contribuito a modificare questa visione, forse eccessivamente rassicurante del problema, dimostrando la presenza di danno epatico più severo (fibrosi da F2 in su) in almeno il 20% dei casi e di cirrosi epatica nel 3-5% dei pazienti, e la possibilità di evoluzione della fibrosi nel

20-25% circa dei casi (19-21). Pertanto, la storia naturale della malattia nei soggetti con PNALT non è sempre benigna (22), e sono stati segnalati anche casi isolati di epatocarcinoma in soggetti con ALT normali (23, 24), addirittura con fegato istologicamente normale (25). L'evoluzione della fibrosi è più accentuata nei maschi, nei pazienti più anziani, in casi di cofattori (alcol, HBV, steatosi epatica, ecc) e in presenza di fibrosi basale di grado avanzato (>F2). Persico M. et al. in un lavoro recente studiarono la storia naturale decennale di un gruppo di 24 pazienti con PNALT e di un gruppo di 40 soggetti con elevate transaminasi sottoponendoli a biopsia epatica al tempo 0 a 5 anni e a 10 anni. Non furono rilevate differenze istologiche significative negli PNALT nei tre tempi sopra menzionati confermando che la progressione a cirrosi è bassa o assente in questi pazienti. La presenza di steatosi fu significativamente alta nei pazienti con elevate transaminasi, confermando che la steatosi è un cofattore alla progressione della malattia (26). Puoti et al sempre in uno studio di recente pubblicazione su un gruppo di 691 soggetti rilevarono che più del 60% di pazienti con PNALT sono genotipo non 1 ed il genotipo più diffuso è stato il 2 (52%) (27). E' stata focalizzata l'attenzione anche sul fatto che il 97% dei flares sono stati documentati entro i primi sei mesi di osservazione.

Trattamento antivirale

I portatori di HCV con PNALT sono stati tradizionalmente esclusi dalla possibilità di trattamento antivirale, sia nell'ambito dei trial che nella pratica clinica (1-2).

Ha contribuito a questo erroneo atteggiamento la percezione che nella maggior parte dei casi il danno epatico è lieve e la malattia non evolutiva, e il fatto che la terapia antivirale di cui si disponeva nei primi anni '90, basata sugli interferoni standard in monoterapia, non solo era coronata da successo in una percentuale assai esigua di portatori (<15%), ma anche dalla considerazione che in alcuni casi il trattamento con IFN era seguito da improvvisi, e non sempre reversibili, incrementi delle transaminasi (10). Alla luce di queste considerazioni, le prime Consensus Conference hanno sconsigliato il trattamento antivirale nella pratica clinica, raccomandandone la limitazione ai soli trial clinici controllati (12,13).

Una prima evoluzione terapeutica si è avuta con l'uso della terapia combinata IFN-ribavirina, con la quale si sono ottenute percentuali di risposta virologica non diverse da quelle osservate in pazienti con transaminasi elevate come evidenziato da uno studio di Mangia et al pubblicato su Aliment Pharmacol Ther del 2004 e successivamente confermato da altri lavori (28-31).

Più recentemente, i risultati di uno studio multicentrico internazionale di Zeuzem S. et al, finalizzato a valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con IFN pegilato alfa 2a+ ribavirina (32) sembrano indicare che la risposta sostenuta complessiva è del 30% nei pazienti trattati per 24 settimane e del 52% in quelli trattati per 48 settimane. Nei pazienti con genotipo 1 si è ottenuta una risposta sostenuta del 13% dei casi trattati per 24 settimane e nel 40% di quelli trattati per 48 settimane, mentre nei soggetti con genotipo 2 e 3 la risposta nei due gruppi è stata del 72% e del 78% rispettivamente.

E' da sottolineare che questi risultati sono stati ottenuti con 180 µg di peginterferone a settimana e con soli 800 mg di ribavirina indipendentemente dal genotipo o dalla carica virale.

Alla luce di questi dati si è concluso che la risposta virologica sostenuta nei portatori con PNALT trattati con PEG-IFN alfa 2a non è diversa rispetto ai pazienti con transaminasi alterate, e che non vi è motivo alcuno di credere che la malattia possa mostrare significative esacerbazioni biochimiche durante il trattamento, come ipotizzato dalle precedenti Consensus Conference Internazionali NIH ed EASL (12, 13). Questi nuovi orientamenti sono stati chiaramente espressi sia nel documento dell'Associazione Americana di Epatologia pubblicato nel 2004 su *Hepatology* (10), sia nel documento dell'Associazione Americana di Gastroenterologia (AGA), pubblicato nel gennaio 2006 su *Gastroenterology* (33).

L'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato in un documento di indirizzo sulla terapia dell'epatite C ha affermato che “in considerazione del fatto che recenti trial hanno dimostrato un profilo di efficacia e tollerabilità della terapia di combinazione PEG-IFN + RBV simile a quella osservato nei pazienti con ALT elevate e che in alcuni portatori la malattia epatica può essere attiva ed evolutiva, appare logico ed opportuno che nel prossimo futuro vengano definiti parametri utili a selezionare anche tra i PNALT quelli candidabili alla terapia, piuttosto che escluderli a priori solo sulla base della normalità delle transaminasi. In prima istanza appaiono candidabili alla terapia con PEG-IFN + RBV i soggetti giovani, con genotipo favorevole, senza controindicazioni al trattamento e con segni di attività o fibrosi anche periportale o

settale, nonché gli operatori sanitari che eseguono procedure invasive che comportino un rischio di trasmissione dell'infezione da HCV" (34).

Con determinazione AIFA dell'8 marzo 2006, pubblicata sulla G.U. n. 58 del 10 Marzo 2006, la nota 32 relativa all'impiego dell'IFN nei pazienti con epatite cronica HCV correlata è stata modificata, per cui attualmente è consentito il trattamento solo con interferone peghilato alfa-2a più ribavirina dei portatori di HCV, indipendentemente dal livello di transaminasi.

In un recente studio multicentrico sul trattamento di associazione peginterferone α -2a e ribavirina di portatori di epatite C caratterizzati da livelli di alanina aminotransferasi stabilmente normali, Puoti mostra come in questi pazienti le percentuali di risposta virologica sono comparabili o addirittura superiori a quelle ottenute in soggetti con livelli di transaminasi elevate.

Una SVR è stata osservata nel 78% dei casi: 62% nei genotipi 1, 89% dei genotipi 2 e 80% nei genotipi 3. La percentuale di SVR globale è stata dell'88% nei pazienti con RVR e del 50% in quelli senza RVR.

Questi dati possono essere giustificati dalla elevata prevalenza del sesso femminile nei pazienti arruolati, il grado lieve di danno epatico, l'età media bassa e i valori normali di BMI osservati nella maggioranza dei casi, quindi sicuramente tutti fattori prognosticamente favorevoli. I dati ottenuti confermano, altresì, l'importanza dell'RVR come fattore predittivo di clearance virale persistente.

Pertanto, conclude che "in casi selezionati, piuttosto che adottare una politica di attesa, si suggerisce di intraprendere immediatamente la terapia". (35)

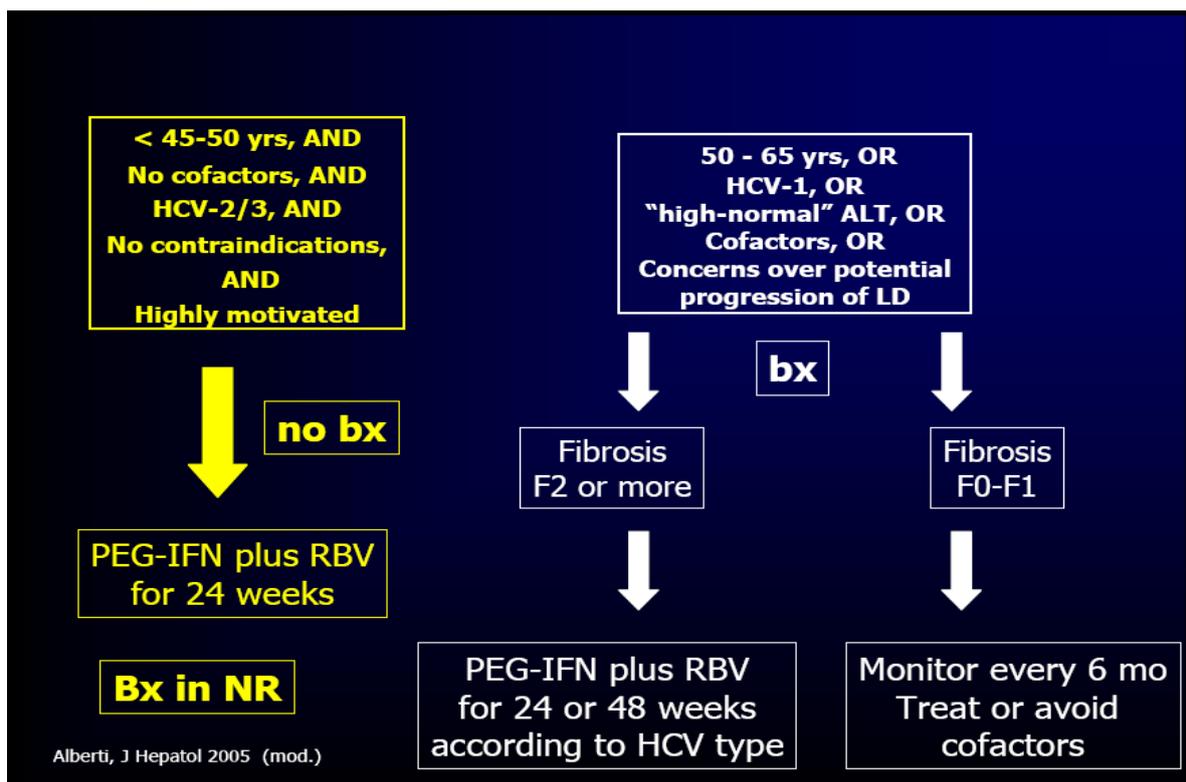
Alla luce dei risultati ottenuti, con la terapia combinata PEG-IFN alfa 2a +RBV, si pone il problema di identificare i soggetti candidati al trattamento e in quali casi proporre la biopsia epatica. In considerazione, infatti, dei costi economici non del tutto marginali e dei possibili effetti collaterali del trattamento, è indispensabile una attenta valutazione del rapporto costo-beneficio ed una accurata selezione dei pazienti candidati alla terapia. E' probabile che i criteri fondamentali per la definizione di protocolli ottimali di trattamento siano costituiti dalla età del paziente, dalle sue motivazioni, dalla possibilità di eradicazione (genotipo virale), dalla aspettativa di vita, durata della malattia, dalla presenza di cofattori di malattia epatica, dalla aderenza al trattamento, dalle controindicazioni, da considerazioni sull'infettività (se soggetto con partner promiscuo o fisso), da occupazioni lavorative (potenziale infettività nei confronti di terzi).

E' stato proposto che in pazienti giovani (età inferiore a 45-50 anni), con genotipo "favorevole" (genotipo 2-3) bassa carica virale, forte motivazione e senza controindicazioni, si possa procedere al trattamento anche in assenza di biopsia epatica. In questi soggetti, infatti, la probabilità di risposta è talmente elevata ed gli effetti collaterali talmente ridotti da permettere di ipotizzare il trattamento anche senza la preliminare conoscenza dell'istologia. La biopsia epatica potrà eventualmente essere effettuata a posteriori nei non responder al trattamento (34).

Al contrario, nei pazienti in cui il rapporto costo/beneficio non sia così nettamente favorevole (età superiore a 50 anni, controindicazioni relative, scarsa motivazione, genotipo 1, alta carica virale, presenza di cofattori, rischio di effetti collaterali ecc.)

l'opportunità del trattamento andrebbe valutato caso per caso in base alla severità della istologia, riservando la terapia ai soli pazienti con fibrosi di grado avanzato (>F2) e monitorando strettamente i soggetti senza fibrosi o con fibrosi modesta. La durata del trattamento sarà ovviamente di 24 o di 48 settimane in funzione del genotipo dell'HCV. Nei soggetti, infine, di età superiore a 65 anni e/o con lunga durata di malattia, appare ragionevole seguire una linea di osservazione clinica, evitando sia la biopsia epatica che il trattamento (34).

Algoritmo proposto dall'AISF per la gestione dei pazienti con PNALT



Gestione di questi pazienti

La Commissione A.I.S.F. “Portatore di HCV con transaminasi normali” (7) ha elaborato alcune raccomandazioni finalizzate alla gestione di questi pazienti.

Un adeguato iter diagnostico, secondo le indicazioni AISF, deve iniziare dalla conoscenza della viremia. Pertanto, la prima indagine da eseguire nel soggetto anti-HCV positivo con transaminasi normali che si presenti per la prima volta in ambulatorio è la determinazione qualitativa dell’HCV-RNA. La determinazione di routine del genotipo dell’HCV e della viremia quantitativa è ingiustificata andrebbe evitata nella pratica clinica in quanto è stato ripetutamente dimostrato che questi parametri non correlano con la presenza e la severità del danno epatico, né sono predittivi dell’evoluzione o meno della malattia.

Se il paziente risulta HCV-RNA negativo, può essere indicata l’effettuazione di test di conferma RIBA al fine di escludere false positività anticorpali. Se il RIBA risulta negativo, non sono necessari ulteriori controlli.

Se il RIBA risulta positivo o indeterminato, è opportuna la ripetizione della PCR a distanza adeguata di tempo (da 1 a 6 mesi), dal momento che i livelli di viremia possono essere particolarmente bassi, e scendere transitoriamente al di sotto dei limiti di sensibilità della PCR. In caso di ulteriore negatività della PCR, questa andrebbe ripetuta annualmente per 2-3 anni al fine di escludere la possibilità di un’improvvisa positivizzazione della viremia. In caso di PCR reiteratamente negative, il paziente va considerato guarito.

Se il paziente risulta HCV-RNA positivo è necessario un adeguato follow-up biochimico al fine di discriminare fra i veri portatori asintomatici di HCV ed i pazienti in transitoria remissione biochimica.

Il follow-up dovrebbe limitarsi al solo controllo delle transaminasi, da effettuare ogni 2 mesi per un periodo minimo di 18 mesi. Il controllo reiterato della PCR è ingiustificato.

In considerazione della possibilità sia pur remota di evoluzione della malattia epatica nonostante le ALT persistentemente normali, è opportuna l'effettuazione di una ecografia epatica, anche se a tempi non troppo ravvicinati (12-18 mesi). Ovviamente la normalità delle ALT deve accompagnarsi alla normalità di tutti gli altri test bioumorali e dell'ecografia epatica, nonché all'assoluta normalità dell'esame obiettivo.

In assenza di altre patologie (per esempio diabete mellito), i portatori di HCV con PNALT non necessitano di particolari norme di vita o di restrizioni dietetiche. Tuttavia va ricordato che il sovrappeso, l'obesità, la steatosi epatica possono incidere sfavorevolmente sull'evoluzione della malattia, peggiorarne la storia naturale, accelerare la progressione della fibrosi, ridurre la risposta al trattamento antivirale. Pertanto anche in presenza di assoluta normalità biochimica, è opportuno raccomandare diete normocaloriche, evitare il sovrappeso, la riduzione del peso in caso di obesità ecc.. In mancanza di specifiche evidenze in materia, il consumo quotidiano di alcool, anche se in quantità modeste, andrebbe evitato, mentre può essere consentito saltuariamente e in dosi minime.

Marcatore di fibrosi non invasivi

Nelle ultime due decadi, la ricerca di laboratorio ha dedicato molta attenzione all'identificazione di marcatori non invasivi capaci di assicurare un'appropriate informazione sul processo di fibrogenesi e sullo studio della fibrosi in pazienti con epatopatie croniche potenzialmente progressive verso la cirrosi e in una certa percentuale di casi, verso la cancerizzazione.

Le caratteristiche del marcatore ideale di fibrosi sono la capacità di misurare lo stadio della fibrosi e l'attività fibrogenetica, metodo di determinazione standardizzato, poco costoso e facilmente eseguibile ecc..

L'esame Fibroscan, o elastografia epatica, rappresenta una delle tecniche più interessanti nel panorama delle nuove metodiche diagnostiche della fibrosi epatica.

In un lavoro di Coco B et Al (36) veniva usato un cut-off di 8.3 kPa per diagnosticare correttamente i soggetti con fibrosi significativa e un cut-off di 14 kPa per prevedere correttamente la cirrosi, valori molto simili a quelli di un più ampio studio di elastografia riportato da Ziol, nel quale, basandosi sulla distribuzione dell'elasticità in accordo con il grado di fibrosi, i valori ottimali di cut-off 8.7 e 14.5 venivano determinati utilizzando curve ROC in modo da ottenere un'accuratezza diagnostica che era di 0.79 (\geq F2), 0.91(\geq F3), 0.97 (=F4). Peraltro essa migliorava ulteriormente (0.81-0.95-0.99) quando si prendevano in considerazione solo le biopsie di maggiori dimensioni.

Tale tecnica sembra avere alto potere discriminante per stadi avanzati di fibrosi e per cirrosi ed elevata riproducibilità oltre ad essere un metodo non invasivo, rapido e indolore. Limite ad essa è la mancata quantificazione dell'attività necroinfiammatoria e i limiti tecnici legati al paziente (ascite, obesità, spazi intercostali troppo stretti).

Un approccio empirico è stato basato sull'identificazione di test biochimici ed ematologici, espresso come punteggio (score).

Un test ben conosciuto ed utilizzato per l'estrema semplicità è l'AST-to-Platelet-Ratio Index (APRI) che è costituito, come da definizione, dal rapporto fra due parametri estremamente semplici, concentrazione di AST e conta piastrinica. (37)

Tale formula è stata derivata da Wai e collaboratori da un set di parametri laboratoristici di routine ed è il rapporto tra GOT e piastrine così ottenuto:

$$\text{APRI} = \text{GOT (UI/L)} \times 100 / \text{piastrine (10}^9\text{/L)}.$$

Nello studio retrospettivo di Wai ed al. si individua nell'indice APRI il più semplice ed accurato test per la valutazione dei due end-point fibrosi significativa e cirrosi con un'area sotto la curva nella Receiving Operator Curve (AUROC) pari a 0.88 e a 0.94 rispettivamente e con una sensibilità dell'89% e specificità del 75%.

Il maggiore vantaggio di tale test è la sua semplicità poiché usa due parametri di laboratorio analizzati di routine e il fatto che la sua performance non è tanto dissimile da quella di altri indici più complessi come FORNS e Fibrotest (37). La sua utilità pratica è limitata però dal fatto che nella categoria di pazienti con fibrosi severa solo il 51% può essere classificato come tale mentre l'accuratezza cresce all'aumentare

dello stadio di fibrosi permettendo di identificare fino all' 81% delle cirrosi tra i pazienti che ne sono portatori.

L'interpretazione di tale test si basa su cut-off decisionali ottenuti tramite l'analisi dell'AUC.

Tabella 1

Risultato di APRI (cut-off decisionali)	Interpretazione
<0,5	Assenza di fibrosi significativa
0,5-1,5	Inclassificato per la fibrosi significativa
>1,5	Presenza di fibrosi significativa
<1	Assenza di cirrosi
1-2	Inclassificato per la cirrosi
>2	Presenza di cirrosi

In uno studio di Koda et Al è stato valutato un altro indice non invasivo predittivo di fibrosi basato sulla conta piastrinica, i livelli ematici delle AST e delle γ -globuline (FIBROINDEX).(38)

Tabella 2

Diagnostic Accuracy of 3 Indices in the Estimation Set (n = 240)								
		Cutoff Value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	Likelihood Ratio	Biopsy Elimination Rate
APRI	F0-1	≤ 0.36	26.5	95.1	83.8	57.6	5.4	30.4
	F2-3	≥ 0.85	34.1	95.7	89.4	58.0	7.9	
Forns index	F0-1	≤ 4.5	25.6	97.6	90.9	58.0	10.6	25.0
	F2-3	≥ 8.7	24.3	96.6	88.2	54.9	7.1	
FibroIndex	F0-1	≤ 1.25	40.2	94.3	87.0	62.4	7.1	37.9
	F2-3	≥ 2.25	35.8	97.4	94.3	59.1	13.8	

Koda et AL. Hepatology, February 2007

Parte sperimentale

Malgrado di PNALT se ne parli da più di un decennio, non sono ancora stati chiariti la storia naturale di questi soggetti, anche per la relativa recente data di scoperta dell'HCV, e i criteri per una eventuale terapia per quei casi che nel tempo mostrano segni di evoluzione clinica. Come è stato detto, è già difficile definire temporalmente quali pazienti debbano essere classificati come PNALT, dal momento che una parte di questi mostra nel tempo un rialzo delle ALT, così come è dibattuto quale è il valore delle ALT da considerarsi normale. La storia naturale dei pazienti con PNALT è stata variamente riportata. Le biopsie epatiche di questi soggetti sono state caratterizzate da un basso grado di fibrosi rispetto ai pazienti con ALT elevate ma in alcuni casi sono stati segnalati anche quadri di cirrosi epatica. Pertanto da questi presupposti, in questo lavoro riportiamo la nostra esperienza sulla storia naturale di alcuni pazienti con PNALT bioptizzati in un periodo compreso tra il 1994-1996 e da noi già pubblicati in alcuni studi (8, 39, 40).

Obiettivi

Il presente studio ha come obiettivo principale quello di valutare la storia naturale di un gruppo di pazienti con anti HCV positività con transaminasi persistentemente normali seguiti presso il nostro Ambulatorio da oltre 15 anni prendendo in considerazione le caratteristiche cliniche e biochimiche, i fattori di rischio associati ad un aumento delle transaminasi, l'eventuale evoluzione della malattia e la risposta dei pazienti sottoposti ad un trattamento antivirale.

Materiale e Metodi

Fra tutti pazienti con anti-HCV transitati presso il nostro Ambulatorio nel biennio 1995-96, sono stati seguiti prospettivamente 45 soggetti con transaminasi persistentemente normali nei 18 mesi successivi alla biopsia epatica. Sono stati esclusi tutti i pazienti che hanno avuto anche un solo rialzo delle transaminasi nei 18 mesi di follow-up. Dei 45 pazienti selezionati 20 sono stati seguiti costantemente in questi anni presso il nostro Ambulatorio. Gli altri 25 sono stati contattati telefonicamente e sono stati invitati ad eseguire un nuovo controllo ematochimico e strumentale presso il nostro Dipartimento.

Al momento dell'inizio dello studio è stata effettuata una visita medica con rilevazione di: pressione arteriosa, frequenza cardiaca, peso, altezza (calcolo del BMI), esame obiettivo generale, ECG. Sono inoltre stati eseguiti i seguenti tests di

laboratorio: transaminasi, gammaGT, fosfatasi alcalina, bilirubinemia totale e frazionata, emocromo, attività di protrombina, elettroforesi proteica, ferritina, sideremia e transferrina, saturazione parziale di transferrina, dosaggio AFP. In particolare per i pazienti ricontattati telefonicamente sono stati eseguiti HBsAg, anti HBs, anti HBc, HCV RNA qualitativo/quantitativo, genotipizzazione, ANA, AMA, ASMA, antiLKM1, dosaggio ormoni tiroidei.

La diagnosi di epatite cronica HCV correlata è stata posta sulla scorta di un referto istologico o di inconfutabili dati clinico strumentali secondo i criteri proposti in letteratura.

Semestralmente, per i pazienti che in questi anni hanno continuato il follow-up, è stata eseguita una visita medica, il dosaggio dei seguenti esami di laboratorio: transaminasi, γ GT, fosfatasi alcalina, bilirubinemia totale e frazionata,

Ecografia e ecocolorDoppler fegato e milza: E' stata eseguita al mattino dopo un digiuno notturno di almeno 10 ore e veniva eseguita semestralmente con Toshiba SSA 240 A munito di sonda convex da 3.5 MHz, e sonda lineare da 5 MHz. Dal 2001 con Philips 5000 HDI con sonda convex 5-2 MHz e lineare 12-5 MHz. La sonda lineare veniva utilizzata per lo studio della superficie epatica. Tutti gli esami sono stati eseguiti da due operatori con un uguale training. Venivano considerati segni di cirrosi i margini irregolari, segni d'ipertensione portale una vena porta con calibro > 12 cm, la velocità media delle massime della vena porta < 24 cm/sec e Resistance Index dell'arteria splenica < 0.64 (41, 42).

Biopsia epatica: la biopsia è stata effettuata utilizzando un ago di Menghini.

Istologia: Analisi immunoistochimica: Le sezioni di tessuto paraffinato di 4 µm sono state sottoposte a trattamento deparaffinizzante e quindi incubate con H₂O₂ per abolire l'attività perossidasi endogena. Le sezioni sono state poi incubate con lo specifico anticorpo primario quindi con un anticorpo biotinilato anti-mouse o anti-rabbit e successivamente con un complesso avidina-biotina-perossidasi. Infine sono state poste a contatto con l'appropriato substrato e colorate con l'ematossilina. L'Hystology Activity Index (HAI) è stato valutato secondo Scheuer. I campioni fissati sono stati esaminati da anatomopatologi locali non al corrente dei dati clinici e biochimici.

Trattamento: Nei pazienti che presentavano un aumento delle transaminasi veniva eseguito un trattamento antivirale secondo le linee guida proposte dall'AIISF fino al 2006. Successivamente è stata introdotta la possibilità di trattare i pazienti anche con transaminasi normali a seconda delle valutazioni del clinico e della determinazione del paziente. Tutti i pazienti sono stati trattati con Peg-IFN α -2° alla dose di 180 µg una volta alla settimana e Ribavirina alla dose di 1000-1200 mg/die per 48 settimane per i pazienti con genotipo 1 o 800 mg/die per 24 settimane per i pazienti con genotipi 2-3.

Nei pazienti con eventi avversi significativi, ove necessario, sono stati apportati modifiche ai dosaggi dei farmaci e/o l'utilizzo di fattori di crescita per l'anemizzazione e la leucopenia.

I dosaggi di HCVRNA sono stati eseguiti a 4, 12, 24 settimane e solo per i genotipi 1 anche a 36 e 48.

Sono stati considerati, sustained virological responder (SVR) i pazienti che sono risultati HCV-RNA negativi a sei mesi dalla sospensione della terapia. Sono stati considerati non responder (NR) i pazienti che non hanno ottenuto la negativizzazione della carica virale o la riduzione di almeno due logaritmi al terzo mese di terapia.

Elastografia: dal gennaio del 2008 la rigidità epatica è stata valutata da un singolo operatore certificato (formato dal costruttore) usando TE (FibroScan®; EchoSens, Paris, France). La velocità di propagazione delle vibrazioni attraverso il fegato è direttamente correlata con la rigidità del tessuto. La misurazione è determinata sul lobo epatico destro, attraverso gli spazi intercostali ponendo il paziente in posizione supina. Sono effettuate 10 misurazioni valide in ogni paziente. Il tasso di successo è calcolato dividendo il numero di misurazioni validate per il numero totale delle misurazioni. Sono considerate affidabili soltanto le procedure con 10 misurazioni validate e una percentuale di successo di almeno il 60%.

E' stato usato un cut-off di 8.3 kPa per diagnosticare correttamente i soggetti con fibrosi significativa e un cut-off di 14 kPa per prevedere correttamente la cirrosi (36).

AST-to-Platelet-Ratio Index (APRI) che è costituito, come da definizione, dal rapporto fra due parametri estremamente semplici, concentrazione di AST e conta piastrinica: AST-to-Platelet-Ratio Index (APRI): $La APRI = GOT (UI/L) \times 100 / \text{piastrine (109/L)}$ (37) .

FibroIndex è stato calcolato con la seguente formula

$1.738 - 0.064 (\text{platelets } [_{10^4}/\text{mm}^3]) + 0.005(\text{AST [IU/L]}) + 0.463 (\text{gamma globulin [g/dl]})$ (38)

La diagnosi di epatite cronica HCV correlata è stata posta sulla scorta del dato istologico

La diagnosi di cirrosi era posta in relazione alla presenza di segni ecografici di cirrosi e/o segni di ipertensione portale, $LS > 14 \text{ kPa}$ e $APRI > 2$.

La diagnosi di ipertensione arteriosa è stata posta in accordo con i criteri WHO/ISH (43)

La diagnosi di diabete mellito o intolleranza ai carboidrati è stata posta in accordo con il “Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus criteria” (44)

Esofagogastroscoopia: tutti i pazienti con diagnosi di cirrosi venivano sottoposti ad esame endoscopico.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati secondo i metodi statistici classici (ACSM) e secondo l'analisi l'Analisi Statistica Implicativa (ASI) (non parametrica) che rispetto all'ACSM ha il vantaggio di non essere influenzata dal numero dei pazienti.

Analisi statistica con i metodi classici (ACSM): Sono stati valutati le percentuali di evoluzione istologica di malattia e di risposta al trattamento. Il rischio dei singoli fattori verrà valutato con il calcolo dell'odds ratio all'analisi univariata, e le variabili risultate significative verranno inserite in un modello di regressione logistica multipla come variabili indipendenti, la variabile dipendente sarà la presenza/assenza di evoluzione della malattia epatica.

Analisi statistica Implicativa (non parametrica) (ISA).

Tutti i dati sono stati inseriti in una tabella a doppia entrata: pazienti, test ematochimici e strumentali. Le variabili avevano valori decimali che sono stati ricondotti a variabili binarie. Il valore decimale sino alla soglia di normalità veniva considerato "0" , "1" se era al di fuori della normalità.

I metodi della statistica implicativa sono di tipo inferenziale e mettono in evidenza il rapporto tra singole variabili o gruppi di variabili. (45-48)

Risultati

Dei 45 soggetti arruolati 25 sono stati contattati telefonicamente. Di questi ultimi 5 non hanno voluto partecipare allo studio. Gli altri 20 erano costantemente seguiti presso il nostro Ambulatorio. Le caratteristiche demografiche dei pazienti selezionati sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3

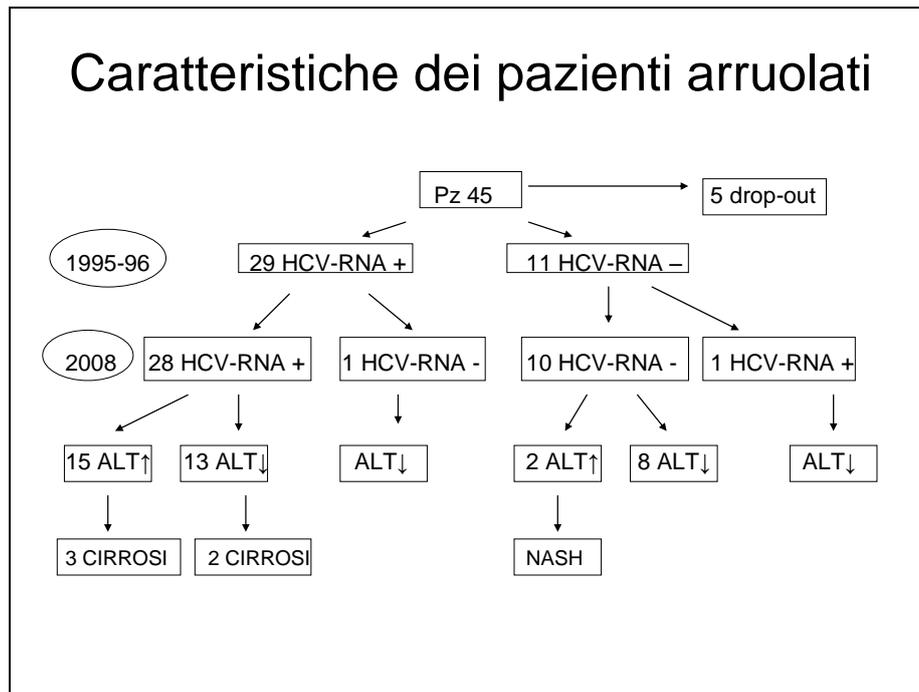
Età media e deviazione standard della popolazione studiata negli anni 1995-1996 e nel 2010		
	1995-96	2010
Popolazione N° 45	44,04 ± 11,42	54,93 ± 12,16
uomini N° 33	42,66 ± 12,07	53,42 ± 12,87
donne N° 12	47,83 ± 8,78	59,08 ± 9,16

Dei 40 pazienti rimasti 11 nel 1995-96 erano HCV-RNA negativi. Di questi, attualmente 10 sono sempre HCV-RNA negativi ma due pazienti hanno avuto dei rialzi dei livelli sierici delle transaminasi ed il loro quadro clinico è risultato compatibile con la diagnosi di NASH. L'unico paziente che ha positivizzato l'HCV-RNA ha avuto sempre le transaminasi normali.

Dei 29 pazienti che erano HCV-RNA positivi nel 1995-96 uno solo è risultato HCV-RNA negativo ed ha sempre avuto le transaminasi nella norma. 13 dei 28 HCV-RNA positivi hanno sempre avuto le transaminasi persistentemente normali ma due sono

evoluti in cirrosi epatica. 15 sempre dei 28 hanno avuto dei flares e tre hanno avuto posta diagnosi di cirrosi epatica (vedi Tabella 4).

Tabella 4



10 pazienti HCV-RNA positivi e transaminasi aumentate sono stati sottoposti a terapia antivirale. Sei pazienti hanno avuto una risposta sostenuta (SVR) e quattro non hanno risposto alla terapia (NR). I quattro pazienti NR avevano tutti genotipo 1b mentre i genotipi dei pazienti SVR sono stati così distribuiti: quattro 1b; due genotipo 2; un genotipo 3.

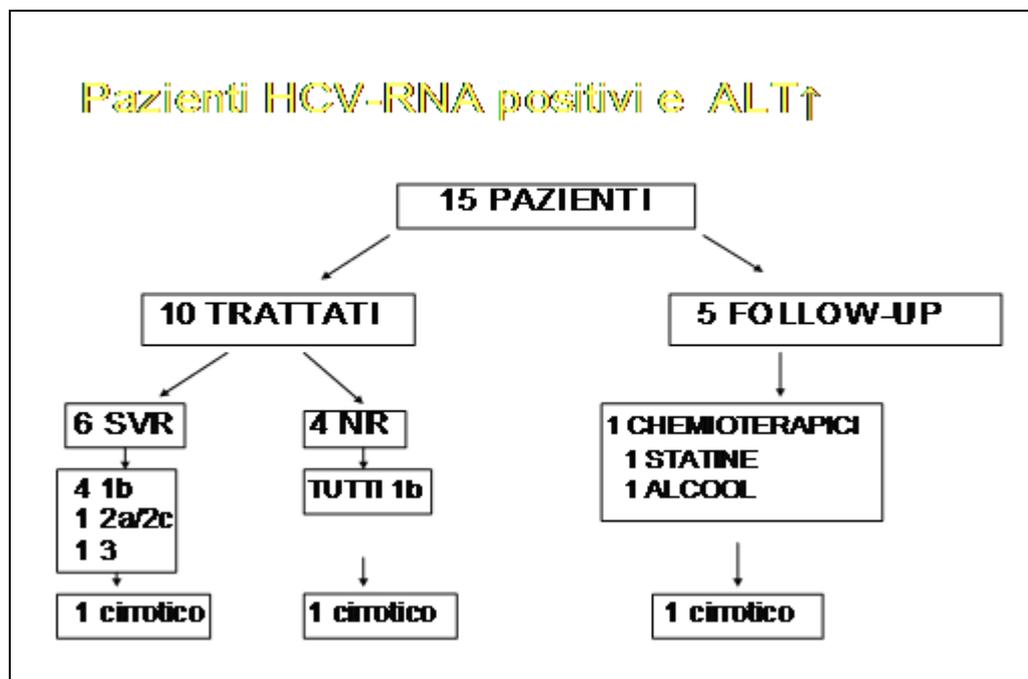
Dei 5 pazienti con transaminasi aumentate non trattati 3 sono rimasti in follow-up perché i rialzi delle transaminasi non sono stati elevati (<1,5 VN) e sostenuti nel tempo e quindi non rientravano nella vecchia nota CUF di trattamento con

interferone. Oggi essi hanno un'età avanzata e cofattori di malattia che sconsigliano la terapia.

Tre pazienti hanno avuto un rialzo dovuto all'assunzione di farmaci (chemioterapici per K mammario, e statine) e di alcool.

Tre pazienti con transaminasi aumentate sono evoluti in cirrosi. Due di essi rientrano nel gruppo dei trattati e uno solo ha ottenuto una SVR.

TABELLA 5



Due dei tredici pazienti con HCVRNA positività e transaminasi persistentemente normali sono stati trattati.

Uno ha iniziato la terapia antivirale nel 2009 e ha terminato i sei mesi di follow-up ottenendo una SVR, l'altro paziente non ha ottenuto una SVR ed ha avuto un rialzo

delle transaminasi in corso di terapia e tuttora i livelli ematici sono circa due volte il valore norma.

Un paziente cirrotico, con transaminasi nella norma, è in stretto follow-up clinico-strumentale per il riscontro ecografico di millimetriche immagini di dubbia interpretazione.

Un paziente cirrotico, con rialzo delle transaminasi, ha avuto posta diagnosi di HCC ed è stato trattato con RFTA. Il controllo ad un mese dalla procedura mostra una recidiva in loco.

All'esame endoscopico 3 dei 5 soggetti cirrotici presentano varici esofagee due di grado F1 e uno F2.

Segnaliamo 2 casi di distiroidismo sotto terapia.

Anche se i nostri numeri sono limitati comunque mostrano una risposta nel 60% dei pazienti trattati.

Confrontando le caratteristiche che avevano nel 1995-96 i pazienti oggi HCV-RNA positivi con transaminasi normali vs pazienti HCV-RNA positivi con transaminasi aumentate, non si rilevano differenze significative. Lo stesso accade confrontando sempre i due gruppi sopra menzionati con i dati di oggi come riportato dalle Tabelle 6 e 7.

Tabella 6

Confronto delle caratteristiche nel 1995-96 dei pazienti HCV-RNA+ oggi a transaminasi elevate e normali

	ALT= n=13	ALT↑ n=15	P<
Età	45,1 ± 15,2	43,1 ± 13,7	Ns
BMI	28,8 ± 3	28,2 ± 4	Ns
Fosf. Alc	104,5 (84-186)	114 (46-268)	Ns
γgt	17,5 (8-42)	26,5 (10-162)	Ns
PT	91 ± 10	100 ± 27	Ns
Alb	4,1 ± 0,5	4,4 ± 0,6	Ns
γglob	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,3	Ns
PLT	251615 ± 91773	375769 ± 65156	Ns
Colest	181,7 ± 25	177,9 ± 34,4	Ns
Trigliceridi	65 (44-207)	77,5 (35-148)	Ns
HDL	51,7 ± 19	45,6 ± 10	Ns
Staging	1 (0-3)	1 (0-3)	Ns
Grading	6 (1-11)	4,5 (0-14)	ns
ipertensione	3	3	Ns
diabete	5	2	Ns

Tabella 7

Confronto delle caratteristiche dei pazienti HCV-RNA+ che oggi hanno transaminasi normali e alte

	ALT= n=13	ALT↑ n=15	P<
Età	56,5 ± 11	54,4 ± 0,7	Ns
BMI	27,4 ± 2,3	28,5 ± 4	Ns
Fosf. Alc	70 (46-115)	89,5 (30-270)	Ns
γgt	45 (13-75)	37 (17-200)	Ns
PT	91,4 ± 7,6	91,3 ± 17,8	Ns
Alb	4,1 ± 0,5	3,89 ± 1,2	Ns
γglob	1,12 ± 0,5	1,2 ± 0,5	Ns
PLT	202307 ± 58327	297666 ± 85195	Ns
Colest	202,5 ± 32,9	187,15 ± 27,9	Ns
Trigliceridi	90 (65-236)	100 (80-218)	Ns
HDL	48,7 ± 6,8	52,08 ± 10	Ns
Staging	1 (0-3)	1 (0-3)	Ns
Grading	6 (1-11)	4,5 (0-14)	ns

La tabella 8 mette a confronto le caratteristiche del 1995-96 dei pazienti HCV-RNA positivi oggi evoluti in cirrosi e non. Le differenze significative riguardano i valori delle HDL-C ($p < 0,02$) e i punteggi istologici del grading ($p < 0,003$) e dello staging ($p < 0,006$).

Tabella 8

Confronto delle caratteristiche nel 1995-96 dei pazienti HCV RNA+ che oggi sono evoluti in cirrosi e non			
	Non cirrotici n=29	Cirrotici n=5	p<
Sesso(M)	17	2	Ns
Età	42.5 ±12.6	52.4 ± 4.1	0,005
BMI	25,9 ± 3	29,2 ± 2,2	0,05
Fosf. Alc	111,9 ± 49,3	107,4 ± 48,2	Ns
ygt	23 (8-128)	32 (16-162)	Ns
PT	91,8 ± 8	100 ± 4,9	Ns
Alb	4,3 ± 0,5	4 ± 0,6	Ns
γglobulina	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3	ns
PLT	316363±52000	263200 ± 13000	Ns
Colest	187,6 ± 35	172 ± 20	Ns
Trigliceridi	90,7 ± 48	69,2 ± 11	Ns
HDL	53,2 ± 13	44 ± 18	0,02
Staging	0,5 (0-2)	3 (1-3)	0,006
Grading	4 (0-11)	11 (5-14)	0,003

La tabella 9, invece mette a confronto le caratteristiche attuali dei pazienti HCV-RNA positivi oggi evoluti in cirrosi e non. Si nota subito che risultano significativamente più bassi, nella popolazione dei cirrotici, i livelli delle piastrine ($p < 0,004$), del colesterolo ($p < 0,005$). e delle γ globuline ($p < 0,02$).

Tabella 9

**Confronto delle caratteristiche nel 2007 dei pazienti HCV
RNA+ che oggi sono evoluti in cirrosi e non**

	Non cirrotici n= 29	Cirrotici n=5	P<
Età	53,7 ± 12,5	64 ± 5	0.01
BMI	28,4 ± 4	26,8 ± 1,5	Ns
Fosf. Alc	79 (70-250)	82 (68-270)	Ns
γgt	27 (13-200)	40 (32-107)	Ns
PT	92,6 ± 8	79,6 ± 11	Ns
Alb	4,1 ± 1	3,8 ± 0,5	Ns
γglob	1 ± 0,4	1,9 ± 0,5	0.02
PLT	220291 ± 64000	117000 ± 47000	0.004
Colest	206,7 ± 28	159 ± 23	0.005
Trigliceridi	117 ± 48	90,2 ± 8,2	Ns
HDL	53,6 ± 6	45 ± 9	Ns

Nelle tabelle 10 e 11 confrontiamo le caratteristiche di ieri e di oggi dei pazienti HCV-RNA positivi che oggi sono evoluti in cirrosi e dei pazienti che hanno transaminasi elevate. Dei dati del 1995-96 risultano significative le differenze dell'età ($p < 0,03$), del BMI ($p < 0,05$), HDL-C (0,02) e i punteggi dello staging ($p < 0,003$) e del grading ($p < 0,003$).

Tabella 10

Confronto delle caratteristiche nel 1995-96 dei pazienti HCV RNA+ che oggi sono evoluti in cirrosi e dei pazienti che hanno le transaminasi elevate

	Alt ↑ n=12	Cirrotici n=5	p<
Sesso(M)	9	2	Ns
Età	41.1 ±14.5	52.4 ± 4.1	0,03
BMI	25,5 ± 3,7	29,2 ± 2,2	0,05
Fosf. Alc	97,5(46-268)	107,4 ± 48,2	Ns
γgt	26(8-162)	32 (16-162)	Ns
PT	94 ± 5	100 ± 4,9	Ns
Alb	4,4 ± 0,5	4 ± 0,6	Ns
γglobulina	1.12 ± 0.3	1.5 ± 0.3	Ns
PLT	429500±77000	263200 ± 13000	Ns
Colest	176 ± 40	172 ± 20	Ns
Trigliceridi	89,7 ± 40	69,2 ± 11	Ns
HDL	52 ± 12	44 ± 18	0,02
Staging	1 (0-3)	3 (1-3)	0,003
Grading	5 (0-14)	11 (5-14)	0,003

Mentre le differenze attuali riguardano l'età (p<0.03), Pt (p<0,04), le piastrine (p<0.02) e il colesterolo (p<0,02) (tabella 9)

Tabella 11

Confronto delle caratteristiche nel 2007 dei pazienti HCV RNA+ che oggi sono evoluti in cirrosi e dei pazienti che hanno le transaminasi elevate

	ALT ↑ n=12	Cirrotici n=5	P<
Età	52,4 ± 14	64 ± 5	0.03
BMI	29,2 ± 5	26,8 ± 1,5	Ns
Fosf. Alc	85,5 (30-270)	82 (68-270)	Ns
γgt	37 (13-200)	40 (32-107)	Ns
PT	96,4 ± 16	86,8 ± 26	0,04
Alb	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,5	Ns
γglob	1 ±0,4	1,9 ±0,5	Ns
PLT	429000 ±77000	117000 ±47000	0.02
Colest	196 ± 20	159 ± 23	0.02
Trigliceridi	128 ± 41	90,2 ± 8,2	Ns
HDL	51,3 ± 11	45 ± 9	Ns

Abbiamo valutato i nostri pazienti col Fibroscan. Purtroppo non è stato possibile eseguire l'esame a tutti i pazienti, 8 di essi non si sono resi disponibili. Questi ultimi non sono stati seguiti periodicamente nel nostro Ambulatorio in questi 15 anni ma sono stati richiamati telefonicamente. Non si è eseguito l'esame ad una paziente perché incinta e ad un paziente affetto da malattia di Parkinson per espressa volontà dei familiari.

Dei 5 pazienti cirrotici solo 2 hanno potuto eseguire l'esame perché gli altri avevano un BMI elevato e questo a conferma dell'importanza dei cofattori per l'evoluzione della malattia epatica.

Dei pazienti che si sono sottoposti a valutazione con Fibroscan due soli hanno avuto un risultato superiore a 8,4kPa (8,6 e 9,6 kPa) e uno ha avuto un valore superiore a 14 (33,8 kPa).

Applicando l' APRI test ai pazienti del nostro studio abbiamo ottenuto dei risultati del confronto fra i valori del 1995 e oggi descritti nella tabella 12.

Tabella 12

Risultati APRI	1995-1996	2010
<0,5	25	22
0,5-1,5	3	4
>1,5	0	2
<1	28	24
1-2	0	2
>2	0	2

Nel biennio 1995-1996 25 pazienti avevano assenza di fibrosi significativa, 3 erano inclassificati per fibrosi significativa, 0 per fibrosi significativa. Tutti avevano assenza di cirrosi così come confermato dalla biopsia epatica.

Oggi i pazienti sono divisi in 22 con assenza di fibrosi significativa, 4 inclassificati per fibrosi significativa e 2 con fibrosi significativa.

Valutandoli con il cut-off per cirrosi 24 non hanno cirrosi, 4 con cirrosi non classificabile e 4 con presenza di cirrosi.

Calcolando il FibroIndex e rivalutando i cut-off dell' APRI come eseguito nel lavoro di Koda si ottengono i seguenti risultati.

Tabella 13

	Cut-off	Risultati
APRI F0-1	$\leq 0,36$	14
F2-3	$\geq 0,85$	3
FibroIndex F0-1	$\leq 1,25$	16
F2-3	$\geq 2,25$	3

Quindi, secondo APRI, 14 pazienti avrebbero F0-1 e 3 pazienti F2-3, mentre secondo il FibroIndex 16 pazienti avrebbero F0-1 e 3 F2-3.

Lo stadio di fibrosi è in accordo col Metavir score.

Confrontando preliminarmente i risultati dell'APRI, FibroIndex e Fibroscan sembra esservi una certa concordanza per identificare i soggetti con assenza o lieve fibrosi e cirrosi, mentre per i quadri di fibrosi intermedi sembra esserci discrepanza soprattutto fra Fibroscan da una parte e Apri e FibroIndex dall'altra.

Con la collaborazione del Professore Filippo Spagnolo, Professore Associato di Matematiche Complementari del G.R.I.M., Dipartimento di Matematica ed Applicazioni, dell' Università di Palermo, abbiamo continuato la valutazione dei dati in nostro possesso con l'utilizzo dell'analisi implicativa .

Analisi Implicativa

L'analisi implicativa delle variabili al 90% è la seguente:

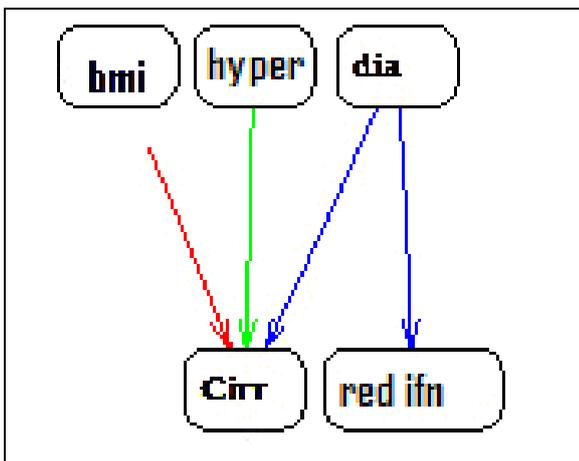


Fig. 1 Analisi implicativa

Da questo grafo le variabili (com, iper, dia) implicano (cirro) cioè un paziente affetto da ipertensione, diabete e sindrome metabolica implicano la Cirrosi epatica.

Questo risultato concorda con gli altri risultati sperimentali (analisi di casi o gruppi di casi).

La variabile (dia) implica la variabile (ridu_IFN), cioè i pazienti diabetici hanno più probabilità di andare incontro a riduzione dei dosaggi dei farmaci antivirali. Questo

risultato sembra essere nuovo rispetto alla letteratura e soprattutto non presente nell'analisi di casi.

Albero Coesivo

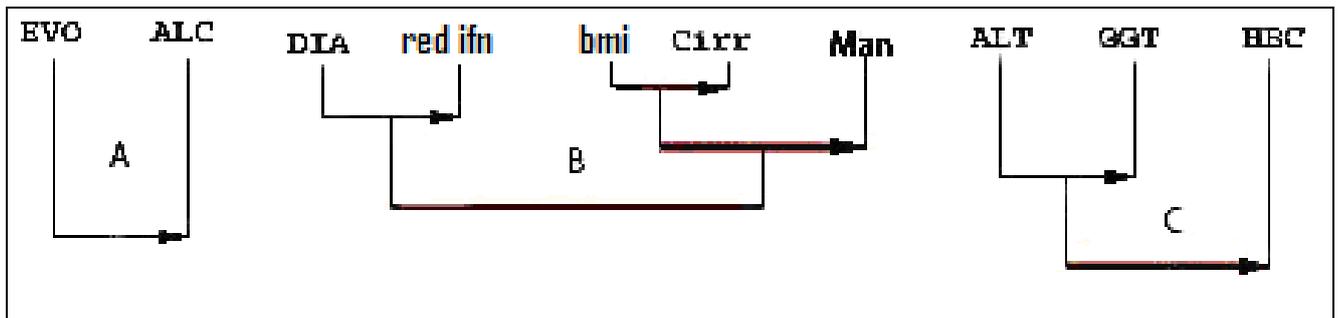


Fig. 2 Albero coesivo

I dati di questo grafo confermano i risultati del grafo delle implicazioni e arricchiscono l'analisi di ulteriori risultati.

In particolare:

1. l'implicazione "A" mi dice che un soggetto in evoluzione cirrotica implica il consumo d'alcol. Questo dato non era presente nel grafo precedente.
2. La variabile (dia) implica la variabile (ridu_IFN), cioè i pazienti diabetici hanno più probabilità di andare incontro a riduzione dei dosaggi dei farmaci antivirali. La variabile (com) implica (cirro), cioè un soggetto con comorbidità ha più probabilità di evolvere in cirrosi. Le due variabili (com. cirro) implicano (Man), cioè il sesso maschile è più a rischio di Cirrosi.
3. Nel caso "C", la variabile (ALT) implica la variabile (GGT) ed entrambe implicano (HBC). Questo significa che un soggetto con positività dei markers

del virus B ha più probabilità di avere un aumento dei livelli sierici delle transaminasi e delle gammaGT.

Variabili supplementari e grafo della similarità.

Sono state introdotte due variabili supplementari di individui. Le variabili sono: (PNALT) e (Cirrosi), sono state individuate attraverso gli indici ematochimici e strumentali di funzionalità epatica. La matrice trasposta ci ha permesso di poter analizzare i gruppi di pazienti che avevano le stesse caratteristiche.

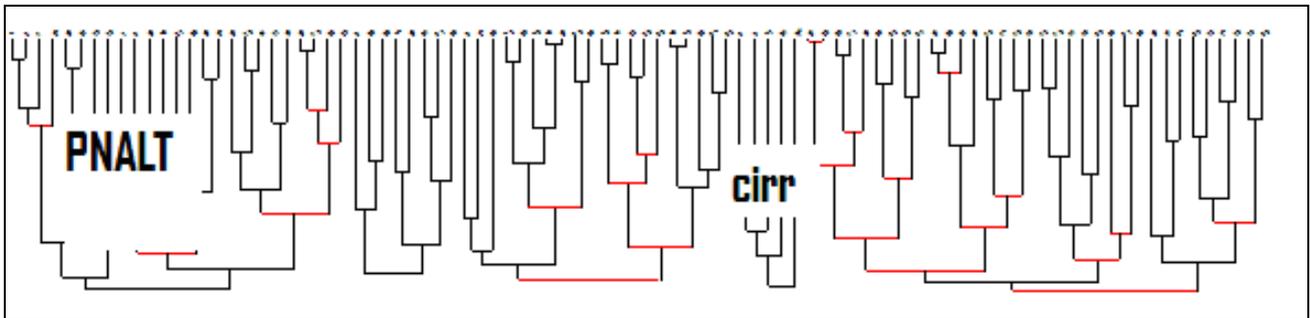


Fig. 3 Grafo delle Similarità

Il grafo di similarità ci conferma che pazienti con infezione da virus C e transaminasi persistentemente normali hanno una probabilità di evolvere in cirrosi bassa, in letteratura i dati si attestano sul 30%.

Discussione

L'analisi dei risultati della nostra casistica fa emergere che cinque dei nostri iniziali 40 pazienti ha sviluppato una franca cirrosi del fegato, a conferma del fatto che i pazienti con PNALT necessitano di un monitoraggio della malattia quanto quelli che si presentano con ALT elevate. Questa affermazione è ancora oggi vera poiché è difficile distinguere fra i pazienti che si presentano con PNALT quelli passibili di progressione della malattia. Dai nostri dati, seppur limitati, sembra venire la conferma che i soggetti che presentano un grado di fibrosi epatica più elevato all'inizio sono quelli che progrediranno la loro malattia. Altri fattori che a nostro avviso contribuirebbero alla progressione sono i classici cofattori di malattia, cioè il sovrappeso/obesità, la coesistenza di diabete mellito, di ipertensione, di consumo alcolico, di associazione con una malattia da HBV magari rappresentata sierologicamente solo dalla presenza dell'anti-HBc.

Una nota a parte merita anche la chiarificazione del ruolo dei genotipi sulla progressione di malattia. La nostra casistica è per certi aspetti limitata numericamente, ma sarebbe interessante capire se progrediscono più facilmente i genotipi "cattivi" rispetto a quelli più "facili". La non numerosità del nostro campione, così come quelli di altri in letteratura, è comunque giustificato dal fatto che per avere informazioni corrette occorre eseguire la biopsia del fegato sia prima che dopo, il che non è eticamente giustificato se non in studi controllati e dedicati a questo scopo.

Un limite del nostro studio è sicuramente quello della mancata esecuzione di una seconda biopsia del fegato a distanza di tanti anni, ed allora come surrogato abbiamo utilizzato i test di funzionalità epatica, l'ecografia, la clinica e i marcatori non invasivi di fibrosi per non risultare aggressivi nei confronti di quei pazienti, e sono la maggior parte, che non hanno avuto progressione clinica della malattia. E' necessario tuttavia continuare a monitorizzare soprattutto questi ultimi pazienti, perché come è noto ormai dalla storia naturale della malattia da HCV, potrebbe volerci un ventennio ed a volte più perché una infezione da HCV progredisca verso la cirrosi e quindi anche i pazienti con funzionalità epatica oggi normale potrebbero più in là nel tempo manifestare evidenza di compromissione epatica.

Visto il ridotto numero della nostra casistica abbiamo utilizzato l'ASI a supporto dell'ASMC, infatti i metodi statistici non parametrici permettono di fare anche analisi di piccoli campioni dando inferenze su popolazioni più vaste. E' una statistica inferenziale (Gras-Einoshin-Guillet-Spagnolo, 2007). Inoltre i metodi statistici non parametrici permettono di fare anche analisi di piccoli campioni. I risultati ottenuti dai grafi implicativi confermano i dati ottenuti con i metodi tradizionali e con l'analisi di casi.

La presenza dei cofattori di malattia, cioè il soprappeso/obesità, la coesistenza di diabete mellito, di ipertensione, di consumo alcolico, di positività dei markers HBV, anche solo la presenza dell'anti-HBc sono risultati statisticamente significativi anche con l'ASI.

Un dato che si evince solo con questo strumento statistico, almeno dai nostri dati è la implicazione del diabete nella riduzione dei dosaggi della terapia antivirale per comparsa di effetti collaterali di rilevanza clinica.

La sicurezza del trattamento e i tassi di risposta suggeriscono di gestire questi pazienti allo stesso modo dei pazienti con transaminasi elevate come dimostrato nello studio di Puoti dove le percentuali di SVR sono state elevate soprattutto per i genotipi 1.(35)

Questi dati possono essere giustificati dalla elevata prevalenza del sesso femminile nei pazienti trattati, il grado lieve di danno epatico, l'età media bassa e i valori normali di BMI, quindi sicuramente tutti fattori prognosticamente favorevoli.

Conclusioni

Sicuramente molta strada è stata percorsa dagli anni in cui i pazienti HCV-RNA positivi con ALT nella norma venivano definiti portatori sani o asintomatici, e ad essi veniva dedicata minore attenzione e prestata minore sorveglianza rispetto ai pazienti HCV positivi con ALT elevate. I dati oggi disponibili dimostrano che, pur in presenza di una minore gravità del quadro istologico e di una storia naturale benigna in molti casi, non possono essere escluse del tutto una più severa evoluzione della fibrosi e una storia naturale maggiormente progressiva. Queste considerazioni, unitamente all'evidenza che la terapia combinata è altrettanto efficace nei soggetti con ALT nella norma, come dimostrato nello studio di Puoti, fa una volta di più ritenere che i due gruppi di pazienti non siano sostanzialmente diversi, e che ai soggetti con ALT normali debbano essere applicati gli stessi criteri sin qui consigliati per i pazienti con ALT elevate.

Bibliografia

1. Puoti C, Bellis L, Galossi A, Guarisco R, Nicodemo S, Spilabotti L, et al. Antiviral treatment of HCV carriers with persistently normal ALT levels. *Mini Rev Med Chem.* 2008 Feb;8(2):150-2. Review
2. Puoti C, HCV carriers with persistently normal aminotransferase levels: normal does not always mean healthy. *J Hepatol* 2003,38:529-32.
3. Alberti A, Morsica G, Chemello L et al Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992; 340: 697-698.
4. Puoti C, Magrini A, Stati T, et al Clinical, histological, and virological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal or abnormal alanine transaminase level. *Hepatology* 1997, 26 (6):1393-1398.
5. Gholson CF, Morgan K, Catinis G et al. Chronic hepatitis C with normal aminotransferase levels: a clinical histologic study. *Am J Gastroenterol.* 1997, 92:1788-1792.
6. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F et al. Histological and virological features and follow up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the

Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol* 2002; 37(1):117-123.

7. Pradat P, Alberti A, Poynard T, et al. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic Hepatitis C: a European Collaborative Study. *Hepatology* 2002; 36: 973-977.

8. Montalto G, Zignego L, Ruggeri MI, Giannini C, Soresi M, Monti M, Carroccio A, Careccia G, Di Martino D, Giannelli F. Serum HCV-RNA and liver histologic findings in patients with long-term normal transaminases. *Digestive Diseases and Sciences*. 1997;42(8) 1703-1707

9. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seef LB. Diagnosis management and treatment of hepatitis C. AASLO Practice Guideline *Hepatology* 2004, 39: 1147-1171.

10. Puoti C, Guido M, Mangia A, et al Clinical management of HCV carriers with normal aminotransferase levels. *Digestive and Liver disease* 2003; 35:362-369.

11. Prati D, Taioli E, Zanella A, et al Update definitions of healthy ranger for serum alanine aminotransferase. *Ann Intern Med* 2002; 137:1-10.

12. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C: Consensus Statement. *Journal of Hepatology* 1999; 30:956-961

13. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel Statement: Management of Hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 (suppl.):1335-1365

14. Martinot-Peignoux M, Bayer N, Cazals-Hatem D, et al. Perspective study of anti-Hepatitis C virus-positive patients with persistently normal serum ALT with or without detectable serum HCV RNA. *Hepatology* 2001; 34: 1000-1005.

15. Rumi MG, De Filippi F, La Vecchia C et al. Hepatitis C reactivation in patients with chronic infection with genotypes 1b and 2c: a retrospective cohort study of 206 untreated patients. *Gut* 2005;54:402-406

16. Bacon BR. Treatment of patients with Hepatitis C and normal serum aminotransferase levels Proc. of the NIH Consensus Conference Management of Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(Suppl. 1). 5179-5184.

17. Persico M, Persico E, Suozzo R, et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2000; 118:760-764.

18. Mathurin P, Moussali J, Cadranel JE, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1996; 27: 868-872.
19. Huí CK, Belaye T, Montegrando K, et al. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003; 38:511-517
20. Puoti C, Bellis L, Martellino F et al. Chronic hepatitis C and normal ALT levels. treat the disease not the test. *J Hepatol* 2005; 43: 534-535.
21. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C *Gastroenterology* 2003; 124:97-104.
22. Okanoue T, Makiyama A, Nakayama M, et al. A follow-up study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for hepatitis C virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *J Hepatol* 2005; 43: 599-605
23. Cividini A, Rebucci C, Silini E, et al. Is the natural history of HCV carriers with normal aminotransferase levels really benign? *Gastroenterology* 2001; 121: 1526-1527

24. Persico M, Palmentieri B, Coppola L, et al. Occurrence of HCC in asymptomatic HCV related chronic hepatitis. *Digest Dis Sci* 2002; 11:2407-2410.
25. Puoti C, Bellis L, Martellino F, L et al. Occurrence of HCC in an apparently healthy HCV carrier. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Nov;17(11):1263-4.
26. Persico M, Perrotta S, Persico E, Terraciano L, Folgori A, Ruggeri L, Nicosia A, Vecchione R, Mura V L, Masarone M e Torella R. Hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels: biological peculiarity and update of the natural history of liver disease at 10 years. *J of Viral Hepatitis* 2006; 13:290-296
27. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, Zaltron S, Stornaiuolo G, Bergami N, Bellis L, Precone D F, Corvisieri P, Puoti M, Minola E, Gaeta G B. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol* 2002; 37: 117-123
28. Mangia A, Spinzi G, Vuturo O, Pazienza V, Iacobellis A, Piattelli M, Giaccone A, Leandro G, Piermanni V, Minoli G, Montalto G, Andriulli A. Viral clearance in HCV viraemic patients with normal alanine aminotransferase after combination therapy: a controlled, open-labelled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:331-337.

29. Lee SS, Sherman M. Pilot Study of interferon-alpha and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C and normal transaminase values. *J viral Hepat* 2001; 8: 202-205.
30. Hui CK, Monto A, Belaye T et al. Outcomes of interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C in patients with normal serum aminotransferase. *Gut* 2003; 52: 1644-1648.
31. Jacobson IM, Ahmed F, Russo MW et al. Interferon alpha-2b and ribavirin for patients with chronic hepatitis C and normal ALT *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1700-1705.
32. Zeuzem S, Diago M, Gane E, et al. Peginterferon alfa-2a (40KD) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2004;127:1724-32.
33. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association [AGA] Medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 225-264

34. Alberti A, Bonino F, Bortolotti F per la Commissione Terapia antivirale della Associazione Italiana per lo Studio del fegato (AISF). Trattamento della epatite da HCV www.webaisf.org
35. Puoti C, Pellicelli AM, Romano M, Mecenate F, Guarisco R, Barbarini G, et al. Treatment of hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels with peginterferon alpha-2a and ribavirin: a multicentric study. *Liver Int* 2009 Nov, 29(10):1479-84
36. Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombatto P, et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat.* 2007 May;14(5):360-9.
37. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A Simple Noninvasive Index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, vol. 38, No. 2, 2003
38. Masahiko Koda, Yoshiko Matunaga, Manri Kawakami, Yukihiro Kishimoto, Takeaki Suou, and Yoshikazu Murawaki. FibroIndex, a Practical Index for Predicting Significant Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *HEPATOLOGY*, Vol. 45, No. 2, 2007. 297-306.

39. Montalto G, Mazzola A, Soresi M, Consiglio P, Ruggeri M I, Ingrassia G, Bascone F, Carroccio A, Galfano G, Notarbartolo A. Antibodies to hepatitis C virus and histological pattern in Sicilian blood donors. *European Journal of Internal Medicine* 1994; 5: 299-304
40. Soresi M, Carroccio A, Bonfissuto G, Agate V, Magliarisi C, Aragona F, Levriero M, Notarbartolo A, Montalto G. Ultrasound detection of abdominal lymphadenomegaly in subjects with hepatitis C virus infection and persistently normal transaminases: a predictive index of liver histology severity. *Journal of Hepatology* 1998; 28: 544-549.
41. Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D'Errico A et al. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997; 27: 679-685.
42. Piscaglia F, Donati G, Serra C, Muratori R, Solmi L, Gaiani S et al. Value of splanchnic Doppler ultrasound in the diagnosis of portal hypertension. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27: 893-9.
43. Guidelines Sub-Committee. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypert.* 1999; 17: 151-83 GL

44. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539–53
45. Spagnolo F. *L'analisi statistica implicativa: uno dei metodi di analisi dei dati nella ricerca in didattica delle matematiche*, Proceedings Troisième Rencontre Internationale A.S.I. (Analyse Statistique Implicative), Palermo 6-8 Octobre 2005, Suppl. al n.15 “Quaderni di Ricerca in Didattica”, ISSN 1592-5137. (pp. 25-52)
46. Gras R., Regnier J.C. Spagnolo F. (2009), Mesurer l'écart entre une analyse a priori et la contingence en didactique, *Revue des Nouvelles Technologies de l'information*, RNTI E-16, pp. 165-174, Cépadués Edition, ISSN 1764-1667, ISBN 978.2.85428.897.1.
47. Gras R. y Régnier J.-C., Spagnolo F. [2009], Una medida comparativa de las matematicas entre el analisis a priori y la contingencia, *Teoria y Aplicaciones del Analisis Estadistico Implicativo*, Eds : P.Orus, L.Zemora, P.Gregori, Universitat Jaume-1, Castellon (Espagne), ISBN : 978-84-692-3925-4, p 143-158.
48. Gras R., Guillet F., Spagnolo F., Suzuki E., (2008)(Editors), *Statistical Implicative Analysis: theory and applications*, Springer, *Studies in Computational Intelligence*, pp. 1-513, ISBN 978-3-540-78982-6.