
UTILITATEA ULTRASONOGRAFIEI CU SUBSTANȚĂ DE CONTRAST ÎN PREDICȚIA CIROZEI HEPATICE – META-ANALIZĂ

DIANA FEIER, RADU BADEA, MONICA LUPȘOR, HORIA ȘTEFĂNESCU

Clinica Medicală III, UMF „Iuliu-Hațieganu”, Cluj-Napoca

Rezumat

Scop. Meta-analiza performanței diagnostice a ultrasonografiei cu contrast (CEUS) în predicția cirozei hepatice, folosind timpul de apariție a substanței de contrast în venele hepatice (HVAT).

Material și metodă. S-au revizuit studiile care raportează performanța HVAT în predicția cirozei la pacienții cu diferite hepatopatii difuze confirmate histologic și evaluate prin CEUS. După testarea variabilității valorilor prag de diagnostic, performanța a fost apreciată prin prisma sensibilității, specificității și ariei de sub curba ROC (AUROC). Prin meta-regresie s-au explorat sursele de eterogenitate.

Rezultate. Din 21 de articole eligibile, au fost incluse în meta-analiză 8 studii, cu un total de 372 pacienți (vârsta medie $52,7 \pm 6,5$ ani, HCV 40,86%, HBV 4,56%, hepatopatii alcoolice 4,04%, hepatopatii non-alcoolice 3,22%, alte etiologii 47,32%), cu o prevalență a cirozei de 40,32% (35,34% Child A, 27,33% Child B, 10% Child C, 27,33% neclasificate). Fără a exista variabilitate între valorile prag raportate (coeficient de corelație Spearman: 0,071, $p=0,86$), sensibilitatea a fost de 0,90 [95% interval de încredere (IC): 0,84-0,94], specificitatea a fost de 0,85 (95% IC: 0,83-0,92), cu AUROC de 0,95 în diagnosticul cirozei hepatice. Nu au existat diferențe semnificative statistic între clasele Child-Pugh ($p=0,7$). Variația de ansamblu între studii a fost de 13,8%, datorită eterogenității. Performanța generală a HVAT a fost influențată de scorul de calitate al cercetărilor ($p=0,01$) și de prevalența cirozei în populațiile studiate ($p=0,02$), indiferent de vârstă, etiologia bolii, agentul de contrast utilizat sau tehnica ultrasonografică de achiziție ($p>0,05$).

Concluzie. La pacienții cu ciroză hepatică, HVAT permite evaluarea neinvazivă a fibrozei, cu o performanță bună, fără a putea diferenția între stadiile Child-Pugh.

Cuvinte cheie: meta-analiză, ultrasonografie cu contrast, ciroză hepatică, timpi de tranzit.

CONTRAST-ENHANCED ULTRASOUND IN THE DIAGNOSIS OF LIVER CIRRHOSIS - A META-ANALYSIS

Abstract

Aims. We aim to evaluate, through a meta-analysis, the ability of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) hepatic vein arrival-time (HVAT) in predicting liver cirrhosis in patients with diffuse chronic liver diseases (LD).

Material and Methods. We reviewed for inclusion all the studies which assess the diagnostic performance of HVAT in patients having unequivocal clinical signs or liver biopsy findings of cirrhosis who underwent CEUS. After testing for variability of the diagnostic threshold and a summary receiver operating characteristic curve (sROC) was constructed, pooled weighted estimates of sensitivity and specificity were calculated. Using a random-effects model, meta-regression was performed to explore sources of heterogeneity and explain differences between studies.

Results. Out of 21 eligible studies, 8 were included in the meta-analysis with

pooled 389 subjects (mean age 52.7±6.5). Individual data were analyzed in 372 patients (HCV 40.86%, HBV 4.56%, alcoholic LD 4.04%, non-alcoholic LD 3.22%, other etiologies 47.32%), with a cirrhosis prevalence of 40.32% (35.34% Child A, 27.33% Child B, 10% Child C, 27.33% not classified). With no variability of the diagnostic threshold (Spearman correlation coefficient: 0.071, $p=0.86$), pooled weighted estimates of sensitivity were 0.90 [95% CI: 0.84-0.94] and of specificity were 0.85 (95% CI: 0.83-0.92), with an AUROC of 0.95 in predicting liver cirrhosis. We found no statistically significant differences among different Child-Pugh classes ($p=0.7$). Variation across studies was 13.8% due to heterogeneity. The overall performance of HVAT was influenced by quality scores ($p=0.01$) and prevalence of cirrhosis ($p=0.02$), regardless of age, disease etiology, contrast agent used or ultrasound acquisition technique ($p>0.05$).

Conclusions. Contrast-enhanced HVAT is a non-invasive method which allows a reliable assessment of liver cirrhosis. It has no ability in distinguishing between Child-Pugh classes.

Keywords: meta-analysis, contrast enhanced ultrasound, liver cirrhosis, transit times.

Introducere

Ciroza hepatică reprezintă o patologie cu implicații asupra hemodinamicii sistemice și intrahepatice. Ultrasonografia (US) reprezintă investigația de primă intenție în evaluarea pacienților cu această patologie, cu specificitate de până la 100% în diagnosticul pozitiv al cirozei. În ceea ce privește sensibilitatea metodei, rezultatele se caracterizează printr-o mare variabilitate cu valori scăzute, de până la 25% [1-4]. Aceste rezultate reflectă în mare parte reproductibilitatea scăzută a US convenționale [5]. Studiile privind valoarea diagnostică a parametrilor Doppler în depistarea precoce a modificărilor hemodinamice din ciroză nu au avut un impact major asupra acurateței diagnostice a metodei [6].

O nouă tehnică imagistică cu rol în diagnosticul neinvaziv al cirozei hepatice este reprezentată de ecografia utilizând diferite substanțe de contrast. Analiza parametrilor caracteristici metodei, curbele de spălare; timpii de tranzit; cuantificarea "cantității de contrast" din periferia parenchimului la sfârșitul fazei arteriale, histograma de culoare, au demonstrat utilitatea metodei în special în diagnosticul de excludere al cirozei [7-9]. Interesul asupra metodei este în continuă creștere.

Scopul studiului este de a stabili performanța diagnostică a ultrasonografiei cu contrast în evaluarea pacienților cu ciroză, evaluând timpul de apariție al substanței în venele hepatice.

Material și Metodă

Documentarea presupune o strategie controlată de căutare a informațiilor cu privire la metodele de interes. S-au utilizat ca și surse de căutare: *PubMed* - <http://medlineplus.gov>; *PloS* - <http://www.plos.org>; *BMC* - <http://www.biomedcentral.com>; *EBSCO* - <http://search.ebscohost.com>; *Cochrane Database of Systematic Reviews* - <http://gateway.ovid.com/autologin.html>; *EMBASE* - <http://www.embase.com>. S-au folosit cuvinte cheie generate de MESH: *liver fibrosis, non-invasive, diffuse liver disease, ultrasonography, contrast enhanced ultrasonographic imaging, CEUS*. Pentru a nu pierde din vedere studii relevante, s-au selectat și procurat articolele de interes, ulterior realizându-se o filtrare a referințelor relevante. Ca și limite impuse căutării, am ales studii efectuate pe pacienți având vârsta de peste 18 ani, iar termenii cheie trebuie să se fi regăsit în titlul sau abstractul articolului. Nu s-a definit o limită privind numărul minim de pacienți incluși în studiu.

Criterii de eligibilitate. Eligibilitatea studiilor s-a evaluat utilizând ghidurile privind standardele de raportare ale acurateței diagnostice, STARD. Criteriile de includere și excludere s-au aplicat titlurilor articolelor care au corespuns documentării. Ulterior s-au aplicat asupra rezumatelor celor care s-au dovedit a fi eligibile, extinzând filtrarea asupra textului integral, pentru a putea stabili articolele incluse în meta-analiză. Am inclus studii care au evaluat performanța metodei utilizând *pacienți* cu ciroză hepatică de diferite etiologii, confirmați prin biopsie hepatică sau utilizând criterii clinice și biochimice unanim acceptate în diagnosticul cirozei.

Metoda diagnostică evaluată a fost ultrasonografia cu contrast la pacienții cu ciroză hepatică. Am inclus doar acele studii care au evaluat performanța timpului de apariție a substanței de contrast în venele hepatice (HVAT) utilizând ca și tehnici de achiziție *Pulse Inversion Imaging* sau Doppler-ul spectral. S-au luat în considerare doar acele studii care au comparat rezultatele obținute cu un standard diagnostic, în cazul de față fiind biopsia hepatică. Pentru a reduce erorile de eșantionare, au fost incluse doar acele studii care au raportat numărul de pacienți adevărat pozitivi, adevărat negativi, fals pozitivi și fals negativi sau au putut fi deduse din rezultatele raportate. Au fost culese

următoarele date: țara de desfășurare a studiului, anul publicației, vârsta medie a pacienților, prevalența cirozelor, substanța de contrast și doza utilizată, tehnica de achiziție a datelor, criteriile de diagnostic folosite ca referință și anume biopsia hepatică sau criterii clinice unanim acceptate de diagnostic al cirozei hepatice, procentul pacienților care au beneficiat de diagnostic histologic și modul de apreciere a valorilor prag, înainte sau după efectuarea testului de referință.

Analiza statistică

În analiza de ansamblu a studiilor luate în considerare s-a calculat sensibilitatea și specificitatea tehnicii CEUS. Sensibilitatea (Se%) s-a calculat utilizând formula: $AP/(AP+FN)$, unde AP reprezintă pacienții adevărat pozitivi, iar FN reprezintă pacienții fals negativi. Specificitatea (Sp%) s-a calculat folosind formula $AN/(FP+AN)$, unde AN sunt pacienții adevărat negativi, iar FP cei fals pozitivi. *Odd-ratio* diagnostic (DOR) s-a considerat ca fiind $(AP*AN)/(FP*FN)$. S-au construit grafice de tip *forest-plot* pentru a ilustra valorile sensibilităților și specificităților studiilor luate în considerare, cu intervalele lor de confidență. S-a realizat curba sROC pentru a sumari pacienții adevărat și falși pozitivi ai studiilor incluse. S-a calculat sensibilitatea și specificitatea modelului construit pentru meta-analiză. Prin meta-regresie s-au evidențiat posibilele surse de eterogenitate care pot influența Se (%) și Sp (%) modelului.

Rezultate

Au fost selectate 21 de studii eligibile, care ulterior au fost evaluate conform criteriilor STARD. În final au fost incluse în meta-analiză 8 studii, cu un număr total de 389 de pacienți, numărul de pacienți din loturile de studiu variind între 12 și 83 și având o vârstă medie de $52,7 \pm 6,5$ ani. Analiza statistică s-a efectuat pe un lot final de 372 pacienți cu ciroză de diferite etiologii: HCV 40.86%, HBV 4.56%, hepatopatii alcoolice 4.04%, hepatopatii non-alcoolice 3.22%, alte etiologii 47.32%. Prevalența

cirozei a fost de 40,32% (35,34% Child A, 27,33% Child B, 10% Child C, iar 27,33% neclasificate (Tabel I).

Sensibilitatea a avut variații mai mari între studii decât a avut specificitatea (Fig. 1, Fig. 2).

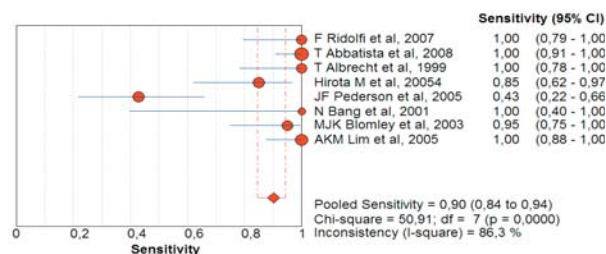


Fig. 1. Forest-plot al sensibilității (95% interval de confidență) tuturor studiilor incluse în meta-analiză.

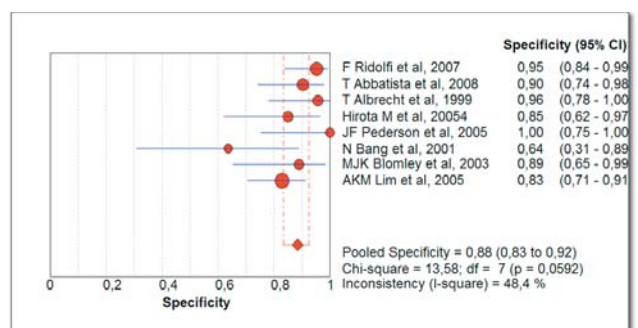


Fig. 2. Forest-plot al specificității (95% interval de confidență) tuturor studiilor incluse în meta-analiză.

Nu s-au observat diferențe statistice semnificative între diferitele clase Child-Pugh ($p=0,7$).

Fără a exista variabilitate între valorile prag raportate (coeficient de corelație Spearman: 0,071, $p=0.86$), sensibilitatea cumulată a fost de 0.90 [95% interval de confidență (CI): 0.84-0.94] și specificitatea a fost de 0.85 (95% CI: 0,83-0.92), cu o AUROC de 0,95 în estimarea

Tabel I. Caracteristicile articolelor incluse în meta-analiză.

Studiu	Total pacienți/pacienți cu ciroză	Pacienți cu ciroză	Substanță de contrast	Tehnica de achiziție	Cut-off HVTT pt ciroză
T Albrecht et al., 1999 [10]	38/15 (Child A/B/C - 8/3/4)	39,47%	Levovist, 2,5 g (300mg/ml)	Spectral Doppler	18,3(s)
N Bang et al., 2001 [11]	15/4	26,66%	Levovist, 2,5 g (300mg/ml)	Pulse inversion imaging	16 (s)
MJK Blomley et al., 2003 [12]	38/20 (Child A/B/C - 5/7/8)	52,63%	Levovist, 2 g (300mg/ml)	Spectral Doppler	21 (s)
JF Pedersen et al., 2005 [13]	34/ 9	26,47%	Levovist, 2,5 g (300mg/ml)	Pulse inversion imaging	19,4 (s)
M Hirota et al., 2005 [14]	40/20 (Child A/B/C- 13/7/0)	50%	Levovist, 2,5 g (300mg/ml)	Pulse inversion imaging	24 (s)
AKP Lim et al., 2005 [15]	85/38	44,70%	Levovist, 2 g (300mg/ml)	Spectral Doppler	21 (s)
F Ridolfi et al., 2007 [16]	53/16 (Child A/B/C - 8/8/0)	30,18%	Sonovue (2,5 ml)	Spectral Doppler	17 (s)
T Abbattista et al., 2008 [17]	85/38 (Child A/B/C -19/16/3)	44,70%	Sonovue (2,5 ml)	Spectral Doppler	17 (s)

cirozei hepatice. Valoarea DOR obținută a fost de 102,36 (36,67-285,75) (Fig. 3).

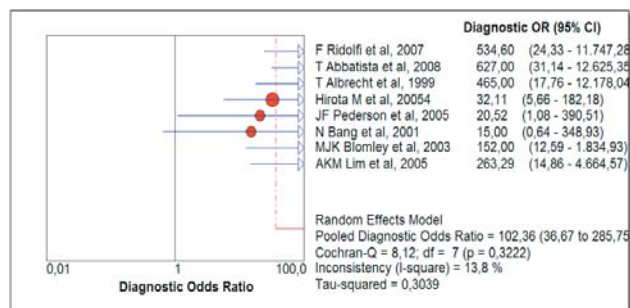


Fig. 3. Forest-plot al DOR (95% interval de confidență) tuturor studiilor incluse în meta-analiză.

Prin reprezentarea grafică a curbei sROC (Fig. 4), cummul tuturor valorilor diagnostice nu respectă modelul, performanța metodei fiind astfel influențată de alți factori decât valorile prag de diagnostic obținute. Variația de ansamblu între studii a fost de 13,8% datorită eterogenității. S-au introdus în meta-regresie parametrii care ar putea influența valoarea diagnostică a HVAT. Performanța metodei este influențată de prezența formațiunilor focale ($p=0,01$) și de prevalența cirozei în populațiile studiate ($p=0,02$), indiferent de vârstă, etiologia bolii, agentul de contrast utilizat sau tehnica ultrasonografică utilizată pentru achiziție ($p>0,05$) (Tabelul II).

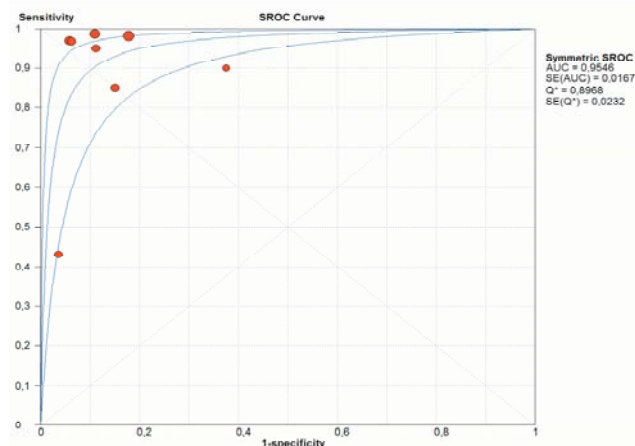


Fig. 4. Sensibilitatea și specificitatea ilustrate sub forma curbei

sROC.

Discuții

Studiul de față se adresează unei probleme de actualitate pe plan internațional și național, evaluarea neinvazivă a fibrozei și restructurării hepatice la pacienții cu ciroză hepatică, utilizând ultrasonografia cu contrast.

Dinamica cercetării pe domeniul temei propuse, investigată la nivel internațional, arată un interes mare al cercetătorilor din lume în ceea ce privește fibroza hepatică (căutare cu cuvintele cheie „*liver fibrosis*”: PubMed 86563 rezumate, din care 8222 publicate în ultimii 5 ani) și tehnicile neinvazive de diagnostic (căutare cu cuvintele cheie „*liver fibrosis, non-invasive*”: PubMed 712 rezumate, din care 104 publicate în ultimii cinci ani; cu o medie de 20 articole/an, aproximativ 3 articole pe lună).

La ora actuală, biopsia hepatică este considerată „standardul de aur” pentru diagnosticul bolilor hepatice cronice. Cu toate acestea, acuratețea puncției-biopsie hepatice este de doar 65-75%, depinzând de dimensiunile fragmentului recoltat [18-20] și fiind influențată de erorile de eșantionare și de prelucrare a probei. Datorită acurateței scăzute, ca și riscurilor potențiale ale biopsiei hepatice, există încercări de dezvoltare a unor metode alternative, neinvazive de stadializare și monitorizare a evoluției bolilor hepatice cronice. Dintre acestea, tehnicile imagistice ocupă un loc important. Majoritatea studiilor imagistice se bazează pe modificările morfologice hepatice din ciroză sau evaluarea semnelor secundare de hipertensiune portală.

Ecografia cu substanță de contrast a adăugat o nouă dimensiune posibilităților de diagnostic ultrasonografic.

Este o metodă modernă, care acoperă cu acuratețe mare diagnosticul formațiunilor focale hepatice și încearcă să-și găsească utilitatea și în evaluarea hepatopatiilor difuze. Printre minusuri se numără costul substanței de contrast, administrarea intravenoasă, curba lungă de învățare și, nu în ultimul rând, accesul la tehnologia necesară.

Agenții de contrast au o multitudine de aplicații clinice, dar printre cele mai cunoscute se numără utilizarea lor în imagistica vasculară, ecocardiografia cu contrast, imagistica ficatului și diverse studii funcționale. În aceste studii funcționale, după injectarea în bolus a agentului de contrast, traseul său spre diverse țesuturi sau organe poate fi urmărit și utilizat mai apoi în calcularea timpului de tranzit și în generarea curbelor specifice timp-intensitate, în mod

Tabel II. Analiza multivariată prin meta-regresie pentru identificarea covariabilelor.

Variabila	Coefficient	Eroare standard.	p	RDOR	[95%CI]
Numărul de pacienți	-0,105	0,0779	0,4	0,90	(0,33;2,42)
Sex feminin/Sex masculin	0,298	1,0675	0,82	1,35	(0,00;102,96)
Prevalența cirozei	0,092	0,0355	0,02	1,10	(0,70;1,72)
Criteriul de diagnostic utilizat	0,009	0,3322	0,32	1,20	(0,70;1,72)
Pacienți diagnosticați prin PBH	0,20	0,2420	0,45	----	----
Substanța utilizată	0,281	0,3420	0,56	----	----
Doza substanței de contrast utilizată	-0,623	2,4364	0,84	0,54	(0,00;14,20)
Doza de soluție salină utilizată	0,281	0,3420	0,56	----	----
Tehnica de achiziție	0,12	0,1115	0,47	1,13	(0,27;4,65)
Prezența formațiunilor focale	0,31	0,2342	0,001	1,23	(0,17;4,67)

similar celor utilizate în medicina nucleară, CT sau MRI.

Una din aplicațiile majore ale cuantificării timpului de tranzit în afecțiunile hepatice este reprezentat de diagnosticul neinvaziv al cirozei. Afecțiunile hepatice severe duc la modificări hemodinamice caracteristice: dezvoltarea circulației hiperdinamice, șunturile pulmonare arterio-venoase, apariția de colaterale venoase, șunturile intrahepatice (între artera hepatică, vena portă și venele hepatice) și arterializarea patului capilar hepatic. Toate aceste modificări determină o apariție mai rapidă în venele hepatice a agentului de contrast injectat periferic [21].

Unele studii care au evaluat timpul de tranzit vascular hepatic (HVTT) la pacienții cu afecțiuni hepatice cronice au utilizat tehnica Doppler spectral, în care momentul apariției contrastului este definit ca o creștere a intensității semnalului Doppler cu 10% față de linia de bază. Această tehnică implică însă utilizarea unor softuri specializate [15].

Dezvoltarea unor agenți de contrast de generația a II-a, cum ar fi Sonovue (Bracco, Milan, Italy), precum și modernizarea aparatelor ultrasonografice, permit evaluarea timpului de apariție a contrastului în artera hepatică, vena hepatică sau vena portă și aprecierea “în timp real” a timpului de tranzit venos hepatic, fără ajutorul unor postprocesări offline [21]. Practic, agentul de contrast se injectează în bolus în vena antecubitală stângă și se măsoară timpul necesar agentului de contrast pentru a ajunge la nivel hepatic. Primele bule apărute în artera hepatică, respectiv în vena portă vor cuantifica “timpul de apariție în artera hepatică, respectiv în vena portă”, iar momentul vizualizării bulelor în vena hepatică va indica “timpul de apariție în vena hepatică”. Timpul de tranzit vascular hepatic (HVTT) este reprezentat de diferența între momentul sosirii în artera hepatică și respectiv în vena hepatică [21].

S-a dovedit că timpul de tranzit între artera și vena hepatică scade semnificativ pe măsură ce crește severitatea fibrozei [15,16]. În ceea ce privește afecțiunile aflate în stadiu pre-cirotic, ele se pot subîmpărți, în funcție de HVTT, în afecțiuni ușoare ($HVTT \geq 28s$), sau moderate spre severe ($HVTT$ între 22-28s). Un timp de tranzit de $\leq 21s$ are o sensibilitate de 100% și o specificitate de 96% pentru diagnosticul de ciroză [15].

După unii autori, la pacienții cu ciroză, HVTT se poate corela și cu scorul Child-Pugh, devenind mai scurt pe măsură ce afecțiunea se agravează [13-15,24].

Într-un studiu recent [23], s-a cuantificat timpul de tranzit venos hepatic (definit ca diferența între momentul apariției bulelor în vena portă și respectiv în vena hepatică), pe un lot de 99 pacienți cu diferite hepatopatii difuze. Pentru valoarea cut-off de 13 s, diagnosticul de fibroză severă (F3-F4 după clasificarea Metavir) s-a stabilit cu Sn de 78,95%, Sp 78,57%, VPP 78,73%, VPN 83,33% și o acuratețe diagnostică de 78,97% [23].

În meta-analiza realizată în acest studiu am obținut pentru examinarea ultrasonografică cu agenți de contrast

valori ale sensibilității de 0.90 [95% (CI): 0.84-0.94] și ale specificității de 0.85 (95% CI: 0,83-0.92), cu o AUROC de 0,95 în estimarea cirozei hepatice. Specificitatea a variat între studii, mai mult decât sensibilitatea, în funcție de prevalența cirozei în lotul de studiu.

Un singur studiu [11] raportează o specificitate de 0,62, valoare substanțial redusă comparativ cu celelalte specificități raportate, însă cu o sensibilitate a metodei de 1. Această diferență se poate datora numărului redus de pacienți și faptului că valoarea cut-off a fost aleasă pentru a optimiza sensibilitatea. Analizând curba sROC, acest studiu se menține pe curba estimată, sugerând doar o variație a valorii cut-off între Se și Sp. Un alt studiu, realizat de Pederson și colaboratorii [13], estimează o sensibilitate de 0,42 și o specificitate de 1, în contrast cu articolul anterior menționat. Acest studiu nu se încadrează pe curba sROC, sugerând existența altor covariate decât valorile prag alese. Pacienții luați în analiză prezentau formațiuni focale, care au influențat semnificativ performanța diagnostică a metodei ($p < 0,001$). Studii suplimentare sunt necesare pentru a cerceta posibilele influențe ale formațiunilor focale asupra timpilor de tranzit la pacienții cu ciroză. Nu au existat diferențe statistic semnificative între diferitele clase Child-Pugh ($p = 0,7$). Acest lucru se poate datora numărului redus de pacienți astfel clasificați. Substanțele de contrast utilizate în analiză au fost Sonovue (2 studii) și Levovist (6 studii), fără a exista diferențe în ceea ce privește performanța diagnostică. AKP Lim și colaboratorii [15] au obținut valori ale HVAT pentru Sonovue semnificativ reduse comparativ cu Levovist în diferențierea stadiilor de fibroză, fără a evidenția însă diferențe între pacienții cu ciroză. Timpul de tranzit mai redus în cazul Sonovue se poate datora stabilității crescute a substanței, oferind astfel o intensitate superioară a semnalului. Tehnicile de achiziție, *Pulse Inversion Imaging* sau Doppler-ul spectral, nu au influențat substanțial rezultatele.

În concluzie, ultrasonografia cu contrast prin evaluarea HVTT este o metodă non-invazivă, cu sensibilitate ridicată, dar o specificitate mai scăzută în estimarea cirozei hepatice. Ea nu are capacitatea de a distinge între clasele Child-Pugh.

Bibliografie

1. Nishiura T, Watanabe H, Ito M et al. Ultrasound evaluation of the fibrosis stage in chronic liver disease by the simultaneous use of low and high frequency probes. Br J Radiol 2005; 78: 189-197
2. Hung CH, Lu SN, Wang JH et al. Correlation between ultrasonographic and pathologic diagnoses of hepatitis B and C virus-related cirrhosis. J Gastroenterol 2003; 38: 153-157
3. Shen L, Li JQ, Zeng MD et al. Correlation between ultrasonographic and pathologic diagnosis of liver fibrosis due to chronic virus hepatitis. World J Gastroenterol 2006; 12: 1292-1295
4. D'Onofrio M, Martone E, Brunelli S et al. Accuracy of

- ultrasound in the detection of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *Radiol Med (Torino)* 2005;110: 341–348
5. Winkfield B, Aubé C, Burtin P, Calès P. Inter-observer and intra-observer variability in hepatology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 959–966
 6. Bernatik T, Strobel D, Hahn EG, Becker D. Doppler measurements: a surrogate marker of liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 383–387
 7. Maruyama H, Matsutani S, Okugawa H et al. Microbubble disappearance-time is the appropriate timing for liver-specific imaging after injection of Levovist. *Ultrasound Med Biol.* 2006; 32(12): 1809-1815.
 8. Iijima H, Moriyasu F, Tsuchiya K, et al. Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2007; 37(9): 722-730.
 9. Li N, Ding H, Fan P et al. Intrahepatic transit time predicts liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: quantitative assessment with contrast-enhanced ultrasonography. *Ultrasound Med Biol.* 2010; 36(7): 1066-1075.
 10. Albrecht T, Blomley MJ, Cosgrove DO, Taylor-Robinson SD, Jayaram V, Eckersley R et al. Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent. *Lancet.* 1999 May 8;353(9164):1579-83.
 11. Bang N, Nielsen MB, Rasmussen AN, Osterhammel PA, Pedersen JF. Hepatic vein transit time of an ultrasound contrast agent: simplified procedure using pulse inversion imaging. *Br J Radiol.* 2001 Aug;74(884):752-5.
 12. Blomley MJ, Lim AK, Harvey CJ, Patel N, Eckersley RJ, Basilico R, et al. Liver microbubble transit time compared with histology and Child-Pugh score in diffuse liver disease: a cross sectional study. *Gut.* 2003 Aug;52(8):1188-93.
 13. Pedersen JF, Larsen VA, Bytzer P, Madsen LG, Hamberg O. Hepatic transit time of ultrasound contrast in biopsy characterized liver disease. *Acta Radiol.* 2005 Oct;46(6):557-60.
 14. Hirota M, Kaneko T, Sugimoto H, Kure S, Inoue S, Takeda S et al. Intrahepatic circulatory time analysis of an ultrasound contrast agent in liver cirrhosis. *Liver Int.* 2005 Apr;25(2):337-42.
 15. Lim AK, Taylor-Robinson SD, Patel N, Eckersley RJ, Goldin RD, Hamilton G, Foster GR et al. Hepatic vein transit times using a microbubble agent can predict disease severity non-invasively in patients with hepatitis C. *Gut.* 2005 Jan;54(1):128-33.
 16. Ridolfi F, Abbattista T, Marini F, Vedovelli A, Quagliarini P, Busilacchi P, et al. Contrast-enhanced ultrasound to evaluate the severity of chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis.* 2007 Oct;39(10):929-35.
 17. Abbattista T, Ridolfi F, Ciabattini E, Marini F, Bendia E, Brunelli E, et al. Diagnosis of liver cirrhosis by transit-time analysis at contrast-enhanced ultrasonography. *Radiol Med.* 2008 Sep;113(6):860-74.
 18. Cho SG, Kim MY, Kim HJ, et al. Chronic hepatitis: in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the liver and correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2001; 221: 740-746.
 19. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology* 2006; 239: 425-437.
 20. Semelka RC, Chung JJ, Hussain SM, Marcos HB, Woosley JT. Chronic hepatitis: correlation of early patchy and late linear enhancement patterns on gadolinium-enhanced MR images with histopathology initial experience. *J Magn Reson Imaging* 2001; 13: 385-391.
 21. Grier S, Lim AK, Patel N, et al. Role of microbubble ultrasound contrast agents in the non-invasive assessment of chronic hepatitis C-related liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(22): 3461-3465.
 22. Searle J, Mendelson R, Zelesco M, et al. Non-invasive prediction of the degree of liver fibrosis in patients with hepatitis C using an ultrasound contrast agent. A pilot study. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2008; 52(2): 130-133
 23. Staub F, Tournoux-Facon C, Roumy J, et al. Liver fibrosis staging with contrast-enhanced ultrasonography: prospective multicenter study compared with METAVIR scoring. *Eur Radiol.* 2009; 19(8): 1991-1997