

ECOGRAFIA CON MEZZO DI CONTRASTO: PRINCIPI GENERALI E APPLICAZIONI IN MEDICINA VETERINARIA

CONTRAST ENHANCED ULTRASOUND: BASICS AND CLINICAL APPLICATIONS IN VETERINARY MEDICINE

FEDERICA ROSSI, DVM, SRV, Dipl. ECVDI
Clinica Veterinaria dell'Orologio - Sasso Marconi (Bologna)

Riassunto

L'ecografia con mezzo di contrasto è una metodica diagnostica innovativa che unisce l'utilizzo di un mezzo di contrasto ecografico ed un sistema ultrasonografico dedicato, con lo scopo di esaltare la visualizzazione della componente macro- e microvascolare di tessuti ed organi. Le principali indicazioni nell'uomo includono malattie cardio-vascolari, traumi e neoplasie di parenchimi. In questo articolo vengono illustrati i principi che stanno alla base di questa tecnologia, le applicazioni fino ad ora proposte nei piccoli animali e altre potenziali indicazioni per la medicina veterinaria.

Summary

Contrast Enhanced Ultrasound is a recent developed diagnostic technology which combines the use of an ultrasound contrast medium and a dedicated equipment. The aim is the enhancement of the macro-and micro-vascularity of tissues and organs. In humans, main indications are cardio-vascular diseases, trauma and parenchymal neoplasia. In this paper, the basic principles, current and potential applications of Contrast Enhanced Ultrasound in Veterinary Medicine are discussed.

INTRODUZIONE

L'ecografia con mezzo di contrasto (Contrast Enhanced Ultrasound, CEUS) rappresenta una delle più importanti e recenti novità tecnologiche nel campo dell'ecografia in medicina umana e negli ultimi anni notevole impulso è stato dato al suo sviluppo ed applicazione clinica. Le prime osservazioni, incidentali, di un aumento della riflessione degli ultrasuoni in seguito alla introduzione di bolle d'aria attraverso un catetere posizionato nella cavità ventricolare sinistra, risalgono alla fine degli anni sessanta. Da allora, un grande impulso tecnologico ha consentito di sviluppare specifici mezzi di contrasto (MDC) ecografici in grado di attraversare il filtro polmonare, di raggiungere la rete vascolare sistemica e persistere per lungo tempo all'interno della circolazione capillare. Oggi questa tecnologia viene utilizzata per lo studio della vascolarizzazione e della perfusione di organi e lesioni e come metodo di screening per la ricerca della metastasi^{2,3}. In medicina umana, diversi studi hanno dimostrato che, per lo studio dei tumori primari e delle metastasi epatiche, la CEUS ha sensibilità e speci-

rità superiori rispetto all'ecografia convenzionale^{4,5}, confrontabili con le metodiche considerate il gold standard come la Tomografia Computerizzata (CT) spirale e la Risonanza Magnetica (RM)⁶.

Il successo di questa metodica ha spinto anche a considerarne una possibile applicazione nella clinica degli animali d'affezione.

In questo articolo, vengono rivisti i principi di base della CEUS, presentati i diversi tipi di mezzo di contrasto e le differenti tecnologie associate, inoltre illustrate le applicazioni sperimentate fino ad ora nei piccoli animali e le possibili future applicazioni alla luce delle esperienze in medicina umana.

CARATTERISTICHE DEI MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI

I MDC ecografici sono costituiti da microbolle provviste di un guscio esterno e di un contenuto rappresentato da gas. Le piccole dimensioni delle microbolle (generalmente comprese tra 2 e 6 μm) consentono al mezzo di contrasto, se iniettato in una vena periferica, di attraversare il filtro polmonare e raggiungere la rete capillare della circolazione sistemica. Grazie alle loro proprietà acustiche, le microbol-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 29/09/2007 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 05/10/2007”.

le determinano un aumento della ecoriflettenza del sangue in cui esse sono contenute. Il progressivo sviluppo tecnologico ha portato sul mercato vari tipi di mezzo di contrasto con diverse caratteristiche chimiche e fisiche:

1. i **primi MDC** erano costituiti semplicemente da soluzione fisiologica agitata manualmente. Le bolle così prodotte, causa le grandi dimensioni e la elevata solubilità nel torrente circolatorio, avevano scarsa stabilità e non erano in grado di attraversare il filtro polmonare. Pertanto, l'impiego è limitato alla visualizzazione di shunt intra- o extracardiaci destri-sinistri⁷.
2. **MDC di prima generazione**: sono caratterizzati da un guscio esterno rigido e contenuto di aria nel lume della bolla. In questo gruppo, il MDC che ha avuto maggior successo nell'utilizzo clinico è il Levovist^{®2} (Schering AG), costituito da bolle di diametro di 2-3 μm con un guscio di acido palmitico e galattosio. Il Levovist[®] è stato utilizzato soprattutto per potenziare il segnale Doppler quindi migliorare la valutazione della vascolarizzazione di tessuti ed organi, inoltre è stata sfruttata la sua proprietà di avere una specifica distribuzione epato-splenica che ha consentito i primi studi sulla perfusione di questi organi^{8,9}. Il limite di questo gruppo di MDC è legato alla impossibilità di produrre un enhancement continuo che consenta un esame dinamico in tempo reale della struttura esaminata¹⁰. Infatti, per avere un'adeguata produzione di segnale di ritorno, è necessario provocare la rottura della bolla, pertanto la rappresentazione della distribuzione del MDC è istantanea, può essere ottenuta dopo un certo numero di secondi dall'iniezione ma ha una durata di soli pochi millisecondi. Il risultato è la visualizzazione di una immagine generata dalla rottura del MDC e quindi una "mappatura" di dove il MDC è e non è arrivato. Questa tecnica viene chiamata Flash Echo Imaging o Stimulated Acoustic Emission. Il limite di questa metodica viene superato con lo sviluppo di MDC di seconda generazione.
3. **MDC di seconda generazione**: hanno guscio esterno elastico e nel lume un gas diverso dall'aria. Queste caratteristiche consentono alle microbolle di persistere per un maggior tempo nel torrente circolatorio grazie ad una ridotta solubilità del gas. Inoltre, le caratteristiche di elasticità conferiscono una più efficace "risonanza" della bolla investita dal fascio ultrasonoro con conseguente produzione di una elevata quantità di segnale armonico. Il MDC più utilizzato in Europa per lo studio degli organi

della cavità addominale è il Sonovue[®] (Bracco Imaging SpA), costituito da un guscio esterno di fosfolipidi e da un lume contenente esafluoruro di zolfo (SF₆)¹⁰. Le piccole dimensioni delle microbolle (5 μm) associate alla elevata stabilità e persistenza di questo MDC sono alla base del grande successo che questo prodotto ha avuto nella diagnostica clinica in medicina umana. Un secondo gruppo di MDC di seconda generazione contiene perfluoropropano. Tra questi, Optison[®] (Amhersam Health) è registrato in Europa, caratterizzato da un guscio esterno contenente albumine di origine umana. Definity[®] (Bristol Myers-Squibb) è registrato negli USA e Canada.

4. **MDC di terza generazione**: per il momento sono ancora in fase sperimentale, l'obiettivo è di aumentare ulteriormente la stabilità nel circolo ematico¹¹.

INTERAZIONE MDC - ULTRASUONO (Tabella 1)

L'interazione tra le microbolle e gli ultrasuoni è un fenomeno complesso che dipende da:

1. caratteristiche della microbolla (dimensioni, composizione chimica, elasticità del guscio, frequenza di risonanza). Fortunatamente, la frequenza di risonanza delle microbolle si situa all'interno del range utilizzato nella pratica clinica (tra 1 e 10 MHz per Sonovue[®])¹⁰.
2. caratteristiche del fascio ultrasonoro utilizzato (frequenza e focalizzazione del fascio, frequenza di ripetizione, intensità del fascio ultrasonoro). L'intensità degli ultrasuoni che viene applicata sulla microbolla (potenza acustica) è un parametro molto importante in quanto influenza la risposta della microbolla, che può variare dalla oscillazione alla rottura della bolla stessa^{2,3}. Questo parametro può essere regolato nell'ecografo variando il valore delle unità kPascal oppure modificando il settaggio del cosiddetto Indice Meccanico (MI), che è una misura indiretta della pressione acustica esercitata dall'ultrasuono sulla microbolla.
3. Se questo valore viene regolato a valori bassi (**MI < 0,1**) l'oscillazione della microbolla è lineare, la bolla entra in risonanza ma le fasi di compressione ed espansione sono identiche. Il risultato è un aumento della intensità dell'eco di ritorno che può essere sfruttato per incrementare la visualizzazione del segnale Doppler. Questa tecnica è stata utilizzata per molti anni in associazione a Levovist[®]. Utilizzando un valore di MI più elevato (**MI compreso**

Tabella 1
Comportamento delle microbolle in base alle caratteristiche di intensità acustica dell'ultrasuono che interagisce con il MDC

Indice meccanico (MI)	Risposta della bolla	Effetto sull'ultrasuono di ritorno	Impiego clinico
< 0,1	Fasi di espansione e compressione simmetriche (oscillazione lineare)	Aumento dell'intensità	Incremento del segnale Doppler (MDC 1° generazione)
0,1-0,5	Espansione > Compressione (oscillazione non lineare)	Produzione di segnale armonico	Studio di perfusione in tempo reale (a "basso MI"). MDC 2° generazione
> 0,5	Rottura	Produzione transitoria di segnale armonico	Stimulated Acoustic Emission, Flash Echo Imaging (MDC 1° generazione)

tra 0,1 e 0,5) si verifica la cosiddetta oscillazione non-lineare della microbolla. Questo è il fenomeno fisico alla base del moderno utilizzo dei MDC ecografici di seconda generazione (per esempio del Sonovue®), che consentono di effettuare uno studio dinamico in tempo reale. Le microbolle, entrando in risonanza, vanno incontro a fasi di espansione e compressione non uguali, in quanto la fase di espansione predomina rispetto alla compressione, ed il risultato è la produzione di un ultrasuono di ritorno che ha una forma asimmetrica e che contiene nel suo spettro frequenze diverse dall'ultrasuono originario, le cosiddette frequenze armoniche. Le frequenze armoniche sono multipli o sottomultipli della frequenza originaria, detta anche fondamentale. Queste frequenze possono essere captate in modo selettivo per ottimizzare la ricezione del segnale proveniente dal MDC, in quanto vengono prodotte quasi esclusivamente dalle microbolle e non dal tessuto circostante.

Se il valore di MI aumenta ancora ($MI > 0,5$) l'elevata intensità dell'ultrasuono produce la rottura della bolla, e in questa situazione anche i MDC di prima generazione sono in grado di produrre un segnale armonico di elevata intensità. Tuttavia, la rottura della bolla rende impossibile uno studio dinamico continuo, ma il risultato è una rappresentazione istantanea della distribuzione del MDC nel tessuto o organo, il cosiddetto Stimulated Acoustic Emission o Flash Echo Imaging.

MODALITÀ DI FORMAZIONE DELL'IMMAGINE ECOGRAFICA NELLO STUDIO CON MDC

L'utilizzo di un MDC ecografico con un sistema ecografico convenzionale non permette un'adeguata visualizzazione del MDC principalmente a causa di una importante attenuazione degli ultrasuoni, che rende inservibile l'immagine ottenuta¹². Pertanto, parallelamente alla preparazione di nuovi e sempre più sofisticati MDC ecografici si è assistito allo sviluppo di tecnologie che migliorassero la ricezione e l'utilizzo del segnale prodotto dal MDC, per avere un'immagine ecografica adatta all'utilizzo nella diagnostica clinica¹³. L'obiettivo era quello di separare in modo ottimale l'ultrasuono di ritorno prodotto dal MDC da quello originato dal tessuto, in modo da rappresentare solamente la componente di flusso dell'organo studiato. Il principio comune su cui si basano tali tecnologie è quello di isolare la componente del segnale di ritorno prodotta dalla microbolla, tuttavia ciò può essere realizzato con modalità diverse. Lo sviluppo dei software dedicati ai MDC è in rapida, continua evoluzione ed i principi su cui si basano queste tecnologie è complesso. Qualsiasi semplificazione è imprecisa e riduttiva, tuttavia vengono riportati i sistemi che sono stati o vengono più comunemente utilizzati. I primi sistemi utilizzavano la **filtrazione** del segnale armonico sulla base della frequenza di ricezione, metodo che era penalizzato dalla parziale sovrapposizione dello spettro di frequenze prodotte dal MDC e dal tessuto circostante, con conseguente possibile perdita di informazioni utili. Una evoluzione a queste prime tecnologie si è verificata con l'introduzione del **Pulse Inversion Imaging**¹⁴, cioè di sequenze in cui l'ultrasuono inviato è costituito da due impulsi che

sono speculari, cioè in fase opposta a 180°. In questo caso, la componente fondamentale dello spettro di ritorno sommandosi si azzerava, quindi il segnale prodotto dal tessuto viene eliminato. Rimane pertanto solamente la componente armonica dello spettro di ritorno, prodotta dalle microbolle, che, grazie alla sua forma asimmetrica, produce un segnale rilevabile. Lo svantaggio di questa metodica è quello di una certa riduzione del frame rate. Una ulteriore sofisticazione di questa sequenza è rappresentata dalla **Cadence Contrast Pulse Sequencing Technology**¹³ (CPS, Siemens), che utilizza una complessa sequenza di impulsi inviati, diversi per fase ed intensità, e sfrutta sia frequenze fondamentali che armoniche per generare il segnale di ritorno. Un'altra recente tecnologia (**Contrast Tuned Imaging**, Cn-TI, Esaote Medmark) si basa sull'utilizzo di una stretta banda di ultrasuoni in uscita associata ad una selezione digitale del segnale di seconda armonica di ritorno. Ciò consente una ottima visualizzazione del MDC e l'efficace soppressione del segnale di fondo prodotto dal tessuto¹⁵.

ESECUZIONE DI UNO STUDIO CON MDC

La **preparazione** dell'animale è molto semplice. È necessario posizionare un catetere endovenoso di dimensioni adeguate (possibilmente uguale o superiore a 20G) in una vena periferica (preferibilmente la vena cefalica dell'avambraccio). L'iniezione del MDC non provoca fastidio o dolore, pertanto l'esame può essere eseguito senza sedazione o anestesia nei soggetti che possono essere mantenuti in decubito laterale o dorsale per il breve tempo necessario, di solito non superiore a 10 minuti. Nei soggetti non collaborativi può rendersi necessaria la sedazione o anestesia. Non è ancora stato sufficientemente chiarito se l'utilizzo di farmaci che agiscono anche sull'attività dell'apparato cardiocircolatorio modifichi in modo significativo i tempi e modi di distribuzione del MDC. In uno studio effettuato in un gruppo di cani normali¹⁶, la somministrazione di propofol ha determinato la riduzione dei tempi di perfusione di Sonovue® nel fegato rispetto ai valori ottenuti in cani non anestetizzati. L'esperienza personale dell'autore suggerisce che, per lo studio di lesioni focali dei parenchimi, le valutazioni cliniche non sono influenzate in modo significativo dalla eventuale somministrazione di farmaci anestetici. Questo aspetto assume invece importanza quando i dati che riguardano la dinamica della perfusione diventano rilevanti.

L'**iniezione** del MDC può essere eseguita in due modi: mediante iniezione a bolo oppure con infusione lenta mediante una speciale pompa. L'iniezione a bolo è manuale, più rapida, pertanto preferibile rispetto all'iniezione con infusione lenta. È inoltre consigliata in quanto la maggior parte degli studi effettuati fino ad ora in medicina veterinaria hanno utilizzato la metodica a bolo. La dose di MDC da utilizzare nei piccoli animali varia a seconda del prodotto impiegato, per Sonovue® è riportato un dosaggio di 0,03 ml/kg. L'iniezione del MDC viene fatta seguire dalla somministrazione di un bolo di circa 5 ml di soluzione fisiologica.

Dopo aver identificato la struttura o lesione da studiare mediante il sistema convenzionale, viene attivato il sistema dedicato alla **visualizzazione** del MDC. Il sistema viene settato in modo che il segnale fondamentale proveniente dal tessuto sia soppresso, pertanto l'immagine prima dell'arri-

vo del MDC risulta quasi completamente nera. Viene mantenuto solo un debole segnale proveniente da una interfaccia o struttura che possa essere un punto di riferimento per l'operatore. Il timer viene attivato al momento dell'iniezione e il flusso del MDC nell'organo in esame viene visualizzato in tempo reale. In questa fase, un punto critico è rappresentato dalla regolazione dell'apparecchiatura (MI, gain totale, TGC, numero e posizionamento del fuoco), l'ottimizzazione di questi parametri può essere difficile per un operatore inesperto. Tutta la procedura deve essere registrata, preferibilmente su supporto digitale, per poter essere rivalutata successivamente.

L'**analisi** dello studio contrastografico può essere qualitativa o quantitativa. Nel primo caso, la valutazione della distribuzione del MDC nel tempo è soggettiva. La vascolarizzazione e perfusione negli organi viene confrontata tra le varie parti dell'organo stesso. Se viene studiata una lesione, questa va paragonata con il parenchima circostante, per valutare come varia la sua ecogenicità nel tempo, valutando se è simile al tessuto vicino oppure se la lesione è ipo- o iperecogena. Talvolta nuove lesioni, non visibili nello studio di base in quanto isoecogene con il tessuto limitrofo, vengono identificate durante l'esame con MDC, e questo è molto importante nella stadiazione di un paziente oncologico. L'**analisi di tipo quantitativo** (Fig. 8) prevede l'utilizzo di software dedicati che consentono di quantificare la presenza del MDC in una regione di interesse (ROI) selezionata. Questi dati possono essere visualizzati mediante l'utilizzo delle cosiddette curve di perfusione oppure con mappe cromatiche. Vengono così calcolati numerosi parametri utili a descrivere le variazioni emodinamiche nel settore che si intende studiare, tra questi i più importanti sono l'intensità di enhancement al picco (PI), il tempo che intercorre tra l'iniezione e l'arrivo del MDC (T0), il tempo tra l'iniezione ed il picco di enhancement (TTP), la pendenza della curva

durante la fase di riempimento (wash in) e di svuotamento (wash out). La valutazione di tipo quantitativo è importante soprattutto per il campo della ricerca.

SICUREZZA

Nel 2004 sono state pubblicate linee guida per l'utilizzo clinico della CEUS in medicina umana dalla Federazione Europea delle Società di Ecografia in medicina e biologia¹⁷.

Nei piccoli animali, non sono riportati effetti collaterali dopo l'impiego di Sonovue® e Levovist®. Il gas contenuto nella microbolla viene espirato nel giro di pochi minuti ed il guscio filtrato dal rene.

I MDC con guscio contenente albumina umana hanno provocato reazioni anafilattiche in due cani¹⁸, pertanto se ne sconsiglia l'utilizzo.

APPLICAZIONI IN MEDICINA VETERINARIA

Studi di perfusione di organi normali

Attualmente, sono disponibili informazioni riguardo la distribuzione di Sonovue® in alcuni organi addominali. La normale perfusione del **fegato** (Fig. 1) è stata descritta in due studi^{12,19} effettuati in due gruppi di cani, di diversa taglia ed età. Durante la breve fase di wash in, l'ecogenicità del parenchima epatico aumenta progressivamente fino al raggiungimento di una massima omogenea intensità di segnale (picco di enhancement), seguita dalla riduzione dell'ecogenicità nella fase di wash-out. Il picco di enhancement del fegato è riportato dopo una media di 22,8 sec (gruppo di cani misto, senza e con anestesia), 34,6 sec (gruppo di cani anestetizzati con propofol) e 46,3 sec (cani

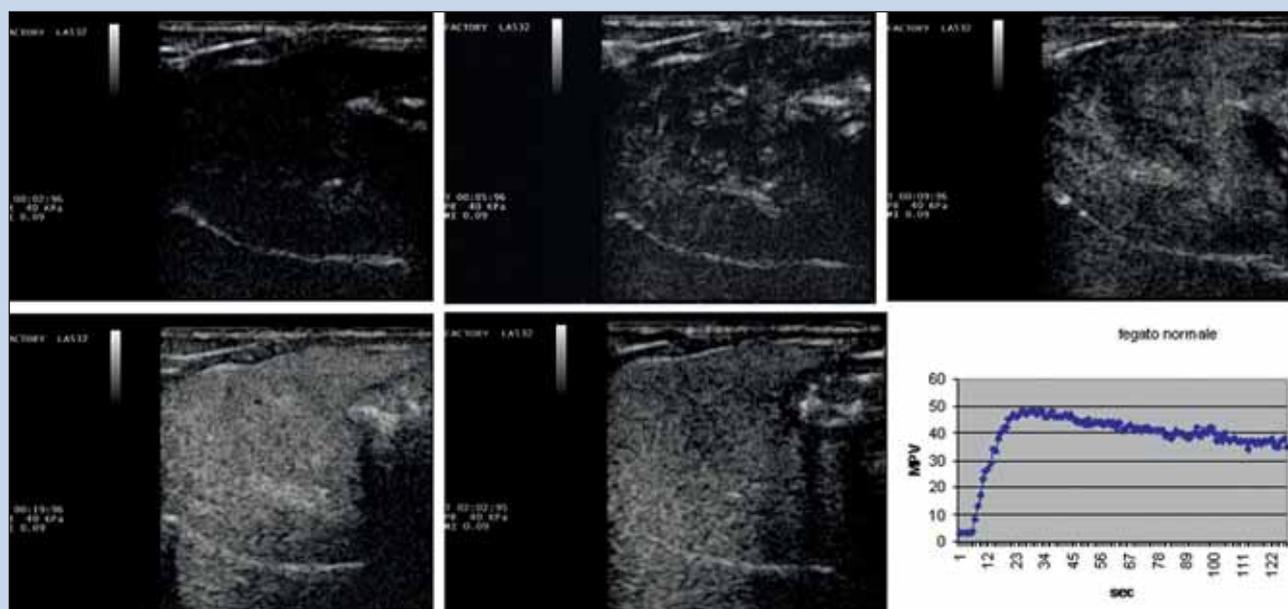


FIGURA 1 - Esempio di esame ecocontrastografico di un fegato di un cane normale eseguito dopo iniezione di Sonovue® (Bracco SpA) con metodica Cn-TI (Esaote Medmark). Immagini ottenute a T0 (A), T5 (B, wash in), T9 (C, wash in), T19 (D, picco di enhancement), T122 (E, wash out). La curva tempo/intensità (F) descrive la variazione della ecogenicità (espressa mediante le unità di intensità media dei pixel) nel tempo (secondi). Il picco di enhancement è raggiunto dopo 19 secondi dall'iniezione.

svegli). Un recente studio ha valutato la perfusione normale di Sonovue® nel **rene sinistro** in un gruppo di 8 cani normali²⁰. Corticale e midollare renale hanno tempi e valori di perfusione diversi. La corticale mostra un enhancement più intenso e più rapido (TTP medio 12,8 nella corticale e 20,9 nella midollare) ed una maggiore pendenza della curva sia nella fase di wash in che di wash out. La normale perfusione della **milza** nel cane è sovrapponibile a quanto riportato per l'uomo²¹: nei primi secondi dopo l'iniezione del MDC (nell'uomo nei primi 30-40 secondi), durante la fase di wash in, il parenchima splenico presenta una normale disomogeneità dovuta alla non uniforme distribuzione delle microbolle nella polpa bianca e rossa della milza. Al picco e durante la lunga fase di wash out, il parenchima diventa omogeneo e presenta una ecogenicità intensa che diminuisce lentamente nei 5 minuti successivi all'iniezione.

Shunt porto sistemico (Fig. 2)

Nel cane, in corso di shunt porto-sistemico, vi è un diffuso incremento della vascolarizzazione arteriosa del fegato²². Questo fenomeno sembra essere un meccanismo emodinamico protettivo, che mira ad apportare un normale flusso ematico al fegato. Va ricordato che l'incremento della componente arteriosa nel fegato si osserva anche in corso di iper-

tensione portale causata da un danno epatico (per esempio in corso di cirrosi) oppure può essere secondaria a compressione o ostruzione della vena porta da parte di masse o trombi. Uno studio effettuato con Sonovue® in tre cani con shunt porto-sistemico extraepatico ha mostrato come sia possibile visualizzare nei primi secondi del wash in un incremento delle dimensioni e tortuosità delle arterie epatiche²³. In questi cani, la perfusione epatica è più rapida rispetto ai valori riportati per cani normali, il TTP è riportato dopo una media di soli 7 secondi. Questi primi risultati vanno confermati e altri studi sono necessari per capire se la CEUS può essere una utile alternativa clinica ad altre tecniche come la scintigrafia nella diagnosi dello shunt nel cane.

Caratterizzazione di lesioni focali nei parenchimi

Le lesioni focali di parenchimi come il fegato e la milza rappresentano quesiti diagnostici spesso problematici a causa della scarsa specificità dell'ecografia basale²⁴. Le diagnosi differenziali che si devono considerare in presenza di una lesione focale sono molte, ed includono patologie benigne e maligne. Per una certezza diagnostica, che condiziona la decisione terapeutica, è indispensabile il risultato di un esame citologico o istologico.

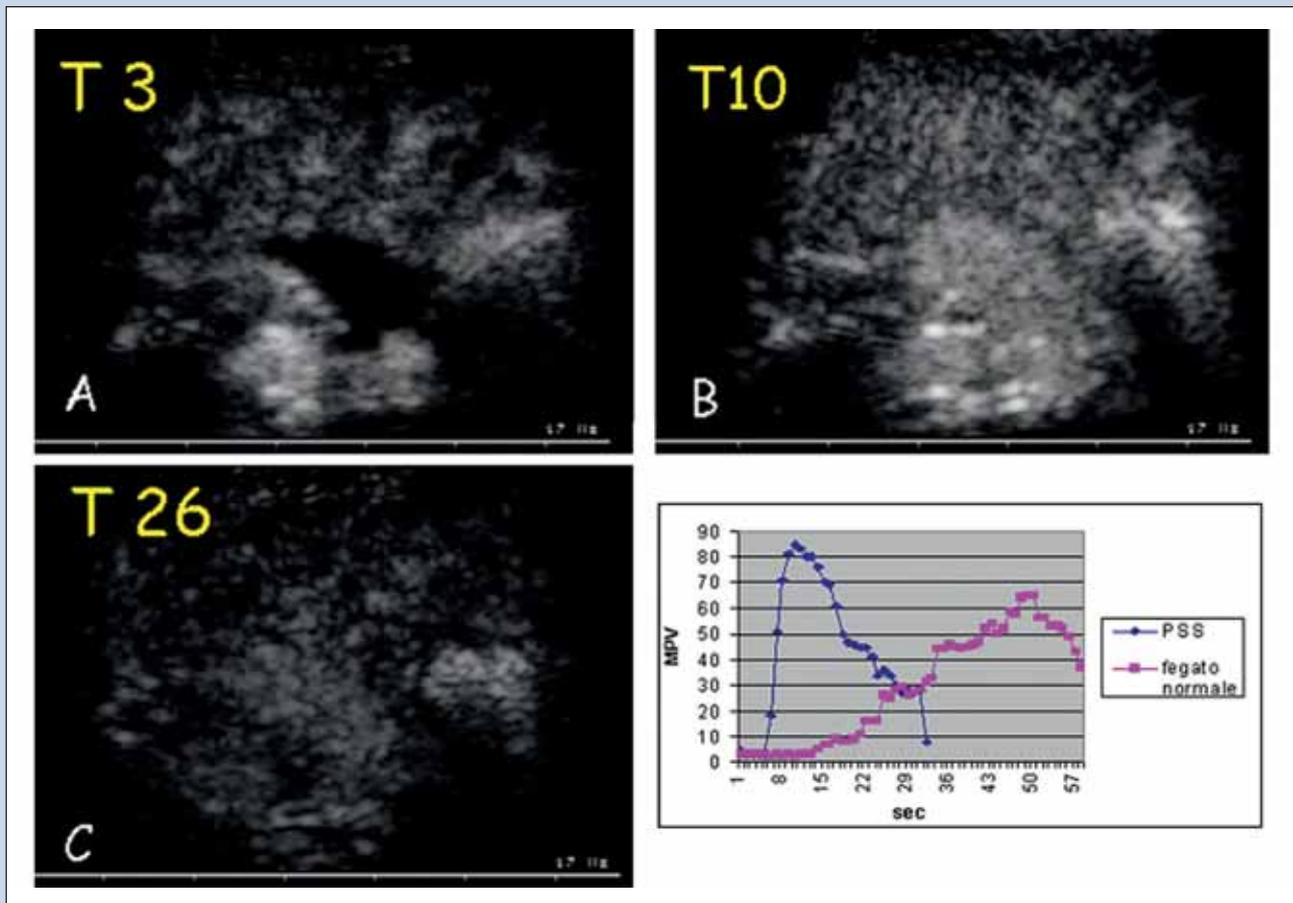


FIGURA 2 - Esame contrastografico eseguito in un cane con shunt porto-cava. Nei primi secondi dell'esame sono visibili numerosi vasi arteriosi (A), il picco di enhancement è raggiunto dopo 10 secondi (B), dopo 26 secondi il MDC ha già quasi completamente lasciato il parenchima epatico (C). La curva intensità/tempo (D) mostra la curva di perfusione del cane con PSS (blu) confrontata a quella di un cane normale (rosa).

L'utilizzo della CEUS offre una nuova potenziale metodica per una migliore caratterizzazione delle lesioni focali. Anche in questo campo, i primi risultati ottenuti in Medicina Veterinaria sono incoraggianti e confermano in parte le conoscenze fino ad ora acquisite nell'uomo. Gli studi fino ad ora effettuati^{25,26} mostrano che i noduli rigenerativi benigni del **fegato** (Fig. 3) sono isocogeni al picco mentre le

lesioni maligne sono ipocogene rispetto al parenchima circostante. Anche se non sono state studiate tutte le lesioni focali epatiche, sono riportati alcuni pattern di perfusione. Gli emangiosarcomi epatici (Fig. 4) sono lesioni non vascolarizzate durante tutta la durata dello studio, i noduli carcinomatosi (Fig. 5) hanno un enhancement misto con vasi tortuosi visibili nella fase di wash in. Per quanto riguarda la

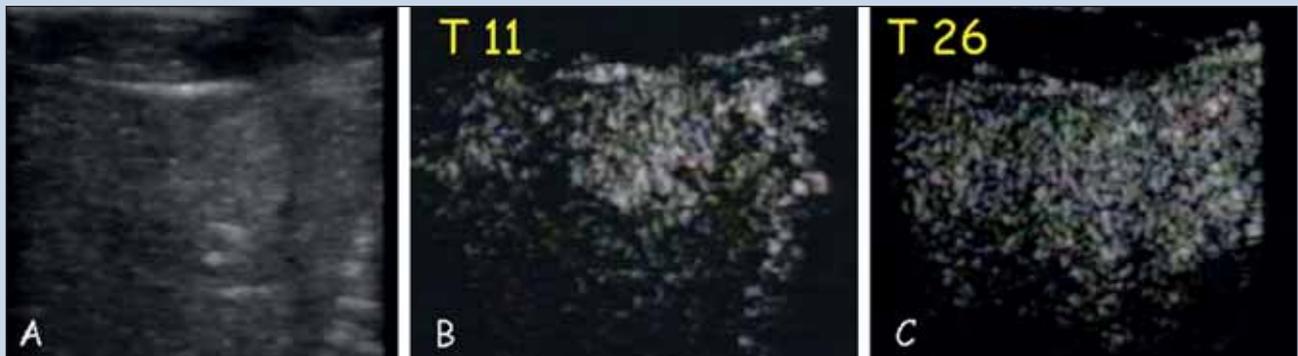


FIGURA 3 - Esempio di lesione nodulare benigna del fegato. La lesione è iperecogena nella scansione basale (A) e nei primi secondi del wash in (B), diventa isocogena rispetto al parenchima circostante al picco e nella fase di wash out (C).

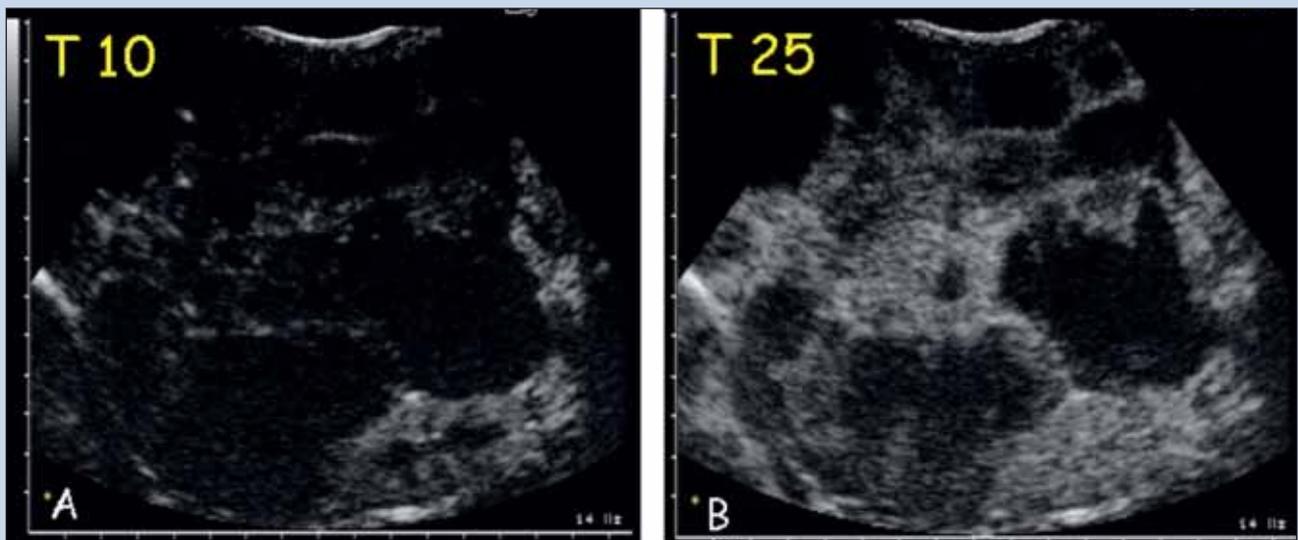


FIGURA 4 - CEUS di fegato di un cane colpito da emangiosarcoma del fegato. Sono visibili numerose lesioni che si mantengono ipovascolari per tutta la durata dello studio, circondate da vasi irregolari e tortuosi.



FIGURA 5 - Esempio di carcinoma epatocellulare. La lesione è ipervascolare nei primi secondi del wash in (A) e al picco (B) mentre diventa rapidamente ipocogena rispetto al parenchima circostante nella fase di wash out (C).

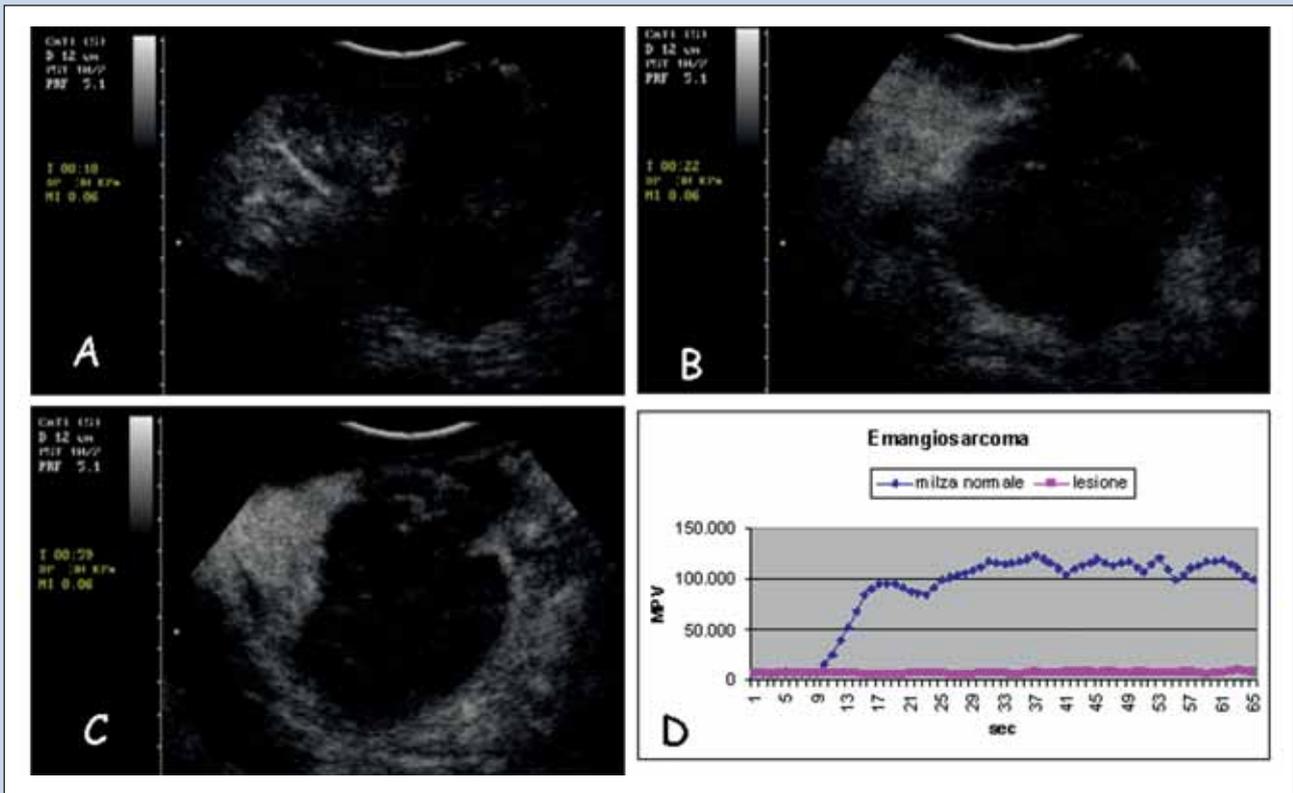


FIGURA 6 - Esempio di un emangiosarcoma splenico. La massa è una lesione non perfusa in tutte le fasi (A, B, C) accompagnate da un parenchima circostante ipervascolare contenente vasi con aspetto tortuoso. La curva di perfusione dimostra che la lesione non ha enhancement (D).

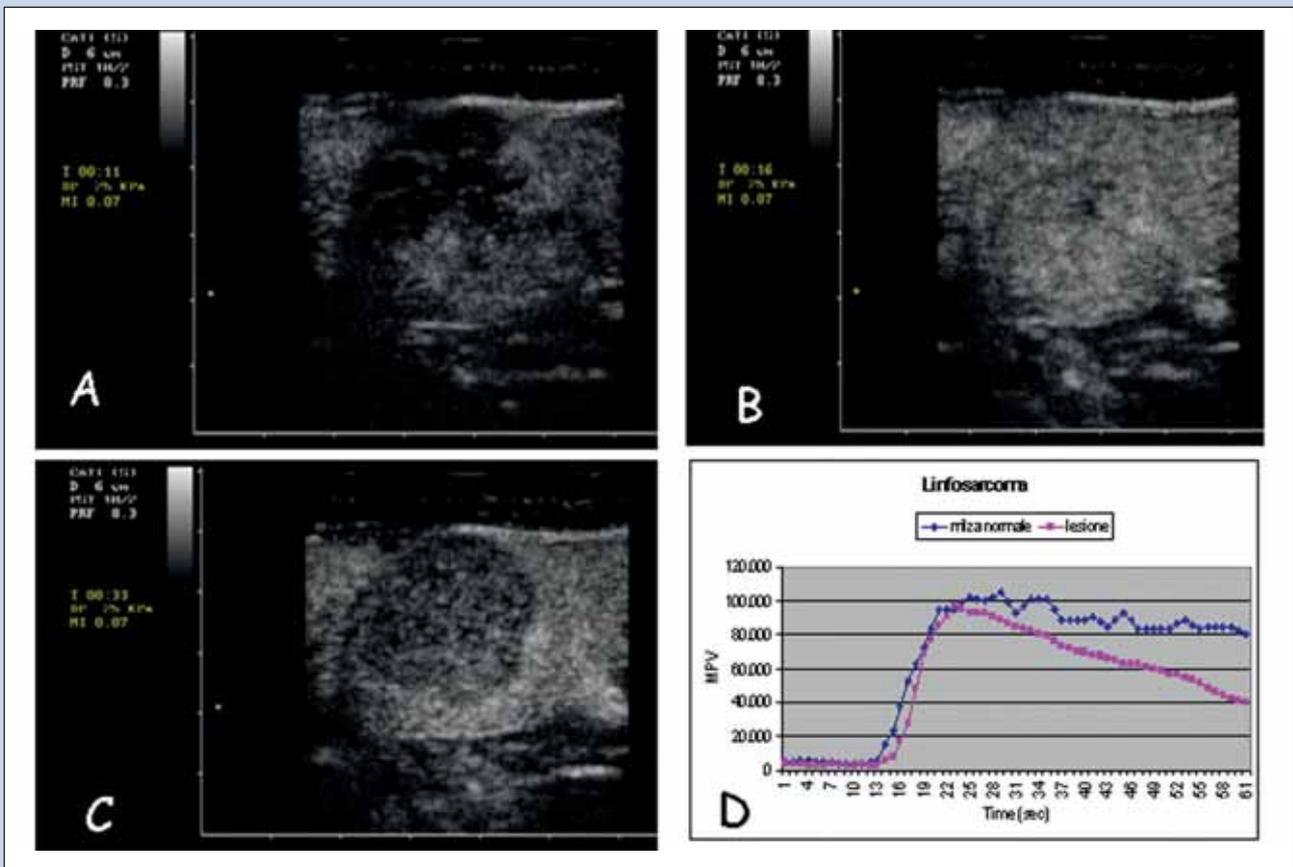


FIGURA 7 - Esempio di nodulo linfosarcomatoso: la lesione ha un rapido ed intenso wash in (A, B) con una fine rete di vasi regolarmente distribuiti, rapido TTP, e nella fase di wash out (C) è ipoecogena disomogenea con piccole aree rotondeggianti anecogene (aspetto a nido d'ape). La curva di perfusione (D) descrive la perfusione della lesione (curva in rosa) rispetto alla milza circostante (curva in blu).

milza, i risultati dei primi studi^{27,28} mostrano che le lesioni benigne vascolarizzate hanno una curva di perfusione simile a quelle del parenchima circostante, pertanto questi noduli non sono più visibili dopo il raggiungimento del picco di enhancement in quanto completamente isoecogeni. Un ematoma splenico aveva una perfusione debole durante tutto il tempo dell'esame e non era accompagnato da vasi neoformati. Il criterio più utile per l'identificazione di una lesione maligna è una intensa ipoecogenicità della lesione nella fase di wash out. Gli emangiosarcomi splenici (Fig. 6) sono lesioni non perfuse in tutte le fasi, accompagnate da un parenchima circostante ipervascolare contenente numerosi vasi spesso con aspetto tortuoso. I noduli linfosarcomatosi (Figg. 7 e 8) mostrano un rapido ed intenso wash in con una fine rete di vasi regolarmente distribuiti e hanno un picco più veloce rispetto alla milza circostante. Nella fase di wash out sono ipoecogeni disomogenei con piccole aree rotondegianti anecogene (aspetto a nido d'ape). La complessità della patologia splenica, che include un vasto elenco di condizioni patologiche benigne e maligne, talvolta difficili da caratterizzare anche dal punto di vista anatomico-patologico, rende necessari, per poter arrivare ad una tipizzazione dei più comuni tumori della milza, altri studi con più ampia ca-

sistica. La differenziazione tra lesioni benigne e maligne è tuttavia già un passo molto significativo, considerando anche la difficoltà di avere una diagnosi certa mediante agoaspirazione del parenchima splenico.

Nel cane e nel gatto, i **tumori superficiali** sono stati studiati mediante la metodica Doppler dopo l'iniezione di Levovist^{®29}. L'utilizzo del MDC ha incrementato la sensibilità della metodica nella rappresentazione della vascolarizzazione di queste lesioni, in particolare nel rilevamento di flussi a bassa velocità e vasi di piccole dimensioni. Queste informazioni sembrano fornire elementi utili per la differenziazione di diversi istotipi tumorali³⁰.

Screening del paziente oncologico

La ricerca di **lesioni metastatiche** addominali in soggetti con neoplasia primaria sia nell'addome che in altre sedi è normalmente effettuata con la ecografia basale. L'utilizzo del CEUS può agevolare tale indagine soprattutto in alcuni organi sede frequente di metastasi come il fegato. La bibliografia veterinaria mostra che l'esame con Sonovue[®] è in grado di dimostrare lesioni non identificate durante la

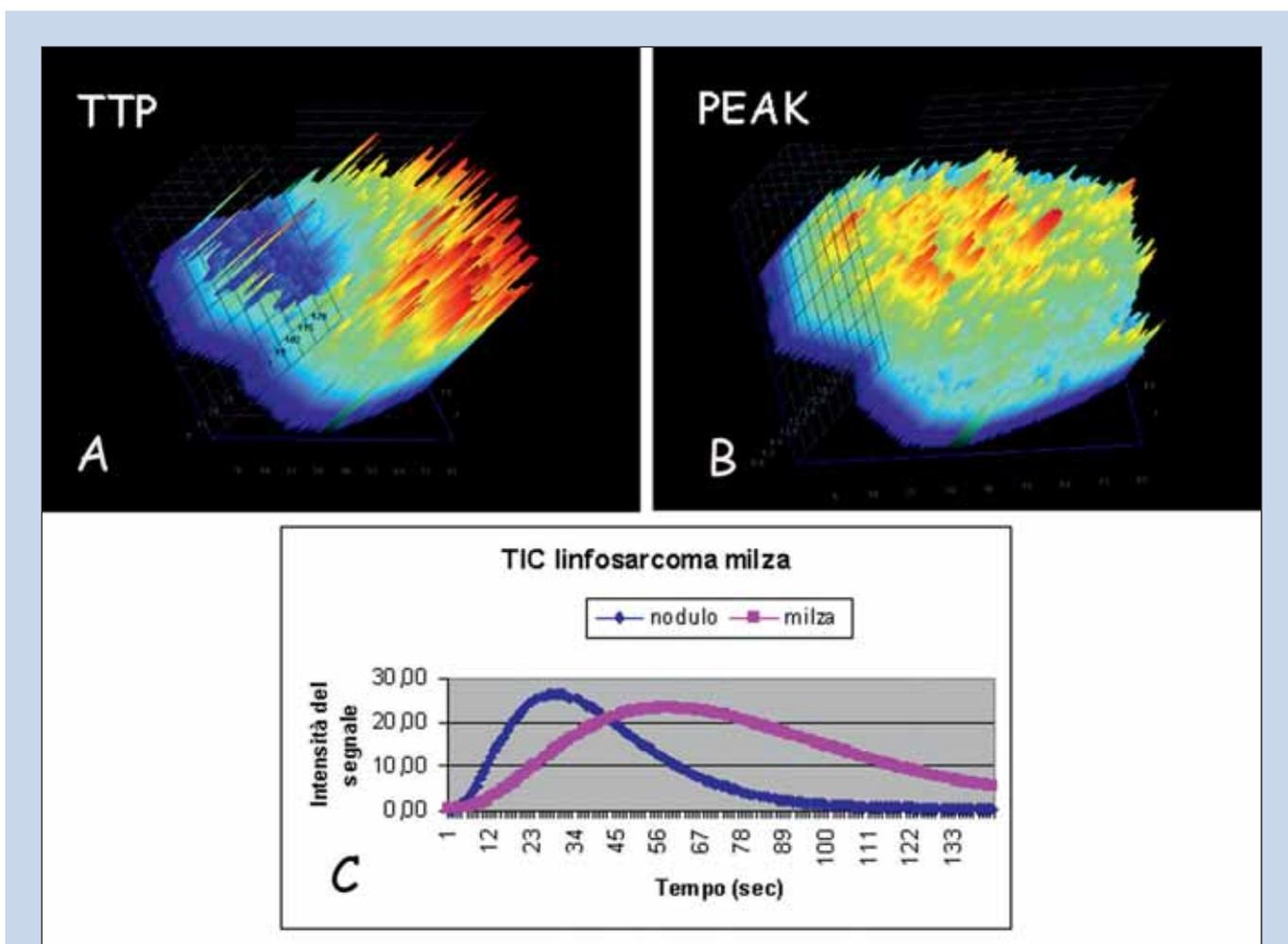


FIGURA 8 - Mappe cromatiche (rappresentazione 3D) (A e B) e curva intensità/tempo (C) della milza di un cane con un nodulo linfosarcomatoso. Esame effettuato dopo iniezione di Sonovue[®] (Bracco Imaging SpA) con metodica CnTI (Esaote Medmark). Curve e mappe costruite mediante il software Qon-contrast (Bracco Imaging SpA). A: tempo al picco (TTP) è più breve per il nodulo (blu) rispetto alla milza circostante (rossa). B: Il picco di enhancement (PEAK) del nodulo è più intenso (rosso) rispetto al picco della milza (blu). C: Il nodulo (curva blu) ha wash in più intenso e rapido rispetto alla milza circostante (curva rosa).



FIGURA 9 - Studio CEUS eseguito in un cane con emangiosarcoma della milza per la ricerca di metastasi epatiche. Nel parenchima del fegato compaiono due noduli anecogeni, confermati successivamente come metastasi della neoplasia splenica. Le lesioni non erano state identificate nell'esame ecografico convenzionale.

scansione fondamentale in quanto isoecogena con il parenchima circostante^{25,26,27,28,31}. La valutazione del parenchima epatico, in un soggetto colpito per esempio da emangiosarcoma splenico, risulta pertanto più accurata se effettuata dopo l'iniezione del MDC: metastasi anche di piccole dimensioni sono facilmente identificate come noduli anecogeni circondati dal parenchima iperecogeno durante la fase di enhancement³¹ (Fig. 9). Le caratteristiche di perfusione delle metastasi di emangiosarcoma sono le stesse indipendentemente dalla localizzazione della lesione, sia addominale che toracica (Fig. 10).

La stadiazione del paziente oncologico richiede la valutazione dei **linfonodi** regionali e a distanza, e anche in questo caso l'ecografia basale e Doppler rappresentano le metodiche di diagnostica per immagini comunemente utilizzate. Parametri importanti per la caratterizzazione di un linfonodo sono le dimensioni, la distribuzione del flusso ematico e l'indice di pulsatilità (PI)³², tuttavia vi sono possibilità di sovrapposizione tra un quadro reattivo e neopla-

stico. Un primo passo nell'utilizzo della CEUS per la valutazione dei linfonodi nel cane è stato fatto grazie ad uno studio che ha coinvolto linfonodi di 11 cani colpiti da linfoma³³. In questa indagine, le alterazioni dell'architettura vascolare e della perfusione sono state ben documentate dallo studio contrastografico. Rimane da verificare la specificità di questi rilievi nella differenziazione tra una linfadenomegalia neoplastica e non neoplastica.

Valutazione di una lesione prima di eseguire una biopsia

Lesioni neoplastiche di grandi dimensioni sono spesso accompagnate da ampie aree necrotiche o di emorragia. Quando si decide di effettuare un prelievo per ago-aspirazione sottile o biopsia tranciante, il campionamento di queste aree comporta l'impossibilità di raggiungere una diagnosi. L'esecuzione di un esame CEUS prima di ottenere una biopsia dimostra chiaramente le zone vascularizzate della lesione, incrementando le probabilità di un successo diagnostico della procedura.

Futuro

Le potenziali applicazioni della CEUS nella diagnostica dei piccoli animali sono estremamente ampie, qui di seguito ne vengono menzionate solo alcune.

Lo studio della perfusione del **miocardio** per il riconoscimento precoce di aree ipovascolari rappresenta una importante applicazione della CEUS in cardiologia umana³⁴ e un suo utilizzo anche in cardiologia veterinaria è ipotizzabile nel prossimo futuro.

Altre **patologie vascolari addominali** (trombo-embolismi, infarti, vasculopatie secondarie a torsioni di organo, differenziazione tra trombi e lesioni neoplastiche maligne) possono beneficiare di questa metodica.

L'iniezione **intralesionale** del MDC ecografico è stata applicata con successo in alcuni studi sperimentali nell'uomo per l'identificazione del linfonodo sentinella.

Nel **paziente traumatizzato**, lo screening per la rilevazione di emorragie occulte o rotture d'organo nell'addome è



FIGURA 10 - Studio CEUS in un cane colpito da emangiosarcoma. Notare che le lesioni spleniche (A), dell'atrio destro (B) e della corticale renale (C) hanno le stesse caratteristiche di lesioni anecogene omogenee, indipendentemente dalla loro localizzazione.

effettuato anche mediante la CEUS³⁵; soprattutto nel paziente pediatrico, con risultati correlabili a quelli ottenuti mediante CT con contrasto³⁶.

Infine, la ricerca sta studiando possibili applicazioni dei MDC ecografici in campo **terapeutico**³⁷. All'interno della microbolla viene introdotto un farmaco e la bolla legata ad un target. La distruzione della microbolla all'interno dell'organo bersaglio consente di distribuire il farmaco in modo estremamente preciso, incrementandone l'effetto terapeutico e riducendone quello tossico. Questo settore fornisce all'oncologia nuove possibilità per la chemioterapia e la terapia genetica.

CONCLUSIONI

L'ecografia con mezzo di contrasto rappresenta oggi una metodica con grandi potenzialità di applicazione anche nei piccoli animali. Nel prossimo futuro è probabile che il suo utilizzo nella pratica clinica subirà una rapida accelerazione, grazie all'acquisizione di sempre maggiori informazioni.

Bibliografia

- Gamiak R, Shah PM: Echocardiography of the aortic root. *Investigative Radiology* 1968; 3:356-366.
- Quaia E. Contrast media in Ultrasonography. Basic principles and clinical application 2005, ed.
- Rossi S, Calliada F, Martegani F. Mezzi di Contrasto in Ecografia - Testo Atlante 2004, ed. Poletto.
- Hohmann J, Albrecht T, Hoffmann CW, Wolf KJ: Ultrasonographic detection of focal liver lesions: increased sensitivity and specificity with microbubble contrast agent *European Journal of Radiology* 2003; 46:147-159.
- Quaia E, Calliada F, Bertolotto M, Rossi S, Garioni L, Rosa L, Pozzi-Mucelli R. Characterization of focal liver lesions with contrast-specific US modes and a sulfur hexafluoride contrast agent: diagnostic performance and confidence. *Radiology* 2004; 232:420-430.
- Teefey SA, Hildeboldt CC, Dehdashti F, Siegel BA, Peters MG, Heiken JP, Borwn J, McFarland EG, Middleton WD, Balfe DM, Ritter JH: Detection of primary hepatic malignancy in liver transplant candidates: prospective Comparison of CT, MR Imaging, US and PET. *Radiology* 2003; 226(2):533-542.
- Kienle RD Thomas WP: Echocardiography. In: Nyland TG, Mattoon JS: *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia, pp 354-423.
- Blomley MJK, Albrecht T, Cosgrove DO, Eckersley RJ, Butler-Barnes J, Jayaram V, Patel N, Heckemann RA, Bauer A, Schlieff R. Stimulated acoustic emission to image a later liver and spleen-specific phase of Levovist in normal volunteers and patients with and without liver disease. *Ultrasound Med Biol* 1999; 25:1341-1352.
- Furuse J, Nagase M, Ishii H, Yoshino M. Contrast enhancement patterns of hepatic tumours during the vascular phase using coded harmonic imaging and Levovist to differentiate hepatocellular carcinoma from other focal lesions. *The British Journal of Radiology* 2003; 76:385-392.
- Greis C. Technology overview: Sonovue (Bracco, Milan). *Eur Radiol Suppl* 2004; Suppl 8:11-15.
- Leen E, Hogan P. Ultrasound Contrast Agent for Hepatic Imaging with nonlinear modes. *Current problems in diagnostic radiology* 2003; 32:66-87.
- Ziegler L, O'Brien RT. Harmonic Ultrasound: a Review. *Vet Radiol & Ultr* 2002; 43:501-509.
- Philips P, Gardner E: Contrast-agent detection and quantification. *Eur Radiol Suppl* 2004; Suppl 8:4-10.
- Hope Simpson D, Chin CT, Burns PN. Pulse Inversion Doppler: a new method for detecting nonlinear echoes from microbubble contrast agent. *IEEE Transactions UFFC* 1999; 46:372-382.
- Lencioni R, Cioni D, Bartolozzi C. Tissue Harmonic and contrast-specific imaging: back to grey scale in ultrasound. *Eur Radiol* 2002; 32:151-165.
- Nyman HT, Kristensen AT, Kjelgaard-Hansen M, McEvoy FJ. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. *Vet rad & Ultr* 2005; 46:243-250.
- Albrecht T, Blomley M, Bolondi L, Claudon M, Correas JM, Cosgrove D, Greiner L, Läger K, de Jong N, Leen E, Lencioni R, Lindsell D, Martegani A, Solbiati L, Thorelius L, Tranquart F, Weskott HP, Whittingham T. Guidelines for the use of contrast agents in ultrasound. *Ultraschall in Medizin* 2004; 25:249-256.
- Yamaya Y, Niizeki K, Kim J, Entin P, Wagner H, Wagner PD. Anaphylactic response to Optison and its effects on pulmonary function in two dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 2004; 66:1429-1432.
- Ziegler LE, O'Brien RT, Waller KR, Zagzebsky JA: Quantitative contrast harmonic ultrasound imaging of normal canine liver. *Vet rad & Ultr* 2003; 44:451-454.
- Waller KR, O'Brien RT, Zagzebski JA. Quantitative Contrast Ultrasound Analysis of renal perfusion in normal dogs. *Vet Radiol & Ultr* 2007; 48:373-377.
- Catalano O, Lobianco R, Sandomenico F, D'Elia G, Siani A. Ecografia splenica con mezzo di contrasto in tempo reale: metodologia d'esame ed esperienza clinica preliminare. *Radiol Med* 2003; 106:338-356.
- Lamb CR. Ultrasonography of portosystemic shunts in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Animal Pract* 1998; 28:725-753.
- Salwei RM, O'Brien RT, Matheson JS. Use of contrast harmonic ultrasound for the diagnosis of congenital portosystemic shunts in three dogs. *Vet Rad & Ultr* 2003; 44:301-305.
- Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell ER, Wisner ER. Spleen. In: Nyland TG, Mattoon JS editors, *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2nd edition. Philadelphia: Saunders; 2002.
- Rossi F, Vignoli M, Terragni R. Contrast harmonic ultrasound in small animals with suspected neoplastic lesions – A preliminary study. *Vet Radiol & Ultrasound* 2004; 45:p.591 (Abstract).
- O'Brien RT, Iani M, Matheson J, Delaney F, Young K. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. *Vet Rad & Ultr* 2004; 45:547-553.
- Rossi F, Vignoli M, Leone VF, Terragni R. Use of Contrast Harmonic Ultrasound for the characterization of focal lesions of the spleen: 21 cases. *Vet Radiol & Ultrasound* 2006; 48:p.170 (Abstract).
- Rossi F, Leone VF, Vignoli M, Laddaga E, Terragni R: Use of Contrast-Enhanced Ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Vet Radiol & Ultrasound* (accettato per la pubblicazione).
- Schärz M, Ohlert S, Achermann R, Gardelle O, Roos M, Saunders M, Wergin M, Kaser-Hotz B. Evaluation of quantified contrast-enhanced colour and power Doppler ultrasonography for the assessment of vascularity and perfusion of naturally occurring tumours in dogs. *AJVR* 2005; 66:21-19.
- Ohlert S, Lалуhoová D, Buchholz J, Roos M, Walt H, Kaser Hotz B. Changes in vascularity and perfusion as a result of photodynamic therapy can be assessed with power Doppler ultrasonography. *Lasers in Surgery and medicine* 2006; 38:229-234.
- O'Brien RT. Improved detection of metastatic hepatic hemangiosarcoma nodules with contrast ultrasound in three dogs. *Vet Radiol & Ultr* 2007; 48:146-148.
- Nyman HT, Kristensen AT, Skovgaard IM, McEvoy F. Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using grey-scale B-mode, Color Flow mapping, Power and Spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. *Vet Radiol & Ultr* 2005; 46:404-410.
- Salwei RM, O'Brien RT, Matheson JS. Characterization of lymphomatous lymph nodes in dogs using contrast harmonic and power Doppler ultrasound. *Vet Rad & Ultr* 2005; 46:411-416.
- Hoffmann R, Borges AC, Kasprzak JD, von Bardeleben S, Firsche C, Greis C, Engelhardt M, Becher H, Vanoverschelde JL. Analysis of myocardial perfusion or myocardial function for detection of regional myocardial abnormalities. An echocardiographic multicenter comparison study using myocardial contrast echocardiography and 2D echocardiography. *Eur J Echocardiogr.* 2006; Sept 28.
- Lurie DM, Seguin B, Schneider PD, Verstraete FJ, Wisner ER Contrast-assisted ultrasound for sentinel lymph node detection in spontaneously arising canine head and neck tumors. *Invest Radiol.* 2006;4:415-21
- Thorelius L. Contrast-enhanced ultrasound in trauma. *Eur Radiol Suppl* 2004;1 4(Suppl8):43-52.
- Olednburg A, Hohmann J, Skrok J, Albrecht T. Imaging of paediatric splenic injury with contrast-enhanced ultrasonography. *Pediatr Radiol* 2004; 34:351-354.
- Unger EC, Matsunaga TO, McCreery T, Schumann P, Sweitzer R, Quigley R. Therapeutic applications of microbubbles. *European Journal of radiology* 2002; 42:160-168.