

Mezzi di contrasto ecografici per la valutazione qualitativa delle lesioni focali epatiche nel cane e nel gatto



Introduzione e scopo del lavoro: È noto che il riscontro all'ecografia convenzionale di alterazioni del parenchima epatico raramente risulta specifico per una particolare patologia. L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) migliora l'accuratezza dell'esame nel caratterizzare le lesioni focali epatiche, tuttavia in campo veterinario i lavori scientifici sull'argomento sono pochi e basati su una casistica esigua (cane) o mancano totalmente (gatto). Scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere i pattern ecocontrastografici di alcune lesioni focali epatiche nel cane e nel gatto.

Materiali e metodi: Sono state rivisitate le cartelle ecografiche di 34 cani e 6 gatti nei quali erano state riscontrate lesioni a livello epatico e per i quali era stato eseguito uno studio ultracontrastografico qualitativo con un mezzo di contrasto contenente esafluoruro di zolfo (Sonovue®) e un esame citologico come gold standard per la diagnosi. I risultati sono stati valutati secondo i metodi della statistica predittiva (sensibilità, specificità, valori predittivi positivo e negativo, likelihood ratios positivo e negativo) relativamente alla capacità dell'ecocontrastografia con Sonovue® di differenziare lesioni focali epatiche benigne da quelle maligne.

Risultati: Dalla valutazione degli esami CEUS è emerso che l'86,4% delle lesioni benigne ha mostrato un enhancement omogeneo in fase portale e tardiva. Tutte (100%) le lesioni maligne presentavano hypoenhancement in fase tardiva, mentre in fase portale apparivano da iso- a ipoecogene nei carcinomi primari e metastatici. Nella nostra esperienza, l'ecocontrastografia con Sonovue® ha mostrato ottime performance nel differenziare le lesioni focali epatiche maligne da quelle benigne.

Discussione: I risultati del nostro studio confermano l'utilità della CEUS nel differenziare le lesioni benigne da quelle maligne. Si registravano tuttavia 3 casi di lesioni benigne con comportamento atipico. La principale differenza di comportamento vascolare si è rivelata in fase tardiva con hypoenhancement caratterizzante le lesioni maligne sia nel cane che nel gatto. In quattro casi (10%) l'hypoenhancement si è rivelato in fase tardiva protratta suggerendo l'importanza di una osservazione di minimo 2 minuti per evitare falsi negativi. Non sono stati accreditati pattern patognomonici per la caratterizzazione di specifiche lesioni. La CEUS, metodica non invasiva e relativamente poco costosa, può risultare utile nell'iter diagnostico delle lesioni focali epatiche del cane e del gatto, in particolare quando non è possibile proporre esami più completi quali la TC o quando non è possibile effettuare una biopsia.

Paola Paradies*
Med Vet, PhD,
EVPC, Professore
Associato Clinica
Medica, DETO,
Campus di Medicina
Veterinaria,
Università di Bari

Italia Mele
Med Vet,
Ecografista free
lance, Puglia

Francesca Palma
Med Vet, Bari

Gabriele Barella
Med Vet, PhD,
Milano

Stefano Faverezani
Med Vet, PhD
Professore Associato
Clinica Medica,
Dipartimento di
Medicina Veterinaria,
Università di Milano

*Sezione Clinica Medica, Dipartimento delle Emergenze e dei Trapianti di Organo, Campus di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari - Strada Provinciale per Casamassima km 3, 70010 Valenzano, Bari

*Corresponding Author (paola.paradies@uniba.it)

Ricevuto: 13/03/2018 - Accettato: 31/01/2019

INTRODUZIONE

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) rientra, in medicina umana,¹ nell'iter diagnostico delle lesioni focali epatiche poiché permette di discernere tra nodulo benigno/maligno ed individuare dei pattern caratteristici associati a patologie specifiche^{2,3}. In medicina veterinaria le potenzialità della CEUS sono state prese in considerazione da più di 10 anni^{4,5,6,7}, tuttavia, i lavori scientifici in merito all'applicazione dei mezzi di contrasto (MDC) a livello delle lesioni focali epatiche nel cane ri-

l'Università di Bari (sito A) e presso l'ambulatorio di Ecografia Extracardiaca del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano (sito B). Sia per l'ecografia convenzionale che per la CEUS sono stati utilizzati macchinari ecografici con software e sonda dedicata (MyLab 30 e MyLab 70, Esaote[®], Italia rispettivamente nel sito A e sito B).

I risultati sono stati valutati complessivamente come campione unico avendo riconosciuto l'uniformità della procedura utilizzata.

Sebbene la CEUS sia una metodica entrata nella pratica clinica, i dati pubblicati in medicina veterinaria sulla sua applicazione nelle lesioni focali epatiche risultano pochi e datati nel cane e assenti nel gatto.

sultano pochi, datati e realizzati su uno scarso numero di lesioni^{8,9,10} e i risultati non sono facilmente sovrapponibili a causa dell'utilizzo di differenti MDC^{11,12}. Inoltre, in letteratura vi è completa assenza di informazioni sulla casistica felina. Dunque, scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere i pattern ecocontrastografici di alcune lesioni focali epatiche nel cane e nel gatto utilizzando un MDC contenente esafluoruro di zolfo (Sonovue[®], Bracco, Italia).

MATERIALI E METODI

Sono state rivisitate le cartelle ecografiche di cani e gatti che presentavano all'esame ecografico standard lesioni focali singole o multiple oppure disomogeneità diffusa a livello epatico e per i quali era disponibile uno studio ultracontrastografico di tipo qualitativo con Sonovue[®] nonché i risultati degli esami cito-istopatologici che potessero essere considerati come gold standard ai fini della diagnosi definitiva.

L'esame citologico è stato considerato come diagnosi definitiva solo nei casi in cui era riconosciuto a giudizio del citologo come sicuramente

diagnostico (i.e. steatosi) oppure se era indubbiamente contestualizzabile in un quadro sistemico (i.e. linfoma) o eventualmente se aveva fornito una diagnosi di neoplasia almeno caratterizzabile per tipo cellulare (epitelliale, mesenchimale, ecc.). Negli altri casi la diagnosi è stata definita su base istologica mediante biopsia eco guidata tru-cut, escissione chirurgica o necropsia.

I pazienti sono stati esaminati in due siti differenti, ovvero presso la Clinica Medica Veterinaria del Dipartimento delle Emergenze e dei Trapianti di Organo del-

Procedura

Il decubito dell'animale e le scansioni impiegate durante l'esame ecografico standard e CEUS sono state scelte in base alla localizzazione delle lesioni (decubito laterale sinistro/destro e dorsale; scansioni trasversali e longitudinali). I pazienti sono stati contenuti manualmente. In tutti i soggetti è stato posizionato nella vena cefalica destra o sinistra un catetere endovenoso della dimensione di 22 gauge quale successiva via di accesso del MDC. In modalità Contrast Tuned Imaging (CnTI) la macchina è stata settata con una potenza acustica di 35 kPa. I guadagni sono stati regolati in modo che si identificassero solo rari rumori di fondo e si posizionava un singolo fuoco appena sotto la lesione da studiare. Per l'esame ultracontrastografico è stata utilizzata una sonda lineare dedicata con frequenza variabile di 3-10 MHz, essendo la taglia dei soggetti inclusi e la profondità delle lesioni compatibile con l'utilizzo di tale sonda. Solo nel sito B era possibile studiare in contemporanea la lesione in scala di grigi e in modalità CnTI. Il MDC è stato utilizzato al dosaggio di 0,05 ml/kg¹³. La somministrazione endovenosa del MDC era seguita da un'inoculazione di circa 2 o 5 ml di soluzione fisiologica rispettivamente nel gatto e nel cane per permettere alle microbolle di arrivare in bolo nell'area da esaminare.

Talvolta è stato necessario effettuare più boli nello stesso paziente per valutare il comportamento di lesioni focali multiple/ aree di parenchima eterogeneo

e/o per migliorare il setting; in tal caso, nell'intervallo intercorso tra i singoli boli l'indice meccanico è stato innalzato al fine di eliminare eventuali residui del MDC somministrato con l'inoculazione precedente.

Le lesioni sono state scansionate e filmate continuamente per due minuti dal momento della partenza del timer, la quale avveniva contestualmente all'iniezione del MDC, e lo studio ecocontrastografico è stato suddiviso in tre diverse fasi: arteriosa, portale e tardiva. I tempi delle fasi vascolari, arteriosa e portale, sono stati de-

Utilizzando i risultati cito-istologici come gold standard è stato studiato il comportamento CEUS delle lesioni focali epatiche nel cane e nel gatto utilizzando un MDC commercializzato in Italia e contenente esafluoruro di zolfo (Sonovue[®]).

finiti sulla base dei risultati di un lavoro realizzato utilizzando Sonovue® come MDC¹³. Stando a questi, la fase arteriosa si manifesta 10-15 secondi post iniezione ed è susseguita dalla fase portale, la quale si avvia dopo almeno 30 secondi dal bolo¹³. Il tempo che intercorre tra l'inoculazione del MDC e il picco di enhancement (impregnazione contrastografica massima) è stato valutato di 46,3 secondi in pazienti non sedati¹³. Si è considerata come fase tardiva quella a partire dai 60 secondi dopo la somministrazione del MDC e comunque successiva al picco di enhancement. Riesaminando le immagini registrate in ecografia convenzionale, le lesioni epatiche sono state classificate in base alla loro distribuzione (singole, unifocali e multifocali) e alla loro ecogenicità rispetto al parenchima circostante (iperecogene, isoecogene o ipoecogene).

Lo studio ecocontrastografico è stato suddiviso in tre diverse fasi: arteriosa, portale e tardiva.

Per quanto concerne gli esami CEUS, i parametri utilizzati nella valutazione sono stati di tipo qualitativo, ovvero sono stati analizzati i filmati prendendo in considerazione l'enhancement (impregnazione contrastografica) delle lesioni, il quale era messo a confronto con l'enhancement del parenchima epatico limitrofo nelle tre diverse fasi. Nella fase arteriosa le lesioni sono state classificate come ipervascolari, isovascolari o ipovascolari sulla base della loro vascolarizzazione in confronto a quella del fegato circostante. Nella fase portale e tardiva la perfusione delle lesioni è stata classificata come aumentata (iper= hyperenhanced), uguale (iso= isoenhanced) e ridotta (ipo= hypoenhanced) rispetto al fegato circostante. Quando possibile, si è cercato di definire il pattern di enhancement contrastografico secondo la classificazione riportata in campo umano³ (Figura 1).

Mediante la valutazione degli indici di performance diagnostica (Sensibilità, Specificità, Positive Likelihood Ratio, Negative Likelihood Ratio, Valore Predittivo Positivo e Valore Predittivo Negativo)¹⁴ è stata calcolata l'uti-

lità dell'impiego di Sonovue® nel differenziare le lesioni maligne da quelle benigne, rispetto ai risultati della diagnosi definitiva.

RISULTATI

Sono stati reclutati in totale 40 soggetti (Tabella 1), specificatamente 34 cani e 6 gatti, di età media avanzata (11,7 anni nei cani; 13,3 anni nei gatti) e peso variabile dai 3,5 ai 5,5 kg i gatti e tra 9 e 22 kg i cani. All'esame ecografico standard tutti gli animali avevano mostrato a livello epatico lesioni focali o a massa, singole o multiple, oppure aree di parenchima eterogeneo come richiesto dai criteri di inclusione (Tabella 2). In particolare, 13 animali mostravano lesioni focali singole o in numero ≤ 3 , 14 animali lesioni focali multiple (di cui in 11 le lesioni avevano caratteri costanti e sovrapponibili, mentre in 3 animali- CN11, CN19 e GT1 le lesioni multiple avevano caratteri differenti tra loro), 8 animali mostravano lesioni a massa di diametro da 3,2 a 9,8 cm e 5 animali mostravano aree di parenchima eterogeneo. Sono stati identificati n. 22 animali con lesioni benigne e 18 animali con lesioni maligne sulla base dell'esame istologico (n=29) o citologico (n=11).

L'86,4% dei casi riferibili a lesioni benigne ha mostrato un enhancement omogeneo in fase portale e tardiva. Il 100% delle lesioni maligne hanno mostrato hypoenhancement in fase tardiva.

Dei 6 gatti inclusi nello studio, 3 mostravano lesione a massa e 2 mostravano lesioni focali con diagnosi di neoplasia maligna primaria o secondaria, un gatto mostrava aree eterogenee poi risultate ascessi multipli.

Dalla valutazione retrospettiva degli esami CEUS è emerso che fra le lesioni benigne (Tabella 3) l'86,4% dei casi (19/22) ha mostrato un enhancement omogeneo in fase portale e tardiva tale che le lesioni si rendevano non valutabili poiché isoecogene rispetto al parenchima circostante (Figura 2). Facevano eccezione: 1. la lesione cistica (CN8) che mostrava il caratteristico difetto di enhancement in tutte le fasi, 2. il granuloma infiammatorio

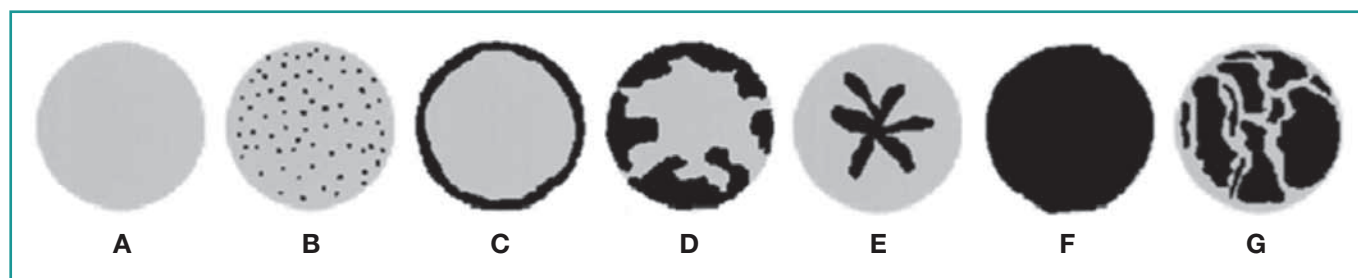


Figura 1 - Classificazione dei pattern di enhancement nelle lesioni focali epatiche in campo umano³: no enhancement (A), punteggiato (B), Rim-like o ad anello periferico (C), Nodulare periferico (D), Centrale a raggi di ruota (E), Diffuso omogeneo (F), Diffuso disomogeneo (G).

Tabella 1 - Tabella riassuntiva dei 40 casi riportati nello studio: segnalamento dell'animale; aspetto delle lesioni epatiche visualizzate in ecografia convenzionale; comportamento delle lesioni in CEUS nelle tre fasi arteriosa, portale e tardiva; diagnosi cito/istologica

CASO	SEGNALAMENTO	ASPETTI PATOLOGICI IN ECOGRAFIA CONVENZIONALE	COMPORTAMENTO IN CEUS			DIAGNOSI ISTOLOGICA/ CITOLOGICA
			ARTERIOSA	PORTALE	TARDIVA	
CN1	Greyhound, FS, 11 anni	Lesione focale singola ipoecogena	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Iperplasia nodulare benigna
CN2	Barbone, FS, 13 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Ipervascolare con rapido pattern ad anello periferico	Wash-out precoce (23"), hypoenhanced	Hypoenhanced	Neoplasia epiteliale maligna/ carcinoma
CN3	Meticcio, FS, 14 anni	Lesione a massa iperecogena, disomogenea e a margini definiti	Ipervascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Epatoma
CN4	Meticcio, MC, 12 anni	Lesioni focali multiple iperecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Steatosi focale-C
CN5	Meticcio, M, 11 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Wash-out precoce (23"), hypoenhanced	Hypoenhanced. Nuove aree ipocaptanti visibili	Sarcoma
CN6	Cocker Spaniel, FS, 14 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Aree non captanti	Aree non captanti	Aree non captanti	Metastasi di emangiosarcoma
CN7	Meticcio, FS, 11 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Epatite purulenta cronica e moderata fibrosi
CN8	Meticcio, FS, 11 anni	Lesione focale singola anecogena con rinforzo posteriore di parete	No enhancement	No enhancement	No enhancement	Cisti epatica
CN9	Labrador, M, 8 anni	2 lesioni focali ipoecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Iperplasia nodulare benigna
CN10	Jack Russel, FS, 10 anni	2 lesioni focali iperecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Steatosi focale-C
CN11	Meticcio, FS, 8 anni	Lesioni focali multiple alcune ipoecogene, altre "a bersaglio"	Aree non captanti	Aree non captanti	Aree non captanti, visibili nuove lesioni	Linfoma
CN12	Meticcio, M, 14 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Degenerazione vacuolare
CN13	Cocker Spaniel, M, 13 anni	Lesioni focali multiple miste: iso-ipo-anecogene	Aree non captanti	Aree non captanti	Aree non captanti	Metastasi di emangiosarcoma
CN14	Golden Retriever, FS, 13 anni	Lesione a massa isoecogena	Ipervascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Epatoma
CN15	Pincher, FS, 10 anni	Lesione a massa iperecogena a margini non definiti, presenza all'interno di aree ipoecogene	Ipervascolare	Isoenhancement disomogeneo (Wash-out precoce di alcune aree intralesionali)	Hypoenhanced	Carcinoma epatocellulare
CN16	Meticcio, FS, 17 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Degenerazione vacuolare
CN17	Beagle, FS, 12 anni	3 lesioni focali iperecogene	Ipervascolare	Isoenhanced	Lieve hypoenhancement	Metastasi carcinoma gastrico
CN18	Meticcio, F, 13 anni	Lesione focale singola ipoecogena	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Iperplasia nodulare benigna
CN19	Labrador, M, 14 anni	Lesioni focali multiple ipo- o iperecogene	Aree non captanti	Aree non captanti	Aree non captanti	Metastasi di emangiosarcoma
CN20	Meticcio, M, 10 anni	Lesione focale singola ipoecogena	Ipervascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Moderata degenerazione vacuolare non lipidosica e colestasi
CN21	Yorkshire, M, 12 anni	Lesione focale singola iperecogena	Ipervascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Degenerazione vacuolare, probabile origine lipidica
CN22	Meticcio, F, 12 anni	Lesione focale a massa iperecogena	Wash-in precoce (13"), ipervascolare	Rapido wash-out (24"), hypoenhancement con sottile pattern ad anello periferico	Hypoenhanced	Carcinoma/adenocarcinoma epatocellulare
CN23	Golden Retriever, M, 11 anni	Lesione focale epatica iso/ipoecogena	Isovascolare	Wash-out rapido e completo (20"), marcato hypoenhancement con pattern punteggiato	Marcato hypoenhancement. Visibili nuove lesioni	Sarcoma istiocitico
CN24	Cocker Spaniel, M, 7 anni	Lesione focale singola iperecogena	Ipervascolare	Wash-out rapido (23"), hypoenhanced	Hypoenhanced	Metastasi di emangiosarcoma
CN25	Maltese, M, 11 anni	Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Wash-out rapido e completo, marcato hypoenhancement con pattern punteggiato	Marcato hypoenhancement. Visibili nuove lesioni	Linfoma metastatico (di provenienza intestinale)

continua

segue

CASO	SEGNALAMENTO	ASPETTI PATOLOGICI IN ECOGRAFIA CONVENZIONALE	COMPORTAMENTO IN CEUS			DIAGNOSI ISTOLOGICA/ CITOLOGICA
			ARTERIOSA	PORTALE	TARDIVA	
CN26	Meticcio, F, 9 anni	Lesione focale singola a bersaglio con centro anecogeno	Enhancement periferico e centro non captante	Hypoenhancement in periferia e centro non captante	Hypoenhancement in periferia e centro non captante	Granuloma infiammatorio
CN27	Volpino, F, 14 anni	Lesione a massa iperecogena	Ipervascolare	Isoenhanced	Hypoenhanced (wash-out a 1'12")	Carcinoma metastatico da neoplasia surrenalica destra
CN28	Cocker Spaniel, M, 9 anni	Fegato disomogeneo con 2 aree iperecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Cirrosi iniziale
CN29	Bassotto, M, 9 anni	Fegato iperecogeno. Lesioni focali multiple ipoecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Degenerazione epatocitaria torbido-vacuolare e steatosi a gocce grosse
CN30	Setter Irlandese, M, 12 anni	Lesioni focali multiple iperecogene	Isovascolare	Isoenhanced	Isoenhanced	Degenerazione torbido-vacuolare e glicogenosi. Reperti multifocali di fibrosi
CN31	Yorkshire Terrier, M, 11 anni	Fegato disomogeneo, iperecogeno	Aree ipervascolari	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Degenerazione vacuolare e steatosi
CN32	Flat Coated Retriever, M, 8 anni	Fegato iperecogeno e disomogeneo	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Epatite cronica associata ad accumulo di rame
CN33	Pastore Tedesco, F, 10 anni	Disomogeneità macronodulare diffusa	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Quadro degenerativo vacuolare
CN34	Meticcio, M, 14 anni	Singolo lobo arrotondato e disomogeneità diffusa	Ipervascolare	Enhancement omogeneo	Enhancement omogeneo	Epatoma
GT1	Europeo, FS, 15 anni	Lesione focale singola ipoecogena su fegato disomogeneo per la presenza di lesioni focali multiple iperecogene	Ipovascolare (lesione singola ipoecogena)	Hypoenhanced (lesione singola ipoecogena)	Hypoenhanced (lesione singola ipoecogena)	Metastasi epatica da carcinoma pancreatico
			Isovascolare (lesioni multiple iperecogene)	Isoenhanced (lesioni multiple iperecogene)	Isoenhanced (lesioni multiple iperecogene)	Quadro degenerativo vacuolare
GT2	Europeo, MC, 10 anni	Lesione a massa con al centro una porzione cistica a contenuto anecogeno	Ipervascolare. No enhancement della parte cistica	Hypoenhanced. No enhancement della parte cistica	Hypoenhanced	Neoplasia epiteliale maligna/carcinoma
GT3	Europeo, M, 15 anni	Lesione focale singola iperecogena	Wash-in velocissimo, ipervascolare	Isoenhancement disomogeneo	Hypoenhanced	Colangiocarcinoma
GT4	Europeo, M, 11 anni	Lesione a massa ipoecogena disomogenea	Ipervascolare in periferia, ipovascolare al centro	Hypoenhancement al centro (permane l'hyperenhancement in periferia)	Hypoenhanced	Metastasi epatica da carcinoma pancreatico
GT5	Europeo, M, 14 anni	Fegato disomogeneo per presenza di aree ad ecogenicità differente	Aree ipovascolari	Aree di hypoenhancement	Aree di hypoenhancement	Ascessi multipli-C
GT6	Persiano, FS, 15 anni	Lesione a massa ipoecogena disomogenea	Ipervascolare	Hypoenhanced	Hypoenhanced, visibili nuove lesioni	Colangiocarcinoma

Tabella 2 - Numero di animali distribuito a seconda del tipo di alterazioni epatiche riscontrate all'esame ecografico convenzionale

	Ipoecogene	Iperecogene	Miste	Altro	N totale (n=40)
Lesione focale singola	3	3	0	3 (1 isoecogena, 1 anecogena, 1 a bersaglio)	9
Lesioni focali multiple	8	3	2	1 a bersaglio	14
Lesioni a massa	2	3	1	2 (1 centro anecogeno, 1 isoecogena)	8
Aree di parenchima eterogeneo			5		5
Altro (2-3 lesioni singole)	1	3			4

Tabella 3 - Comportamento in CEUS delle lesioni benigne distribuito in base alla diagnosi cito-istologica

LESIONI BENIGNE	Fase arteriosa			Fase portale			Fase tardiva		
	Iper	Iso	Ipo	Iper	Iso	Ipo	Iper	Iso	Ipo
Iperplasia nodulare benigna n=3		3			3			3	
Epatoma n=3	3				3			3	
Steatosi focale n=2		2			2			2	
Epatite purulenta cronica/ascessi multipli n=2		1	1		1	1		1	1
Cisti epatica n=1 °									
Degenerazione vacuolare+/-steatosi o fibrosi n=8	3	5			8			8	
Granuloma infiammatorio n=1	1*					1*			1*
Cirrosi n=1		1			1			1	
Epatite cronica da accumulo di rame n=1		1			1			1	

* con centro non captante; ° non captante in alcuna fase.

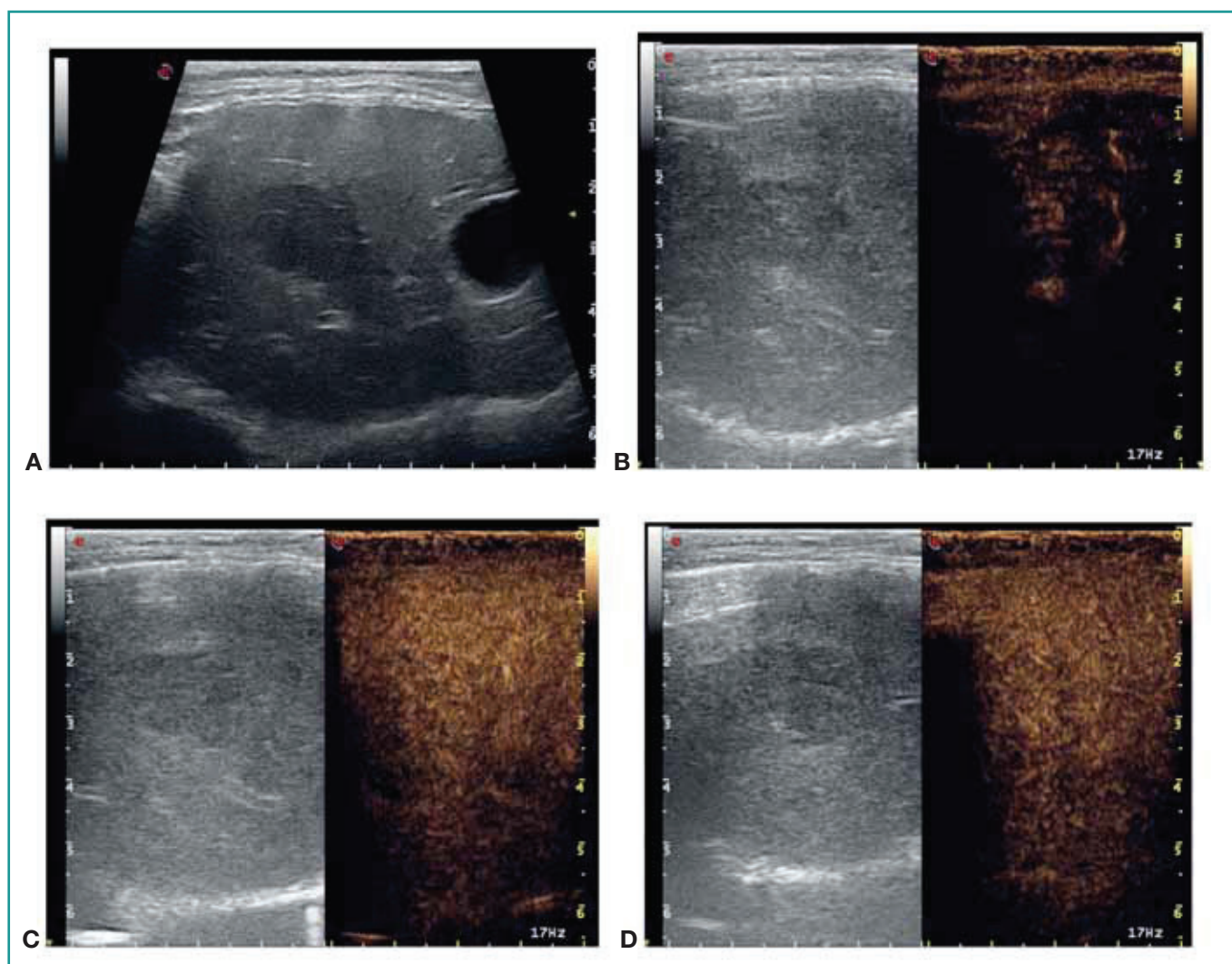


Figura 2 - Cane Greyhound, femmina sterilizzata, 11 anni con diagnosi di iperplasia nodulare benigna. All'esame ecografico convenzionale era visualizzabile un'unica lesione focale ipoecogena di diametro di circa 2 cm a margini irregolari (A). Durante l'esame CEUS nel sito B era possibile visualizzare contemporaneamente le immagini in B-mode (a sinistra) e in modalità CnTi (a destra) (B, C, D). Dopo iniezione del MDC la lesione focale presentava un enhancement sovrapponibile a quello del parenchima epatico circostante durante tutte e tre le fasi, ovvero appariva iso-vascolare in fase arteriosa (B) e presentava isoenhancement in fase portale e tardiva (C, D).

rio (CN26) che assumeva in fase arteriosa un pattern ipervascolare periferico seguito da hypoenhancement in fase portale e tardiva e centro non captante in alcuna fase, 3. gli ascessi multipli (GT5) nel quale si registrava una fase arteriosa ipovascolare e hypoenhancement in fase portale e tardiva.

Eccetto questi ultimi 3 singolari casi, nelle lesioni benigne la fase arteriosa risultava per lo più isovascolare, tranne che nei noduli di epatoma (CN3, CN14, CN34) e in 3 casi di disturbi degenerativi (CN20, CN21, CN31) nei quali invece appariva ipervascolare.

Fra le lesioni maligne (Tabella 4), le neoplasie epatiche primarie, ovvero epatocarcinomi e colangiocarcinomi rispettivamente nel cane e nel gatto (CN15, CN22, GT3, GT6) assumevano un comportamento simile tra loro, ovvero con fase arteriosa ipervascolare con wash-in rapido e vivace, fase portale caratterizzata da iso o hy-

poenhancement e fase tardiva persistente di hypoenhancement (Figura 3).

I casi di metastasi da carcinoma o neoplasia epiteliale maligna (CN2, CN17, CN27, GT1, GT2, GT4) esibivano un comportamento CEUS variabile in fase arteriosa e portale, ma costante in fase tardiva per il caratteristico hypoenhancement. In 4 casi su 6 la fase arteriosa si mostrava ipervascolare, mentre la fase portale era isoecogena in 2 soggetti e ipoecogena in 4.

Le metastasi da carcinoma pancreatico (GT1, GT4) assumevano un aspetto costantemente ipoecogeno in tutte le fasi con presenza di anello periferico ipervascolare in uno dei 2 casi.

L'unico caso di sarcoma indifferenziato (CN5) presentava fase arteriosa isovascolare, seguita da un rapido wash-out in fase portale e hypoenhancement persistente in fase tardiva.

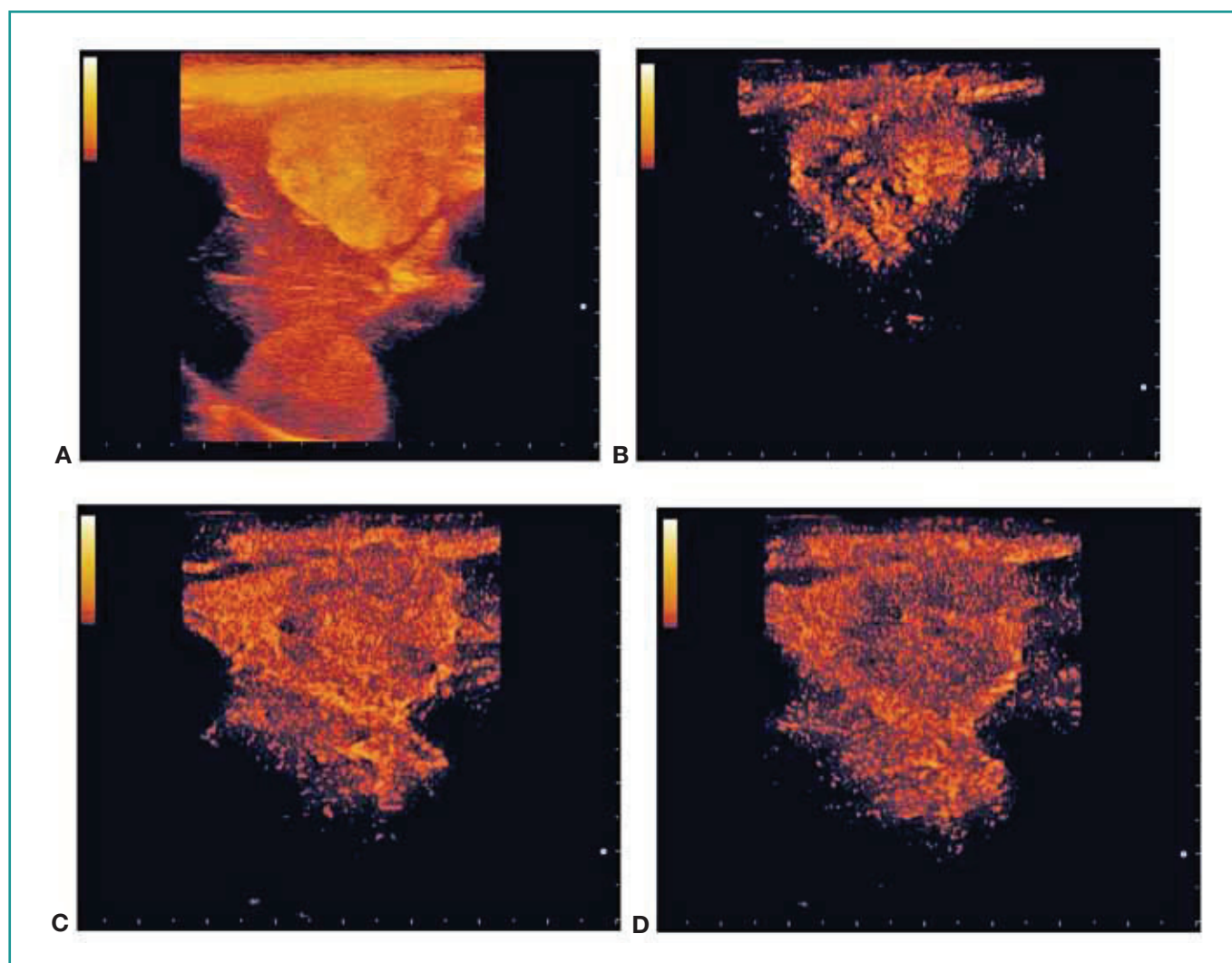


Figura 3 - Cane meticcio, femmina, 12 anni con diagnosi di carcinoma/adenocarcinoma epatocellulare (CN22). All'esame ecografico standard si riscontrava la presenza nel contesto epatico di una lesione a massa iperecogena deformante il profilo dell'organo (A). Dopo iniezione del MDC la lesione mostrava un wash-in rapido e vivace (a 13") in fase arteriosa e assumeva un aspetto ipervascolare rispetto al parenchima epatico limitrofo (B). In fase portale seguiva un rapido wash-out (24") e la massa presentava hypoenhancement con un sottile pattern ad anello periferico (C). In fase tardiva persisteva l'hypoenhancement della lesione (D).

Tabella 4 - Comportamento in CEUS delle lesioni maligne distribuito in base alla diagnosi cito-istologica

LESIONI MALIGNI	Fase arteriosa				Fase portale				Fase tardiva			
	Iper	Iso	Ipo	No E.	Iper	Iso	Ipo	No E.	Iper	Iso	Ipo	No E.
Epatocarcinoma n=2	2					1	1				2	
Colangiocarcinoma n=2	2					1	1				2	
Metastasi carcinoma/ neoplasia epiteliale n=6	4		2			2	4				6	
Sarcoma n=1		1					1				1	
Metastasi emangiosarcoma n=4			1	3			1	3			1	3
Linfoma n=2		1		1			1	1			1	1
Istiocitosi maligna n=1		1						1				1

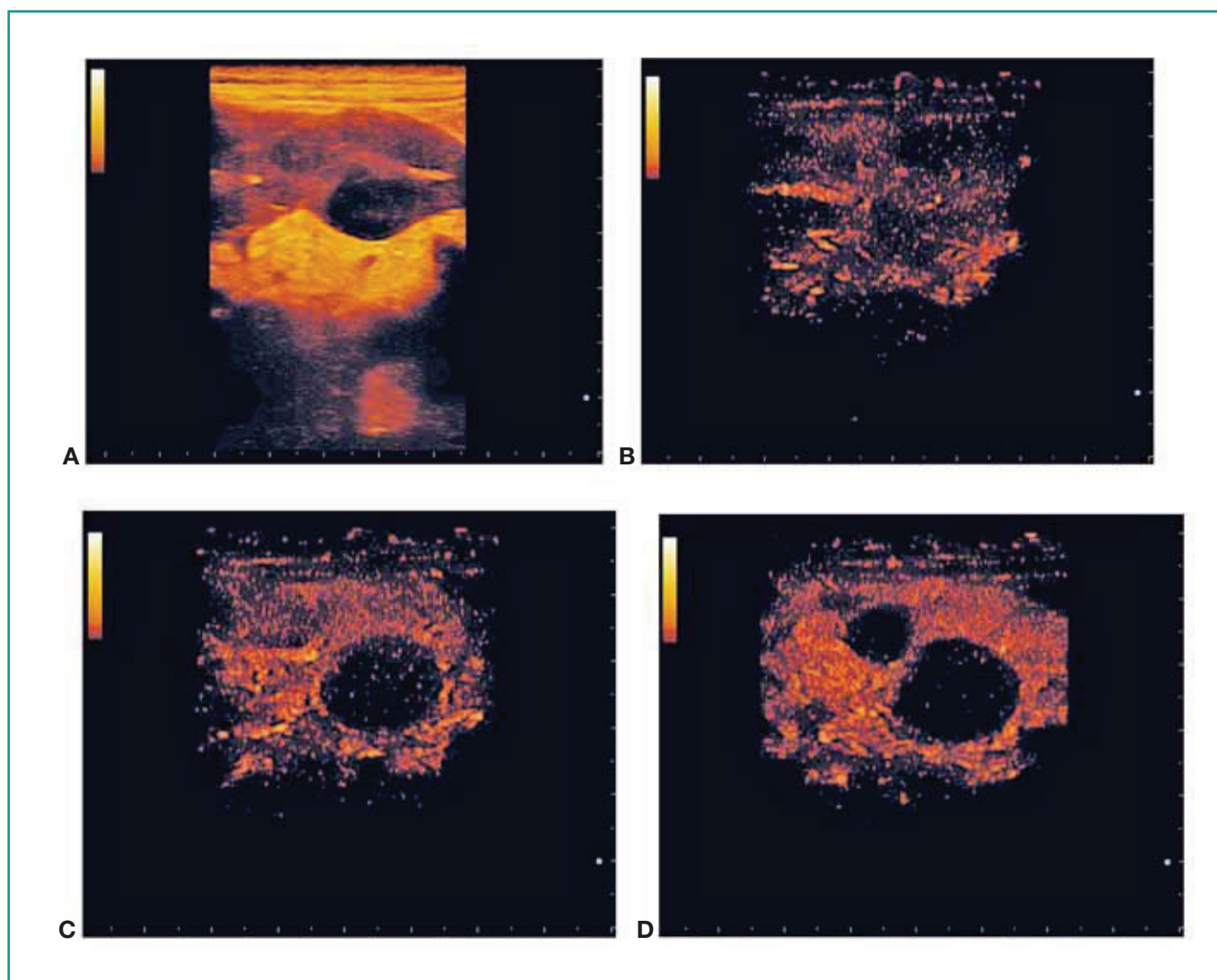


Figura 4 - Cane Golden Retriever, maschio, 11 anni con diagnosi di sarcoma istiocitico (CN23). All'esame ecografico convenzionale presentava a livello epatico una lesione focale singola mista iso- e ipoecogena di circa 2 cm di diametro (A). All'esame CEUS la lesione in fase arteriosa (B) era isovascolare con un riempimento sovrapponibile a quello del parenchima circostante. Successivamente mostrava un wash-out rapido e completo (già a 20") con marcato hypoenhancement al picco di enhancement (C) e presenza di un pattern punteggiato in fase portale e tardiva (C, D). Si rilevavano in fase tardiva ulteriori lesioni focali epatiche non visibili all'esame ecografico standard (D).

Le metastasi di emangiosarcoma (CN6, CN13, CN19, CN24) mostravano assenza di enhancement in tutte le fasi per assoluta mancanza oppure ridotta impregnazione contrastografica.

Tra le 3 neoplasie a cellule rotonde (linfoma o sarcoma istiocitico), in 1 caso (CN11) non si assisteva ad alcuna captazione di contrasto in nessuna fase, mentre nei rimanenti due (CN23 e CN25) è stato riscontrato un pattern punteggiato (secondo descrizione di Quaia et al., 2004³) in fase portale che seguiva a una fase arteriosa iso-vascolare dal rapidissimo wash-out (Figura 4). In tutti e tre i casi si identificavano in fase tardiva ulteriori lesioni non visibili in ecografia convenzionale.

Sulla base dei risultati esposti, l'analisi di statistica descrittiva ha evidenziato una sensibilità della CEUS, nella nostra casistica, del 100%, una specificità del 91,67% con valori di PLR (Positive Likelihood Ratio) di 12 (IC 95%, Intervallo di confidenza al 95%, 3,18-45,23), di NLR (Negative Likelihood Ratio) di 0, PPV (Positive Predictive Value) del 90% (IC 95% 70,48-97,14%) e NPV (Negative Predictive Value) del 95,24% (IC 95% 83,84%-99,42%).

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio confermano innanzitutto che l'ecografia convenzionale non è in grado di caratterizzare in maniera conclusiva le lesioni focali epatiche, come già riportato^{15,16,17,18,19}.

Riguardo gli esami ecocontrastografici con Sonovue[®], l'aspetto predominante di iso-enhancement in fase portale e tardiva nelle lesioni benigne è stato già documentato sia in campo umano^{3,20} che veterinario^{8,10} ed è presumibilmente dovuto a una struttura vascolare simile tra la lesione stessa e il parenchima epatico normale, in termini di conformazione dei vasi e di velocità del flusso ematico³. Il comportamento ecocontrastografico di rapido wash-in con fase arteriosa ipervascolare osservato in tutti i 3 casi di epatoma rispecchia quanto descritto in medicina umana¹, sebbene sia stato registrato anche in 3 casi di lesioni degenerative, risultando dunque non patognomonico.

Nel complesso delle lesioni benigne, in 3 casi è stato registrato un comportamento atipico. In un caso, ovvero nella lesione cistica caratterizzata da non captazione in alcuna fase, il peculiare comportamento era facilmente e correttamente interpretato come benigno. Diversamente nel granuloma infiammatorio il pattern di enhancement periferico in fase arteriosa seguito da hypo-enhancement in fase portale e tardiva con porzione centrale non captante era stato erroneamente interpretato come un comportamento riferibile a una lesione maligna con necrosi centrale. In campo umano, tuttavia, un simile comportamento è stato descritto in associazione o al comportamento tipico degli ascessi^{21,22}. Anche nel gatto af-

fetto da ascessi multipli la CEUS effettuata con paziente non in sedazione aveva indirizzato verso un comportamento neoplastico maligno, poi smentito dalla istologia. Le lesioni avevano mostrato un debole wash-in con hypo-enhancement rispetto al parenchima circostante in tutte le fasi. Si sottolinea che in animali poco collaborativi la sedazione può risultare necessaria e utile a ridurre al minimo gli errori interpretativi. In generale non sono stati riscontrati pattern caratteristici capaci di differenziare, tra le lesioni benigne, quelle infiammatorie, degenerative e iperplastiche. Nei 3 casi di iperplasia nodulare benigna non è stato evidenziato il tipico comportamento descritto nell'uomo di rapido riempimento centrifugo e cicatrice centrale non contrastata²⁰.

La CEUS ha mostrato una sensibilità del 100%, una specificità del 91,67%. Tra le lesioni benigne il caso di granuloma infiammatorio e il caso di ascessi epatici multipli hanno mostrato un comportamento CEUS atipico e dunque forviante ai fini diagnostici.

Per quanto riguarda invece le lesioni maligne, tutte hanno mostrato hypo-enhancement in fase tardiva, risultando quindi decisamente distinguibili dalle lesioni a carattere benigno, mentre la fase portale è risultata variabile da iso- a ipoecogena nei carcinomi primari e metastatici. Nei tumori maligni primari l'aspetto di fase arteriosa vigorosamente ipervascolare e perdita precoce di contrasto rispetto al parenchima circostante corrisponde a quanto riportato sia in campo umano²³ che veterinario^{8,10}. Tuttavia, il diverso aspetto iso- o ipoecogeno in fase portale è in disaccordo con altri lavori effettuati utilizzando il Sonovue^{®8,10} i quali riportano un rapido wash-out già in fase portale; malgrado ciò, questi dati vanno interpretati alla luce di un limitato numero di casi, ovvero un caso di epatocarcinoma⁸ e un caso di colangiocarcinoma¹⁰. In studi successivi con MDC parenchimali^{11,12} elaborati su un numero più elevato di soggetti la fase arteriosa era per lo più ipervascolare e tutti mostravano una fase parenchimale (o tardiva) di hypo-enhancement. In fase portale, invece, l'hypo-enhancement non era una caratteristica costante, anzi la maggior parte delle lesioni apparivano isoecogene o miste^{11,12}. Nonostante la differenza sostanziale del MDC utilizzato, è da sottolineare come nel nostro studio 2 di 4 casi di neoplasia primaria (CN15 e GT3) risultavano isoecogeni al picco di enhancement, divenendo ipoecogeni solo tardivamente dopo il minuto di osservazione. In campo umano sono riportati epatocarcinomi dal prolungato enhancement e wash-out tardivo dopo il picco di enhancement e questo comportamento atipico è stato associato a quei carcinomi epatocellulari dall'istotipo tumorale

maggiormente differenziato²³. Uno studio²⁴ ha richiamato l'attenzione sull'adenoma colangiocellulare del cane, neoplasia benigna con aspetto a massa, che può mostrare un comportamento riferibile erroneamente a un comportamento maligno all'esame CEUS.

Sempre tra i tumori primari, nel nostro studio abbiamo esaminato 2 gatti affetti da colangiocarcinoma, il quale rappresenta il tumore primitivo epatico più comune nella specie felina; la fase arteriosa appariva marcatamente ipervascolare e vivace. Gli altri rari casi di colangiocarcinoma documentati si riferiscono al cane^{10,11}.

Per quanto concerne le neoplasie metastatiche, queste hanno mostrato un rapido wash-out in fase portale o tardiva, come già riportato precedentemente^{8,10}. Tuttavia, è interessante notare come, similmente a quanto detto per le neoplasie primarie, anche quelle secondarie possano risultare isoecogene al picco di enhancement e diventare ipoecogene solo in fase tardiva, come registrato nei 2 casi di metastasi di carcinoma (CN17 e CN27). Questi riscontri si discostano da quelli di O'Brien et al.⁸ i quali riportano in 15 lesioni focali maligne (prevalentemente metastatiche) un aspetto ipoecogeno al picco di enhancement, ovvero prima di un minuto dall'iniezione.

È necessario prolungare i tempi di osservazione per minimo 2 minuti per evitare di incorrere in falsi negativi essendo possibile un wash-out tardivo nelle lesioni maligne.

I nostri dati sono in accordo con quelli di un lavoro ad ampio raggio svolto in campo umano con Sonovue[®] (452 lesioni studiate) nel quale si conclude che la principale differenza fra le lesioni benigne e maligne si rileva solo durante la fase tardiva³ e suggeriscono di prolungare i tempi di osservazione per un minimo di 2 minuti per evitare di incorrere in falsi negativi. Infatti nel cane, sebbene il comportamento vascolare sia spesso già definito al picco di enhancement (46,2 secondi dall'iniezione di Sonovue[®] in cani non sedati¹³), la perdita di contrasto può avvenire tardivamente.

Si ritiene che le lesioni maligne abbiano una precoce perdita di contrasto in quanto dispongono di un'irrorazione prettamente arteriosa, a differenza del parenchima epatico che invece presenta una doppia vascolarizzazione^{25,26}. Il ruolo dei vasi portali nel nutrimento delle lesioni maligne è controverso. In studi sperimentali è stato ipotizzato che il flusso portale possa penetrare nei tumori epatici tramite degli shunt tra le diramazioni portali e il sistema arterioso afferente alla lesione²⁷: questo potrebbe spiegare il wash-out della lesione solo in fase tardiva e non in quella portale da noi riscontrato.

Tra le lesioni metastatiche, quelle da emangiosarcoma splenico presentavano un comportamento caratteristi-

co già descritto da altri autori^{8,9,28}, ovvero assenza di enhancement o enhancement ridotto in tutte le fasi, confermando l'importante ruolo della CEUS nella stadiazione di questo tumore. Tuttavia, questo aspetto non è risultato patognomonico di emangiosarcoma, essendo stato registrato anche in un caso di linfoma (CN11) e in diverse forme metastatiche in un altro studio⁸.

Nei tumori a cellule rotonde, il pattern vascolare punteggiato visualizzato in CN23 e CN25 è stato precedentemente documentato in un altro caso di linfoma¹¹. In questo studio abbiamo trovato difficilmente realizzabile la valutazione dei pattern di distribuzione del MDC in fase arteriosa come invece realizzato in un altro lavoro¹¹. I pattern di enhancement erano più facilmente apprezzati in fase portale, senza però riconoscerne alcuni caratteristici univocamente associati a lesioni specifiche. Va considerato che i casi di linfoma inclusi nello studio erano solo 2, derivavano da linfomi multicentrici e si mostravano con lesioni nodulari, mentre è noto che più comunemente il linfoma determina un infiltrato diffuso. I nostri dati non si possono generalizzare per i casi di linfoma che può avere aspetti ecografici estremamente variabili.

I riscontri del comportamento CEUS nei gatti dello studio, sebbene di numero limitato, risultano interessanti alla luce della totale assenza in letteratura di studi sulla caratterizzazione delle lesioni focali epatiche in questa specie. Indipendentemente dalla presentazione a massa o a lesione focale i casi di neoplasia maligna primaria o metastatica hanno mostrato la fase tardiva ipovascolare come atteso dai dati ricavati dall'uomo e dal cane. Sebbene siano da considerare suscettibili di ulteriori conferme e condotti su una casistica piuttosto limitata, quantomeno per quanto riguarda i gatti, i risultati del nostro studio confermano la capacità della CEUS di distinguere tra lesioni benigne e lesioni maligne con una specificità superiore al 90% (91,67%), con 2 falsi positivi su 22 (CN26, GT5). Da questa considerazione, però, non può derivare una minor importanza di ricorrere alle tecniche diagnostiche d'elezione, quale soprattutto la biopsia epatica. Infatti, esiste sempre la necessità di ottenere una diagnosi "morfologica" che permetta di definire una prognosi e, di conseguenza, una terapia: questo vale anche per le alterazioni epatiche che, seppure definibili come benigne, possono essere espressione di una grave malattia del fegato, seppure non neoplastica. Piuttosto la CEUS può essere considerata una utile alternativa per tutte quelle condizioni in cui, per una ridotta compliance da parte del proprietario piuttosto che per un maggiore rischio anestesilogico, possa risultare più difficoltoso ricorrere a tecniche di diagnostica di 2° livello (ad. esempio Tomografia Computerizzata, Risonanza Magnetica) per lo studio di alterazioni focali epatiche. Inoltre, il comportamento delle lesioni focali epatiche.

tiche nei confronti del mezzo di contrasto ecografico può fornire utili indicazioni nella scelta (quando necessaria) di quali lesioni campionare prioritariamente ai fini diagnostici.

In medicina umana, infatti, la metodica CEUS non rappresenta la prima scelta nell'approccio alle lesioni epatiche. Le linee guida¹ riportano la risonanza magnetica come prima scelta seguita dalla tomografia computerizzata (TC) mentre alla CEUS

viene preservato un utilizzo di nicchia, per esempio nei controlli in corso di terapia, oppure in corso di procedure interventistiche o in pazienti con cirrosi epatica accertata per valutare possibili lesioni carcinomatose diverse dai noduli rigenerativi. Anche in medicina veterinaria la TC con contrasto è diventata molto disponibile ed essa rappresenta una metodica più completa per la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche, sebbene essa sia più costosa e da effettuarsi necessariamente in anestesia. La TC è in grado di dare le stesse informazioni di perfusione della CEUS e in più consente una stadiazione completa del paziente, cosa non possibile con la CEUS. D'altra parte, quando le circostanze richiedono l'es-

cuzione di una biopsia, la tecnica ecoguidata si rivela solitamente più facilmente eseguibile rispetto alle tecniche di prelievo TC-guidate.

In conclusione, il nostro lavoro ribadisce la capacità della CEUS nel distinguere tra le lesioni maligne e benigne e perciò riteniamo che questa metodica non invasiva e

La CEUS rappresenta una metodica non invasiva e relativamente poco costosa, utile nell'iter diagnostico delle lesioni focali epatiche nella clinica pratica veterinaria.

relativamente poco costosa, possa rappresentare un utile step nell'iter diagnostico delle lesioni focali epatiche nella clinica pratica veteri-

naria, in particolare quando non è possibile proporre esami più completi quali la TC o quando non è possibile effettuare una biopsia.

Dai dati del nostro studio si rileva l'importanza nell'eseguire un esame ecocontrastografico corretto e standardizzato; in particolare è indispensabile prolungare i tempi di osservazione oltre il picco di enhancement per minimo 2 minuti, e porre notevole attenzione alla fase tardiva per non incorrere in falsi negativi. Non è stato possibile definire in maniera univoca il comportamento CEUS che caratterizza i diversi tipi di neoplasia e per tale scopo sono auspicabili ulteriori studi con casistica più ampia.

PUNTI CHIAVE

- Nonostante la CEUS sia entrata a far parte della pratica clinica veterinaria dei piccoli animali i dati riferibili all'applicazione del mezzo di contrasto contenente esafluoruro di zolfo (SonoVue®) a livello delle lesioni focali epatiche sono pochi nel cane e completamente assenti nel gatto.
- I risultati di questo studio ultracontrastografico qualitativo delle lesioni epatiche con mezzo di contrasto SonoVue® in 34 cani e 6 gatti confermano che la CEUS può risultare utile nel distinguere tra le lesioni maligne e benigne, tuttavia la possibilità di lesioni benigne con comportamento atipico deve essere considerata.
- La principale differenza di comportamento vascolare tra lesioni maligne e benigne è rivelata in fase tardiva con hypoenhancement caratterizzante le lesioni maligne sia nel cane che nel gatto.
- I tempi di osservazione devono essere prolungati per minimo 2 minuti oltre il picco di enhancement al fine di svelare possibili wash out tardivi.
- In 2 gatti affetti da colangiocarcinoma la fase arteriosa è apparsa marcatamente ipervascolare e vivace. Le metastasi da emangiosarcoma mostrano comportamento caratteristico con assenza di enhancement in tutte le fasi.
- La CEUS rappresenta una metodica non invasiva e relativamente poco costosa utile nell'iter diagnostico delle lesioni focali epatiche nella clinica pratica veterinaria.

Characterization of liver focal lesions in dogs and cats by contrast-enhanced ultrasonography

Summary

Introduction and aim of the study: *The detection of parenchymal disorders in the liver is rarely specific for a particular pathology during an ultrasound examination. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) improves the accuracy in the characterization of focal liver lesions. Nevertheless, in veterinary medicine information on liver lesions characterization by CEUS are scant and based on a small number of cases in dogs and totally missing in cats. The aim of this study was to describe the contrast enhancement pattern of focal liver lesions in dogs and cats.*

Materials and Methods: *Initially 34 dogs and 6 cats with lesions in the liver were considered. Each animal underwent a qualitative contrast-enhanced ultrasound using a contrast agent consisting of sulfur hexafluoride and a cyto-histological examination as gold standard for the diagnosis. Sensibility, specificity, positive and negative predictive values and positive and negative likelihood ratios have been determined in order to classify as benign or malignant the hepatic focal lesions examined with Sonovue®.*

Results: *The CEUS examinations showed that the 86.4% of benign lesions had homogeneous enhancement in the portal and late phase compared with surrounding liver parenchyma; all (100%) malignant lesions had hypoenhancement in the late phase, although the portal phase ranged from iso- to hypoechoic in primary and metastatic carcinomas.*

Discussion: *The results of our study confirm the usefulness of CEUS in differentiating benign from malignant lesions. Nevertheless three cases of benign lesions with atypical behavior were registered. The main vascular behavior differences were registered in the late phase showing a hypoenhancement in malignant lesions both in dogs and in cats. In four cases (10%), hypoenhancement was revealed in advanced late phase suggesting that observation need to be prolonged for at least 2 minutes to avoid possible false negatives. Pathognomonic pattern to characterize specific lesions were not recognized. In our experience, Sonovue® performed a high sensibility and specificity to differentiate benign or malignant liver focal lesions. CEUS, a non invasive and relatively cheap technique, could have an important role in the diagnostic plan to characterize hepatic lesions in dogs and cats, particularly when more complete exams (i.e. TC) and/or biopsy are unavailable.*

BIBLIOGRAFIA

- Claudon M, Dietrich CF, Choi BI et al. Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the liver- Update 2012. *Ultrasound in Medicine & Biology* 39:187-210, 2013.
- Isozaki T, Numata K, Takayoshi K et al. Differential diagnosis of hepatic tumors by using contrast enhancement patterns at US. *Radiology* 229:798-805, 2003.
- Quaia E, Calliada F, Bertolotto M et al. Characterization of focal liver lesions with contrast-specific US modes and a sulfurhexafluoride contrast agent: diagnostic performance and confidence. *Radiology* 232:420-430, 2004.
- Szattmáry V, Harkaany Z, Vöaröas K. A review of non-conventional ultrasound techniques and contrast enhanced ultrasonography of non-cardiac canine disorders. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 44: 380-391, 2003.
- Nyman HT, Kristensen AT, Flagstad A et al. A review of the sonographic assessment of tumor metastases in liver and superficial lymphnodes. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 45:438-448, 2004.
- Ohlert S, O'Brien RT. Contrast ultrasound: General principles and veterinary clinical application. *The Veterinary Journal* 174:501-512, 2007.
- Haers H, Saunders JH. Review of clinical characteristics and applications of contrast-enhanced ultrasonography in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234:460-470, 2009.
- O'Brien RT, Matheson J, Delaney F et al. Contrast harmonic ultrasound of spontaneous liver nodules in 32 dogs. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 45:547-553, 2004.
- Ivancic M, Long F, Seiler GS. Contrast harmonic ultrasonography of splenic masses and associated liver nodules in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234:88-94, 2009.
- Volta A, Gnudi G, Manfredi S et al. The use of contrast-enhanced ultrasound with a second-generation contrast medium: preliminary report in the dog. *Veterinary Research Communications* 33:221-223, 2009.
- Kanemoto H, Ohno K, Nakashima K et al. Characterization of canine focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound using a novel contrast agent-Sonazoid. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 50:188-194, 2009.
- Nakamura K, Takagi S, Sasaki N et al. Contrast-enhanced ultrasonography for characterization of canine focal liver lesions. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 51:79-85, 2010.
- Nyman HT, Kristensen AT, Kjelgaard-Hansen M et al. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 3:243-250, 2005.
- Sardanelli F, Di Leo G. *Biostatistica in Radiologia*, Ed. Springer-Verlag Italia, Milano, 2008.
- Winkley W et al. Standards for clinical and histological diagnosis of canine and feline liver diseases, AAVV, Ed. Wsava, 2006.
- Feeney DA, Johnston GR, Hardy RM. Two-dimensional, gray-scale ultrasonography for assessment of hepatic and splenic neoplasia in the dog and cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 184:68-81, 1984.
- Nyland TG. Ultrasonic patterns of canine hepatic lymphosarcoma. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 25:167-172, 1984.
- Lamb CR. Ultrasonography of the liver and biliary tract. *Problems in Veterinary Medicine* 3:555-573, 1991.
- Whiteley MB, Feeney DA, Whiteley LO et al. Ultrasonographic appearance of primary and metastatic canine hepatic tumors: A review of 48 cases. *Journal of Ultrasound in Medicine* 8:621-630, 1989.
- Dietrich CF, Schuessler G, Trojan J et al. Differentiation of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma by contrast-enhanced ultrasound. *The British Journal of Radiology* 78:704-707, 2005.
- Catalano O, Sandomenico F, Raso MM et al. Low mechanical index contrast-enhanced sonographic findings of pyogenic hepatic abscesses. *American Journal of Roentgenology* 182:447-450, 2004.
- Liu GJ, Lu MD, Xie XY et al. Real-time contrast-enhanced ultrasound imaging of infected focal liver lesions. *Journal of Ultrasound Medicine* 27:657-666, 2008.
- Solbiati L, Tonolini M, Cova L et al. The role of contrast enhanced ultrasound in the detection of focal liver lesions. *European Radiology* 11:15-26, 2001.
- Baron Toaldo M, Diana A, Bettini G, Di Donato P et al. Imaging Diagnosis-cholangiocellular adenoma: contrast-enhanced ultrasonographic findings of a benign tumor mimicking malignant neoplasia in a dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 54 (1): 71-74, 2013.
- Jang HJ, Kim TK, Burns PN et al. Enhancement patterns of hepatocellular carcinoma at contrast-enhanced US: comparison with histologic differentiation. *Radiology* 244:898-906, 2007.
- Martegani A et al. Tumori maligni-Metastasi. In: Rossi S, Callida F, Merzaghi A. Ed. Mezzi di contrasto in ecografia, Testo Atlante. Poletto ed. Gaggiano Milano, 2004
- Ackerman NB. Experimental studies on the role of the portal circulation in hepatic tumor vascularity. *Cancer* 58:1653-1657, 1986.
- O'Brien RT. Improved detection of metastatic hepatic hemangiosarcoma nodules with contrast ultrasound in three dogs. *Veterinary Radiology&Ultrasound* 48:146-148, 2007.