



MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI O ECOAMPLIFICATORI

PROPRIETÀ FONDAMENTALI

PROPRIETÀ FISICHE DEI MEZZI DI CONTRASTO

- Capacità di riflessione del sangue
- Riflessione lineare delle microbolle
- Riflessione non lineare
- Potenza acustica e frequenza di risonanza

CLASSIFICAZIONE DEI MEZZI DI CONTRASTO

- Microbolle di gas libero
- Microbolle di CO₂
- Microbolle d'aria incapsulate o stabilizzate
- Microbolle di gas a bassa solubilità
- Agenti selettivi organo-specifici
- Applicazioni potenziali delle microbolle

ACQUISIZIONE DEL SEGNALE DOPO INFUSIONE DI MdC.

TECNICHE DI ACQUISIZIONE CONVENZIONALI

- Enhancement* del segnale Doppler spettrale
- Enhancement* del segnale Color Power Doppler

SEQUENZE ECOGRAFICHE DEDICATE

- Imaging armonico contrastografico
- Imaging contrastografico in seconda armonica con acquisizione in *pulse o phase inversion*
- Stimulated Acoustic Emission (SAE). Flash echo imaging*

TECNICHE DI INIEZIONE

- APPLICAZIONI DEL MDC NEL RENE NATIVO E NEL TRAPIANTO

La commercializzazione dei primi mezzi di contrasto (MdC) per ecografia è stata accompagnata da un grande entusiasmo. Il rinforzo del segnale vascolare offriva all'ecografia la possibilità di studiare la perfusione e caratterizzare i tessuti al pari della TC e della MRI con contrasto. L'entusiasmo si è rapidamente affievolito poiché i dirompenti sviluppi dell'ecografia digitale hanno migliorato la sensibilità del color e del power Doppler e reso inutile l'uso del contrasto nella sua principale indicazione, ossia il rinforzo della frequenza fondamentale. Il risultato finale, anche a causa della bassa resistenza acustica e della breve durata d'azione, è stato il rapido abbandono dei contrasti di prima generazione.

I MdC di seconda generazione, caratterizzati da una maggiore resistenza acustica, sono stati immessi in commercio quando la rivoluzione digitale e le applicazioni dell'*imaging* in seconda armonica erano già completate. Si è compreso, in questa fase, che i MdC andavano sfruttati non per amplificare semplicemente il segnale fondamentale che origina dal sangue circolante, ma per caratterizzare selettivamente il circolo con il segnale in seconda armonica. Questo ha stimolato la ricerca ed ha portato allo sviluppo di tecniche d'analisi della perfusione parenchimale e di algoritmi di acquisizione contrasto-specifici che hanno avvicinato l'eco-contrastografia alla Angio-MRI funzionale ed alle tecniche di medicina nucleare. Allo stato attuale, le prospettive dei MdC sono nuovamente in una fase di stallo, in quanto se in alcuni settori (ad esempio nella diagnostica differenziale delle lesioni focali del fegato) l'ecocon-

trastografia ha trovato un largo impiego, in altri settori specialistici (dalla cardiologia alla nefrologia, dall'endocrinologia alla neurologia) non ha ottenuto risultati esaltanti.

Proprietà fondamentali

I mezzi di contrasto ecografici registrati e disponibili in commercio, così come quelli in fase di studio e di registrazione (MdC di "seconda generazione"), sono accomunati da alcune proprietà fisiche fondamentali.

- Tutti i MdC sono costituiti da microbolle d'aria o da microbolle di gas inerte, insolubile. Tutte le preparazioni di MdC prevedono che le microbolle siano stabilizzate in soluzione da un involucro lipidico o proteico biodegradabile (**Fig. 1**).
- Tutti i MdC, dopo iniezione ev, si diluiscono nel sangue sino a raggiungere una concentrazione massima (principio della diluizione). A partire da questo livello di concentrazione l'*enhancement* generato dalle microbolle riflettenti può essere sfruttato lungo l'intero sistema cardiovascolare: dal ventricolo sinistro alle grosse arterie, dalle arteriole sino alle grandi vene periferiche ed al sistema portale.
- La durata del rinforzo vascolare può variare da 2 a 10 minuti in base alla potenza acustica d'insonazione ed alle caratteristiche del prodotto ed equivale alla durata in circolo di una concentrazione minima di microbolle.

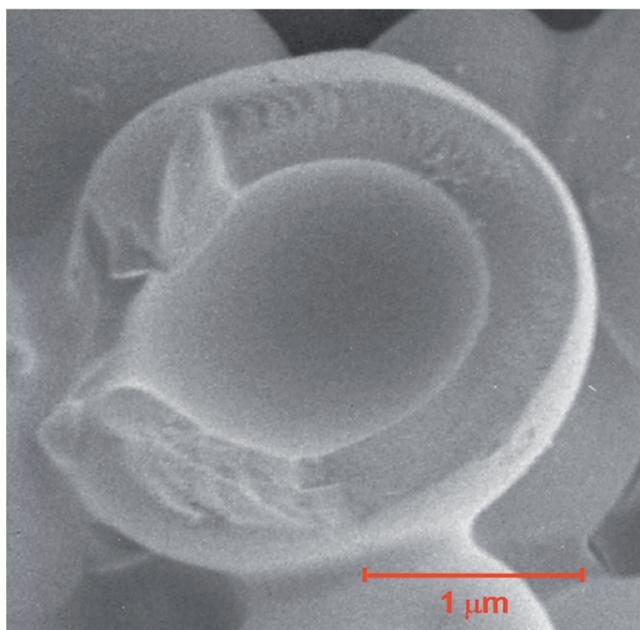


Fig. 1. GUSCIO DI MICROBOLLA. La microfotografia elettronica mostra il "guscio" spesso e rigido di una microbolla d'aria incapsulata con albumina denaturata.

- Le microbolle infuse in soluzione devono avere in media un diametro inferiore alla lunghezza d'onda degli US. Nella maggior parte dei MdC il diametro medio è di 3 μm, sebbene nel *pooling* o *ambiente* circolante delle microbolle siano presenti unità di diametro variabile da 1 a 10 μm (Fig. 2).
- Il diametro di 3 μm è considerato *critico* per le microbolle per due diversi motivi: intanto, perché favorisce la risonanza delle stesse e la liberazione di frequenza armonica con le comuni frequenze operative del B-Mode (3.5 MHz); in secondo luogo, perché questo diametro assicura facilmente il superamento del filtro capillare polmonare e periferico.
- Tutti i MdC ecografici, a differenza dei contrasti io-

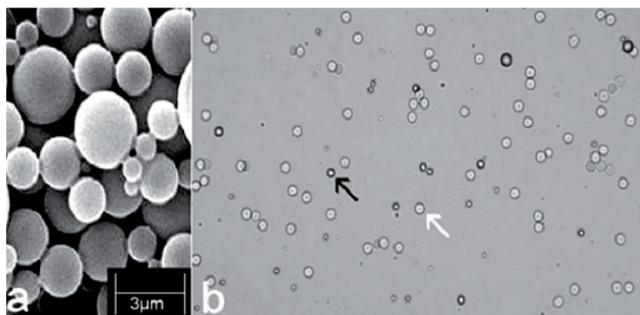


Fig. 2. MICROFOTOGRAFIA DI MICROAGGREGATI DI LEVOVIST®. Le microbolle di Levovist® hanno un diametro variabile da 2 a 8 μm; il 97% delle microbolle ha un diametro < 6 μm. In sospensione le microbolle vengono stabilizzate dal reticolo cristallino del galattosio e circondate da una sottile pellicola molecolare costituita da acido palmitico che abbassa la tensione superficiale del mezzo acquoso.

dati ionici o non ionici e del gadolinio chelato, non diffondono nell'interstizio degli organi e dei tessuti ma restano confinati esclusivamente nel lume vasale sino all'esalazione del gas a livello polmonare.

- Taluni prodotti, in fase di sperimentazione, sono fagocitati dal sistema reticolo-endoteliale del fegato, della milza e dei linfonodi e per questo peculiare comportamento sono considerati organo-specifici e possono essere potenzialmente sfruttati a scopo diagnostico e terapeutico.
- L'efficacia dei MdC si esaurisce dopo alcuni minuti dall'iniezione ev. Il gas contenuto nelle microbolle diffonde nel sangue ed esala negli alveoli polmonari mentre l'involucro esterno biodegradabile, di natura lipidica o proteica, viene rapidamente distrutto nelle vie del metabolismo intermedio.
- Allo stato attuale, salvo rarissime segnalazioni, tutti i MdC ecografici sono risultati atossici e privi di effetti collaterali significativi.

Proprietà fisiche dei mezzi di contrasto

Capacità di riflessione del sangue. Il meccanismo con cui il MdC esalta il segnale che origina dal sangue circolante è l'amplificazione dello *scattering*, cioè degli echi che originano per dispersione semplice dalla componente corpuscolata del sangue. Ricordiamo brevemente che la dispersione semplice di Rayleigh descrive gli effetti dell'interazione fra US e strutture di grandezza <10 μm, che il diametro comune dei globuli rossi è di soli 6-7 μm, mentre la lunghezza d'onda di un fascio di US con frequenza 5 MHz è di 0.3 mm, vale a dire 300 μm. Il MdC amplifica lo *scattering* in quanto aumenta la *superficie* o *capacità di riflessione* del sangue circolante per la contemporanea presenza in sospensione nel plasma degli eritrociti e delle microbolle di gas. La capacità di riflessione del sangue viene definita con la notazione σ_{α_s} , ed è strettamente legata alla concentrazione delle microbolle in sospensione e ad alcune proprietà fisiche fondamentali delle stesse, ossia:

- numero e dimensioni;
- densità e comprimibilità.

La relazione che lega la capacità di riflessione del sangue ai fattori segnalati è la seguente:

$$\sigma_{\alpha_s} = (\pi \cdot r^2) \cdot Q_s \cdot N_s$$

ove: σ_{α_s} , è il coefficiente di riflessione, r , è il raggio della microbolla; N_s , è il numero di microbolle espresso in parti per milione (p.p.m.) e Q_s , un coefficiente nu-

merico strettamente legato alle caratteristiche di densità e comprimibilità delle stesse. In altri termini, dopo infusione in bolo del MdC la capacità di riflessione del sangue è direttamente proporzionale al numero di microbolle presenti in sospensione ed alle loro caratteristiche di densità e comprimibilità, ma dipende anche in modo diretto dal raggio della microbolla che nella relazione interviene con la sua seconda potenza.

L'aria ed i gas inerti sono "i riflettori" che meglio rispondono ai requisiti di densità e comprimibilità necessari per ottenere un'ottima amplificazione dello *scattering* in quanto il coefficiente di ampiezza e di intensità di riflessione dell'interfaccia aria-sangue è molto elevato e prossimo all'unità (rispettivamente 0.99 e 0.98). Questo significa che l'energia degli US che colpisce le microbolle d'aria circolanti viene quasi completamente riflessa. Peraltro, il numero di microbolle necessario per migliorare la capacità riflettente del sangue ed ottenere un effetto di amplificazione è molto contenuto (circa 1.3 p.p.m.). Le particelle di diametro $<3 \mu\text{m}$ hanno un coefficiente Q_s di circa 200: questo significa che per ottenere una significativa differenza di contrasto fra tessuti stazionari e sangue circolante sono necessari solo 1830 microbolle/ml di sangue.

Riflessione lineare delle microbolle. La chiave per comprendere il meccanismo d'azione dei MdC ecografici e le possibili applicazioni cliniche è la comprensione dei fenomeni di interazione che si verificano fra *pooling* ematico delle microbolle e fascio US incidente. In linea di principio, quando le microbolle sono investite dagli US entrano in vibrazione, cioè si contraggono e si espandono sino ad implodere. Nella realtà, il comportamento delle microbolle del *pool* ematico varia in base al loro diametro ed all'ampiezza acustica (o indice meccanico) del fascio incidente. Quando le microbolle vengono investite da US a basso indice meccanico ($<100 \text{ KPa}$ o $\text{MI} < 0.1$) vengono sottoposte ad una pressione acustica positiva (compressione) e negativa (dilatazione) di basso grado. In queste condizioni, le microbolle si comportano *in modo lineare* come semplici riflettori, oscillano in modo simmetrico (Fig. 3) senza implodere, per cui riflettono prevalentemente la frequenza fondamentale. Questo comportamento fisico dà origine ad un fenomeno di *riflessione lineare* che si traduce in un rinforzo diffuso, più o meno significativo, dello *scattering* che origina dal sangue circolante (Fig. 4).

Riflessione non lineare delle microbolle. L'oscillazione delle microbolle aumenta di pari passo con la potenza acustica del fascio incidente. Infatti, a mano a mano che l'intensità acustica aumenta da 100 KPa a 1

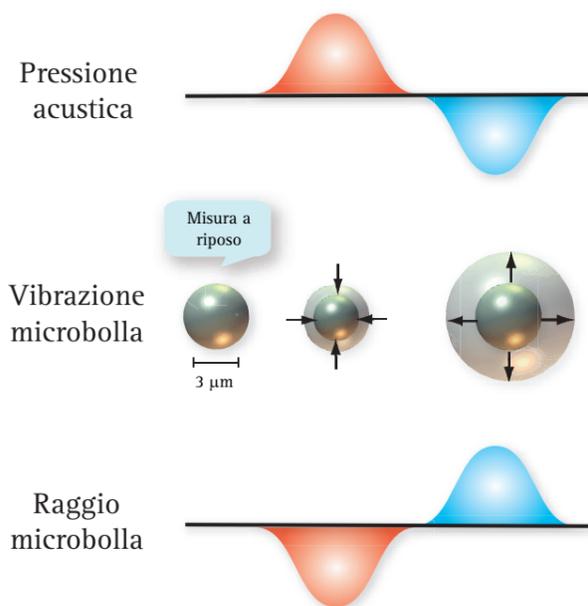


Fig. 3. RISONANZA SIMMETRICA DELLE MICROBOLLE E RIFLESSIONE LINEARE. Quando le microbolle sono investite da un fascio di US con basso indice meccanico si comportano in modo lineare, riflettendo prevalentemente la frequenza fondamentale.

MPa (MI fra 0.1 e 1) l'oscillazione diventa non solo più intensa, ma anche asimmetrica poiché la fase positiva o di compressione della microbolla diventa molto più rapida rispetto alla fase di decompressione o dilatazione. A questo punto la distorsione del fenomeno oscillatorio muta il *comportamento fisico delle microbolle che diventa non lineare* (Fig. 5).

Cosa significa comportamento non lineare? Il movimento oscillatorio delle microbolle in risonanza si accompagna ad accumulo di energia meccanica in fase di compressione e liberazione di energia in fase di decompressione. La distorsione del fenomeno oscillatorio fa sì che in fase di decompressione della microbolla venga riflessa e liberata non solo energia acustica con frequenza sovrapponibile a quella fondamentale (f_0), ma anche frequenze armoniche o subarmoniche, ossia frequenze multiple ($2f_0$, $3f_0$) e sottomultiple ($0.5 f_0$) (Fig. 6). Il comportamento non lineare delle microbolle in risonanza si verifica in modo non dissimile nei tessuti stazionari ove viene sfruttato con il *Tissue Harmonic Imaging*. Lo stesso fenomeno di distorsione si realizza pizzicando una corda di chitarra con una certa forza o suonando con maggior forza una nota di pianoforte: la nota emessa avrà un timbro forte e conterrà, accanto alla frequenza della nota fondamentale, anche quella dei sovratoni della nota (*sovratono* è il termine musicale usato per definire la presenza di frequenze corrispondenti all'ottava superiore). Il vantaggio fondamen-

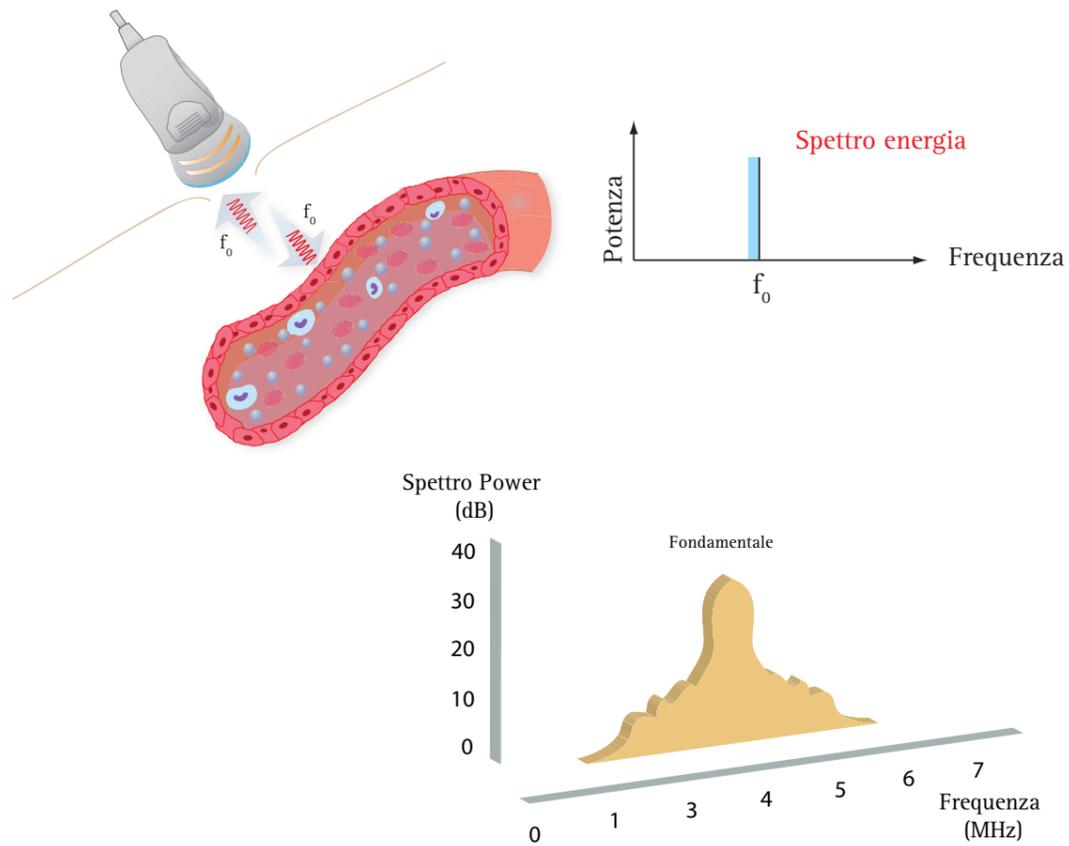


Fig. 4. RIFLESSIONE LINEARE E RISONANZA DELLE MICROBOLLE A BASSO INDICE MECCANICO. Quando le microbolle si comportano in modo lineare riflettono prevalentemente la frequenza fondamentale. Questo comportamento fisico dà origine ad un fenomeno di riflessione lineare che si traduce in un rinforzo diffuso, più o meno significativo, dello *scattering* che origina dal sangue circolante. La frequenza riflessa dalle microbolle è prevalentemente la frequenza fondamentale.

tale offerto dai MdC è che la quota di segnale in seconda armonica che viene generato dalle microbolle è di gran lunga superiore a quella generata dai tessuti stazionari. Per questo motivo l'imaging in seconda armonica è la modalità più indicata per sfruttare le proprietà intrinseche dei MdC.

Potenza acustica e frequenza di risonanza. Il comportamento non lineare delle microbolle e la liberazione di energia acustica in seconda armonica è tanto maggiore quanto più la frequenza del fascio incidente si avvicina alla *frequenza di risonanza* o *frequenza di oscillazione naturale* della microbolla e quanto più elevata è la potenza acustica del fascio incidente (Tabella 1). Assumendo che una microbolla di 3 μm di diametro libera in soluzione acquosa abbia un comportamento lineare, è possibile calcolare teoricamente la *frequenza di risonanza* e le variazioni discontinue del raggio in funzione della frequenza di insonazione. Come mostrato nella (Fig. 7) la frequenza centrale di risonanza di una microbolla di questo diametro corrisponde alla frequen-

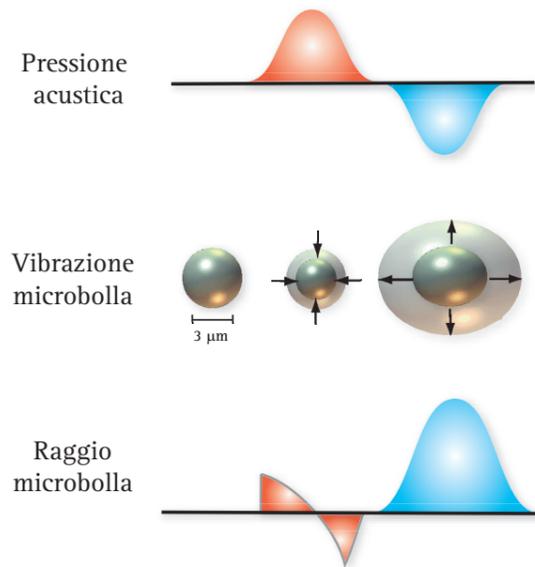


Fig. 5. RIFLESSIONE NON LINEARE. Se la potenza acustica degli US aumenta, la vibrazione delle microbolle tende a diventare asimmetrica: la fase di compressione diventa più rapida rispetto alla fase di decompressione. Questo comportamento fisico *non lineare* si accompagna alla liberazione di frequenze armoniche.

Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

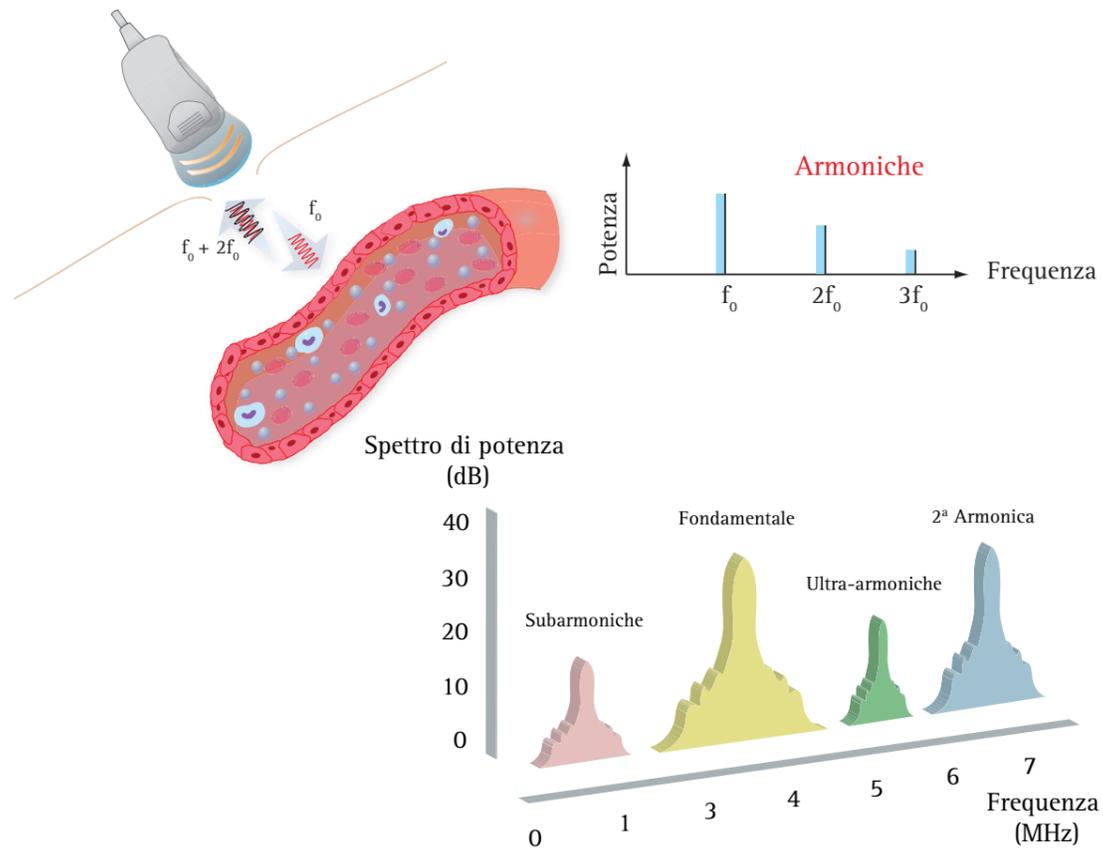


Fig. 6. RIFLESSIONE NON LINEARE E RISONANZA DELLE MICROBOLLE A BASSO INDICE MECCANICO. La distorsione del fenomeno oscillatorio si manifesta a mano a mano che aumenta la potenza acustica del fascio incidente. In queste condizioni, durante la fase di decompressione della microbolla l'energia incidente viene ridistribuita in una frequenza sovrapponibile a quella del fascio incidente (f_0), ed in una serie di frequenze armoniche ($2f_0$, $3f_0$) e subarmoniche ($0.5 f_0$) a bassa potenza acustica. La propagazione non lineare degli US interessa in modo non dissimile anche i tessuti stazionari ed è alla base del *Tissue Harmonic Imaging*.

PICCO PRESSIONE	INDICE MECCANICO (MI A 1 MHz)	COMPORAMENTO MICROBOLLE	COMPORAMENTO ACUSTICO	APPLICAZIONI
< 100 KPa	< 0.1	Oscillazione lineare	Rinforzo lineare della frequenza fondamentale	Rinforzo segnale Doppler
0.1 >> 0.5 KPa	0.1 >> 0.5	Oscillazione non lineare	Rinforzo e generazione di frequenze armoniche	Imaging perfusionale in real time (a basso MI)
> 0.5 KPa	> 0.5	Rottura ed implosione	Transient Acoustic Emission	Imaging perfusionale intermittente (ad alto MI)

Tabella. 1. COMPORAMENTO FISICO DELLE MICROBOLLE IN UN CAMPO ACUSTICO.

za di circa 3 MHz, ossia alla frequenza che viene usata comunemente per lo studio degli organi addominali. Questa straordinaria e fortunata coincidenza spiega perché i MdC ecografici possano essere somministrati in piccole quantità e siano così efficaci.

Il comportamento non lineare delle microbolle è strettamente correlato anche con l'energia acustica del fascio

incidente che, come abbiamo ricordato nel paragrafo dedicato agli effetti biologici degli US, viene misurato con un parametro detto *indice meccanico*. L'indice meccanico di un fascio US è definito dal picco di pressione negativa degli US e si calcola dividendo il valore di picco di pressione negativa per la radice quadrata della frequenza incidente, ossia $MI = P_{neg}/\sqrt{f_0}$. L'indice meccanico riflette la poten-

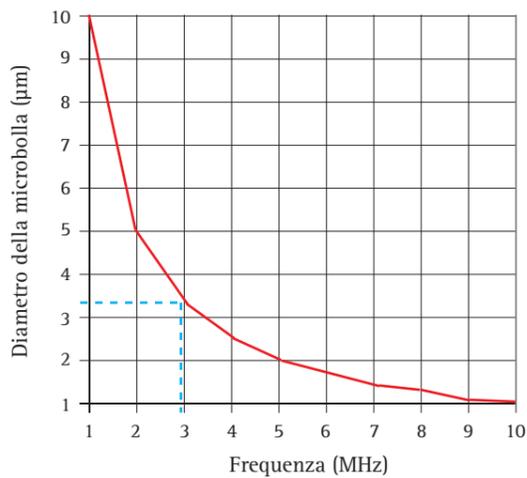


Fig. 7. DIAMETRO CRITICO E FREQUENZA DI RISONANZA DELLE MICROBOLLE IN UN CAMPO ACUSTICO. Il grafico mostra come la frequenza di risonanza o frequenza naturale di oscillazione delle microbolle d'aria in un campo sonoro dipenda strettamente dalle dimensioni o raggio delle microbolle. Per un diametro critico $<3.5 \mu\text{m}$, la frequenza di risonanza è pari a circa a 3 MHz. Queste dimensioni sono particolarmente utili per superare il filtro capillare polmonare e periferico.

za acustica a cui sono esposti i riflettori e le microbolle d'aria presenti nel campo acustico e viene misurato per convenzione nella zona focale del fascio US. Il valore numerico dell'indice meccanico tende a decrescere nelle zone più lontane e laterali del campo sonoro in funzione dell'attenuazione e della naturale divergenza del fascio. L'indice meccanico varia nei sistemi ecografici delle varie aziende costruttrici e deve essere obbligatoriamente indicato sul monitor insieme al valore dell'indice termico. Picchi di pressione negativa molto elevati possono generare fenomeni di cavitazione, vale a dire di formazione e confluenza di microbolle tessutali là dove queste non esistevano. Questi fenomeni si verificano tanto più facilmente quanto più prolungato ed ampio è il picco di pressione negativa. La risposta delle microbolle al fascio US è direttamente legata al picco di pressione negativa (**Fig. 8a, b, c**).

Quando il diametro della microbolla rientra nelle dimensioni critiche e l'ampiezza degli US si avvicina alla frequenza naturale di oscillazione o frequenza di risonanza, la microbolla si rompe ed il contenuto di aria o gas inerte viene liberato nel sangue ed esalato negli alveoli polmonari. Nel diagramma in (**Fig. 9**) sono schematizzati i comportamenti fisici delle microbolle in un campo acustico in funzione della potenza del fascio incidente. Tuttavia, bisogna considerare che nell'ambito delle microbolle esiste una variabilità di diametro per cui il pool di microbolle in sospensione può rispondere in modo diverso in base alle dimensioni, al contenuto di gas ed alla distribuzione spaziale nel campo acustico. Nello stesso modo, anche la pressione acustica del fascio incidente va-

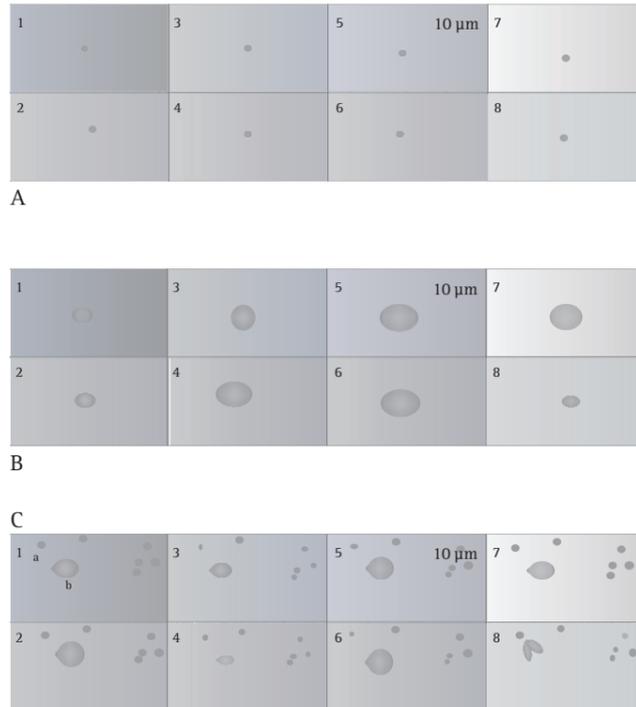


Fig. 8a, b, c. VARIAZIONI DEL DIAMETRO DELLE MICROBOLLE CON PRESSIONE ACUSTICA DI 12 KPA (A), 24 KPA (B) E 60 KPA (C). Immagine microscopica del MdC immerso in un campo acustico. Le variazioni di diametro sono state registrate con una telecamera ad altissima frequenza. (Thomas JE et al. University of California, Biomedical Engineering Division, Davis CA, USA; Proc. IEEE, Ultrasonics Symposium, 1999).

ria in base alla profondità di campo, alla distanza dalla zona focale ed all'asse di propagazione degli US. In altri termini, l'eterogeneità dei parametri può giustificare una risposta estremamente variabile del contrasto. Se le microbolle sono investite da US a bassa potenza generano un rinforzo dello scattering per riflessione lineare, se sono investite da una potenza acustica leggermente più elevata generano un rinforzo del segnale fondamentale ed energia armonica per riflessione non lineare. In ultimo, se le bolle vengono investite da US ad alta potenza generano uno scattering transitorio ad alta potenza. Per questo è molto difficile predire la risposta dell'intero pool ematico di microbolle e spesso il comportamento teorico atteso, cioè l'emissione di frequenze armoniche e subarmoniche ben separate le une dalle altre, è ben lontano dal comportamento reale che porta alla sovrapposizione del segnale di varia frequenza (**Fig. 10**). Una stessa microbolla che si muove nel campo sonoro può peraltro attraversare punti dove viene sottoposta a diverse pressioni acustiche. Quando la microbolla è nella zona focale viene esposta al massimo picco di pressione negativa, mentre quando è in periferia viene esposta ad un campo acustico molto più debole. In sintesi, in uno stesso momento e con la stessa potenza acustica il comportamento delle



Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

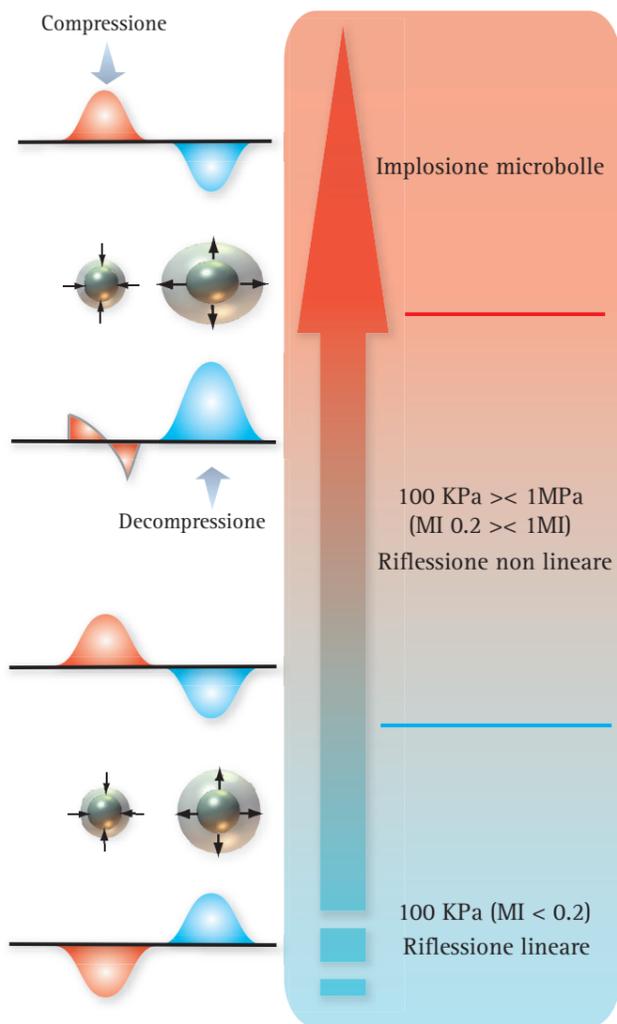


Fig. 9. RISONANZA DELLE MICROBOLLE E PRESSIONE ACUSTICA. Il comportamento delle microbolle varia in relazione alla pressione acustica con cui vengono insonate. Quando l'energia pressoria che investe le microbolle è inferiore a 100 KPa le microbolle si comportano in modo lineare come semplici riflettori degli US. A mano a mano che l'intensità acustica aumenta da 100 KPa a 1 MPa (MI 0.2-1) il loro comportamento non è più lineare. Le microbolle entrano in risonanza ed il periodo dell'oscillazione subisce una distorsione per cui la fase di compressione diventa più rapida rispetto alla fase di decompressione. Questo comportamento delle microbolle è definito riflessione non lineare ed in fase di rilassamento genera segnale acustico in seconda armonica. Quando le microbolle vengono sottoposte a valori di pressione acustica >1 MPa implodono generando un segnale acustico di alta intensità e ricco di frequenze armoniche (Emissione Acustica Stimolata o *Stimulated Acoustic Emission - SAE*). In ogni caso, la risonanza delle microbolle è tanto più efficace quanto più la frequenza del fascio incidente si avvicina alla frequenza naturale di risonanza.

microbolle può essere estremamente variabile e generare un rinforzo del segnale vascolare con meccanismi diversi. Per ricordare il fenomeno della risonanza e l'implosione delle microbolle citiamo un aneddoto molto simpatico sul tenore Enrico Caruso. Si racconta, infatti, che il tenore fosse in grado di frantumare un calice di cristallo di

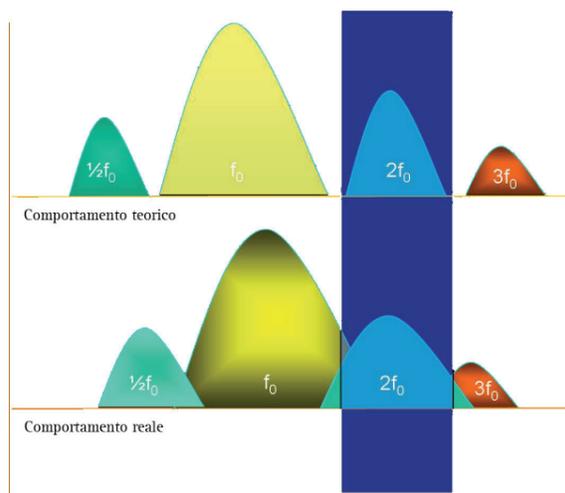


Fig. 10. RISPOSTA DEL POOL EMATICO DI MICROBOLLE ALLA INSONAZIONE. La risposta del *pool* ematico di microbolle è eterogenea e spesso il comportamento teorico atteso, cioè l'emissione di frequenze armoniche e subarmoniche ben separate le une dalle altre, è ben lontano dal comportamento reale che porta alla sovrapposizione del segnale di varia frequenza.

Boemia cantando a piena voce il do di petto. La performance del grande tenore non era che un'espressione del fenomeno di risonanza naturale di un mezzo elastico: le onde sonore agivano sul cristallo come un'oscillazione forzata. Se per una fortunata coincidenza la frequenza applicata (do di petto) corrispondeva alla frequenza di risonanza naturale del cristallo, l'oscillazione risultante poteva avere un'ampiezza abbastanza grande da superare il limite massimo del modulo elastico del cristallo e mandare il calice in frantumi.

Classificazione dei mezzi di contrasto

In questo momento sono disponibili, in fase di studio o di registrazione, circa 20 prodotti diversi. Le *caratteristiche* che contraddistinguono i singoli prodotti l'uno dall'altro sono il tipo di interazione fra US e microbolle (tipo di gas, rigidità della capsula, diametro medio e distribuzione del diametro nel *pool* di microbolle), il grado di potenza acustica necessario per ottenere la liberazione di energia armonica, la capacità di attraversare il filtro capillare polmonare e periferico e la specificità d'organo. I mezzi di contrasto possono essere classificati in base al *tipo di gas* contenuto nelle microbolle (aria, perfluorocarburo, esafluoruro di zolfo, dodecafluoropentano, perfluoroesano, perfluoropropano), al *tipo di capsula* (rigida o leggera) ed alla *natura chimica della capsula* (surfactante, lipidi, albumina so-



nicata) (Tabella 2). La qualità di un mezzo di contrasto è strettamente correlata alle caratteristiche della capsula ed alla stabilità delle microbolle, alla diffusibilità ed alla solubilità del gas, alla grandezza ed alla concentrazione delle particelle. La *maneggevolezza* dipende dalle modalità di preparazione, dalla stabilità e dalla possibilità di stoccaggio. La *tolleranza* dipende dalla dose necessaria, dagli eccipienti e dagli effetti collaterali. Il *costo* è strettamente legato al numero di dosi necessarie per eseguire un esame ed infine, il *beneficio* è strettamente legato ai risultati diagnostici per il paziente.

Microbolle di gas libero. La prima esperienza di rinforzo del segnale ecografico è stata segnalata durante un cateterismo cardiaco nel 1967 da Gramiak e Shah. Dopo aver iniettato nella cavità ventricolare del verde di indocianina per calcolare la frazione di eiezione del ventricolo sinistro, mentre eseguivano un'ecografia TM-Mode notarono un marcato rinforzo del segnale ecografico. In seguito, il fenomeno è stato segnalato anche con uso di soluzione fisiologica, soluzione glucosata al 5% o *soluzioni acquose sonicate*, cioè soluzioni arricchite di microbolle di aria per agitazione della soluzione. In tutti questi casi il rinforzo deriva dalla riflessione degli US sulle microbolle d'aria (interfaccia aria/liquido) che si genera per fenomeni di cavitazione durante la preparazione, l'agitazione e l'iniezione della soluzione. Il rinforzo da soluzione sonicata è evidente, ad esempio, durante il riempimento forzato della vescica in pazienti con catetere di Foley a dimora ed in cui è necessario uno stu-

dio ecografico della parete vescicale. L'introduzione forzata di soluzione fisiologica in vescica si accompagna ad un forte rinforzo del segnale del lume vescicale per riflessione degli US sulle microbolle d'aria in soluzione, formatesi per cavitazione nel corso dell'infusione. Oltre al rinforzo del segnale ecografico, le soluzioni acquose sonicate possono rinforzare anche il segnale Doppler, ma hanno due inconvenienti fondamentali dovuti alla difformità delle dimensioni delle microbolle: il primo è l'aggregazione con possibile formazione di emboli gassosi in circolo, il secondo è l'incapacità delle microbolle di superare agevolmente il filtro polmonare.

Microbolle di CO₂. Le microbolle di CO₂ libere, introdotte per via arteriosa durante un cateterismo selettivo, sono state utilizzate come contrasto ecografico per lo studio delle lesioni focali del fegato. La CO₂ è un gas caratterizzato da un alto coefficiente di perfusione alveolare. Ha un'elevata solubilità plasmatica ed una viscosità 400 volte minore rispetto ai contrasti iodati. L'iniezione arteriosa di CO₂ è stata praticata durante il cateterismo selettivo dell'arteria epatica eseguito per chemioembolizzazione di lesioni focali primarie. L'esame ecografico eseguito subito dopo l'infusione di CO₂ consente di osservare l'arrivo e la fissazione del contrasto nella lesione tumorale che diventa intensamente iperecogena. Questa tecnica si è rivelata utile al radiologo interventista per controllare gli effetti della chemioembolizzazione ed evitare, in alcuni casi, l'esecuzione della TC con lipiodol.

AZIENDA FARMACEUTICA	NOME COMMERCIALE	GUSCIO/GAS	STATO
Alliance	Imagent®	Surfactante perfluoroesano-aria	Approvato USA
Bracco	Sono Vue®	Fosfolipidi Esafluoruro di zolfo	Approvato UE, USA
Bristol Myers-Squibb	Definity®	Liposomi Perfluoropropano	Approvato USA, Canada
Mallinckrodt/Nycomed- Amersham	Optison®	Albumina sonicata Octafluoropropano	Approvato Ue, USA, Canada
Mallinckrodt/Nycomed- Amersham	Albunex®	Albumina umana denaturata /Aria	Approvato Ue, USA, Canada
Nycomed-Amersham	Sonazoid®	Lipidi Perfluorocarbonio	Sviluppo clinico
Schering	Echovist®	Matrice galattosio Aria	Approvato Ue, Canada
Schering	Levovist®	Lipidi Aria	Approvato UE, Canada, Giappone
Schering	Sonavist®	Polimeri biodegradabili Aria	Sviluppo sospeso
Sonus Pharmaceuticals	EchoGen®	Lipidi Perfluoropentano	Approvato USA, UE

Tabella. 2. MEZZI DI CONTRASTO PER ECOGRAFIA.



Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

Microbolle d'aria incapsulate o stabilizzate. Le bolle di gas stabilizzate sono un'evoluzione delle bolle di gas libero. In questo caso le microbolle sono mescolate ad una sostanza solubile (galattosio, albumina umana denaturata) e stabilizzate da un guscio lipidico (acido palmitico) o da un involucro di proteine denaturate insolubili (frazioni di albumina insolubile). In questi MdC le microbolle sono più piccole di quelle di gas libero. L'*Echovist*[®] ed il *Levovist*[®] (Schering AG, Berlino, Germania) e l'*Albunex*[®] (Mallinckrodt Medical Inc. St Louis, USA) sono un esempio di questo tipo di contrasti. Il *Levovist*[®] è stato il primo contrasto a base di microbolle d'aria ad essere registrato ed introdotto in commercio in Europa, Stati Uniti, Canada e Giappone. *Levovist*[®] si presenta come una polvere cristallina bianca, costituita per il 99% da particelle di galattosio aggregate fra loro e per lo 0.1% da acido palmitico (Fig. 11). Prima dell'iniezione in vena il preparato viene diluito con acqua sterile in quantità variabili sino ad ottenere la diluizione desiderata. La soluzione viene quindi agitata dolcemente per qualche secondo in modo che i granuli di galattosio si disaggregano e costituiscono microaggregati cristallini. L'aggregato cristallino fornisce alle microbolle in soluzione dei punti di aderenza in forma di nicchie di 3-4 μm . L'acido palmitico forma un sottile strato avvolgente intorno ai microaggregati cristallini ed impedisce il rapido dissolvimento e l'escape dell'aria. La grandezza e la conformazione sterica dei microaggregati cristallini sono decisive per l'incarceramento e per il numero e la grandezza delle microbolle d'aria. Il volume totale di gas per grammo di *Levovist*[®] è di 100 μl , mentre la dimensione media delle microbolle è di 2 μm (circa 6 μm entro il 97° percentile) ed il numero totale di microbolle è di circa $10^{10}/\text{ml}$. Le microbolle sono molto riflettenti e sufficientemente stabili per il transito attraverso il filtro capillare polmonare.

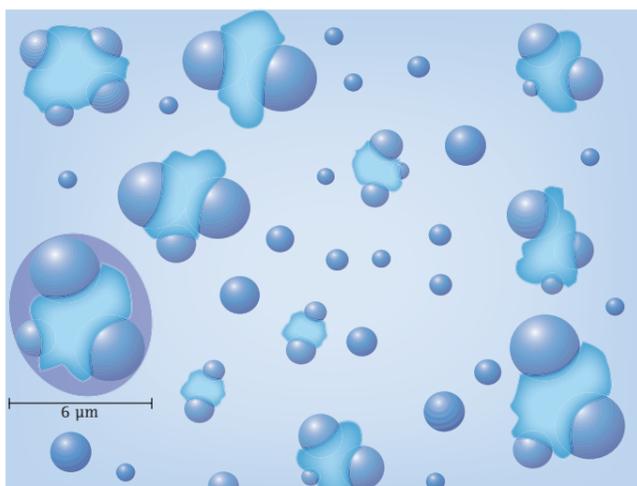


Fig. 11. SOSPENSIONE DI LEVOVIST[®]. Aggregato cristallino e microbolle.

Numerosi studi hanno dimostrato che il comportamento meccanico di *Levovist*[®] è diverso in base alla potenza acustica con cui vengono insonate le microbolle (Fig. 12). Con indice meccanico basso ($MI < 0.4$) il diametro delle microbolle varia in modo sincrono con il fascio degli ultrasuoni, senza deformarsi. Per questi livelli di potenza acustica, l'*enhancement* deriva solo dalla riflessione lineare della frequenza fondamentale ed è ben evidente sia in modalità Doppler spettrale sia in modalità color e power Doppler. A potenza acustica intermedia (MI fra 0.4 e 1.0), le microbolle aumentano di diametro in modo asincrono con il fascio di US e la risonanza porta all'emissione di frequenze armoniche. Per questi livelli di potenza acustica, l'*enhancement* diventa ben registrabile con l'*imaging* in seconda armonica ed in *pulse inversion*. Con potenze acustiche elevate ($MI > 1.0$), la distruzione delle microbolle è massima e determina la liberazione di un intenso segnale acustico transitorio con alto contenuto in armoniche. Pertanto, il *Levovist*[®] è in grado di amplificare il segnale color Doppler, il segnale spettrale così come l'*imaging* B-Mode in scala di grigio in *pulse inversion*.

Microbolle di gas a bassa solubilità. La capsula che stabilizza le microbolle è molto sottile e consente al gas di diffondere rapidamente in soluzione nel sangue. La rapidità con cui si realizza quest'evento dipende in parte dalle caratteristiche del MdC, ma varia da paziente a paziente. Comunque, dopo iniezione ev in bolo l'effettiva durata del rinforzo è di pochi minuti (3-5 minuti),

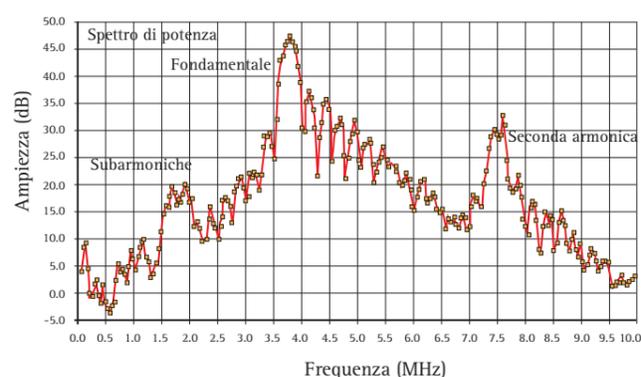
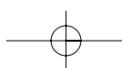


Fig. 12. EMISSIONE ARMONICA DEL LEVOVIST[®]. Il diagramma riproduce lo spettro del segnale eco che origina da un campione di contrasto insonato con una frequenza di 3.5 MHz (ricreato e modificato da Becher H, Burns PN. Handbook of contrast echocardiography, Berlin, Springer, 2000). Il picco di maggior intensità interessa la frequenza di 3.5 MHz. Nello spettro è chiaramente evidente un secondo picco (spettro delle armoniche) a circa 7.5 MHz, così come un picco nello spettro delle subarmoniche a 1.875 MHz. Il segnale eco in seconda armonica ha un'ampiezza di soli 13 dB inferiore a quello della frequenza fondamentale. L'*imaging* in seconda armonica deve isolare, senza sovrapposizione, la frequenza fondamentale dalla frequenza in seconda armonica.



in quanto il massimo effetto si manifesta al primo passaggio. I contrasti più recenti, detti di seconda generazione, sono caratterizzati da una maggiore stabilità e durata d'azione, da una minore solubilità dei gas contenuti nelle microbolle e da una maggiore resistenza dell'involucro lipidico all'insonazione. Tutte queste caratteristiche migliorano la durata e l'efficacia del contrasto, sebbene esistano delle differenze rilevanti fra i singoli prodotti disponibili in commercio. **Optison®** (Malinkrodt/Nycomed-Amersham, Oslo, Norway), ad esempio, è costituito da microbolle di perfluoropropano incarcerate in un involucro d'albumina denaturata ed insolubile, simile all'Albunex®. Questo contrasto reagisce all'insonazione in un modo completamente diverso rispetto al Levovist® e libera un segnale armonico molto intenso con impulsi di bassa potenza. **EchoGen®** (Sonus Pharmaceuticals, Bothell, USA) contiene anch'esso un gas perfluorato, il perfluoropentano, che in soluzione acquosa ha la caratteristica di diventare gas solo quando si riscalda a temperatura corporea.

Sonovue® (Bracco SpA, Milano, Italia), **Definity®** (Bristol/Myers-Squibb, Inc, Boston USA) ed **Imagent®** (Alliance, San Diego, USA) sono invece esempi di un'importante famiglia di contrasti in cui l'involucro è costituito da fosfolipidi ed il gas è rispettivamente l'esafuoruro di zolfo nel primo caso ed il perfluoropropano negli altri due. I MdC contenenti gas perfluorati ad elevato peso molecolare (perfluorocarburi come il perfluoropropano ed il perfluoropentano) e l'esafuoruro di zolfo hanno il vantaggio di migliorare il rinforzo vascolare rispetto alle microbolle d'aria sia per la minore solubilità del gas nell'acqua e nel plasma, sia per la maggiore durata in circolo (circa 10 minuti dopo l'iniezione in bolo). In **Tabella 3**

vengono riportate le caratteristiche e le principali applicazioni cliniche dei MdC disponibili in commercio.

Agenti selettivi organo-specifici. Fra i nuovi MdC in fase di studio particolarmente interessanti appaiono le caratteristiche di **Sonavist®** (Schering AG, Berlino, Germania), un polimero biodegradabile che stabilizza le microbolle d'aria di diametro fra 1-2 µm con un involucro stabile. L'involucro delle microbolle è costituito da polibutil-2-cianoacrilato, un polimero da lungo tempo usato in chirurgia come adesivo tessutale e che forma una pellicola di circa 100 nm di spessore intorno alle microbolle. La stabilità del polimero consente la fagocitosi delle particelle da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale del fegato e conserva intatte le caratteristiche d'elasticità della microbolla che può vibrare più a lungo e con ampiezza elevata quando è investita da un fascio di US. L'elevata stabilità delle microbolle consente una lunga persistenza del contrasto in circolo e la cattura delle microbolle da parte del sistema reticolo-endoteliale del fegato, della milza e dei linfonodi. Per questo, **Sonavist®** può essere considerato un *contrasto organo specifico*.

Sonavist® consente teoricamente due diverse fasi diagnostiche: una prima fase iniziale legata alla diffusione delle microbolle nel sangue (*blood-pooling*) ed una seconda legata alla captazione delle microbolle da parte del sistema reticolo-endoteliale. I tumori primitivi del fegato o le metastasi epatiche prive di cellule del sistema reticolo-endoteliale possono essere differenziati dal tessuto epatico normale ricco di cellule reticolari. Il fegato normale mostra un caratteristico rinforzo del segnale ed appare iperecogeno in B-Mode, mentre al campionamento color Doppler mostra un forte segnale policromatico esteso a

MdC	Ø MICROBOLLE (µm)	STABILITÀ (MINUTI)	SUPERAMENTO FILTRO POLMONARE	APPLICAZIONI CLINICHE
Albunex®	3-8	<1	si	Margini endocardio
Echovist®	2	<1	no	Cavità cardiache di destra Shunt cardiaci
Levovist®	2	<5	si	Imaging cuore, fegato, rene
EchoGen®	2-5	<5	si	Imaging cuore
Optison®	2-4,5	<5	si	Contrastografia cavità cardiache e definizione margini ventricolo sinistro
Sono Vue®	2.5	<5	si	Contrastografia cavità cardiache e margini del ventricolo sinistro. Contrastografia vasi cerebrali, carotide, arterie periferiche. Vascularizzazione mammella, fegato, rene
Definity®	1.1-3.3	<10	si	Contrastografia cavità cardiache e definizione margini ventricolo sinistro. Prostata

Tabella 3. CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PRINCIPALI MdC DISPONIBILI IN COMMERCIO.



Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

tutto il parenchima, ma assente nelle lesioni focali tumorali prive di cellule reticolari. Il tumore appare anecogeno in B-Mode e privo di rinforzo al color Doppler.

Applicazioni potenziali delle microbolle. Al di là del rinforzo del segnale endovascolare, diversi lavori sperimentali hanno segnalato molte altre potenziali applicazioni delle microbolle. Di particolare interesse, ad esempio, è il sinergismo fra US e MdC a scopo terapeutico. E' stata segnalata la possibilità di distruggere coaguli (Siegel R, Carter R, 1996), tumori (Simon R et al. 1993), calcoli renali e della cistifellea (Brink K et al. 1990) veicolando farmaci rilasciati "in loco" con la rottura delle microbolle. E' stata segnalata anche la possibilità di veicolare farmaci citostatici (Vreger R, 1992) o materiale genetico (Wertchies et al 1994) per la transfezione genica, nonché la possibilità di marcare le microbolle con anticorpi monoclonali in grado di riconoscere epitopi sito-specifici presenti sulla superficie cellulare di strutture normali o patologiche. La possibilità di veicolare materiale genico, anticorpi monoclonali e farmaci apre una strada potenzialmente utile sia per la diagnosi, sia per la terapia organo-specifica.

Acquisizione del segnale dopo infusione di MdC.

Dopo infusione ev, i MdC rinforzano il segnale di *scattering* vascolare di circa 25-30 dB. Questo rinforzo, legato alla riflessione lineare, è dose dipendente e ben documentabile con il Doppler spettrale ed il color power Doppler. In realtà, l'interazione fra US e MdC nel *pool* ematico è molto più complessa in quanto le microbolle modificano il segnale che origina dal sangue circolante in base alla potenza acustica del fascio incidente, per cui il rinforzo dello *scattering* è solo una di queste azioni.

TECNICHE DI ACQUISIZIONE CONVENZIONALI

Enhancement del segnale Doppler spettrale. Nell'analisi spettrale, il rinforzo da MdC si traduce in un aumento dell'intensità (brillanza) dei vari segmenti della curva velocità/tempo. Il rinforzo può superare il *dynamic range* dell'apparecchiatura e generare artefattualità con comparsa di *clutter* e *wall thump artifact* da rinforzo del segnale Doppler. Questi artefatti possono essere limitati riducendo il guadagno totale del Doppler spettrale.

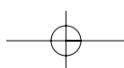
Enhancement del segnale Color Power Doppler. In modalità color Doppler, il rinforzo dello *scattering* da

un lato migliora il disegno dei piccoli vasi e dei vasi con bassa intensità di segnale (vasi profondi, vasi con flusso lento), dall'altro genera artefattualità. Nelle normali applicazioni, la regolazione delle funzioni Doppler è un compromesso fra sensibilità, risoluzione e *frame rate* e comporta aggiustamenti continui della PRF, del filtro di parete, del guadagno totale, della densità di linea, della profondità di campo, della persistenza dell'immagine e del *dynamic range*. Il rinforzo del segnale endovascolare rende, spesso, inappropriate queste impostazioni e richiede rapidi aggiustamenti della PRF, del guadagno e del filtro. Il rinforzo esalta il rumore ed i *flash artifacts* da movimento ma, in particolare, genera *sbavatura simmetrica del colore* e nelle fasi iniziali una *sovrasaturazione artefattuale del colore* che prende il nome di *blooming*. I vasi campionati appaiono più grandi perché il rinforzo colora erroneamente molti pixel disposti a ridosso della parete vascolare generando una *sbavatura simmetrica del colore*. Il *blooming*, invece, definisce l'effetto mosaico ad alta intensità che si registra nel lume del vaso campionato. L'artefatto appare come un'improvvisa variegata fioritura del lume che raggiunge la massima intensità subito dopo l'infusione del MdC con il picco di concentrazione, per ridursi progressivamente con la distruzione delle microbolle. L'effetto *blooming* può essere contenuto riducendo la sensibilità, il guadagno colore totale e la persistenza, ed aumentando la PRF.

Il power Doppler, come abbiamo ripetuto più volte, rappresenta la potenza acustica registrata nella finestra color Doppler, per questo in modalità power molti degli artefatti indotti dall'infusione di MdC, come il *blooming* e la *sbavatura simmetrica del colore*, vengono sensibilmente ridotti o scompaiono. Anzi, la sensibilità specifica del power per i flussi lenti viene esaltata ulteriormente dall'amplificazione del segnale endovascolare. Per questo il power Doppler è la modalità di immagine più indicata negli studi di perfusione con MdC con o senza uso di seconda armonica.

SEQUENZE ECOGRAFICHE DEDICATE

La visualizzazione del microcircolo e la caratterizzazione tessutale rappresentano una vera sfida per tutte le tecniche morfologiche contrastografiche. In ecografia, la caratterizzazione del microcircolo richiede la disponibilità di apparecchiature estremamente sensibili, capaci di rappresentare il segnale molto debole che origina dai piccoli vasi dove il flusso è lento, ma anche di differenziarlo dal rumore di fondo perivascolare (*color noise*, *clutter*, *speckle*). Poiché i MdC ecografici restano confi-



nati in ogni caso nel letto vascolare, la ricerca ecografica nei primi anni 2000 ha dovuto sviluppare sequenze ecografiche contrasto-specifiche per potere isolare il segnale vascolare rinforzato e distinguerlo dalle artefatti del rumore di fondo, anch'esso rinforzato dal MdC. In quest'ottica, la comprensione della risposta non lineare delle microbolle ha rappresentato lo stimolo verso lo sviluppo dell'*imaging* in seconda armonica.

Imaging armonico contrastografico (Contrast Enhanced Ultrasound – CEUS). L'*imaging* armonico è il risultato di una serie di fortunate coincidenze. La prima è rappresentata dalla corrispondenza fra dimensione critica di risonanza delle microbolle d'aria (3 mm) e la frequenza comunemente usata per le applicazioni diagnostiche addominali. La seconda coincidenza è che lo sviluppo della seconda armonica ha coinciso con lo sviluppo del *beamformer* digitale e la costruzione di sonde multifrequenza. Queste ultime, in particolare, sono capaci di trasmettere e ricevere una larga banda di frequenze e di rappresentare singolarmente la frequenza fondamentale e la seconda armonica, senza sovrapposizione (Fig. 13). Quando il Levovist® venne introdotto in commercio, l'intento dell'azienda farmaceutica produttrice era quello di sfruttare il rinforzo del segnale Doppler ottenuto con la riflessione lineare, poichè le apparecchiature analogiche disponibili alla fine degli anni '90 non erano capaci di rappresentare il debole segnale in seconda armonica.

Lo sviluppo del *digital beamformer* e delle sonde a banda larga ha portato al rapido sviluppo dell'*imaging* B-Mode, color e power Doppler in seconda armonica con MdC (*Imaging contrastografico in seconda armonica*). Peraltro, anche se questa tecnica di acquisizione era stata specificamente studiata per i MdC, il rapido miglioramento del *dynamic range* e delle capacità di calcolo ha permesso di sviluppare anche l'*imaging armonico tessutale* che presenta in scala di grigi il segnale in seconda armonica originante dai tessuti stazionari. Se

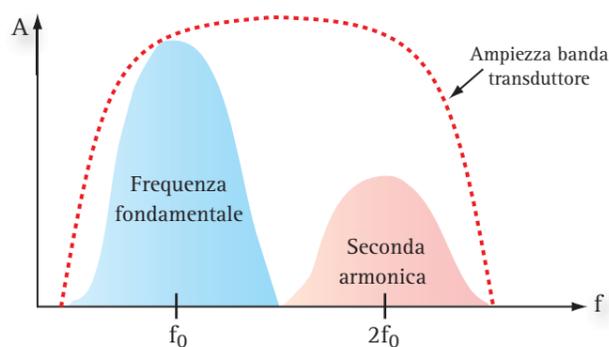


Fig. 13. SONDA AD AMPIA BANDA. Separazione delle bande di frequenza fondamentale ed armonica.

lo strumento opera una selezione sul segnale di ritorno eliminando la frequenza fondamentale, sul monitor saranno automaticamente rappresentati solo i segnali derivanti dal rinforzo vascolare in armonica, con un netto miglioramento del rapporto segnale/rumore e senza artefatti derivanti dalle strutture adiacenti. Impropriamente viene eseguita una sottrazione digitale non molto diversa da quella comunemente utilizzata in angiografia digitale (Fig. 14, 15). La seconda armonica consente di evidenziare anche vasi di diametro molto piccolo (<40 μ) con flussi veramente lenti.

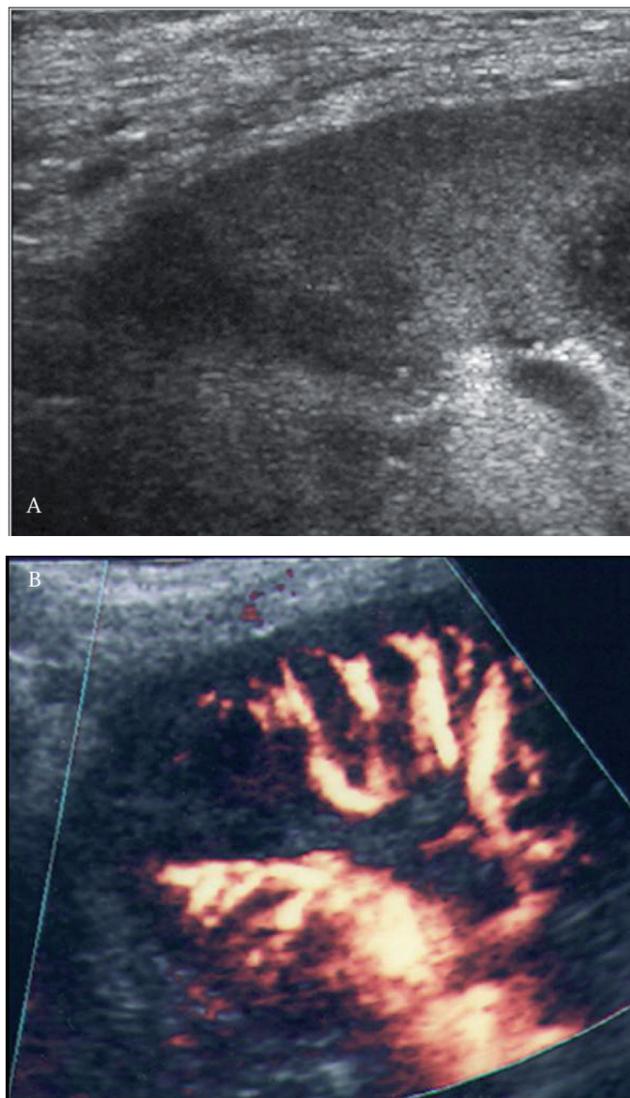


Fig. 14. PIELONEFRITE FOCALE SU TRAPIANTO. (A) Immagine B-Mode ad alta risoluzione del polo superiore del rene. L'aspetto morfologico denota una lieve disomogeneità ipoecogena del polo, ma è estremamente aspecifico. (B) L'infusione di MdC e l'acquisizione in seconda armonica del segnale power Doppler consentono di evidenziare anche vasi corticali di diametro molto piccolo (<40 μ m) con flussi veramente lenti e di definire l'area parenchimale ipoperfusa. La diagnosi differenziale con l'infarto segmentale può derivare però esclusivamente dal contesto clinico.

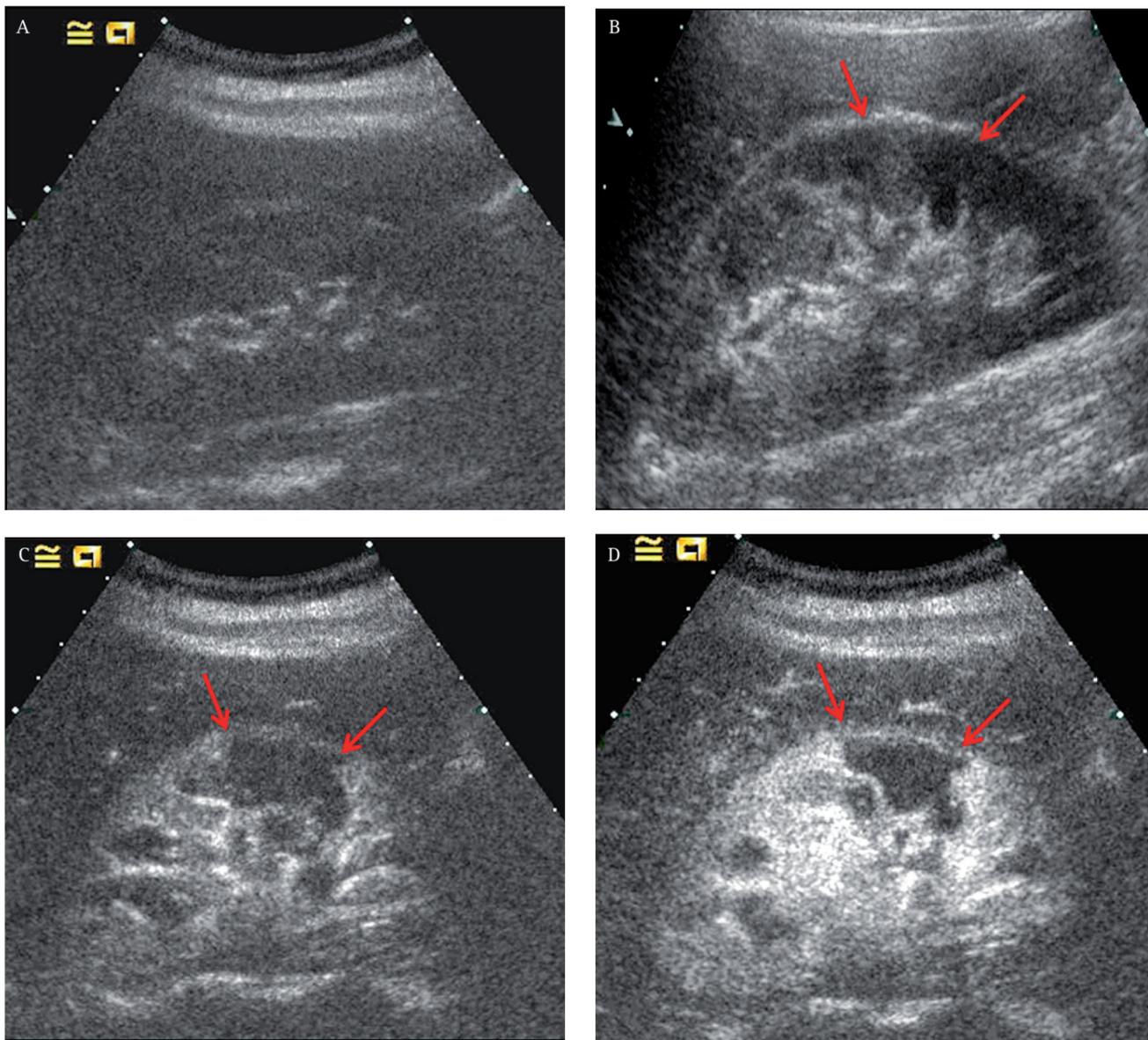
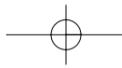


Fig. 15. SEQUENZA CONTRASTOGRAFICA IN B-MODE O IMAGING PERFUSIONALE DEL RENE NATIVO. Paziente con stato febbrile persistente, dolore al fianco, microematuria, leucocitosi ed alterazione degli indici di flogosi dopo infezione delle vie urinarie trattata con terapia antibiotica per os. (A) L'immagine B-Mode non evidenzia lesioni parenchimali specifiche. (B) Immagine dopo infusione in bolo del MdC. (C) La perfusione corticale evidenzia un'area triangolare, irregolare, con base volta alla superficie del rene ed apice volto verso il seno renale. (D) La lesione focale tende a delinearsi con maggiore evidenza nella fase di *plateau* di concentrazione del MdC. Il contesto clinico depone per una diagnosi di nefrite focale infettiva.

Imaging contrastografico in seconda armonica con acquisizione in *pulse inversion*. La tecnica di sottrazione digitale non è molto diversa da quella comunemente usata in angiografia digitale ed è stata la prima tecnica adottata per isolare il segnale in seconda armonica. Con questo metodo il ricevitore filtra elettronicamente la frequenza fondamentale (f_0) e rappresenta solo il segnale in seconda armonica ($2f_0$) che origina dai vasi. L'immagine è priva di artefatti da rumore e da movimento, ma molto scarna e povera di informazioni.

La *Pulse Inversion* è una sequenza di acquisizione introdotta e brevettata da ATL-Philips verso la fine degli anni '90 e sviluppata successivamente anche da altre aziende con *trade mark* dai nomi più o meno pittoreschi (*Phase Inversion*, etc.). La tecnica è già stata descritta nel capitolo sugli avanzamenti tecnologici, per cui ci soffermeremo brevemente solo su alcuni aspetti fondamentali. La *pulse inversion* parte da due acquisizioni della tecnologia digitale: 1) le sonde a larga banda in grado di rappresentare correttamente senza sovrapposi-



zione il segnale armonico e la frequenza fondamentale; 2) la disponibilità di un *range* dinamico esteso sino a 120-150 dB. Nella sequenza di acquisizione, la frequenza fondamentale viene sottratta senza uso di filtri elettronici sfruttando le caratteristiche di risonanza delle microbolle. Questo consente di operare in trasmissione e ricezione con impulsi a banda larga e di migliorare la risoluzione spaziale e di contrasto. Su ciascuna delle linee di vista del campo sonoro vengono lanciati due impulsi in rapida sequenza: il primo è in fase (90°) mentre il secondo impulso, simile al primo, è in controfase (a 180°). Qualsiasi riflettore che si comporti in modo lineare a basso indice meccanico (ad esempio, i globuli rossi, il MdC) risponde ai due impulsi in controfase con due segnali di uguale ampiezza, ma in fase inversa. Questi segnali si annullano a vicenda, quando vengono sommati dal ricevitore. Il segnale in seconda armonica che si libera dalle microbolle in risonanza raggiunge la sonda in fase e si somma algebricamente nel ricevitore. In altri termini, mentre la frequenza fondamentale si annulla sommandosi, la seconda armonica raddoppia in ampiezza.

L'*imaging* in seconda armonica in *pulse inversion* può essere applicato al Doppler spettrale, al color ed al power Doppler e può essere rappresentato in scala cromatica o in scala di grigi. La rappresentazione del rinforzo endovascolare in scala di grigi rappresenta un'immagine morfologica basata esclusivamente sul rinforzo vascolare nel macro e microcircolo parenchimale e viene definita *imaging perfusionale in scala di grigi* (Fig. 16). Nel rene con funzione normale, dopo infusione in bolo ev di MdC la perfusione renale inizia dopo circa 15 secondi. Il contrasto perfonde prima la corticale con un effetto tipo "tutto o nulla" e, dopo 30-40 secondi, la midollare del rene. L'*imaging perfusionale* completa l'esame B-Mode nella diagnosi delle patologie ischemiche del rene (trombo-embolia dell'arteria o della vena, steno-ostruzione di rami segmentari o accessori). Inoltre, si è rivelato particolarmente utile nella diagnosi differenziale della pielonefrite focale che altera la perfusione parenchimale normale per comparsa di aree mute o ipoperfuse (Fig. 15). Purtroppo, al di là della spettacolarità, l'*imaging* perfusionale fornisce scarse informazioni sulle patologie parenchimali primitive e secondarie del rene nativo e del trapianto.

Stimulated Acoustic Emission (SAE). Flash echo imaging. La distruzione continua delle microbolle da parte del fascio US riduce progressivamente l'efficacia del MdC. L'insonazione intermittente del parenchima facilita invece l'accumulo delle microbolle nei vasi capillari. Questa sequenza d'acquisizione prende il nome

di *transient o intermittent imaging*, ma è anche conosciuta con i nomi di *Stimulated Acoustic Emission (SAE)*, *Loss off correlation o LOC imaging*, *Flash echo imaging*. Essa può essere applicata utilizzando la durata di un intero ciclo cardiaco o congelando e scongelando in modo intermittente l'immagine e rivedendo i *frames* acquisiti con un *cineloop*. Il rinforzo da contrasto diventa molto alto subito dopo il congelamento dell'immagine e l'arresto della trasmissione di US, mentre cade rapidamente nei millisecondi successivi quando l'immagine viene scongelata e riparte l'emissione di US che determina una distruzione continua delle microbolle. Questa tecnica di acquisizione riduce significativamente il *frame rate* ma migliora il segnale e la durata in circolo dei MdC. L'acquisizione intermittente dell'immagine può essere combinata con la modalità in seconda armonica.

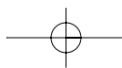
Tecniche di iniezione

Per le applicazioni renali possono essere adottate tre diverse tecniche di iniezione:

- **L'iniezione in bolo (<5 secondi).** Questo metodo è utile quando si vuole valutare semplicemente lo stato di permeabilità dei vasi mentre diventa indispensabile per gli studi dinamici. L'iniezione in bolo tuttavia crea degli artefatti legati all'eccesso di segnale nella fase iniziale arteriosa (*blooming* in modalità color Doppler e saturazione in modalità Doppler spettrale).
- **L'iniezione più lenta, fra 10 e 20 secondi,** previene la formazione di artefatti grazie ad un picco di concentrazione più basso e quindi di un rinforzo di minore intensità ma di durata significativamente più prolungata.
- **L'iniezione molto lenta (nell'ordine di 20-40 secondi)** può essere ottenuta con l'uso di siringhe automatiche.

Applicazioni del MDC nel rene nativo e nel trapianto

Teoricamente il rene è un organo privilegiato per lo studio con MdC. Nell'adulto a riposo ciascun rene riceve una portata ematica di circa 500-600 ml/min, pari a circa il 10% della portata cardiaca. Tuttavia, lo studio della vascularizzazione renale si presta a numerose li-



Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

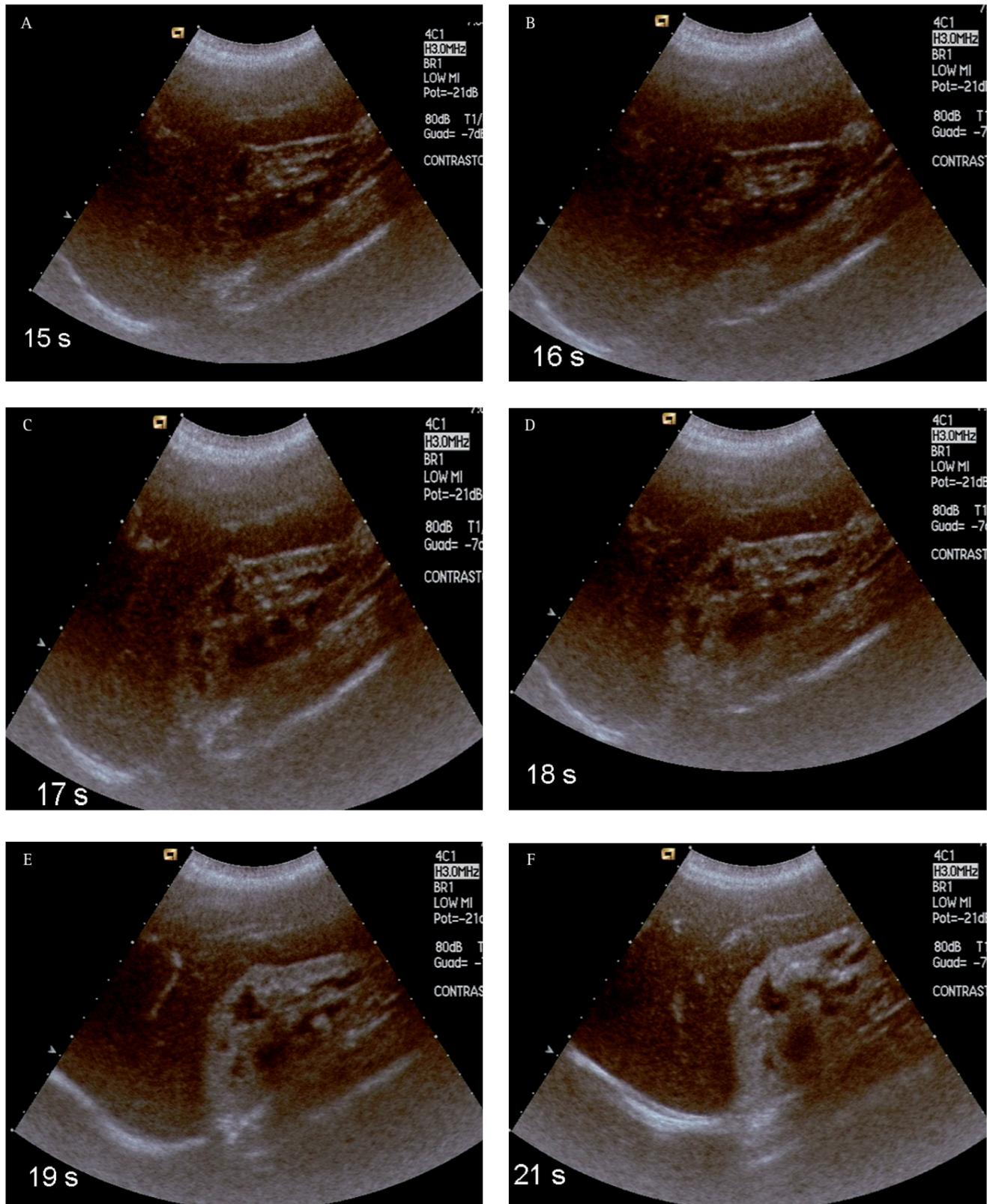


Fig. 16. PERFUSIONE DEL PARENCHIMA RENALE DOPO INFUSIONE EV DI SONOVUE®. Frames acquisiti in sequenza su rene nativo normale dal 15° al 21° secondo dopo infusione in bolo di *Sonovue*®. Il contrasto perfonde in modo progressivo, con effetto tipo “tutto o nulla” dapprima la corticale e dopo circa 30-40 secondi la regione midollare.

mitazioni legate alla morfologia delle arterie ed alle variazioni emodinamiche del circolo intrarenale che risente di numerosi fattori di regolazione nervosi, ormonali (sistema renina-angiotensina, trombossano, prostaglandine), farmaci (furosemide, inibitori dell'enzima di conversione, etc.).

La maggior parte dei lavori sperimentali nell'uomo sui campi d'applicazione clinica dei MdC risale agli anni '95-2000. Diversi lavori hanno dimostrato l'interesse del Levovist (Schering) e dell'Echogen (Sonus, Mallinkrot) nella ricerca dei segni diretti o indiretti di stenosi dell'arteria renale. In un esteso studio multicentrico europeo l'iniezione di Levovist migliorava sia la sensibilità e la specificità dell'esame, sia la percentuale di esami completi dell'arteria renale principale, in particolare modo nei soggetti obesi e nei pazienti con malattia cronica del rene nei quali la riduzione della portata ematica rende estremamente difficile l'esame color Doppler. Negli studi monocentrici l'uso del Levovist o dell'Echogen ha permesso di portare al 95% la percentuale di fattibilità dell'esame Doppler delle arterie renali principali e segmentarie, di migliorare l'evidenziazione delle arterie polari e di migliorare la sensibilità e la specificità nella diagnosi di stenosi dell'arteria renale.

L'*enhancement* del segnale Doppler dei piccoli vasi si è rivelato molto utile per caratterizzare il *pattern* vascolare delle lesioni tumorali. La neovascolarizzazione tumorale ha sempre un'architettura anomala, caotica, irregolare. Nell'adulto, l'80-90% delle masse renali solide è rappresentata dal carcinoma a cellule renali. La diagnosi differenziale del carcinoma renale comprende gli pseudotumori, la nefrite focale batterica, i tumori benigni (angiomiolipoma, oncocitoma) o altri tumori maligni più rari (linfoma, sarcoma, metastasi). A differenza del fegato, non esistono lavori sull'uso dei MdC nella diagnosi differenziale delle masse focali renali. Al contrario, la caratterizzazione delle masse tumorali del rene con MdC è stata oggetto di numerosi lavori che hanno dimostrato una diffusa ipervascolarizzazione dei noduli di carcinoma a cellule renali. In verità, l'interesse del *pattern* vascolare del nodulo tumorale resta aleatoria avendo gli studi angiografici dimostrato il carattere aspecifico degli aspetti di ipervascolarizzazione descritti nei vari tumori. La dimostrazione del circolo nel contesto del tumore si è rivelata invece utile nella diagnosi differenziale dei piccoli tumori o nei casi in cui la TC è difficile da interpretare per l'effetto di volume parziale. Nelle lesioni cistiche di tipo 2 e 3 secondo la classificazione di Bosniak, lo studio attento della settazione o della parte strutturata intralesionale permette di orientare la diagnosi verso la natura della malattia in modo non dissimile dai criteri di perfusione usati in TC

o MRI. Nei tumori più voluminosi, il rinforzo di segnale permette di migliorare lo studio della distribuzione vascolare. La scansione della lesione e la ricostruzione 3D permettono di ottenere nei casi favorevoli una rappresentazione qualitativa dei vasi normali e patologici e di produrre una sorta di cartografia vascolare. L'associazione del MdC con la ricostruzione 3D può essere utile nei casi in cui un bilancio di estensione intrarenale del tumore è fondamentale per pianificare una chirurgia conservativa o nei casi in cui è necessario valutare l'estensione del tumore in vena renale e in vena cava inferiore e valutare l'aderenza del trombo neoplastico sulla parete venosa.

Diversi lavori sperimentali hanno dimostrato l'attitudine dei MdC a visualizzare i difetti di vascolarizzazione renale da infarto segmentario. L'ecografia convenzionale B-Mode non mostra alcuna variazione della struttura parenchimale nella prima ora che segue l'infarcimento emorragico, mentre l'iniezione di MdC permette di mostrare immediatamente un difetto di vascolarizzazione con geometria triangolare, a limiti netti, con la base rivolta verso la corticale sottocapsulare. Questo si rivela particolarmente utile in un paziente che si presenta con una crisi di lombalgia acuta, ematuria e/o febbre e potrebbe avere applicazioni anche nella diagnostica delle pielonefrite e della necrosi corticale acuta dove l'approccio in power Doppler può non essere così semplice a causa degli artefatti indotti dai movimenti respiratori, dalle pulsazioni arteriose trasmesse, dai movimenti intestinali e dall'attenuazione in profondità (Fig. 14, 15).

Dopo infusione in vescica, il MdC ha rivelato con buona sensibilità il rigurgito di urina nelle cavità calico-pieliche o nell'uretere retrovescicale. Questa tecnica potrebbe sostituirsi in certi casi alla cistografia minzionale retrograda o alla cistografia minzionale con radioisotopi per la diagnosi di reflusso vescico-ureterale. Anche la ricerca di vasi polari responsabili di una sindrome giuntale sembra essere promettente. La trombosi della vena renale nei pazienti con insufficienza renale, in caso di sindrome nefrosica o in rianimazione, è spesso difficile da confermare o escludere in ragione del basso flusso sanguigno renale e/o delle condizioni di esecuzione del color Doppler. L'iniezione di MdC dovrebbe permettere di evidenziare il segnale nei vasi venosi, abbreviare il tempo e migliorare l'efficacia dell'indagine.

Le applicazioni cliniche del MdC nel trapianto si limitano a patologie vascolari di nicchia. Lo studio color Doppler dell'arteria principale, una delle prime applicazioni cliniche del Levovist®, ha fornito risultati non esaltanti che indicano un miglioramento della fattibi-

lità dell'esame, della definizione anatomica dei vasi principali ed una riduzione della percentuale di insuccessi tecnici. Le indicazioni sull'uso del MdC derivate dagli studi clinici presenti in letteratura segnalano l'utilità del Levovist® nella valutazione della riperfusione del rene dopo angioplastica, nella diagnosi di infarto segmentale nel trapianto e nel rene nativo, nella diagnosi differenziale tra occlusione completa e sub-occlusione dell'arteria principale, nella diagnosi di aneurisma dei rami segmentali dell'arteria renale e di trombosi della vena renale.

Il ruolo del contrasto non appare dirimente nella diagnosi differenziale fra ischemia e pielonefrite focale al di fuori del contesto clinico e nella caratterizzazione delle lesioni solide renali benigne e maligne. Negli pseudotumori (come l'ipertrofia della colonna mesorenale) il rinforzo del segnale migliora la definizione dell'anatomia vascolare normale. Il MdC è importante invece nella diagnosi delle fistole artero-venose a basso flusso (congenite o iatrogene), difficilmente documentabili con il color power Doppler. L'utilità del contrasto è risultata modesta nella diagnosi differenziale fra necrosi corticale acuta e necrosi tubulare acuta in pazienti con insufficienza renale acuta sottoposti a dialisi in terapia intensiva. L'utilità del contrasto nella diagnosi di pielonefrite acuta diffusa è scarsa, ma consente di individuare con maggiore facilità aree segmentali singole o multiple di ipoperfusione.

Come appare evidente, i risultati non sono esaltanti, per questo l'uso dei MdC in nefrologia è limitato. Nel rene nativo come nel trapianto il quesito clinico ricorrente è se l'*imaging* perfusionale possa fornire informazioni utili per la diagnosi differenziale fra le patologie che vengono comunemente caratterizzate con la biopsia renale. Gli indici di resistenza, largamente usati per caratterizzare il microcircolo renale, hanno dato risultati contrastanti e mostrano una scarsa sensibilità e specificità nella diagnosi differenziale fra rigetto e necrosi corticale, fra nefropatia cronica e tossicità da ciclosporina. Pertanto, la domanda è se nel futuro immediato l'*imaging* perfusionale in seconda armonica sarà in grado di fornire una risposta a questo quesito clinico. Nel rene con funzione normale, dopo infusione in bolo in vena di MdC, la perfusione della corteccia renale si evidenzia in THI dopo circa 16-19 secondi. Il contrasto perfonde in modo progressivo prima la corticale e, dopo circa 30-40 secondi, la regione midollare. L'immagine del rene così acquisita in THI deriva quasi esclusivamente dalla perfusione renale. Le informazioni morfofunzionali che si ottengono con l'*imaging* perfusionale non differiscono sostanzialmente dall'immagine B-Mode con color-Doppler.

Nel trapianto qualche informazione in più può essere ottenuta con la valutazione seriale delle *curve tempo/intensità* che analizzano e riportano su un grafico l'andamento medio dell'intensità del segnale in funzione del tempo (Fig. 17). L'intensità del segnale viene misurata sul vettore delle immagini B-Mode/color power Doppler registrate in una sequenza cine immagazzinata nella memoria del sistema. In ascissa è riportato il valore del tempo in secondi, mentre in ordinata è indicato il valore medio dell'intensità (o della deviazione standard dell'intensità) in un determinato momento o *frame*, normalizzato fra 0 ed 1. L'analisi della curva consiste in due procedimenti separati: il primo volto all'acquisizione dei *frames* temporali ed il secondo all'elaborazione dei dati ed alla visualizzazione della curva. Pertanto, le curve tempo/intensità sono un'elaborazione in *post-processing* dell'immagine acquisita durante la fase di perfusione del rene. Per ottenere una buona curva bisogna, in primo luogo, acquisire una sequenza sufficientemente lunga, evitando movimenti della sonda e dell'organo da esplorare (respiro bloccato) ed, in secondo luogo, che l'area di interesse parenchimale (ROI = *Region Of Interest*) sia ben circoscritta. In *post-processing*, sulla sequenza cine vengono disegnate 1, 2 o più ROI, in modo non dissimile dalla tecnica usata in angioscintigrafia per definire le curve attività/tempo. Anche in questo caso, come in angioscintigrafia, il punto critico dell'analisi è rappresentato dall'acquisizione e dalla definizione delle ROI. Teoricamente, per ottenere una buona riproducibilità dell'esame, la/e ROI disegnate al primo esame dovrebbero essere fedelmente riprodotte negli esami successivi, con la stessa forma e la stessa dimensione.

Con la tecnica della diluizione del contrasto è possibile valutare selettivamente la fase di "*input/output*" del Mdc e l'*imaging* perfusionale può acquisire una valenza quantitativa. Dopo infusione ev (continua o in bolo) la concentrazione in circolo delle microbolle raggiunge rapidamente l'equilibrio ed il rene si riempie di MdC. A questo punto vengono lanciati in rapida successione 1-2 impulsi *flash* ad alta intensità acustica (1.9 MI) per rompere le microbolle e si valuta il *refilling* del rene, cioè il riempimento con nuove microbolle (Fig. 18). Alcuni autori hanno sviluppato un algoritmo per il calcolo della *perfusion regionale* partendo dal presupposto che la pendenza della curva di *refilling* può essere considerata come la velocità di flusso del sangue, mentre l'intensità massima del segnale power Doppler in *pulse inversion* nella ROI prescelta può essere considerata come l'area di sezione totale dei vasi distrettuali. La portata di flusso si calcola in base all'equazione: $Q = V_m \times S$ ove Q , è la portata, V_m , la velocità media

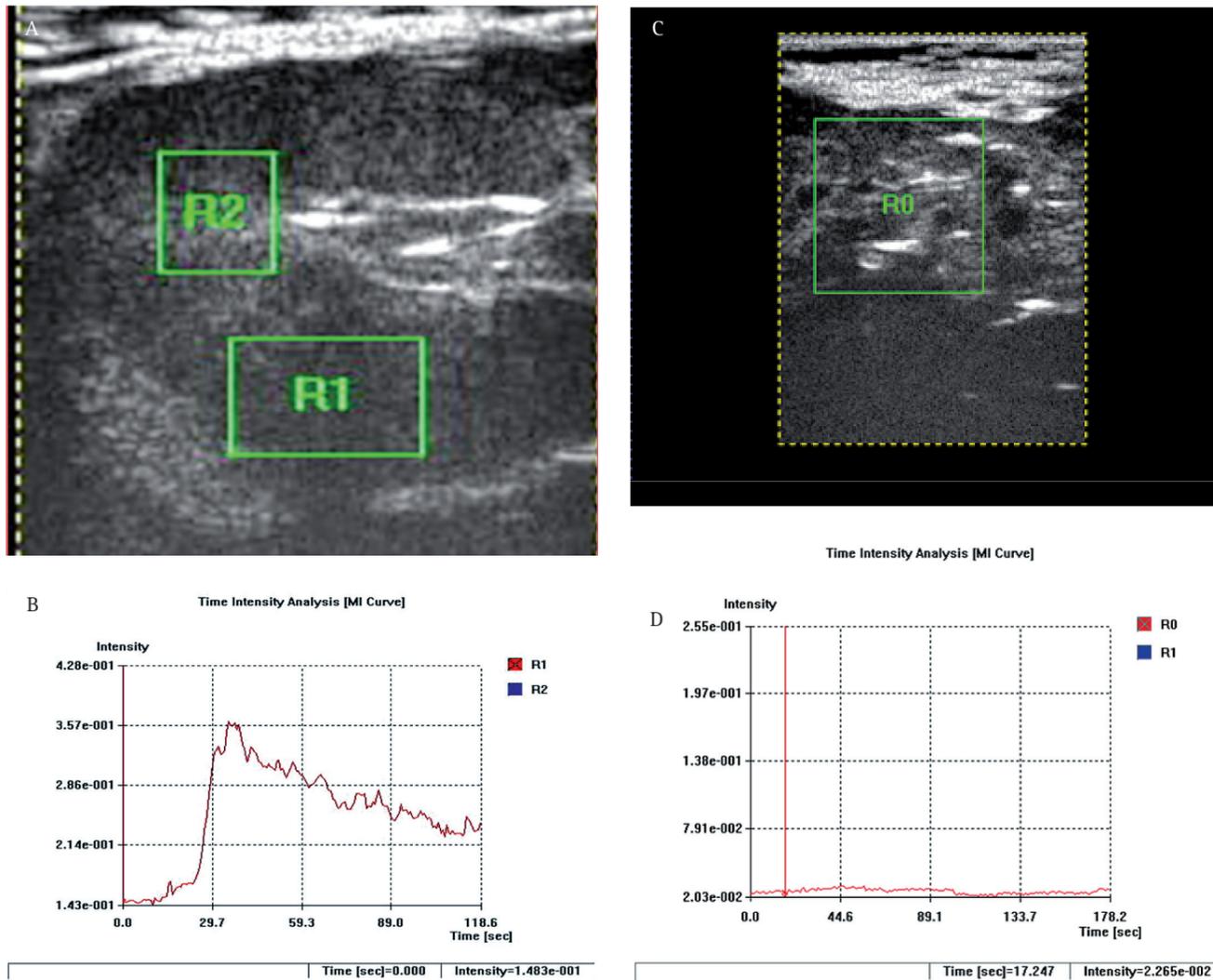
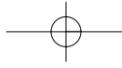


Fig. 17 CURVA INTENSITÀ/TEMPO IN TRAPIANTO NORMALE. Curva intensità/tempo registrata in due diverse ROI di un trapianto renale. Nella storia clinica il paziente aveva lamentato un episodio di endocardite batterica a 2 mesi dal trapianto cui era seguito un aumento della sCRr da 1 a 1.9 mg/dl. Dopo la guarigione, la creatininemia è rimasta stabile ed è tuttora stabile dopo 14 anni dal trapianto. Lo studio perfusionale eseguito con *SonoVue*[®] ha evidenziato una regione parenchimale (polo superiore) con perfusione normale (A) (curva caratterizzata da un rapido arrivo dell'ecocontrasto, da un breve plateau ed una progressiva dismissione) (B) ed un'area ischemica-cicatriziale scarsamente perfusa nel polo inferiore (C, D). La causa della scleroatrofia del polo inferiore è sicuramente da ascrivere ad un episodio di embolia settica.

temporale e S , l'area di sezione. Pertanto, il prodotto della velocità di arrivo delle microbolle per l'intensità massima di segnale registrato nella ROI rappresenta il *flusso frazionale o regionale*. Questa ipotesi di misurazione è stata introdotta per la prima volta da Wei usando una funzione esponenziale, modificata successivamente da altri autori. La funzione del *refilling* è una funzione esponenziale sigmoidea:

$$Y = s + A (1 - e^{-\beta t})$$

ove Y , è la video-intensità power Doppler in *pulse-inversion* al momento t ; A , è il plateau della video-intensità che rappresenta il volume di flusso; β , rappresenta la velocità media di arrivo delle microbolle (velocità di riempimento) ed s , un fattore di correzione. Il flusso ematico regionale viene calcolato moltiplicando $A \times \beta$ (Fig. 19). Le variazioni di intensità di segnale nella ROI in esame corrispondono alle variazioni di concentrazione delle microbolle, sebbene l'attenuazione degli US ed altri fattori di minore importanza (infusione in bolo) impediscano una valutazione della con-



Mezzi di contrasto ecografici o ecoamplificatori

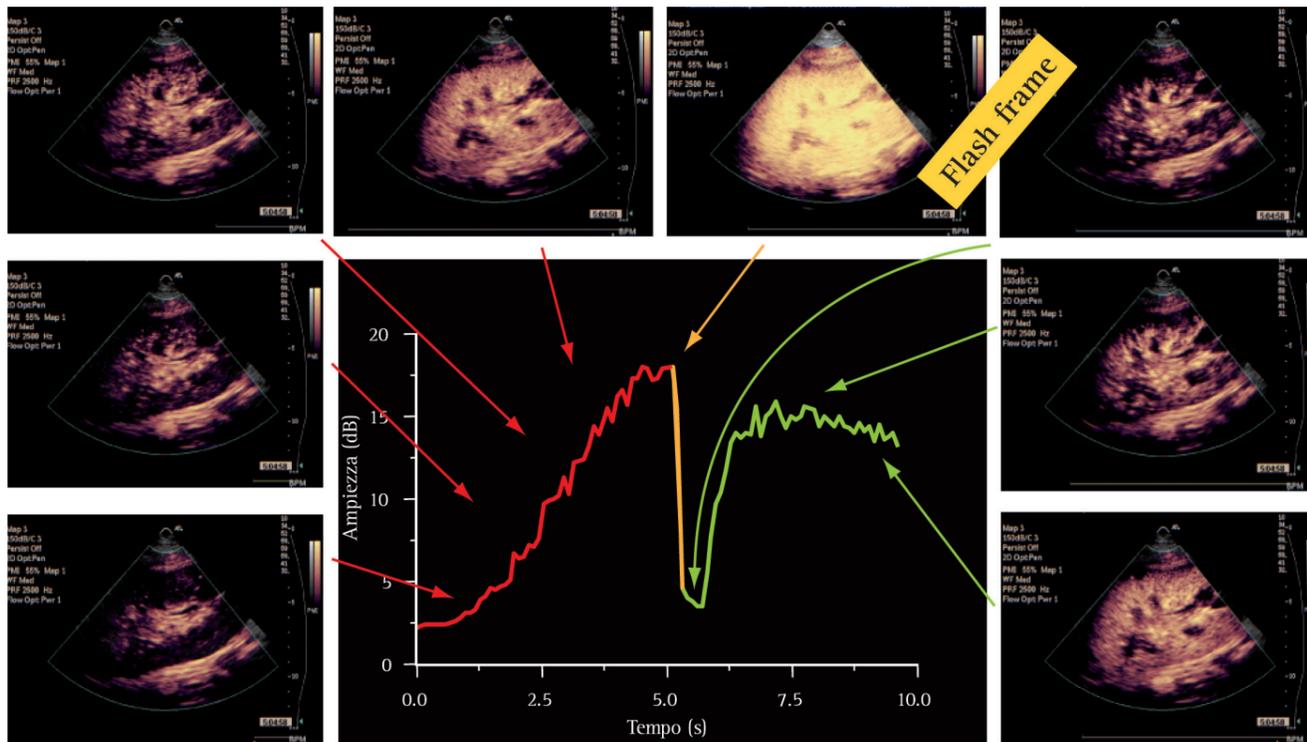


Fig. 18 PERFUSIONE RENALE CON MdC E CURVA DI REFILLING. Dopo infusione ev (continua o in bolo) la concentrazione in circolo delle microbolle raggiunge rapidamente l'equilibrio ed il rene si riempie di MdC. A questo punto vengono lanciati in rapida successione 1-2 impulsi *flash* ad alta intensità acustica (1.9 MI) per rompere le microbolle e si valuta quindi la curva di *refilling* del rene, cioè il riempimento con nuove microbolle.

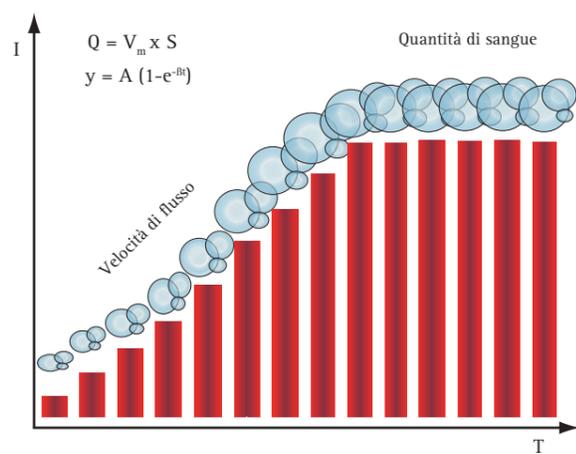
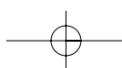


Fig. 19 CALCOLO DEL FLUSSO EMATICO REGIONALE CON MdC E HI. La pendenza della curva di *refilling*, dopo rottura delle microbolle con *flash-frame*, può essere assimilata alla velocità di arrivo del sangue nella ROI. A riempimento completo, l'intensità massima del segnale può essere assimilata all'area di sezione vascolare. La perfusione ematica distrettuale (Q), pertanto, può essere calcolata in base all'equazione: $Q = V_m \times S$; dove V_m , è la velocità media e S , l'area di sezione vascolare. In realtà, la funzione di *refilling* dopo rottura delle microbolle è una funzione esponenziale sigmoidea per cui: $Y = S + A(1 - e^{-bt})$ dove Y , è l'intensità al momento t , A , è il plateau dell'intensità (che rappresenta il volume di flusso), B , rappresenta la velocità media di arrivo delle microbolle ed s , un fattore correttivo. Il flusso ematico regionale viene calcolato moltiplicando $A \times B$.

centrazione assoluta. Tuttavia, la conoscenza della concentrazione relativa al tempo t , è sufficientemente attendibile per fornire una stima quantitativa di parametri quali il *volume vascolare* di un tessuto, la *velocità di flusso* e l'*indice di perfusione*. In un prossimo futuro sarà possibile ottenere, mediante software dedicati, mappe parametriche distinte per ciascuno di questi valori, in modo non dissimile da quanto si verifica in medicina nucleare. La possibilità di ottenere dati morfologici comparabili con TC e MRI, senza utilizzare radiazioni ionizzanti né MdC nefrotossici, la possibilità di ripetere l'esame nel tempo e di ottenere dati funzionali comparabili con la medicina nucleare rappresentano sicuramente una *chance* da non sottovalutare.

Ad oggi non esistono in letteratura studi longitudinali sulle patologie parenchimali del rene nativo e solo qualche lavoro sul trapianto. È possibile però ipotizzare che nel prossimo futuro l'*imaging* perfusionale parametrico possa fornire notizie utili per discriminare i quadri patologici così da ridurre il ricorso alla biopsia renale che, al momento, è l'unico metodo capace di differenziare i quadri istopatologici del rene nativo e del trapianto renale.



La possibilità di ripetere l'esame nel tempo e di ottenere dati funzionali comparabili con la medicina nucleare rappresentano sicuramente una *chance* da non sottovalutare in un settore come la trapiantologia del rene e del rene-pancreas ove le variazioni della perfusione parenchimale rappresentano spesso un segno premonitore di un danno d'organo ischemico o tossico.

La mancanza di dati e di studi longitudinali, ma specialmente l'indisponibilità di strumenti idonei e di sufficienti competenze nelle U.O. di Nefrologia, ha fortemente limitato le applicazioni dell'ecografia con contrasto ed ha sempre più marginalizzato nelle radiologie l'uso del contrasto verso le patologie ischemiche di nicchia. In realtà, comparando le curve di tempo/intensità con le curve di attività/tempo dell'angioscintigrafia, è evidente che l'uso seriato nel *follow-up* potrebbe fornire notizie aggiuntive utili per discriminare i quadri patologici parenchimali e forse ridurre il ricorso alla biopsia renale, al momento unico metodo in grado di discriminare con certezza i quadri patologici del rene trapiantato.

Bibliografia

- Albrecht T, Blomley M, Urbank A, Jayaram V, Cosgrove DO, Schlieff R. *Doppler quantification of Levovist infusions in vivo. A linear dose response relationship.* Radiology 1997; 205: 337.
- Albrecht T. *The influence of injection modes on the enhancing of ultrasound contrast.* 10th meeting of Efsumb, XIX^e Congrès de la Sfaumb. Tours, March 26-30 1998.
- Balen FG, Allen CM, Lees WR. *Ultrasound contrast agents.* Clinical Radiology 1994; 49: 77-82.
- Barnhart JL, Levene H, Villapano BS et al. *Air-filled albumin microspheres for echocardiography contrast enhancement.* Invest Radiol 1990; 25: 162-4.
- Baxter GM, Watt A, Bolger A, Bamber JC, Bell D. *Levovist microbubble enhanced sonorenography. A new functional diagnostic technique in the diagnosis of renal artery stenosis.* Radiology 1997; 205: 241.
- Beppu S, Matsuda H, Shishido T, Miyatake K. *Success of myocardial contrast echocardiography by peripheral venous injection method: visualization of area at risk.* Circulation 1993; 4: I401.
- Burns PN, Hilpert P, Goldberg BB. *Intravenous contrast agent for ultrasound Doppler: in vivo measurement of small vessel dose-response.* IEEE Eng Med Biol Soc 1990; 1: 322-4.
- Burns PN, Powers JE, Fritzsche T. *Harmonic imaging: a new imaging and Doppler method for contrast-enhanced ultrasound.* Radiology 1992; 185: 142.
- Burns PN, Powers JE, Hope Simpson D et al. *Harmonic power mode Doppler using microbubble contrast agents: an improved method for small vessel flow imaging.* Proc IEEE UFFC, 1994, 1547-50.
- Burns PN, Powers JE, Hope Simpson D, Uhlendorf V, Fritzsche T. *Harmonic imaging: principles and preliminary results.* Angiology 1996; 47: S63-74.
- Burns PN, Powers JE, Hope-Simpson D, Uhlendorf V, Fritzsche T. *Harmonic contrast enhanced Doppler as a method for the elimination of clutter - in vivo duplex and color studies.* Radiology 1993; 189: 285.
- Burns PN, Wilson SR, Muradali D, Powers JE, Fritzsche T. *Intermittent US harmonic contrast-enhanced imaging and Doppler improves sensitivity and longevity of small vessel detection.* Radiology 1996; 201: 159.

- Burns PN. *Contrast agents for ultrasound imaging and Doppler*. In: Rumack CM, Wilson SR, Charboneau JW (eds.). *Diagnostic ultrasound 2nd ed.* Mosby, St Louis, 1998, 57-84.
- Calliada F, Botinelli O, Campani R, Sala G, Corradi B, Draghi F. *Optimization of colour and spectral Doppler scanning of the renal arteries using a US contrast agent and second harmonic imaging*. *Radiology* 1997; 205: 24.
- Claudon M, Barnewolt CE, Taylor GA, Dunning PS, Gobet R, Badawy AB. *Renal blood flow in pigs: Changes depicted with contrast enhanced harmonic US imaging during acute urinary obstruction*. *Radiology* 1999; 212: 725-31.
- Claudon M, Rohban T. *Levovist (SH U 508A) in the Diagnosis of renal artery stenosis: results of a controlled multicenter study*. *Radiology* 1997; 205: 242.
- Correas JM, Hélénon O, Méjean A, Legendre C, Pourcelot L, Moreau JF. *Value of US with dodecafluoropentane in the diagnosis of renal diseases: preliminary results*. *Radiology* 1996; 201: 66.
- Correas JM, Moreau JF, Pourcelot L. *Les produits de contraste injectables en échographie-Doppler*. In: *Echo-Doppler*, edited by M Claudon et N Grenier, Société Française de Radiologie, Paris 1995: 27-32.
- Correas JM, Quay SC. *EchoGenTM emulsion: a new ultrasound contrast agent based on phase shift colloids*. *Clinical Radiology* 1996; 51 (S1): 11-4.
- Corréas JM, Lafortune M, Burns PM. *Detection of renal artery stenosis after administration of a US contrast agent*. *Radiology* 1996; 201: 218.
- Dacher JN, Pfister C, Monroe M et al. *Power Doppler sonographic pattern of acute pyelonephritis in children: comparison with CT*. *AJR* 1996; 166: 1451-5.
- de Jong N. *Physics of microbubble scattering*. In: Nanda NC, Schlieff R, Goldberg BB (Eds.). *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997, 39-64.
- Deichert U, Schlieff R, Van de Sandt M, Jhunke I. *Transvaginal hysterosalpingo-contrast-sonography (Hy-Co-Sy) compared with conventional tubal diagnostics*. *Hum Reproduct* 1989; 4: 418-24.
- Epstein PS, Plesset MS. *On the stability of gas bubbles in liquid-gas solutions*. *J Chem Phys* 1950; 18: 1505.
- Feinstein SB, Cheirif J, Ten Cate FJ et al. *Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound agent: initial multicenter clinical results*. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 316-24.
- Fink IJ, Miller DJ, Shawker TH. *Lipid emulsions as contrast agents for hepatic sonography: an experimental study in rabbits*. *Ultrasonic Imag* 1985; 7: 191-7.
- Frauscher F, Janetschek G, Klauser A, Münsterer B, Helweg G, Bartzch G. *Detection of crossing vessels at the ureteropelvic junction using contrast enhanced color Doppler sonography*. 6th European Symposium on Uroradiology. Strasbourg, 2-16, 1998.
- Fritsch T, Hauff P, Heldmann D, Luders F, Uhlendorf V, Weitschies W. *Preliminary results with a new liver-specific ultrasound contrast agent*. *Ultrasound in Med Biol* 1994; 20: S137.
- Gramiak R, Shah PM. *Echocardiography of aortic root*. *J Investigative Radiol* 1988; 3: 356.
- Hélénon O, El Rody F, Correas JM et al. *Color Doppler US of renovascular disease in native kidneys*. *Radiographics* 1995; 15: 833-54.
- Jakobsen J. *Echo-enhancing agents in the renal tract*. *Clinical Radiology* 1996; 51: 40-3.
- Karge K, Troeger J, Duetting T, Zieger B, Rohrschneider. *Ultrasonographic diagnosis of vesicoureteral reflux with the application of an echo-enhancing agent*. 6th European Symposium on Uroradiology. Strasbourg, September 12-16, 1998.
- Kedar RP, Cosgrove DO, Smith IE, Mansi JL. *Breast carcinoma: measurement of tumour response to primary medical therapy with color Doppler flow imaging*. *Radiology* 1994; 190: 825-30.
- Kliewer MA, Tupler RH, Carroll BA et al. *Renal artery stenosis: analysis of tardus and parvus pattern*. *Radiology* 1993; 189: 779-87.
- Lees WR. *Echo-enhanced renal ultrasound imaging with Levovist (SHU 508 A)*. *Angiology* 1996; 47: S31-S37.
- Lefèvre F, Martin Bertaux A, Lercher MN, Rubini-Remigy D, Lecuiller P, Claudon M. *The use of an automatic injector for the intravenous administration of an ultrasound contrast agent*. 10th meeting of Efsu XIX Congres de la Sfaumb. Tours, March 26-30 1998.
- Mattrey R.F. *Perfluoroethylbromide: a new contrast agent for CT, sonography, and MR imaging*. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 247-52.
- Melany ML, Grant EG, Duerinckx AJ, Watts TM, Levine BS. *Ability of a Phase-shift US contrast agent to*

- improve imaging of the main renal arteries. *Radiology* 1997; 205: 147-52.
- Meltzer RS, Tickner EG, Popp RL. *Why do the lungs clear ultrasonic contrast?* *Ultrasound in Medicine and Biology* 1980; 6: 263-67.
 - Missouri CG, Allen CM, Balen FG, Buckenham T, Lees WR, Mac Gregog GA. *Non-invasive screening for renal artery stenosis with ultrasound contrast enhancement.* *J Hypertens* 1996; 14: 519-24.
 - Neppiras EA, Nyborg WL, Miller PL et al. *Nonlinear behaviour and stability of trapped micron-sized cylindrical gas bubbles in an ultrasound field.* *Ultrasonics* 1983; 21: 109-15.
 - Ophir J, Parker KJ. *Contrast agents in diagnostic ultrasound.* *Ultrasound Med Biol* 1989; 15: 319-33.
 - Porter TR, Xie F. *Visually discernible myocardial echocardiographic contrast after intravenous injection of sonicated dextrose albumin microbubbles containing high molecular weight, less soluble gases.* *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 509-15.
 - Porter TR, Xie F, Kricsfeld D, Armbruster RW. *Improved myocardial contrast with second harmonic transient ultrasound response imaging in humans using intravenous perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin.* *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1497-501.
 - Porter TR, Xie F. *Transient myocardial contrast after initial exposure to diagnostic ultrasound pressures with minute doses of intravenously injected microbubbles: demonstration and potentials mechanisms.* *Circulation* 1995; 92 : 2391-5.
 - Powers JE, Burns PN, Souquet J. *Imaging instrumentation for ultrasound contrast agents.* In: Nanda NC, Goldberg BB, (eds.). *Advances in echo imaging using contrast enhancement.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997, 139-170.
 - Quay S.C. *Ultrasound contrast agent development: phase shift colloids.* *J Ultrasound Med* 1994; 13: S9.
 - Sahn D.J., Valdez-Cruz L.M. *Ultrasonic contrast studies for the detection of cardiac shunts.* *J Am Coll Cardiol* 1984; 3: 978-85.
 - Schlieff R. *Galactose-based echo-enhancing agents.* In: *Ultrasound Contrast Agents*, edited by B Goldberg, Mosby Publisher, 1997, 75-82.
 - Summaria V. *Usefulness of ultrasound contrast agents in the characterization of focal renal lesions.* Congrès SFAUMB-EFSUMB, Tours, 27 mars 1998.
 - Taylor GA, Ecklund K, Dunning P. *Renal cortical perfusion in rabbits: visualization with colour amplitude imaging and experimental microbubble-based US contrast agent.* *Radiology* 1996; 201: 125-9.
 - Unger E, Shen D, Fritz T et al. *Gas-filled lipid bilayers as ultrasound contrast agents.* *Invest Radiol* 1994; 29 Suppl 2: S134-S136.
 - Van der Hulst VPM, Van Baalen J, Schultze Kool Let al. *Renal artery stenosis: endovascular flow wire study for validation of Doppler US.* *Radiology* 1996; 200: 165-8.
 - Weskott HP, Brands A. *Transpulmonary ultrasound contrast agent helps to characterize small renal masses.* *Radiology* 1997; 205: 242.