

**ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA
DOTTORATO DI RICERCA IN ULTRASONOLOGIA IN
MEDICINA UMANA E VETERINARIA (XX° CICLO)**

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

**CONOSCENZA E CONSAPEVOLEZZA SUGLI
EFFETTI BIOLOGICI DEGLI ULTRASUONI
NELLA PRATICA CLINICA IN ITALIA: RISULTATI
DI UNA INCHIESTA CON QUESTIONARIO TRA
ECOGRAFISTI DELLA SOCIETA' ITALIANA DI
ULTRASONOLOGIA IN MEDICINA E BIOLOGIA
(S.I.U.M.B.)**

Relatore e Coordinatore del Dottorato:

Chiar.mo Prof. L. Bolondi

Presentata da:

Dr. Roberto Righini

**Settore Scientifico Disciplinare MED/09
Tesi Finale anno 2008**

INDICE

Introduzione	pag.2
<i>Terminologia ed interazioni</i>	<i>pag.3</i>
-Principali parametri fisici e strumentali correlati alla sicurezza	pag.3
-Meccanismi di interazione fra ultrasuoni e tessuti biologici	pag.4
-Effetti termici	pag.4
-Parametri correlati al rischio di rialzo termico	pag.4
-Effetti cavitazionale	pag.5
-Parametri correlati al rischio di cavitazione	pag.6
-Effetti non cavitazionale	pag.9
-Regolazione generale dell'ecografo ed effetti sull'esposizione	pag.9
-Peculiarità d'interazione in presenza di mezzo di contrasto ecografico: effetti in presenza di ampiezze pressorie lievi-moderate ed elevate	pag.10
<i>Evidenze disponibili sugli effetti biologici degli ultrasuoni</i>	<i>pag.13</i>
-prove nell'animale da laboratorio	pag.13
-prove in vitro	pag.16
-dati nell'uomo e raccomandazioni internazionali	pag.19
Razionale e scopo dello studio	pag.23
Materiali e metodi	pag.23
Risultati	pag.23
Discussione e conclusioni	pag.24
Appendici e tabelle	pag.27
Elenco delle abbreviazioni	pag.30
Bibliografia	pag.30
Principali linee guida internazionali citate	pag.34

Introduzione

Le strumentazioni ecografiche, per ottenere immagini di strutture anatomiche, sfruttano l'eco di ritorno derivante da un fascio ultrasonoro (US) incidente sui tessuti. Il fascio US è generato da una sonda contenente cristalli piezoelettrici i quali vengono sottoposti ad una differenza di potenziale. Gli US incontrano sul loro cammino varie strutture anatomiche, costituenti ognuna un'interfaccia con differente impedenza acustica. Di conseguenza il fascio US originario viene attenuato per fenomeni di diffrazione, diffusione ed assorbimento per cui solo una parte degli US generati dalla sonda viene riflessa e torna ad essa come eco di ritorno.

I cristalli contenuti nella sonda ecografica generano allora una differenza di potenziale che viene analizzata dal computer dell'ecografo e consente la formazione dell'immagine.

Grazie alla semplicità di trasporto ed utilizzo degli ecografi ed all'assenza di radiazioni ionizzanti, gli US sono da tempo utilizzati per una moltitudine di applicazioni (gastroenterologia, ginecologia, cardiologia ne sono esempi).

In anni recenti l'impiego degli US in diagnostica ha subito un'ulteriore incremento grazie alla riconosciuta utilità anche nell'ambito dell'emergenza ed all'introduzione dei mezzi di contrasto ecografici (m.d.c.). In particolare questi ultimi sono sostanze costituite da microbolle contenenti gas di varia natura con una membrana stabilizzante. La ridotta dimensione delle microbolle (diametro inferiore a quello di un globulo rosso) consente ad esse di raggiungere la circolazione sistemica dopo iniezione in una vena periferica (superando quindi il circolo polmonare), senza rischio di eventi embolici causati dalle bolle stesse. Allo stesso tempo la membrana stabilizzante (di varia natura) consente alla microbolla di persistere per alcuni minuti nel circolo, permettendo quindi un'osservazione delle caratteristiche vascolari delle strutture insonate per un periodo di tempo sufficiente a formulare ipotesi diagnostiche (per esempio nell'ambito della caratterizzazione di lesioni focali epatiche).

Attualmente non sono noti effetti nocivi a lungo termine per l'uomo derivanti dall'utilizzo estensivo degli US in diagnostica.

Tuttavia è provato come gli US siano in grado di determinare riscaldamento e stress meccanico conseguente ad alterazioni pressorie locali. In tal senso vi sono dati sperimentali che indicano bioeffetti a livello di colture cellulari e dell'animale di laboratorio. Di conseguenza rimane alto il livello di attenzione per determinare gli eventuali effetti dannosi dell'utilizzo estensivo degli US nell'uomo e le principali società scientifiche internazionali che si occupano di diagnostica per immagini emanano periodicamente dei suggerimenti per un uso prudente delle metodiche diagnostiche ecografiche.

È necessario anche tener presente come le nuove applicazioni dell'ecografia (uso dei mezzi di contrasto, ecografia polmonare) e l'applicazione ripetuta delle metodiche Doppler durante la gravidanza (in particolare il Doppler pulsato) rendano teoricamente più probabili i bioeffetti e come l'output acustico delle moderne strumentazioni sia potenzialmente maggiore di quello degli ecografi di 10-15 anni addietro.

Terminologia ed interazioni

Principali parametri fisici e strumentali correlati alla sicurezza

Gli ultrasuoni rappresentano una forma di energia meccanica caratterizzata da onde di rarefazione e compressione a propagazione sinusoidale. In ambito clinico, per potere avere cognizione di quale sia l'entità di energia alla quale si stanno sottoponendo i tessuti insonati, è fondamentale potere definire con precisione le condizioni di esposizione (la cui misurazione potremmo definire "dosimetria di emissione") sia dal punto di vista qualitativo (frequenza, ampiezza, focalizzazione) che quantitativo (intensità emessa). Esiste a questo riguardo una folta schiera di termini tecnici dei quali si riportano i principali:

- Ampiezza della pressione acustica (P): entità dell'escursione positiva o negativa della pressione acustica nel mezzo, in fase di compressione (pressione positiva) e rarefazione (pressione negativa) espressa in Pa (Pascal)
- Picco di pressione acustica negativa(=picco di pressione in rarefazione): il massimo valore negativo di pressione acustica
- Potenza acustica di emissione: quantità di energia che passa nell'unità di tempo per l'area di sezione in cui l'onda si propaga
- Intensità: potenza acustica di emissione che attraversa nell'unità di tempo una superficie ortogonale alla direzione di propagazione (Watt/cm² o, in forma logaritmica, dB=decibel). Dato che l'emissione acustica varia da punto a punto e, se pulsata, anche nel tempo vi sono parametri che tengano conto di questo fenomeno, come:
 - Intensità spaziale e temporale media: potenza del fascio US, considerato il valore medio durante tutto il periodo di emissione e ricezione dell'impulso, diviso per l'area del fascio

Attualmente non è chiaro quale parametro correli meglio con la risposta biologica agli US e non è possibile generalizzare le caratteristiche di esposizione dei vari ecografi a causa delle innumerevoli soluzioni tecniche e delle possibili regolazioni che li differenziano. Per una stessa applicazione clinica è infatti possibile disporre di varie regolazioni, con conseguente differente emissione ultrasonora.

Anche nell'ambito di quella che potremmo definire "dosimetria incidente" esistono difficoltà notevoli di quantificazione. Se infatti si vuole valutare la trasmissione di energia in un determinato punto del percorso degli US nel tessuto si deve tenere conto del fatto che il fascio US è sottoposto ad attenuazione mentre attraversa la materia (fenomeno dipendente dalla frequenza e dall'impedenza acustica) ed anche ricordare come nel vivente le interfacce acustiche siano innumerevoli e disposte in modo poco prevedibile e geometricamente irregolare per cui la distribuzione del fascio US risulta anch'essa poco prevedibile. Per risolvere in modo quantomeno parziale queste problematiche vengono utilizzati modelli tessutali che sono però caratterizzati da un coefficiente di attenuazione acustica omogeneo che può sovrastimare o sottostimare l'attenuazione a seconda che nella realtà clinica lo

spessore attraversato sia costituito solo da tessuti molli o da cospicue aree liquide (come accade nel 1°-2° trimestre di gestazione, utilizzando la via transaddominale).

Meccanismi di interazione fra ultrasuoni e tessuti biologici

Durante il passaggio nei tessuti il fascio US subisce una attenuazione (legata a riflessione, rifrazione, diffusione, assorbimento) per cui una parte dell'energia meccanica viene depositata nei tessuti stessi. Tale energia può produrre effetti biologici di due tipi:

- termici
- non termici: cavitazionali e non cavitazionali

Effetti termici

Consistono nella produzione di calore per assorbimento, attraverso la conversione dell'energia meccanica ultrasonora in energia termica.

Per potere stimare quale sarà l'incremento di temperatura per unità di volume ($T = \text{cal/cm}^3/\text{s}$) al passaggio degli US viene utilizzata la seguente formula:

$$T = 0.0055\alpha I$$

Dove I = intensità spaziale e temporale media (W/cm^2); α = coefficiente di assorbimento (dB/cm).

La probabilità che si verifichi un effetto biologico termico è descritta dall'indice termico (IT) che è il rapporto tra potenza acustica (che è la quantità di energia che passa nell'unità di tempo per l'area di sezione in cui si propaga l'onda) in un punto e quella necessaria per produrre in quel punto un incremento di T di 1°C .

Approssimativamente il suo valore è proporzionale all'incremento termico in situ.

In sostanza l'IT indica quale sia il massimo incremento termico atteso in qualsiasi punto del tessuto esposto, misurato in base a modelli tessutali (TIS per i tessuti soffici TIB per l'osso, TIC per l'utilizzo transcranico poiché la sonda è molto vicina all'osso) ed è direttamente proporzionale alla frequenza.

Il valore dell'IT viene automaticamente ricalcolato ed aggiornato sullo schermo al variare delle regolazioni applicate dall'operatore.

Parametri correlati al rischio di rialzo termico

L'incremento locale di temperatura, come riportato negli statements dell'AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine) del 1997, è correlato a:

- sorgente di emissione degli US (frequenza, durata degli impulsi, tempo di esposizione)
- proprietà tessutali (assorbimento, attenuazione, impedenza acustica, circolo ematico, capacità di replicazione cellulare)

Di conseguenza predire l'entità del riscaldamento tessutale è difficile e dipende principalmente dal coefficiente di assorbimento e di conduzione termica dei tessuti, così come dall'entità del raffreddamento locale fornito dalla circolazione ematica.

I reali valori di innalzamento termico in situ risultano quindi differenti da quelli teoricamente previsti.

L'incremento termico risulta inoltre differente in base alla composizione del tessuto insonato, rendendosi minimo nei liquidi e nell'adipe e più marcato nei parenchimi solidi, per raggiungere valori massimi nell'osso (quindi risultano molto sensibili i tessuti fetali adiacenti a strutture ossee).

In considerazione del risultato complessivamente poco prevedibile di tutte queste variabili l'FDA (Food and Drugs Administration) consiglia di mantenere per prudenza i valori massimi di intensità acustica al di sotto di 720 mW/cm^2 .

Le nuove applicazioni con mezzo di contrasto ecografico (m.d.c.) introducono una ulteriore difficoltà nella determinazione del reale incremento termico poiché l'm.d.c. assorbe parte dell'energia US, determinando una attenuazione che può fare sottostimare il rialzo termico basandosi sull'IT. Alcune modalità a basso IM utilizzano più di un impulso lungo ogni linea di scansione. Questo incrementa la sensibilità e la capacità di discriminare fra tessuti e m.d.c. ma aumenta l'intensità media nel tempo degli US rispetto al B-mode. Aumenta così il rischio di riscaldamento. Quindi l'IT rappresentato sullo schermo è maggiore.

Effetti cavitazionali

Si verificano in tessuti contenenti gas: insonando un medium contenente gas, la fase di rarefazione dell'onda acustica può portare al raggiungimento di valori pressori uguali od inferiori a quello della tensione di vapore del liquido, formando così microbolle (=cavità di vapore compressibili).

-cavitazione stabile: il diametro della microbolla subisce oscillazioni cicliche in rapporto alle variazioni pressorie dell'onda acustica. In prossimità delle bolle le forze cinetiche indotte dagli US sono potenziate e la superficie esterna delle bolle presenta differenze di potenziale elettrico che possono indurre ossidazione, riduzione, formazione di radicali liberi.

-cavitazione instabile (o inerziale): una intensità acustica sufficiente può causare un'espansione tale della bolla da indurre la repentina contrazione e rottura, con liberazione violenta di energia cinetica (con conseguente ionizzazione e formazione di radicali liberi nelle strutture vicine).

Per tentare di predire la probabilità che si verifichino fenomeni di cavitazione viene utilizzato l'Indice Meccanico (IM) che è la risultante del rapporto fra il picco di pressione acustica negativa (misurata in MPa) e la radice quadrata della frequenza (misurata in MHz). Esso viene calcolato in riferimento ad un medium equivalente ad un tessuto omogeneo con coefficiente di attenuazione (fattore derating) di $0.3 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-1}$.

Tale coefficiente di attenuazione viene applicato in quanto il valore di IM calcolato in base alle sole misurazioni standard in acqua deve essere corretto per essere meglio rappresentativo di quanto accada nella realtà clinica nella profondità tissutale dove il fascio US viene focalizzato. Viene tenuto conto della distanza fra sonda e punto di misurazione nel tessuto e della frequenza, pertanto il valore del coefficiente di attenuazione riportato è un compromesso dell'attenuazione relativa ai tessuti incontrati nell'ecografia addominale standard ed ostetrica.

L'IM viene visualizzato sullo schermo in tempo reale ed il suo valore è automaticamente aggiornato in base alle variazioni delle regolazioni operate dall'ecografista. Non tutti gli ecografi lo visualizzano nelle immagini archiviate. L'FDA limita l'IM massimo a 1.9 ma i valori rappresentati come uguali sullo schermo dei diversi ecografi non possono essere standardizzati a causa delle differenti caratteristiche costruttive.

L'IM è comunemente utilizzato per descrivere le condizioni di esposizione nell'uso degli m.d.c. come predittore del comportamento delle microbolle ma si deve tenere presente che l'IM è calcolato utilizzando bolle di vapore esposte ad un singolo ciclo di impulsi e non microbolle stabilizzate da membrana esposte a lunghi cicli di impulsi come accade nelle scansioni per l'imaging a basso IM con m.d.c., quindi uno stesso valore di IM non può essere completamente affidabile nel predire il rischio di rottura della membrana delle bolle e la probabilità di cavitazione per tutti gli m.d.c., tutti gli ecografi e tutte le modalità di scansione.

Ricordando quanto detto poco sopra a riguardo del coefficiente di attenuazione da applicare per rendere più aderenti possibili i valori di IM alla realtà clinica, si tenga presente come il m.d.c. introduca una maggiore attenuazione ed inoltre come alcune applicazioni tipiche degli m.d.c. (ecografia transtoracica ed ecocardiografia) siano caratterizzate da un'ulteriore attenuazione dovuta alla peculiare costituzione dei tessuti attraversati.

Un ulteriore fattore da considerare nel calcolo dell'IM è come per frequenze e pressioni diagnostiche sia possibile la propagazione non lineare dell'onda acustica con sua distorsione, generazione di armoniche ed eccessivo assorbimento energetico [1].

In conseguenza di questo evento il valore di picco di pressione negativa, all'incrementarsi del voltaggio applicato al trasduttore e quindi dell'ampiezza dell'impulso in dB, aumenta meno di quel che farebbe in assenza di una distorsione non lineare ed il punto nel tessuto dove si raggiunge tale picco si sposta verso il trasduttore [2].

Di conseguenza il picco di P negativa in situ può essere sottostimato tanto più quanto si aumenta la profondità [3].

Tenendo conto che la misurazione dell'IM viene effettuata con un fattore derating di 0.3 e ad una distanza dal trasduttore abbastanza breve, si calcola che la sottostima del valore di picco di P negativa in situ sia di meno del 20% [4].

Una soluzione proposta per calcolare un valore di picco di P negativa in situ più corretto è l'extrapolazione lineare di misure fatte in acqua ad una ampiezza d'impulso abbastanza bassa da assicurare un propagazione quasi lineare.

Parametri correlati al rischio di cavitazione

Due parametri fondamentali indicano il rischio di cavitazione di un gas non capsulato o di bolle di vapore in un liquido:

-l'ampiezza di picco di P negativa

-la durata della metà del ciclo con P negativa

Il parametro che rappresenta il primo è il picco spaziale-picco temporale di P negativa (p_-) che è la più ampia P negativa che può essere presente nel fascio US in qualunque momento della scansione.

Il parametro che rappresenta il secondo è la frequenza centrale (f_c) dello spettro degli impulsi US. Essa è minore nelle modalità Doppler e nell'imaging a basso IM rispetto al B-mode.

Il p_- può non essere sempre accurato: per esempio un fascio US con ampiezza pressoria sufficiente a causare cavitazione può subire una marcata distorsione della propria onda sinusoidale quando viene valutato in acqua, portando ad una sottostima del p_- reale nel tessuto.

Sono pertanto stati proposti altri indicatori come l'ampiezza della frequenza fondamentale dello spettro d'impulsi [5] od il picco di P positiva [6], quest'ultimo è indicato per i tessuti contenenti gas in quanto il parenchima potrebbe frenare l'espansione del gas e quindi l'evento principale sarebbe il collasso.

Il valore soglia di pressione negativa per la comparsa di cavitazione è minore all'aumentare della durata dell'impulso, del tempo di esposizione e della PRF (Pulse Repetition Frequency) [7] (forse per la produzione di ulteriori bolle o comunque prodotti di cavitazione che influenzano gli effetti del ciclo di impulsi successivo), ed è minore anche in presenza di una bassa viscosità ed un aumento di temperatura (anche indotto dagli US).

Studi teorici [8] e sperimentali [9] hanno dimostrato che il rischio di cavitazione è correlato all'IM e che un valore di $IM > 0.5$ rende possibile la cavitazione inerziale per un singolo ciclo di impulsi in acqua.

Si ricordi comunque che in vivo la determinazione dei valori soglia per cui si possa predire la comparsa di cavitazione viene resa più difficoltosa dalla presenza di fattori che riducono la possibilità di cavitazione, come le forze di coesione fra le componenti tessutali (si oppongono all'espansione della bolla) e le cellule attorno alla bolla (limitano la diffusione gassosa).

Considerando le varie modalità ecografiche selezionabili si rileva come la variazione nel tempo del picco di pressione acustica e la forma dell'onda di un singolo impulso durante un frame completo (costituito da vari impulsi) dipendano appunto dalla modalità ecografia stessa.

In A-mode o M-mode (modalità "non-scanned") vi sono 2-3 cicli per impulso. Dato che sono modalità non-scanned non vi è variazione di picco pressorio fra un impulso e l'altro.

In B-mode gli impulsi sono simili a quelli dell'A-mode ed M-mode ma allo spostarsi del fascio US da un punto all'altro dell'area insonata, in un determinato punto vi potrà essere un valore di pressione pari a zero, così come un aumento ed una riduzione transitoria dell'ampiezza dell'impulso al passaggio del fascio US.

Nell'imaging armonico l'impulso ha una frequenza centrale più bassa rispetto al B-mode ed il trasduttore è in grado di operare sia alla frequenza centrale trasmessa (frequenza fondamentale) sia ad una frequenza doppia della precedente (seconda armonica). L'ampiezza pressoria è solitamente nel range alto di quella utilizzata nel B-mode, per favorire la generazione della seconda armonica durante la propagazione

dell'onda nei tessuti. L'utilizzo di un filtro per silenziare la frequenza fondamentale e per evitare la sovrapposizione tra la frequenza trasmessa e gli echi di ritorno presuppone la trasmissione di impulsi più lunghi e con lunghezze d'onda minori. Nel Doppler con analisi spettrale gli impulsi sono più lunghi (da 3 a 20 cicli), con PRF elevata per ridurre l'aliasing e con una frequenza centrale bassa. L'ampiezza pressoria è minore di quella utilizzata in A-M-B-mode per mantenere l'intensità media nel tempo nei limiti suggeriti dall'FDA.

Nel color Doppler sono trasmessi 8-20 impulsi lungo ogni linea di scansione prima che il fascio US avanzi. Quando il fascio US passa oltre si ha uno smorzamento dell'ampiezza pressoria nel punto iniziale, la quale diviene pressochè zero per il restante frame. Per completare un frame in modalità color Doppler sono necessari tempi più lunghi che per le altre modalità.

Nella modalità a basso IM gli impulsi hanno bassi valori di ampiezza pressoria (0.1 MPa o meno, per valori di IM minori di 1), con $p-$ basso, per ridurre il rischio di rottura delle microbolle. Vi è un minor rischio di cavitazione ma gli impulsi possono essere numerosi e lunghi ed il valore dell'IM può comunque ricadere nel range per il quale si sono osservati effetti in vitro (IM soglia di 0.06 a 1 MHz o IM di 0.12 a 4 MHz). Inoltre la cavitazione instabile in presenza di m.d.c. è stata osservata per valori di $IM=0.2$ [10].

Esempi di imaging con contrasto a basso IM:

- Filtraggio della frequenza emessa tessutale: viene riconosciuto il maggior contenuto di frequenza riflessa come seconda armonica dal m.d.c. rispetto al tessuto. Gli impulsi sono più lunghi rispetto al B-mode.
- Pulse-inversion: anche in tal caso viene discriminata la presenza della seconda armonica riflessa dal m.d.c. Sono trasmessi due brevi impulsi lungo ogni linea di scansione (uno è la versione inversa dell'altro), con bassa ampiezza.
- Pulse sequence imaging: Sono trasmessi 3 o più impulsi a bassa ampiezza lungo ogni scan line, con differenti ampiezze e/o alcuni impulsi invertiti. La discriminazione del segnale fra tessuto ed m.d.c. avviene attraverso segnali non lineari nell'eco fondamentale o tramite il rilevamento di una componente armonica nell'eco.

Le modalità ad alto IM (valori di IM attorno ad 1 o maggiore) sfruttano la rottura delle microbolle, comparando poi l'eco di ritorno prima e dopo tale rottura.

Esempi di imaging con contrasto ad alto IM:

- Loss of correlation: analizza la distribuzione del m.d.c. confrontando l'eco prima e dopo la distruzione del m.d.c. A seconda dell'ecografo vengono trasmessi lungo ogni scan line lunghe sequenze (fino a 10) di lunghi impulsi (3-5 cicli), analogamente a quanto avviene per il color Doppler, o sequenze più brevi (2-4) di brevi impulsi (2-3 cicli).
- Pulse subtraction: vengono utilizzati due impulsi brevi ma di grande ampiezza che distruggono il m.d.c.. L'esposizione in un determinato punto ha brevissima durata.
- Flash: Lungo ogni scan line vengono trasmesse lunghe sequenze (fino a 10) di impulsi a larga ampiezza. Il m.d.c. viene distrutto e si analizza la fase di ripercussione.

Effetti non cavitazionali

Si verificano in tessuti che normalmente non contengono gas:

-forza radiante: è la forza esercitata dagli US sul tessuto. Per effetto di tale forza i tessuti subiscono microspostamenti verso le zone a minor pressione, orientandosi nella stessa direzione dell'onda US. Negli eritrociti (cellule sospese in un fluido) è stato osservato un riarrangiamento spaziale delle strutture cellulari esposte, con loro disposizione a bande parallele distanti tra loro mezza lunghezza d'onda.

-torsione acustica: le strutture cellulari e subcellulari esposte ad US subiscono fenomeni di torsione, rotazione e traslazione per effetto della disomogenea distribuzione dell'energia acustica.

-streaming: le stesse forze determinanti la torsione, causano la formazione di flussi e vortici nei fluidi insonati (con incremento di tale fenomeno in presenza di microbolle). Tale fenomeno potrebbe essere rilevante se si insonano la vescica, i grossi vasi od il liquido amniotico.

Regolazione generale dell'ecografo ed effetti sull'esposizione

- Output power: aumentandolo si incrementa l'ampiezza pressoria.
- Profondità del fuoco: viene regolata per ottenere una buona risoluzione laterale e sensibilità. Incrementando la profondità si approfondirà anche il punto di maggior ampiezza pressoria e comunque l'ampiezza pressoria sarà mediamente incrementata dovunque. Aumenta quindi p_{-} ed il riscaldamento.
- Write-zoom box: ogni punto di un'area relativamente piccola viene insonato per una frazione molto ampia dello stesso frame, con molti impulsi per secondo. Viene incrementata l'intensità media temporale e il riscaldamento. Se il box è profondo aumenta anche p_{-} poiché il fuoco è spostato automaticamente in profondità.
- Doppler pulsato con analisi spettrale: una serie continua d'impulsi viene trasmessa lungo un fascio stazionario di US per un tempo relativamente prolungato. La PRF è alta ed il picco pressorio è generalmente più basso rispetto all'A-B-M mode. L'intensità acustica può eccedere il limite di $1W/cm^2$ suggerito dall'FDA. Oltre al riscaldamento si possono ottenere fenomeni di streaming acustico. Le principali regolazioni sono:
 - Sample volume: allargandolo si incrementa il numero di cicli per impulso e si riduce l'ampiezza dell'impulso. Spesso è impostata una riduzione automatica del voltaggio applicato all'aumentare del volume campione. I maggiori valori di p_{-} saranno raggiunti per volumi campioni minori.
 - PRF: incrementandola si riduce l'ampiezza pressoria. Anche se non dovrebbero esservi notevoli variazioni del p_{-} i costruttori spesso impostano una riduzione automatica del voltaggio applicato all'aumentare della PRF, per mantenere l'intensità media entro i limiti prescritti.
 - Steering: incrementando l'angolazione rispetto alla direzione del flusso si ottiene una riduzione dell'ampiezza pressoria ed un fascio US più ampio, con l'insonazione di ogni punto da parte di più impulsi.

- Color Doppler: una serie d'impulsi viene trasmessa lungo ogni linea del color box. I valori d'intensità acustica sono intermedi fra il Doppler pulsato con analisi spettrale ed il B-mode. Siccome il fascio US scansiona l'intera regione d'interesse, ogni singolo volume del box colore non rischia di essere esposto a valori elevati di intensità acustica per un periodo prolungato. Il range di PRF applicate è simile a quello dell'analisi spettrale. Le principali regolazioni sono:
 - Regolazioni per incrementare la qualità del segnale colore (per rappresentare anche i flussi lenti): viene incrementato il numero di impulsi trasmessi lungo ogni linea di scansione.
 - Steering: incrementando l'angolazione rispetto alla direzione del flusso si ottiene una riduzione dell'ampiezza pressoria ed un fascio US più ampio, con l'insonazione di ogni punto da parte di più impulsi.
 - Dimensione del box colore: riducendolo si incrementa il rischio di sottoporre all'energia acustica per tempi prolungati ogni singolo volume dell'area insonata.
- Modalità 3D: l'esposizione del feto è di durata modesta poiché la gran parte del risultato dell'esame si basa sulla ricostruzione successiva d'immagine. Inoltre sono sottoposte a scansione multiple regioni e quindi la durata dell'esposizione di ogni singolo volume è ridotto. Complessivamente si può ritenere che le condizioni di esposizione acustica siano paragonabili a quelle del B-mode.

Peculiarità d'interazione in presenza di mezzo di contrasto ecografico: effetti in presenza di ampiezze pressorie lievi-moderate ed elevate

AMPIEZZA PRESSORIA APPLICATA LIEVE-MODERATA (la pressione acustica applicata è di ampiezza ridotta e varia in modo sinusoidale nel tempo, con frequenza costante).

Oscillazioni volumetriche lineari: la microbolla si espande e si contrae in risposta agli US con una variazione di ampiezza dipendente dalla frequenza incidente e la frequenza dell'eco di ritorno è analoga a quella degli US incidenti. In particolare tale variazione di ampiezza è massima se la frequenza corrisponde a quella di risonanza, la quale è inversamente proporzionale al raggio iniziale della bolla. La frequenza di risonanza dipende dalle proprietà elastiche del gas e della membrana, dalla densità del medium circostante e dalla tensione superficiale all'interfaccia liquido-gas. Un altro parametro che influenza il valore della frequenza di risonanza è il coefficiente di smorzamento che dipende anch'esso dalle proprietà elastiche della membrana.

All'aumentare di tale coefficiente la risposta di risonanza si riduce progressivamente. Quando la variazione di ampiezza è piccola in relazione al raggio iniziale della bolla, la risposta meccanica della bolla produce ulteriori US che hanno la medesima frequenza degli US incidenti, con ampiezza pressoria proporzionale a quella degli US incidenti. L'ampiezza pressoria dell'eco di ritorno dalle microbolle è maggiore di quella dell'eco proveniente dai globuli rossi e questo consente di discriminare il segnale emesso dal m.d.c.

Conversione dell'energia meccanica: la microbolla vibrando estrae parte dell'energia meccanica degli US incidenti, producendo in minima parte altra energia meccanica come eco di ritorno (scattering), mentre la maggior parte dell'energia incidente viene convertita in energia termica. L'estrazione di energia incidente da parte della microbolla in vibrazione è direttamente proporzionale al raggio della bolla a riposo ed alla intensità degli US, mentre è inversamente proporzionale alla frequenza incidente ed al coefficiente di smorzamento.

L'intensità del fascio US che attraversa una sospensione di microbolle di m.d.c. decresce a causa dell'estrazione di energia operata dalle bolle in vibrazione. Tale attenuazione, espressa dal coefficiente di attenuazione, dipende in primo luogo dalla concentrazione delle microbolle ed è tendenzialmente elevato per gli m.d.c. rispetto all'attenuazione nei tessuti soffici. Nell'ambito dell'attenuazione totale una componente importante è determinata dal coefficiente di assorbimento che determina la quota di energia meccanica convertita in energia termica. Il rapporto fra il coefficiente di assorbimento e quello di attenuazione è di poco inferiore ad uno, confermando che la gran parte della energia degli US incidenti è convertita in energia termica con riscaldamento del medium. La temperatura raggiunta dipende dal tempo di esposizione, dalla distribuzione spaziale del fascio US e dalle proprietà di trasporto termico del tessuto insonato.

Forza radiante: è la forza esercitata dal fascio US incidente sulla microbolla. Essa è diretta nella stessa direzione degli US. Quando la concentrazione del m.d.c. è sufficientemente elevata il movimento delle microbolle in risposta agli US è apprezzabile anche per un uso diagnostico degli US [11]. Il movimento della microbolla sottopone le cellule vicine ad uno stress meccanico che le può danneggiare [12]. Se si applica un campo di US nella porzione laterale di un vaso in cui stia scorrendo sangue con m.d.c., la forza radiante tende a sospingere le microbolle verso la porzione laterale del lume e possono crearsi interazioni meccaniche con l'endotelio [13]. Le microbolle di m.d.c. in vibrazione possono attrarre su di loro le microparticelle biologiche vicine [14]. L'entità e la direzione della forza radiante agente sulla microbolla dipendono dalla sua dimensione relativamente a quella di risonanza. Se tale dimensione corrisponde a quella di risonanza allora la forza radiante è zero. Se la dimensione è minore, le bolle tenderanno a raggrupparsi per ampiezza pressoria massima mentre se la dimensione è maggiore tenderanno a raggrupparsi per ampiezza pressoria minima.

Se vibrano contemporaneamente più m.d.c., la forza radiante che si sviluppa fra due diverse microbolle può essere attrattiva se entrambe hanno dimensione minore di quella di risonanza. L'ampiezza pressoria applicata sarà grande (per fare aggregare bolle con diametro inferiore a quello di risonanza) e quindi potranno aversi effetti meccanici sulle cellule che la bolla in vibrazione incontra sul proprio percorso.

Streaming: quando si espone un fluido ad un fascio US, ogni volume elementare del fluido è sottoposto a forze che determinano la formazione di vortici che creano stress viscoso alle strutture vicine. La velocità massima di tali vortici è proporzionale al coefficiente di attenuazione del medium ed è verosimile che in presenza di m.d.c. (che determina un incremento dell'attenuazione) i fenomeni di streaming siano

accentuati. È stato riportato danno cellulare associato allo stress viscoso nel caso di sospensioni di cellule [15] e che i moti convettivi correlati ai vortici consentono di raffreddare particelle precedentemente riscaldate [16]. Se una sospensione di cellule, in presenza di m.d.c., viene sottoposta ad una fascio di US, gli effetti biologici si verificano per ampiezza pressorie minori che in assenza di m.d.c. e sono almeno in parte attribuibili allo streaming [17].

AMPIEZZA PRESSORIA APPLICATA ELEVATA

Distruzione del rivestimento della microbolla: quando la parete della microbolla viene distrutta dalle sollecitazioni meccaniche a cui la sottopongono gli US il gas in essa contenuto fuoriesce e forma bolle libere. È stato osservato [18] come l'esposizione di Quantison® (che è composto da aria con una parete di albumina) a 10 cicli di US (1.6 MPa e 0.5 MHz) sia seguito da un incremento dello scattering che poi scompare entro 30 secondi. Tale scattering precoce è dovuto al gas libero fuoriuscito dalle bolle distrutte che poi si è disciolto nel medium.

È stato dimostrato [19] che la microbolla è sottoposta ad uno stress meccanico in grado di danneggiarla già utilizzando ampiezze pressorie di poche centinaia di kPa. Una teoria datata [20], ma confermata da studi recenti, ipotizza che la superficie di una bolla divenga instabile dopo una iniziale espansione se il raggio che si ottiene nella successiva contrazione è tale da fare in modo che il rapporto “raggio in contrazione/raggio massimo in espansione” sia 0.1 o meno. Esponendo le microbolla ad un singolo impulso costituito da un ciclo in una sequenza espansione-compressione (picco di P negativa 800 kPa, frequenza 2.25 MHz) si verifica la frammentazione quando il rapporto fra raggio massimo in espansione e raggio a riposo è 3 o maggiore. Esponendo le microbolla alla stessa frequenza ma ad un impulso costituito da due cicli si osserva come il valore di raggio per cui si crea instabilità sia maggiore del diametro a riposo, come aumenti in modo lineare alla pressione applicata e sia inversamente proporzionale alla frequenza. La frammentazione inoltre avviene più frequentemente se la prima metà del ciclo è di espansione.

Emissione di armoniche e subarmoniche: applicando elevate ampiezze pressorie la vibrazione della microbolla diviene non lineare. Pertanto l'eco di ritorno comprende frequenze multiple di quella incidente (armoniche) e frequenze che rappresentano frazioni di quella incidente (subarmoniche). La presenza di armoniche ad alta frequenza può essere considerata segno di probabile cavitazione instabile [21].

Crescita dimensionale della microbolla: questo fenomeno può avvenire in due modi. Grazie alla forza radiante due bolle di m.d.c. di diametro minore di quello di risonanza possono avvicinarsi talmente da fondersi. In secondo luogo una bolla di gas libero, oscillando, presenta una fuoriuscita di gas nel momento della contrazione ed un ritorno di gas in espansione: se vi è una quantità sufficiente di gas nel fluido circostante e viene applicata un'ampiezza pressoria abbastanza elevata la quantità di gas in entrata nella bolla può divenire maggiore di quello in uscita.

Riscaldamento del medium: questo fenomeno, presente anche in assenza di m.d.c., è incrementato dalla presenza delle microbolle [22]. Tale fenomeno è osservato anche in vivo poiché nel rene di topo esterorizzato [23] in presenza di Optison® e di US a 3.2 MHz si può osservare un raddoppio di breve durata della temperatura.

Cavitazione instabile: può verificarsi per frequenze simili a quelle diagnostiche (1-10 MHz) quando la dimensione della microbolla sia analoga o minore di quella di risonanza, con ampiezza pressoria applicata 0.2 MPa o maggiore. Il collasso della bolla che si verifica dopo la sua espansione (con diametro massimo raggiunto doppio o maggiore rispetto a quello iniziale) può essere simmetrico od asimmetrico. Nel collasso simmetrico si crea un'alta pressione all'interno della microbolla così come un elevato gradiente pressorio con l'esterno e si può riscontrare anche un rialzo termico. Si creano inoltre molecole sonochimiche altamente reattive che, in presenza di sospensioni cellulari, possono danneggiare il DNA. Si osserva inoltre che se il gas contenuto nella bolla presenta una grande capacità di assorbire calore (come i perfluorocarburi) la produzione di reattivi sonochimici è ridotta [24]. Il collasso asimmetrico si verifica quando la microbolla si trova vicino ad una struttura solida o semisolida (anche cellule). In tal caso il liquido circostante penetra nella bolla in modo non uniforme e si crea un flusso liquido locale ad alta energia cinetica che può danneggiare le cellule [25].

Evidenze disponibili sugli effetti biologici degli ultrasuoni

Prove nell'animale da laboratorio

I bioeffetti correlati all'esposizione agli US sono dovuti sia all'effetto termico sia a quello cavitazionale. Se le condizioni di esposizione sono tali da potere considerare trascurabili quelli termici allora nei tessuti liberi dal gas i bioeffetti sono minimi, mentre la presenza di microbolle di m.d.c. favorisce la formazione di nuclei di cavitazione, rendendo così suscettibili al danno da US anche tali tessuti.

EMOLISI

Il cuore murino [26] è stato esposto, attraverso la parete toracica, ad un fascio US pulsato (PRF=100 Hz) per 5 minuti ad una frequenza di 1.15 o 2.35 MHz. Alla frequenza di 1.15 MHz il picco di pressione negativa calcolato alla superficie del cuore variava da 1.38 a 3.6 MPa. Alla frequenza di 2.35 MHz il valore era unicamente di 4.4 MPa. Nei controlli è stata somministrata e.v. soluzione salina oppure nulla (questi ultimi non sono stati sottoposti al fascio US) mentre negli altri animali 4 boli di Alburnex™ (volume totale 0.1 ml). Gli animali sono stati poi sacrificati ed il sangue è stato raccolto mediante puntura cardiaca, per valutare il grado di emolisi. Per esposizione a 1.15 MHz e 3.6 MPa la percentuale di emolisi è risultata comparabile negli animali che avevano ricevuto soluzione salina e in quelli non infusi e non sottoposti ad US. Questo indica che in vivo, in assenza di m.d.c., l'esposizione ad US anche ad un picco pressorio negativo elevato non induce in

pratica emolisi. Negli animali che hanno ricevuto m.d.c. l'esposizione ad US con frequenza >1.15 MHz ha portato ad un incremento della percentuale di emolisi, con un valore del 4% per le condizioni di esposizioni maggiori. In particolare a tale frequenza il valore soglia di picco di pressione negativa alla superficie cardiaca per la comparsa di emolisi è risultato 1.9 MPa. Si deduce che in presenza di m.d.c. in vivo l'emolisi indotta da US è possibile per applicazioni diagnostiche ma il valore soglia di frequenza relativamente elevato (1.15 MHz), associato alla forte dipendenza del valore soglia dalla frequenza, induce a ritenere che la percentuale di emolisi per la maggior parte delle esposizioni diagnostiche sia bassa.

DANNO MICROVASCOLARE

Infondendo 10 ml/kg di Albunex™ [27] ed esponendo il topo ad US continui o pulsati a frequenza di 1.09 MHz si osserva come per esposizione continua (100 sec) la presenza di petecchie intestinali sia incrementata in presenza di m.d.c. Per tali condizioni di esposizione si ritiene che i meccanismi termici giochino un ruolo importante nel determinare il danno. Per esposizione pulsata (100 sec) l'incremento del numero di petecchie nei confronti dei controlli è di 30 volte. Il numero delle petecchie aumenta (ed il valore soglia di picco pressorio diminuisce) con l'aumentare della dose di m.d.c. e con l'incremento della durata dell'impulso. Il valore soglia di picco pressorio per la comparsa di petecchie è 0.8 MPa mentre per l'emorragia è 2.4 MPa.

La valutazione della formazione di petecchie intestinali è stata effettuata anche comparando 4 m.d.c. contenenti sia aria sia perfluorocarburi [28]. Applicando US pulsati (PRF=1kHz) il valore soglia di picco pressorio per la comparsa di petecchie è risultato 0.85 MPa, 1.2 MPa, 3 MPa per frequenze rispettivamente di 0.4 MHz, 1.09 MHz, 2.4 MHz, valori vicini ai limiti dei comuni ecografi. Gli m.d.c. contenenti perfluorocarburi sembrano favorire maggiormente la formazione di petecchie, per valori soglia di picco pressorio minori.

Insonando il muscolo di ratto in presenza di Optison™ (0.24 ml) con modalità di imaging armonico a 2.3 MHz in trasmissione e 4.6 MHz in ricezione [29], con un singolo frame ed IM compreso fra 0.4 a 1, la rottura capillare nel muscolo è stata rilevata unicamente in presenza di m.d.c. ed il numero di capillari danneggiati è incrementato con l'aumentare dell'IM.

Questi dati sono stati confermati da uno studio più recente [30] nel quale è stato utilizzato Optison™ (da 0.05 a 5 ml/kg) ed è stata ricercata la presenza di petecchie intestinali e muscolari utilizzando US ad 2.5 MHz per tempi di 10 sec in scansione e 10 sec in ricezione. Il numero di petecchie è aumentato con l'incremento della dose e dell'ampiezza pressoria. Inoltre il numero di petecchie è circa uguale sia che si esegua una singola scansione sia che se ne eseguano numerose: questo indica che il danno da cavitazione è precoce.

Il danno endoteliale nel mesentere di topo è stato osservato in presenza di Levovist™ con US in modalità armonica a 1.8 MHz ed IM 1.6. Il danno endoteliale è stato

dimostrato unicamente negli animali infusi con m.d.c. ed i capillari si sono dimostrati più sensibili delle venule [31].

Nel rene di ratto [32] è stato ricercato il danno vascolare per esposizione ad US continui (30 Hz) o pulsati (1 Hz) con frequenze da 1.8 a 6 MHz ed IM da 0.4 a 1.6. Sono stati testati vari m.d.c. contenenti tutti perfluorocarburi ma con pareti stabilizzanti di diversa composizione. Sono state rilevate petecchie ed emorragie con stravaso nello spazio glomerulare e nei tubuli contorti prossimali. L'imaging intermittente e le frequenze minori si sono dimostrate più dannose dell'imaging continuo, con un danno vascolare significativo osservato per 1.8 MHz ed IM maggiore di 0.8 (picco di pressione negativa 1.26 MPa). Il danno era presente dopo 15 sec di esposizione, incrementando con il tempo. La composizione della parete del m.d.c. non si è dimostrata in grado di influenzare l'entità del danno.

A livello del polmone di ratto [33] sono stati applicati per 5 minuti US pulsati (PRF=100) ad 1.2 MHz con un picco di pressione positiva di 2 MPa, che è una condizione di esposizione pressoria, per tale frequenza, due volte maggiore al limite per indurre emorragie polmonari tramite US in assenza di m.d.c.

L'area di danno vascolare sulla superficie polmonare nei topi infusi con m.d.c. non è risultata diversa da quella presente nei topi infusi con soluzione salina, indicando come la cavitazione instabile correlata al m.d.c. non sia il meccanismo di danno prevalente nel polmone.

La barriera ematoencefalica (BEE) di ratto è stata indagata [34] per valutare le modificazioni di permeabilità dopo infusione di Optison™ (0.05 ml/kg) in una vena auricolare ed applicazione di US pulsati con frequenza di 1.63 MHz (PRF=1 Hz; ampiezza pressoria da 0 a 5 MPa) per un tempo totale di 20 sec. L'analisi dell'encefalo con Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) ha mostrato un incremento di permeabilità della BEE negli animali infusi con m.d.c., con persistenza di tale fenomeno fino a 6 ore dall'infusione ed un successivo declino fino al ritorno ad una permeabilità normale. L'analisi istologica ha evidenziato un danno encefalico ed uno stravaso ematico nel 70% degli animali esposti a 5 MPa e nel 25% di quelli esposti a 2-3 MPa.

Normalmente la litotrissia induce scarso danno tessutale in assenza di gas. In presenza di Alunex™ [35] ed US con picco di pressione positiva di 2 MPa (relativamente bassa) è stato rilevato un minimo danno negli animali non infusi (polmone, intestino), mentre in quelli infusi con m.d.c. sono state osservate estese emorragie nel muscolo, grasso, mesentere, intestino, rene, vescica, stomaco, vescicole seminali. Se ne deduce che il m.d.c. funge da nucleo di cavitazione anche per pressioni applicate inferiori a quelle utilizzate nella pratica clinica.

E' stato anche indagato per quanto tempo il m.d.c. fornisca nuclei di cavitazione [36], iniettando una singola dose di Alunex™ (0.1 ml) e sottoponendo il topo a litotrissia (200 impulsi a 2 MPa) a distanza di tempo dall'iniezione variabile fra 5 minuti e 24 ore. In tali condizioni il danno in vari tessuti è stato rilevato fino a 4 ore dall'iniezione, mentre applicando una pressione vicina a quella realmente utilizzata nella pratica clinica (60 MPa) il danno era presente fino a 6 ore. Effettuando la

litotrissia dopo 24 ore non è stato evidenziato danno neppure a queste pressioni. Quindi dopo che il m.d.c. iniettato è diventato non efficiente dal punto di vista dell'imaging (pochi minuti), esso fornisce per molte ore nuclei di cavitazione (piccole bolle stabilizzate ed aria intrappolata in frammenti di albumina) che favoriscono il danno tessutale da cavitazione.

EFFETTI CARDIACI

Gli US sono in grado di produrre effetti sul ritmo cardiaco anche in assenza di m.d.c. Un singolo impulso ad alta intensità applicato durante la diastole favorisce le contrazioni ventricolari premature (CVP) nel topo [37], mentre se l'impulso è applicato durante la sistole si riduce la pressione aortica [38]. Per esposizione ad US con frequenza 1.2 MHz con un burst singolo di 5 ms, il valore soglia per la comparsa di CVP nel topo è 2 MPa e tale fenomeno è più frequente all'aumentare della durata dell'impulso ed al ridursi della frequenza.

In presenza di m.d.c. [39] si riduce tale valore soglia. In particolare utilizzando US pulsati ad 1.2 MHz per 5 ms esso diviene 0.25 MPa. Per una durata d'impulso di 10 μ s il valore diviene 1 MPa.

Utilizzando US ad 1.7 MHz [40] non sono state rilevate CVP né petecchie miocardiche nei topi non infusi mentre esse comparivano in presenza di m.d.c., con un valore soglia di 1 MPa per la comparsa di CVP e di 0.5 MPa per la comparsa di danno microvascolare. Il trigger endosistolico, l'incremento dell'ampiezza pressoria e della dose di m.d.c. rendono maggiore lo sviluppo sia di CVP che di petecchie miocardiche.

Prove in vitro

Gli effetti del contatto fra cellule ed m.d.c. in presenza di US sembrano dipendere in gran parte dal valore del picco di pressione negativa e sono correlati allo stress meccanico (dovuto all'attività pulsatile delle microbolle indotta dagli US) e, per ampiezze pressorie maggiori, alla cavitazione instabile. Gli studi in vitro si avvalgono sostanzialmente di due modelli: il monostrato cellulare e la sospensione cellulare. Nel caso del monostrato cellulare una porzione della superficie cellulare entra in contatto con il m.d.c., subendo gli effetti del microstreaming (generazione di flusso nel fluido extracellulare con conseguente stress meccanico di membrana). Vi sono dati che indicano come lo stress meccanico correlato al microstreaming (e quindi all'attività pulsatile della microbolla) possa danneggiare la membrana cellulare per valori di ampiezza pressoria inferiori a quelli necessari per indurre cavitazione instabile [41]. Nell'ambito delle sospensioni cellulari (viene utilizzato solitamente il sangue intero) un dato importante sembra essere il rapporto fra la concentrazione cellulare e quella del m.d.c. per cui gli effetti cellulari incrementano in modo inverso alla terza potenza della distanza media cellula-microbolla [42]. La cavitazione instabile induce la produzione di radicali liberi con sviluppo di perossido di idrogeno e danno genomico [43]. Inoltre si riscontra la sonoporazione della membrana cellulare (transitorio incremento della permeabilità di membrana) [44].

SOSPENSIONI CELLULARI

La cavitazione instabile si riduce all'aumentare dell'ematocrito [45] ma applicando ampiezze pressorie relativamente elevate questa relazione si riduce. Infatti se si applicano US continui alla frequenza di 1 MHz con picco di ampiezza pressoria negativa di 0.4 MPa si rileva un sostanziale riduzione della cavitazione instabile aumentando l'ematocrito al di sopra del 10%, mentre utilizzando US pulsati con analoga frequenza e con picco di pressione negativa 2.7 MPa la frazione di cellule lisate decresce all'aumentare dell'ematocrito ma il numero di cellule lisate è pressoché costante [46]. Di conseguenza l'aumento dell'ematocrito non limita in senso assoluto la lisi cellulare, la quale può addirittura incrementare se all'aumento del numero delle cellule corrisponde un incremento della concentrazione di m.d.c. Pertanto assume maggiore importanza il rapporto fra ematocrito e concentrazione del m.d.c. Con l'uso di US pulsati si rileva [47] come per un dato picco di pressione negativa (al di sopra del valore soglia per la comparsa di cavitazione) si abbia una riduzione dell'emolisi all'aumentare della frequenza, mentre non abbia molta importanza in tal senso la durata ed il numero degli impulsi (a patto che il rapporto fra tempo totale e numero d'impulsi sia costante). La dimensione cellulare influenza la facilità con cui si genera emolisi, con maggiore sensibilità da parte delle cellule con dimensione maggiore, come nel caso di eritrociti adulti rispetto a quelli fetali [48]. La composizione della microbolla può influenzare il tasso di emolisi, dato che gli m.d.c. contenenti perfluorocarburi (Optison™), confrontati con quelli contenuti aria (Albunex™) dimostrano di favorirla [49], per cui alle stesse condizioni di esposizione si rileva come il valore soglia di picco di pressione negativa per la comparsa di emolisi si riduca in presenza di Optison™. La verosimile spiegazione è che questo tipo di gas si dissolva meno rapidamente nel medium circostante, consentendo la permanenza di nuclei di cavitazione anche dopo la rottura della microbolla. Al tempo stesso l'incremento della durata dell'impulso causa un lieve aumento dell'emolisi nel caso dell'Albunex™, a causa della più rapida distruzione delle microbolle.

MONOSTRATO CELLULARE

Una caratteristica importante di questo modello è l'adesione fra cellule e substrato, che può venire ridotta dalla presenza di m.d.c. ed US. Applicando US pulsati (PRF=500) perpendicolarmente ad un monostrato endoteliale [50] si rileva come il distacco cellulare sia più marcato con l'incremento dell'ampiezza pressoria e la riduzione della frequenza (andando da un valore soglia di 0.5 MPa per 1 MHz a 1 MPa per 3.5 MHz). In un monostrato di cellule epiteliali [51] l'applicazione di US in analisi spettrale Doppler determina valori soglia per la comparsa rispettivamente di sonoporazione e morte cellulare di 0.15 MPa e 0.23 MPa. Se ne deduce che i valori soglia per la comparsa di bioeffetti nel modello del monostrato cellulare siano minori di quelli rilevati nel modello della sospensione cellulare. La sonoporazione consente di transfettare le cellule con materiale genetico, come richiesto dalle terapie geniche. Anche questo fenomeno risulta più evidente all'incrementarsi dell'ampiezza pressoria

[52] e la cavitazione favorirebbe l'incremento della permeabilità di membrana [53]. Analizzando il tasso di transfezione in un monostrato di cellule epidermiche in presenza di Optison™ ed US a 1.5 MHz si rileva come la presenza delle microbolle favorisca la penetrazione del materiale genetico nella cellula, ma si ritiene che il tasso di morte cellulare indotto dai danni cavitazionali possa rendere meno applicabile del previsto tale metodica in terapia genica.

FAGOCITOSI DELLE MICROBOLLE

Le cellule deputate alla fagocitosi possono interiorizzare le microbolle di m.d.c. Questo rende tali cellule più sensibili ai bioeffetti dovuti all'attività acustica che le microbolle mantengono anche se fagocitate [54]. Sottoponendo in vitro un m.d.c. (MP1950®), sia libero nel medium sia fagocitato da neutrofilo, ad uno o tre cicli di impulsi (2.25 MHz; 600 kPa) [55] si osserva come la massima espansione delle bolle sia maggiore (5 µm) per quelle libere che per quelle fagocitate (3.5 µm), verosimilmente in relazione alla maggiore viscosità del citoplasma cellulare rispetto all'ambiente extracellulare. In particolare tale differenza di espansione si rileva se gli impulsi sono brevi. Aumentando la massima ampiezza della pressione negativa a 0.9 MPa e poi a 1.6 MPa si verifica prima un'espansione della bolla fagocitata fino ad un volume molto vicino a quello del citoplasma cellulare e poi una espansione tale da lisare la cellula stessa. Se un monostrato di macrofagi che hanno fagocitato Optison® sono sottoposti in vitro ad US pulsati con 4.5 MHz e con picco di pressione negativa prima di 0.73 MPa e poi ad 1.1 MPa si rileva prima un'alterazione della permeabilità di membrana poi la lisi cellulare. L'analisi di microfotografie mostra come una singola cellula venga distrutta da una bolla fagocitata. La modalità Doppler risulta più efficace del B-mode nell'indurre il danno cellulare in presenza di m.d.c., a parità di picco di pressione negativa. Confrontando gli effetti dell'esposizione ad US continui o pulsati su un monostrato di cellule macrofagiche in presenza di Optison™ si evidenzia come il valore soglia di picco di pressione negativa per la comparsa di morte cellulare sia minore per l'esposizione continua (per una esposizione di 60 sec i valori sono rispettivamente di 0.05 MPa per US continui e 0.21 MPa per US pulsati). Si rileva comunque come anche i valori soglia in presenza di US pulsati siano sostanzialmente minori di quelli necessari per indurre cavitazione, suggerendo come il meccanismo scatenante il danno cellulare sia in prima istanza lo stress meccanico al confine fra cellula e m.d.c. Attualmente non è chiaro quale sia il preciso meccanismo di danno cellulare in presenza di m.d.c. fagocitato ma bisogna considerare come tale fenomeno sia potenzialmente importante dato che la fagocitosi del m.d.c. si verifica anche nell'uso diagnostico degli US.

Dati nell'uomo e raccomandazioni internazionali

Notevole interesse riveste l'esecuzione di esami in gravidanza, dato il diffuso utilizzo degli US in epoca gestazionale molto precoce, quando il feto è in generale più suscettibile agli insulti di qualsiasi genere.

I primi dati epidemiologici disponibili sugli effetti post-natali dell'esposizione fetale ad US (Ziskin, 1972) risalgono agli anni '70 e sono ricavati da questionari. Essi riguardano ampie casistiche (fino a 340000 soggetti) di soggetti in età pediatrica, seguiti però per pochi mesi dopo il parto. Tali casistiche escluderebbero tuttavia effetti negativi a breve termine. Altri studi (Bernstein, 1969; Koranyi, 1972) nei quali è stata considerata anche l'esposizione a Doppler continuo non hanno evidenziato ad 1 anno di età alcuna alterazione neurologica né dello sviluppo corporeo e mentale. Due analisi retrospettive di un'ampia casistica (2135 gravidanze non gemellari, esaminati o non esaminati in utero con US) ha portato a risultati discordanti: una prima valutazione dei dati (Moore, 1982) ha evidenziato una lieve riduzione, statisticamente significativa, del peso alla nascita nei neonati esposti. Una seconda analisi dei dati (Stark, 1984) non ha invece rilevato differenze di peso corporeo alla nascita né alterazioni di vari parametri corporei, neurologici, psicologici a 7 e a 12 anni. Tuttavia è stato riscontrato un lieve incremento dell'incidenza di dislessia a 7-12 anni negli esposti. Una conferma di questi dati è stata ricercata in un'ampia recente casistica (Salvesen, 1992): 2011 soggetti di 8-9 anni esposti e non esposti ad US in utero. Non è stato confermato l'incremento d'incidenza di dislessia. Un altro studio (Newnham 2004) ha riguardato il confronto fra soggetti esposti in utero a 5 ecografie+1 flussimetria Doppler e soggetti esposti ad una sola ecografia e non sono state riscontrate alterazioni del peso corporeo né dello sviluppo psicomotorio o neurologico ad 1 ed 8 anni di età.

Nel 2005 l'AIUM ha affermato che non sono attualmente dimostrati effetti dannosi a lungo termine correlati all'esposizione fetale ad US, in particolare non sono stati riscontrati effetti teratogeni né alterazioni dello sviluppo neuro-psico-motorio. Alcuni studi hanno riportato un incremento dell'incidenza di mancinità o basso peso alla nascita, in particolare per frequenti esposizioni allo studio Doppler, ma questi dati non sono stati confermati in altre casistiche. Inoltre è necessario considerare come molte indagini epidemiologiche disponibili siano antecedenti al 1992, anno in cui i limiti di esposizione acustica per le applicazioni fetali/ostetriche sono stati modificati in maniera sostanziale.

Attualmente sono disponibili varie linee guida sulla sicurezza per l'ecografia fetale (quelle del BMUS, British Medical Ultrasound Society, e del ISUOG, International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, ne sono esempi).

Gli effetti termici sono potenzialmente rischiosi in 3 casi:

- l'embrione di meno di 8 settimane (tessuti embrionali più lassi ed immersi in ambiente liquido)
- il cervello ed il midollo spinale del feto e del neonato
- l'occhio (in un soggetto di qualsiasi età, per l'assenza di una vascolarizzazione che raffreddi i tessuti)

Fra le varie applicazioni quelle Doppler risultano più efficaci nel produrre bioeffetti termici, in particolare il Doppler pulsato con analisi spettrale dato che vengono utilizzate intensità elevate e prolungati tempi di insonazione all'interno del limitato spazio del volume-campione. Particolare attenzione viene posta all'analisi degli effetti che il riscaldamento può avere sull'encefalo fetale, dato che il rialzo termico aumenta con l'età gestazionale, per la progressiva ossificazione del cranio (la mineralizzazione delle ossa fetali inizia verso la 10°-12° settimana). È noto come la vascolarizzazione encefalica abbia scarso effetto di raffreddamento ed è dimostrato come un danno irreversibile all'encefalo fetale sia determinato certamente per un valore soglia di rialzo termico pari a 4 °C per 5 minuti. L'utilizzo prolungato del Doppler pulsato con analisi spettrale su tessuti soffici adiacenti a strutture ossificate può indurre un rialzo termico maggiore di tale valore, mentre il B-mode non induce incrementi termici maggiori di 1,5 °C, valore che è considerato assolutamente sicuro nell'utilizzo fetale, anche se mantenuto per tempi indefiniti.

Casi particolari in cui porre ancora maggiore attenzione agli effetti termici sono:

- l'utilizzo delle sonde endocavitarie, in cui il riscaldamento della sonda stessa diviene significativo per i tessuti adiacenti

- la presenza di una gestante febbrile. La temperatura fetale è infatti normalmente maggiore di quella materna di 0,5 °C e quindi l'iperpiressia materna rende difficile sapere qual sia la reale temperatura corporea del feto prima dell'esposizione agli US

- un ridotto grado di attenuazione da parte dei tessuti materni, come nel caso del primo trimestre quando si insona il feto unicamente attraverso la vescica materna piena o per via transvaginale.

In base all'epoca gestazionale si preferisce monitorare il TIS od il TIB. In particolare nelle prime 8 settimane (quando l'ossificazione non è ancora iniziata) si monitorizza il TIS poiché vengono insonati unicamente tessuti soffici, mentre nelle altre epoche si utilizza il TIB dato che esso è solitamente un poco più elevato del TIS e quindi fornisce un margine di sicurezza che consente all'operatore di non monitorare due parametri durante l'esame.

Considerando invece il tipo di tessuto insonato è raccomandato monitorare il TIS nel caso del bulbo oculare, mantenendolo a valori <1, mentre per tutti gli altri tessuti è sufficiente monitorare il TIB.

Sono disponibili tabelle che indicano quale sia il massimo tempo di esposizione consigliato per i tessuti fetali in base all'IT ed in particolare per IT=0,7 il valore massimo è 60 minuti mentre per IT=2,5 è 1 minuto. È sconsigliato esporre tali tessuti ad IT>3 per qualsiasi tempo.

Se l'ecografo consente di visualizzare in tempo reale l'IT si cercherà di mantenere il valore <0,5 altrimenti si utilizzerà come guida il valore di rialzo termico derivante dal "worst case scenario", che rappresenta l'innalzamento termico che si rileva in condizioni sperimentali con trasduttore e bersaglio immobili e con minima dispersione di calore. Tale "Tmax" deve essere <1 °C.

I valori di IT raccomandati sono prudenziali anche tenendo presente che l'IT può sottostimare il reale incremento termico fino ad un fattore di 2. Di conseguenza un

valore di IT di 1 corrisponde ad una elevazione di temperatura di “worst case scenario” pari a 2 °C.

In quanto all'IM è suggerito di mantenere il valore $<0,3$, dato che per valori maggiori sono stati riportati danni vascolari non termici in tessuti di mammiferi contenenti gas (polmone ed intestino). Per valori di IM compresi fra 0,3 e 0,7 si consiglia di ridurre al minimo il tempo di esposizione, mentre per valori $>0,7$ il rischio di cavitazione diviene consistente anche in assenza di m.d.c.

Alla luce di tutto questo si comprende come l'AIUM scoraggi l'esecuzione di indagini ecografiche fetali al solo scopo di produrre immagini “souvenir” per i genitori in quanto essa afferma che nonostante l'impiego degli US sia considerato sicuro, l'energia meccanica ultrasonora ha la potenzialità di produrre bioeffetti ed essi sono più probabili per esposizioni prolungate e per un uso esagerato del Doppler pulsato (già nel 1997 l'AIUM poneva l'attenzione sul fatto che i tessuti fetali fossero più sensibili ai danni da incremento termico rispetto a quelli adulti).

Per quanto riguarda i dati sui possibili bioeffetti nei soggetti adulti sono disponibili alcune evidenze, soprattutto per quel che concerne gli m.d.c.

Per studiare le alterazioni della permeabilità della BEE nell'adulto in presenza di m.d.c. [56] sette volontari sani maschi sono stati infusi con Levovist™ (10 ml) od Optison™ (3 ml) e sottoposti ad US transcranici con color duplex da 2 a 3.5 MHz per 3 minuti (IM=1.9; ampiezza pressoria=2.7 MPa). L'analisi successiva con RMN cerebrale non ha evidenziato alterazioni della permeabilità della BEE.

In ecocardiografia con imaging armonico, la somministrazione a volontari sani di un m.d.c. (AIP 101) composto da aria stabilizzata da albumina [57], alla frequenza fondamentale 1.66 MHz, ha favorito la comparsa di CVP. In particolare il trigger endosistolico con IM=1.5 in presenza di m.d.c. ha favorito tale fenomeno, ma non il trigger con IM=1.1. Non sono state rilevate CVP nei soggetti infusi con m.d.c. in presenza di IM=1.5 e sottoposti a trigger endodiastolico, così come nei soggetti non infusi. Se ne conclude che la comparsa di CVP sia favorita dalla presenza di m.d.c. anche per applicazioni diagnostiche e che tale fenomeno sia reso meno probabile dal trigger endodiastolico e dal basso IM.

In 20 soggetti sottoposti ad ecocardiogramma con Optison™ [58] ed IM almeno 1.4 è stata misurata la concentrazione ematica dei principali marcatori di citonecrosi miocardica sia prima dell'esame che a vari intervalli di tempo dopo la sua esecuzione e non sono state rilevate variazioni statisticamente significative.

Le raccomandazioni allegate dai Produttori di m.d.c. indicano che in meno del 5% dei soggetti si verificano alterazioni del ritmo cardiaco. Un inserto aggiuntivo relativo ad Optison™ nel 2002 pone l'attenzione sul fatto che l'uso di un alto IM e del trigger endosistolico siano fattori favorevoli allo sviluppo di CVP.

Nell'ambito delle applicazioni addominali dei m.d.c., ed in particolare del Sonovue, uno studio retrospettivo [59] coinvolgente un'ampia casistica multicentrica (23188 studi addominali con US+m.d.c.) ha rilevato 29 reazioni avverse di cui solo 2 giudicate severe e rapidamente risolte con la somministrazione di cortisonico ev.

Nell'ambito di tale applicazione il m.d.c. ecografico si è quindi rivelato sicuro almeno quanto quelli utilizzati in radiologia e RMN.

Dall'esperienza complessiva attuale nell'uso dei m.d.c. ecografici sia in ambito ecocardiografico sia internistico, gli effetti avversi più frequenti (circa nel 2% dei pazienti) sono: cefalea, alterata sensibilità nel sito di iniezione, nausea, parestesie. Nell'1% dei casi si rilevano: dolore addominale, difficoltà respiratorie, faringite, prurito, rash, alterata visione, secchezza delle fauci, edema periferico, parestesie. Nella maggior parte dei casi si tratta di effetti idiosincrasici o da ipersensibilità. Nel 2004 l'utilizzo del Sonovue in campo ecocardiografico è stato sospeso in quanto tre pazienti sottoposti ad ecocardiografia con tale m.d.c. sono deceduti in seguito ad arresto cardiaco ed infarto miocardio. L'analisi successiva dei dati ha fatto ritenere che la severa ipotensione e bradicardia dovute ad una reazione di ipersensibilità abbiano favorito l'ischemia cardiaca in pazienti con elevato rischio cardiovascolare preesistente. Attualmente l'utilizzo del Sonovue è quindi sconsigliato in caso di recente infarto miocardio, angina instabile, severa aritmia, protesi valvolari, endocardite acuta, recente malattia tromboembolica, stati ipercoagulativi. Non vi è evidenza di effetti cardiotossici o nefrotossici diretti da parte di questo m.d.c. e non è autorizzato il suo utilizzo in gravidanza poiché non vi sono dati riguardanti tale utilizzo.

Nel 1993 l'AIUM segnalava come lo stravasamento ematico nel polmone post-natale di topo fosse riscontrabile per IM 0.3 e nel 2002 ricordava come fossero evidenziabili danni microvascolari nell'animale da laboratorio per applicazioni diagnostiche in presenza di m.d.c. con IM 0.4 e come tali effetti dipendessero non solo dal tipo e dalla dose di m.d.c. ma anche dalle regolazioni dell'ecografo e dalla regione anatomica insonata.

Nel 2007 l'AIUM ha affermato che attualmente non sono confermati effetti avversi nell'uso diagnostico degli US nell'uomo in assenza di m.d.c. e che il riscontro di stravasamento ematico nel polmone di topo per esposizioni diagnostiche non ha trovato un riscontro clinico.

La WFUMB (World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology) nel 2007 ha ripreso quanto affermato dall'EFSUMB (European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology) nel 2004 nelle linee guida per l'uso dei m.d.c. ecografici, consigliando cautela nell'insonare in presenza di m.d.c. le regioni anatomiche in cui un eventuale danno microvascolare risulterebbe più pericoloso (occhio, cervello, feto, neonato) e in ecocardiografia ha consigliato il monitoraggio dell'ECG per riconoscere rapidamente l'insorgenza di alterazioni del ritmo. In considerazione delle possibili, seppur rare, reazioni idiosincrasiche o di ipersensibilità viene consigliata l'esecuzione delle indagini con m.d.c. in ambienti e con personale adatti a trattare tali reazioni. Viene ricordato come l'IM sia un indicatore utile ma imperfetto del rischio di cavitazione e nelle applicazioni a basso IM è consigliato ai costruttori di porre come valore di IM di default 0.4, dato che sono stati rilevati bioeffetti nell'animale da laboratorio per tale valore, anche se la ricaduta clinica di questi riscontri sperimentali rimane da definire.

La WFUMB suggerisce alcuni comportamenti per ridurre il rischio di bioeffetti:

- utilizzare l'IM minore possibile
- utilizzare alte frequenze
- ridurre al minimo il tempo complessivo di esposizione
- ridurre al minimo la dose di m.d.c.
- in ecocardiografia evitare di eseguire il trigger nella fase di endosistole
- evitare l'utilizzo del m.d.c. 24 ore prima di una seduta di litotrissia

Razionale e scopo dello studio

Nonostante non vi siano attualmente evidenze che indichino effetti nocivi nell'uomo derivanti dall'uso ripetuto degli US in diagnostica, vi sono dati sperimentali (in vitro ed in vivo) che riportano bioeffetti dannosi per particolari condizioni di esposizione. Pertanto si ritiene corretto, in via prudenziale, non abbassare il livello di attenzione riguardo l'uso sicuro degli ultrasuoni.

Scopo di questa indagine mediante questionario è pertanto verificare il livello di conoscenza e consapevolezza fra gli ecografisti della SIUMB (Società Italiana di Ultrasonologia in Medicina e Biologia) dei principali parametri e dei suggerimenti delle società scientifiche internazionali sulla sicurezza nell'uso degli US in diagnostica.

Materiali e metodi

La segreteria della SIUMB ha spedito 915 mail ai soci SIUMB, di cui si conosceva l'indirizzo di posta elettronica nel 2006, con la richiesta di disponibilità a partecipare in forma anonima all'indagine. In tale comunicazione si specificava di rispondere ai quesiti entro 48h, per rendere meno probabile la consultazione di testi.

Ai soci che si sono dichiarati disponibili è stato spedito il questionario via mail.

Il questionario (Appendice 1) era formato da due parti:

-prima parte: raccolta delle informazioni del partecipante (dati anagrafici; tipologia di ecografia praticata ed esperienza in tale campo)

-seconda parte: 11 quiz a scelta multipla, ognuno con una sola risposta corretta

Complessivamente sono stati compilati dai partecipanti 105 questionari, le cui risposte sono state analizzate statisticamente presso l'UO di Medicina Interna Bolondi, come concordato con la segreteria della SIUMB.

Sono stati ritenuti validi 97 questionari, utilizzando come criterio di validità la presenza di almeno 10 risposte.

Risultati

Prima parte

L'età media degli ecografisti intervistati è risultata 44 anni (range 26-59 anni) e mediamente l'attività ecografica è risultata praticata da 13 anni (range 1-29 anni).

La valutazione della quantità di tempo dedicata all'esecuzione di indagini ecografiche (Tabella 1) indica che il 6% dedica il 100% del proprio tempo lavorativo ed una quota considerevole (29%) dedica a tale attività fra il 70% ed il 100% del tempo. Un'ulteriore quota notevole (33%) dedica fra il 30% ed il 70%.

La maggior parte degli operatori (70%) effettua le indagini nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale o sul territorio (Tabella 2), mentre le strutture puramente private occupano in modo esclusivo solamente il 18% degli ecografisti.

Fra le tipologie di esami eseguiti ed i campi di applicazione (Tabella 3) è preponderante la metodica Doppler (74%), seguita dall'ecografia pediatrica (41%) e da quella con m.d.c. (43%). È da tenere presente come ad ogni operatore fosse permesso di indicare tutte le principali tipologie di esami da lui effettuate.

Seconda parte

Le prime domande (1,2,4,5,6) hanno riguardato le definizioni di IM ed IT e di quest'ultimo è stato richiesto di sottolineare la tessuto-specificità e l'utilizzo pratico per stimare l'incremento termico nella regione insonata.

Il quesito 3 ha valutato la conoscenza delle evidenze sperimentali nell'animale da laboratorio, in particolare lo stravasamento ematico nel polmone di topo in seguito a prolungata esposizione ad US.

I quesiti 7 e 9 hanno riguardato la maggiore sensibilità tessutale fetale all'incremento termico rispetto ai tessuti adulti ed hanno sottolineato l'importanza del monitoraggio dell'IT nelle indagini ecografiche in gravidanza.

La domanda 8 ha richiesto la conoscenza del limite prudenziale di emissione acustica raccomandato dall'FDA per ridurre il rischio di eccessivo rialzo termico.

I quesiti 10 ed 11 hanno valutato la conoscenza di alcuni suggerimenti per l'uso sicuro degli US e degli m.d.c. ecografici emanate rispettivamente dall'AIUM e dall'EFSUMB.

La percentuale di risposte corrette per ogni quesito è riportata nella Tabella 4.

Discussione e conclusioni

La conoscenza dei principali parametri di sicurezza è risultata di buon livello. In particolare i quesiti riguardanti le definizioni di IT e IM (domande 2 e 4, risposte correttamente rispettivamente dal 61,9% e 93,8%) e la dipendenza dell'IT dal tipo di tessuto insonato (domanda 5, risposta correttamente dal 67%), anche se la domanda 6, che trattava l'applicazione pratica della definizione di IT (quindi il calcolo del potenziale aumento di temperatura nel tessuto insonato) è stata risposta correttamente solo dal 35,1%.

Sono risultate ben conosciute anche le differenti sensibilità tessutali all'incremento termico. In particolare la domanda numero 7, riguardante le implicazioni dell'incremento di temperatura nell'ecografia fetale del primo trimestre è stata risposta correttamente dall'80,4% dei partecipanti. La domanda 9, che trattava della minore sensibilità dei tessuti adulti all'effetto termico, rispetto a tessuti meno maturi

come quelli fetali e neonatali, ha ricevuto un'adeguata risposta nell'87.6% dei casi. Entrando nel merito delle conoscenze riguardanti le sperimentazioni sull'animale da laboratorio, il livello di conoscenza non è risultato particolarmente ampio, dato che la domanda numero 3, che trattava lo stravasamento ematico nel polmone di topo, ha ricevuto una risposta adeguata solo da parte del 39.2% dei partecipanti.

La valutazione della conoscenza delle principali indicazioni internazionali all'uso sicuro delle tecniche ecografiche ha prodotto risultati contrastanti poiché se da un lato le raccomandazioni della FDA per limitare l'emissione acustica entro limiti prudenziali, per evitare soprattutto il riscaldamento, è risultata buona (domanda 8, risposta correttamente dal 72,2%), dall'altro lato l'attenzione posta dall'AIUM nei confronti del fatto che sia possibile identificare in futuro bioeffetti nell'uomo attualmente non riportati (domanda 10) è risultata nota solo al 42,3%. Per ultimo si segnala come le linee guida dell'EFSUMB per un utilizzo sicuro dei m.d.c. siano risultate conosciute solo parzialmente poiché, alla luce della particolare importanza dell'argomento, non appare completamente soddisfacente il fatto che la domanda che trattava questo tema (domanda 11) sia stata risposta correttamente dal 48,5% dei partecipanti.

I risultati ottenuti confermano una buona conoscenza, per lo meno, delle definizioni dei principali parametri e le loro implicazioni nei principali campi di applicazione. Considerata infatti la notevole percentuale di ore lavorative dedicate alle indagini ecografiche ed il fatto che esse venissero praticate prevalentemente nell'ambito di strutture pubbliche dove più facilmente le competenze ecografiche di diversi specialisti si integrano e quindi anche l'aggiornamento per una corretta esecuzione pratica delle indagini è alla portata dei più, era comprensibile preventivare un buon esito dei quesiti riguardanti le nozioni di base.

Sempre partendo da queste considerazioni si può tentare di interpretare la minore conoscenza di aspetti sperimentali, come la domanda sugli effetti dannosi nel polmone di topo, come l'espressione di un minore aggiornamento a riguardo di tematiche non eminentemente pratiche. Tuttavia se da un lato si comprende come vengano privilegiate dal medico pratico le conoscenze immediatamente applicabili alla realtà quotidiana, si sottolinea la potenziale importanza anche dei principali dati sperimentali, soprattutto nei mammiferi. Nel caso specifico si noti come il quesito riguardasse il polmone, quindi una struttura per sua natura ricca di contenuto gassoso che potrebbe fornire utili indicazioni sulla interazione fra gas ed US, come accade per i m.d.c. ecografici. Inoltre oggi è una realtà frequente l'utilizzo degli US, soprattutto in urgenza, per indagare il parenchima polmonare superficiale. Dai dati sperimentali emerge poi come il danno sperimentale prevalente in questo organo sia di tipo termico e quindi non cavitazionale come invece ci si aspetterebbe, impedendo quindi di non semplificare eccessivamente l'interazione fra gas ed US con una equazione per cui l'esposizione di un ambiente gassoso agli US sia solo sinonimo di cavitazione. Un'attenzione particolare deve poi essere rivolta verso la conoscenza delle raccomandazioni internazionali che nel complesso non è risultata accurata. È evidente come la consultazione delle principali emanazioni delle società scientifiche sia di particolare utilità per rendere edotti gli operatori non tanto sugli aspetti di base,

quanto più su nuove eventuali acquisizioni relative alle applicazioni più recenti. Proprio in questa ottica si giustifica il fatto di ritenere che la percentuale di risposte esatte alla domanda sulle linee guida EFSUMB per l'uso dei m.d.c. ecografici non sia ottimale. Infatti le applicazioni ecografiche di queste sostanze sono relativamente recenti ed in rapida evoluzione per cui i potenziali bioeffetti che dovessero presentarsi dovranno essere rilevati tempestivamente e questo sarà possibile solo praticando nel modo più corretto e standardizzato gli esami. Si tenga inoltre presente come attualmente l'utilizzo dei m.d.c. ecografici sia consigliato solo in strutture in cui il paziente sia adeguatamente trattabile con presidi d'urgenza in caso di eventuali reazioni avverse e questo è un fatto certamente peculiare per l'utilizzo diagnostico degli ultrasuoni, da sempre sinonimo di tecnica di pronto utilizzo anche al di fuori di ambienti specialistici. Tutto ciò può fare comprendere quindi come le nuove tecnologie correlate all'utilizzo dei mezzi di contrasto rappresentino una svolta non solo per i vantaggi di imaging ma anche per le attenzioni procedurali e conoscitive che il professionista debba applicare.

Oltre all'analisi statistica ed all'interpretazione dei risultati devono essere ora discussi alcuni possibili bias di questa indagine conoscitiva.

In primo luogo appare ridotto il numero di partecipanti rispetto agli iscritti alla SIUMB. Una spiegazione potrebbe essere lo scarso interesse suscitato dall'argomento, oppure il limitato tempo a disposizione concesso che ha scoraggiato gli interpellati, od ancora semplicemente i medici contattati possono avere giudicato inutile occupare parte del loro tempo per questo fine. Tale campione numericamente ridotto potrebbe fornire una sottostima delle reali conoscenze degli operatori ma in realtà il vero rischio è una sovrastima, se si pone attenzione al fatto che la tipologia di indagini praticate (principalmente Doppler ed uso di m.d.c.) indichi un campione di ecografisti esperti.

Altro punto da affrontare è la possibilità che la scelta del campione nell'ambito di una sola società scientifica non sia rappresentativo di tutti gli ecografisti italiani. È però evidente come non sarebbe semplice sottoporre un analogo questionario in sedi in cui si incontrino una moltitudine di ecografisti, ed in particolare nel corso dei principali congressi dedicati. In tal caso infatti non sarebbe garantita la mancata consultazione di testi o la "collaborazione" fra colleghi nella scelta delle risposte. Certamente neppure le modalità di invio e ricezione applicate nella presente indagine conoscitiva mettono completamente al riparo da tali evenienze ma le rendono quantomeno meno probabili, grazie al limitato tempo concesso. Inoltre anche durante un convegno la partecipazione al questionario sarebbe volontaria e quindi presumibilmente parteciperebbero i colleghi più motivati e potenzialmente più aggiornati. Complessivamente quindi il campione analizzato può non essere pienamente rappresentativo di tutti gli ecografisti italiani ma, nell'ambito di questa supposizione, si può ragionevolmente ritenere che esso tenda al massimo a sovrastimare il reale livello di conoscenza.

In conclusione da questa indagine conoscitiva risulta che il livello medio attuale di conoscenza e consapevolezza dei parametri di sicurezza in campo ecografico fra ecografisti SIUMB sia di buon livello per le necessità del recente passato ma ci sono

ormai basi scientifiche, pratiche e teoriche, che inducono ad elevare il livello di interesse, anche considerando che il grado di esperienza ecografica dei partecipanti era verosimilmente più elevato di quello che ci si potrebbe aspettare da operatori meno esperti ma pur numerosi nel territorio e nelle strutture ospedaliere.

Appendici e tabelle

Appendice 1: questionario

Prima parte

-Età

-Da quanto tempo effettua esami ecografici

-Quale è la percentuale di attività lavorativa dedicata all'attività ecografica:

A.100%

B.70-100%

C.30-70%

D.1-30%

-Tipologia di struttura in cui effettua gli esami ecografici:

A.Pubblica o ambulatorio di medicina generale

B.Semi-privata

C.Completamente privata

-Quali delle seguenti tipologie di esami ecografici pratica di solito (indicare "si" o "no" a fianco di ogni dicitura:

-Ostetrica

-Oculare

-Doppler

-Con m.d.c.

-Transcranica

-Pediatria

Seconda parte

1) Gli indici termici e meccanico sono presentati:

A. sulla documentazione di accompagnamento dell'ecografo (manuale d'uso)

B. in tempo reale sullo schermo

C. all'inizio di un nuovo esame

2) L'indice meccanico MI si riferisce:

A. alla probabilità che si presenti un fenomeno di cavitazione cellulare

B. alla intensità con cui si possono usare i mezzi di contrasto

C. alla probabilità che l'effetto meccanico sia superiore a quello termico

3) Con l'uso di un indice meccanico MI elevato si sono determinati stravasi di emazie in quali dei seguenti organi durante esperimenti sul topo:

A. Polmone

B. Rene

C. Fegato

4) L'indice termico si riferisce:

A. alla probabilità di innalzare la temperatura della zona sotto esame

B. alla probabilità di innalzare la temperatura della superficie della sonda

C. alla probabilità di innalzare la temperatura dell'impugnatura della sonda

5) Gli indici termici sono:

A. TIS e TIB (Thermal Index at Soft tissue e Thermal Index at Bone, rispettivamente Indice Termico ai Tessuti Molli e all'Osso)

B. TIS, TIB, TIC (Thermal Index at Soft tissue, Thermal Index at Bone e Thermal Index at Colon, rispettivamente Indice Termico ai Tessuti Molli, all'Osso ed al Colon)

C. TIS, TIA, TIL (Thermal Index at Soft tissue, Thermal Index at Adnexa e Thermal Index at Liver, rispettivamente Indice Termico ai Tessuti Molli, agli Annessi ed al Fegato)

6) Se $TI=2$, la temperatura nel tessuto, rispetto alla condizione iniziale

A. è potenzialmente raddoppiata

B. è potenzialmente diminuita di due gradi

C. è potenzialmente aumentata di due gradi

7) Gli indici termici sono di massima importanza durante esami

A. ostetrici del primo trimestre

B. Vascolari

C. del fegato

8) L'emissione acustica è limitata, per conformità alla norma FDA

A. per l'indice meccanico MI (<1.9) e gli indici termici TI (<4.0)

B. nell'intensità ($<720\text{mW/cm}^2$)

C. nell'intensità ($<720\text{mW/cm}^2$) e per l'indice meccanico MI (<1.9)

9) Quali tra i seguenti tessuti sono meno sensibili ad un aumento di temperatura corporea determinato dagli ultrasuoni?

A. Tessuti fetali

B. Tessuti del neonato

C. Tessuti di un adulto

10) "Benché non si siano confermati effetti biologici su pazienti a causa di esposizioni agli attuali strumenti ecografici diagnostici, la possibilità che tali effetti biologici possano realizzarsi ed essere identificati in futuro esiste". Tale affermazione è stata enunciata dall'AIUM (Istituto Americano per gli Ultrasuoni in Medicina) nel 1999. Anche due delle seguenti frasi sono anch'esse affermazioni dell'AIUM, mentre una terza non lo è. Quale frase non è una enunciazione AIUM e non corrisponde a verità?

A. gli ultrasuoni debbono essere usati in una maniera prudente per determinare un beneficio medico al paziente o, in caso di uso di ultrasuoni a scopo didattico il soggetto deve essere anticipatamente informato delle condizioni di esposizione.

B. gli ultrasuoni a scopo diagnostico possono essere usati per visualizzare liberamente gli organi anche di soggetti sani, perché l'esecuzione dell'esame rispetti i TIS e TIB previsti e duri meno di 5 minuti su ogni organo, salvo diversa necessità medica.

C. l'esecuzione di ecografie 2D e 3D solo per vedere il feto o per determinare il sesso del nascituro senza una reale indicazione medica è inappropriata e contraria alla pratica medica.

11) Quali delle seguenti affermazioni è corretta e contenuta nelle linee guida della Società Europea di Ultrasonologia (EFSUMB) sull'uso dei mezzi di contrasto (Guidelines for the use of contrast agents in ultrasound. January 2004. Ultraschall Med 2004, 25(4):249-256)?

A. Si deve usare cautela nell'utilizzo dei mezzi di contrasto in tessuti suscettibili di danno microvascolare clinicamente rilevante quali cervello senza una scatola cranica intatta, occhio ed i tessuti del neonato

B. Si deve usare cautela nell'uso del mezzo di contrasto in ecocardiografia nel caso di studio della perfusione del miocardio, mentre la valutazione del bordo interno del ventricolo non comporta rischi aritmici in quanto lo studio non interessa direttamente le coronarie

C. Nell'uso dei mezzi di contrasto in ecografia va sempre considerato il livello di indice meccanico MI, mentre l'indice termico (TIS e TIB) ed il tempo di esposizione non hanno particolare influenza in questo campo perché i rischi legati all'uso del mezzo di contrasto sono di tipo cavitazionale, quindi non termico.

Tabella 1: percentuale di attività lavorativa dedicata all'esecuzione di indagini ecografiche

Percentuale di tempo dedicato	Numero di operatori	%
100 %	6/97	6.1
70–100 %	28/97	28.9
30–70%	32/97	33.0
1–30%	31/97	32.0

Tabella 2: sede principale in cui viene effettuata l'attività ecografica

Tipologia di sede	Numero di operatori	%
Pubblica	68/97	70.1
Semi-privata	12/97	12.4
Privata	17/97	17.5

Tabella 3: tipologia di ecografia praticata. Ogni operatore ha avuto la facoltà di segnalare più tipologie di esami ecografici a seconda della propria attività, per cui la somma complessiva delle percentuali riportate eccede il 100%.

Tipologia di ecografia	Numero di operatori	%
Ostetrica	7/97	7.2
Oculare	9/97	9.3
Doppler	72/97	74.2
Con m.d.c.	42/97	43.3
Transcranica	7/97	7.2
Pediatrica	40/97	41.2

Tabella 4: risposte corrette

Domanda	Risposta corretta	%
Q1	B	53.6
Q2	A	61.9
Q3	A	39.2
Q4	A	93.8
Q5	B	67
Q6	C	35.1
Q7	A	80.4
Q8	C	72.2
Q9	C	87.6
Q10	B	42.3
Q11	A	48.5

Elenco delle abbreviazioni

SIGLA	SIGNIFICATO
US	ultrasuoni
m.d.c.	mezzo di contrasto
IM	Indice meccanico
IT	Indice termico
TIS	Indice termico nei tessuti soffici
TIB	Indice termico nell'osso
TIC	Indice termico nelle applicazioni transcraniche
PRF	Pulse Repetition Frequency
WFUMB	World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology
EFSUMB	European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology
BMUS	British Medical Ultrasound Society
AIUM	American Institute of Ultrasound in Medicine
FDA	Food and Drugs Administration
ISIOUG	International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology
BMUS	British Medical Ultrasound Society
SIUMB	Società Italiana di Ultrasonologia in Medicina e Biologia
BEE	Barriera emato-encefalica
CVP	Contrazione ventricolare prematura
Pa	Pascal
Hz	Hertz
p-	Picco spaziale-picco temporale di P negativa

Bibliografia

- 1) Duck FA. Nonlinear acoustics in diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:1–18.
- 2) Duck FA, Starritt HC. The locations of peak pressures and peak intensities in finite amplitude beams from a pulsed focused transducer. *Ultrasound Med Biol* 1986;12(5):403– 409.
- 3) Duck FA, Bacon DR. A fundamental criticism of hydrophone-in-water measurement. *Ultrasound Med Biol* 1988;14:305–307.
- 4) Christopher T. Computing the mechanical index. *J Ultrasound Med* 1999;18:63– 68.
- 5) Morton KI, ter Haar G. The role of cavitation in the interaction of ultrasound with V79 Chinese hamster cells *in vitro*. *Br J Cancer* 1982;45(Suppl V):147.
- 6) Hartman C, Child SZ et al. Lung damage from exposure to the fields of an electro-hydraulic lithotripter. *Ultrasound Med Biol* 1990;16:675– 679.
- 7) Ciaravino V, Flynn HG et al. Pulsed enhancement of acoustic cavitation: A postulated model. *Ultrasound Med Biol* 1981;7:159–166.

- 8)Holland KH, Apfel RE. An improved theory for the prediction of micro-cavitation thresholds. IEEE. Trans Ultrason Ferroelectrics Fre Qcontr UFFI- 1989;36(2):139.
- 9)Apfel RE, Holland KH. Gauging the likelihood of cavitation from short pulse low duty cycle diagnostic ultrasound. Ultrasound Med Biol 1991;17:179–185.
- 10)Chen WS et al. A comparison of the fragmentation thresholds and inertial cavitation doses of different ultrasound contrast agents. J Acoust Soc Am 2003;113:643– 651.
- 11)Dayton PA, Morgan KE et al. A preliminary evaluation of the effects of primary and secondary radiation forces on acoustic contrast agents. IEEE Trans UFFC 1997;44:1264 –1277.
- 12)Miller DL, Thomas RM et al. Mechanisms for hemolysis by ultrasonic cavitation in the rotating exposure system. Ultrasound Med Biol 1991;17:171–178.
- 13)May DJ, Allen JS et al. Dynamics and fragmentation of thickshelled microbubbles. IEEE Trans Ultrasound Ferroelec Freq Contr 2002;49:1400 –1410.
- 14)Miller DL. Particle gathering and microstreaming near ultrasonically activated gas-filled micropores. J Acoust Soc Am 1988a;84:1378–1387.
- 15)Dunn F. Cellular inactivation by heat and shear. Radiat Environ Biophys 1985;24:131–139.
- 16)Wu J, Winkler AJ et al. Effect of acoustic streaming on ultrasonic heating. Ultrasound Med Biol 1994;20:195–201.
- 17)Wu J. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. Ultrasound Med Biol 2002;28:125–129.
- 18)Frinking PJA, de Jong N et al. Scattering properties of encapsulated gas bubbles at high ultrasound pressures. J Acoust Soc Am 1999;105:1989 –1996.
- 19)Stride E, Saffari N. On the destruction of microbubble ultrasound contrast agents. Ultrasound Med Biol 2003;29:563–573.
- 20)Plesset MS, Mitchell TP. On the stability of the spherical shape of a vapor cavity in a liquid. Quarterly Appl Math 1956;13:419–430.
- 21)Everbach EC, Makin IR et al. Correlation of ultrasound-induced hemolysis with cavitation detector output *in vitro*. Ultrasound Med Biol 1997;23:619–624.
- 22)Holt RG, Roy RA. Measurements of bubble-enhanced heating from focused, MHz-frequency ultrasound in a tissue-mimicking material. Ultrasound Med Biol 2001;27:1399 –1412.
- 23)Umemura S, Kawabata K et al. In vivo acceleration of ultrasonic tissue heating by microbubble agent. Proc 2002 IEEE Ultrasonics Symposium. 1375–1378.
- 24)Suslick KS, Kemper KA. The effect of fluorocarbon gases on sonoluminescence: A failure of the electrical hypothesis. Ultrasonics 1993;31:463– 465.

- 25)Kudo N, Miyaoka T et al. Study on mechanism of cell damage caused by microbubbles exposed to ultrasound. Proc. 2002 IEEE Ultrasonics Symposium 1351–1354.
- 26)Dalecki D, Raeman CH et al. Remnants of Albunex nucleate acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:1405–1412.
- 27)Miller DL, Gies RA. Gas-body-based contrast agent enhances vascular bioeffects of 1.09 MHz ultrasound on mouse intestine. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:201–208.
- 28)Miller DL, Gies RA. The influence of ultrasound frequency and gasbody composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffect in mouse intestine. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:307–313.
- 29)Skyba DM, Price RJ et al. Direct *in vivo* visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation* 1998;98:290- 293.
- 30)Miller DL, Quddus J. Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice. *Proc Nat Acad Sci* 2000;97:10179 –10184.
- 31)Kobayashi N, Yasu T et al. Endothelial cell injury in venule and capillary induced by contrast ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:949 –956.
- 32)Wible JH, Galen KP et al. Microbubbles induce renal hemorrhage when exposed to diagnostic ultrasound in anesthetized rats. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:1535–1546.
- 33)Raeman CH, Child SZ et al. Albunex,[®] does not increase the sensitivity of the lung to pulsed ultrasound. *Echocardiography* 1997;14:553–557.
- 34)Hynynen K, McDannold N et al. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology* 2001;220:640–646.
- 35)Dalecki D, Raeman CH et al. Hemolysis *in vivo* from exposure to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:307–313.
- 36)Dalecki D, Child SZ et al. Age dependence of ultrasonically-induced lung hemorrhage in mice. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:767–776.
- 37)MacRobbie AG, Raeman CH et al. Thresholds for premature contractions in murine hearts exposed to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:761–765.
- 38)Dalecki D, Keller BB et al. Thresholds for premature ventricular contractions in frog hearts exposed to lithotripter fields. *Ultrasound Med Biol* 1991;17:341–346.
- 39)Dalecki D, Rota C et al. Premature cardiac contractions produced by ultrasound and microbubble contrast agents in mice. *Acoust Res Let Online* 2005;6:221–225.
- 40)Li P, Armstrong WF et al. Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: comparison of three different contrast agents. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:83–91.

- 41) Miller DL. Frequency relationships for ultrasonic activation of free microbubbles, encapsulated microbubbles and gas-filled micropores. *J Acoust Soc Am* 1998;104:2498–2505.
- 42) Ward M, Wu J, Chiu J. Experimental study of the effects of Optison™ concentration on sonoporation *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:1169–1175.
- 43) Miller DL, Thomas RM et al. Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 1995;21:841–848.
- 44) Ward M, Wu J et al. Experimental study of the effects of Optison™ concentration on sonoporation *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:1169–1175.
- 45) Miller MW, Azadniv M et al. Effect of a stabilized microbubble contrast agent on CW ultrasound induced red blood cell lysis *in vitro*. *Echocardiography* 1995;12:1–11.
- 46) Brayman AA, Azadniv M et al. Hemolysis of Alunex®-supplemented 40 % hematocrit human erythrocytes *in vitro* by 1 MHz pulsed ultrasound: Acoustic pressure and pulse length dependence. *Ultrasound Med Biol* 1996a;22:927–938.
- 47) Brayman AA, Strickler PL et al. Hemolysis of 40% hematocrit, Alunex® supplemented human erythrocytes by pulsed ultrasound: Frequency, acoustic pressure and pulse length dependence. *Ultrasound Med Biol* 1997;23:1237–1250.
- 48) Miller MW, Brayman AA et al. Comparative sensitivity of human fetal and adult erythrocytes to hemolysis by pulsed 1 MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2001a;27:419–425.
- 49) Miller MW, Everbach EC et al. A comparison of the hemolytic potential of Optison™ and Alunex® in whole human blood *in vitro*: Acoustic pressure, ultrasound frequency, donor and passive cavitation detection considerations. *Ultrasound Med Biol* 2001b;27:709–721.
- 50) Brayman AA, Miller MW. Sonolysis of Alunex®-supplemented, 40% hematocrit human erythrocytes by pulsed 1-MHz ultrasound: Pulse number, pulse duration and exposure vessel rotation dependence. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:307–314.
- 51) Miller DL, Quddus J. Lysis and sonoporation of epidermoid and phagocytic monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:1107–1113.
- 52) Greenleaf WJ, Bolander ME et al. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:587–595.
- 53) Lawrie A, Brisken AF et al. Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:2023–2027.
- 54) Dayton PA, Lindner JR et al. Ultrasound contrast agents phagocytosed by neutrophils demonstrate acoustic activity. *Proceedings of the IEEE Ultrasonics Symposium*. New York: Institute of Electrical and Electronic Engineers, 1999:1705–1708.

55)Dayton PA, Chomas JE et al. Optical and acoustical dynamics of microbubble contrast agents inside neutrophils. *Biophys J* 2001; 80:1547–1556.

56)Schlachetzki F, Holscher T et al. Observation on the integrity of the blood-brain barrier after microbubble destruction by diagnostic transcranial color-coded sonography. *J Ultrasound Med* 2002;21:419–429.

57)vand der Wouw PA, Brauns AC et al. Premature ventricular contractions during triggered imaging with ultrasound contrast. *J Am Soc Echocardiogr* 2000;13:288 –294.

58)Borges AC, Walde T et al. Does contrast echocardiography with Optison induce myocardial necrosis in humans? *J Am Soc Echocardiography* 2002;15:1080 –1086.

59) [Piscaglia F, Bolondi L. Italian Society for Ultrasound in Medicine and Biology \(SIUMB\) Study Group on Ultrasound Contrast Agents](#) The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations. *Med Biol.* 2006 Sep;32(9):1369-75.

Principali linee guida internazionali citate

WFUMB: Symposium on safety of ultrasound in medicine; *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 33, No. 2, pp. 171-234, 2007

EFSUMB (Study Group): Guidelines for the Use of Contrast Agents in Ultrasound; *Ultraschall in Med*, 2004; 249-256

ISUOG: *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2000; 16: 594-596.

BMUS (Safety Group): Guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound equipment; *BMUS Bulletin* 2000; 8:30-33.