

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI**

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/B1 - MEDICINA INTERNA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/09 - MEDICINA INTERNA

**ECOGRAFIA CON MEZZO DI CONTRASTO DALLA RICERCA ALLA
PRATICA CLINICA: DIAGNOSI DI CARCINOMA EPATOCELLULARE CON
SISTEMA CEUS LI-RADS E CON SOFTWARE DI QUANTIFICAZIONE DELLA
PERFUSIONE TISSUTALE**

Presentata da: Antonella Forgione

Coordinatore Dottorato

Fabio Piscaglia

Supervisore

Alessandro Granito

Esame finale anno 2022

INDICE

ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	7
Carcinoma epatocellulare: epidemiologia, fattori di rischio e prevenzione	7
Ruolo della sorveglianza ecografica nella diagnosi precoce di carcinoma epatocellulare	12
CEUS e sistema LI-RADS: una rivoluzione nella pratica clinica	15
Quantificazione digitale della perfusione tissutale con ecografia con mezzo di contrasto	24
SCOPO DELLO STUDIO	28
PAZIENTI E METODI	28
RISULTATI	36
Caratteristiche descrittive dei pazienti	36
Caratteristiche descrittive dei noduli	40
Diagnosi dei noduli	42
LR-5 45	
LR-M 47	
LR-1 48	
Follow-up dei 49 noduli di natura indeterminata all'arruolamento	49
LR-2 49	
LR-3 49	
LR-4 49	
LR-NC 50	
Validare il sistema CEUS LI-RADS nella diagnosi di carcinoma epatocellulare	54
Concordanza fra CEUS e TC/RM sulla classe LI-RADS	55
Concordanza classe LR-4	56
Concordanza classe LR-5	56
Concordanza fra CEUS e TC/RM sul riscontro di enhancement e wash-out	57

Accuratezza diagnostica della classe CEUS LR-5.....	60
Valutare l'efficacia di un software di quantificazione della perfusione tissutale nel riscontro di wash-out per la diagnosi di carcinoma epatocellulare in CEUS	62
DISCUSSIONE.....	66
CONCLUSIONI.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

ABSTRACT

Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta il tumore epatico primitivo più comune con una incidenza fino all'85%. È uno dei tumori più frequenti al mondo ed è noto per l'elevata letalità soprattutto in stadio avanzato. La diagnosi precoce attraverso la sorveglianza ecografica è necessaria per migliorare la sopravvivenza dei pazienti a rischio. Il mezzo di contrasto ecografico migliora la sensibilità e la specificità diagnostica dell'ecografia convenzionale. L'ecografia con mezzo di contrasto (*contrast-enhanced ultrasound, CEUS*) è pertanto considerata una metodica valida per la diagnosi di HCC a livello globale per la sua ottima specificità anche a fronte di una sensibilità subottimale. L'aspetto contrastografico delle lesioni focali epatiche ha portato un team di esperti allo sviluppo del sistema *Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS)* con l'obiettivo di standardizzare la raccolta dati e la refertazione delle metodiche di imaging per la diagnosi di HCC. La CEUS è una metodica operatore-dipendente e le discordanze diagnostiche con gli imaging panoramici lasciano spazio a nuove tecniche (*Dynamic Contrast Enhanced UltraSound, DCE-US*) volte a migliorare l'accuratezza diagnostica della metodica e in particolare la sensibilità. Un software di quantificazione della perfusione tissutale potrebbe essere di aiuto nella pratica clinica per individuare il wash-out non visibile anche all'occhio dell'operatore più esperto. Il nostro studio ha due obiettivi: 1) validare il sistema CEUS LI-RADS nella diagnosi di carcinoma epatocellulare in pazienti ad alto rischio di HCC usando come gold-standard l'istologia quando disponibile oppure metodiche di imaging radiologico accettate da tutte le linee guida (tomografia computerizzata o risonanza magnetica con aspetto tipico) eseguite entro quattro settimane dalla CEUS; 2) valutare l'efficacia di un software di quantificazione della perfusione tissutale nel riscontro di wash-out per la diagnosi di HCC in CEUS.

Pazienti e metodi

Lo studio riporta la analisi dei dati di Bologna dello studio multicentrico promosso dalla Thomas Jefferson University di Philadelphia (PA, US) che la tesista ha seguito in prima persona presso l'Ambulatorio di ecografia diagnostica ed interventistica – Medicina interna, malattie epatobiliari e immunoallergiche UOC Piscaglia, Policlinico di S. Orsola, Bologna tra gennaio 2018 e marzo 2021 e che ha visto l'inclusione di 119 pazienti con 140 lesioni. Il nostro studio include inoltre in modo originale una analisi con il software di quantificazione contrastografica LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera) delle lesioni che fossero risultate retrospettivamente idonee grazie a: a) disponibilità di immagini in formato DICOM delle fasi portale e tardiva, b) adeguata acquisizione tecnica ad essere analizzate, c) che presentassero iperenhancement in fase arteriosa, d) che avessero diametro superiore a 10 millimetri. Il clip della fase portale e tardiva è stato analizzato per la presenza e quantificazione del wash-out confrontando due regioni di interesse (ROI) individuate dall'operatore, rispettivamente la lesione oggetto di studio e parte del parenchima circostante.

Risultati

In totale 72 lesioni focali epatiche con diametro mediano massimo di 22 millimetri hanno ricevuto diagnosi di HCC all'arruolamento nello studio. La classe CEUS LR-5 ha mostrato un valore predittivo positivo del 93% a fronte di una sensibilità del 62,5% nella diagnosi di HCC. L'accuratezza diagnostica della classe CEUS LR-5 è stata del 79,2%. Il software di quantificazione contrastografica LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera) ha consentito il riscontro di wash-out in noduli HCC anche quando non individuato da un operatore esperto alla CEUS, migliorando la sensibilità della metodica del 15,2 % (dall'81,8% al 97%).

Conclusione

La CEUS è un ottimo strumento diagnostico e ha una specificità elevata nella diagnosi di HCC. In questo studio pilota un software di quantificazione della perfusione tissutale ha riscontrato wash-out anche quando non visibile all'occhio dell'operatore in lesioni HCC. La DCE-US potrebbe migliorare l'accuratezza diagnostica della CEUS. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per il suo impiego nella pratica clinica.

INTRODUZIONE

Carcinoma epatocellulare: epidemiologia, fattori di rischio e prevenzione

Il tumore del fegato è la terza causa di mortalità negli uomini, dopo il tumore del polmone e della prostata e la quinta causa di mortalità nelle donne. Nel 2020 il tumore epatico primitivo è stata la terza causa di morte nel mondo con oltre 800 mila decessi e più di 900 mila nuovi casi. Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta il tumore epatico primitivo più comune con una incidenza fino all'85%, seguito dal colangiocarcinoma che rappresenta il 10-15% dei casi. (1) Dal 2000 al 2012 si è registrato un calo dell'incidenza dei tumori del fegato in Italia del 2.6% annuo. (2) Dal 2008 al 2016 l'incidenza annua dei tumori primitivi del fegato in Italia si è ridotta dell'8% nei maschi sotto i 50 anni e del 3,4% nelle donne con età superiore ai 70 anni. La riduzione dell'incidenza del tumore del fegato può essere attribuibile alla vaccinazione per l'epatite B e al trattamento dell'epatite C. (3) Anche la mortalità per HCC è in calo con un decremento annuo dell'1.6% negli uomini e dell'1.3% nelle donne.(4) Nel 2020 in Italia i tassi stimati di incidenza e di mortalità per tumore del fegato standardizzati per età per 100,000 abitanti sono stati rispettivamente del 7.7 e del 5.3. (Figura 1 e 2)

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, liver, both sexes, all ages,

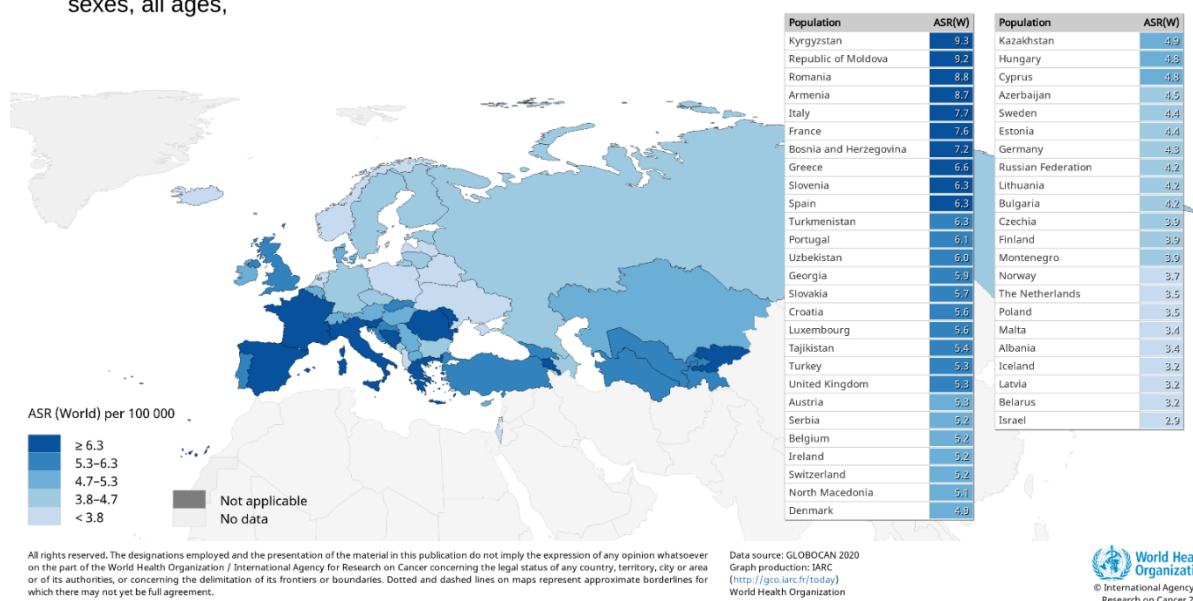


Figura 1. Tratta da <http://gco.iarc.fr/today>. Distribuzione dei tassi stimati di incidenza dei tumori del fegato standardizzati per età (mondo) o ASR (W) per 100,000 abitanti in entrambi i sessi in Europa nel 2020.⁽⁵⁾

Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, liver, both sexes, all ages,

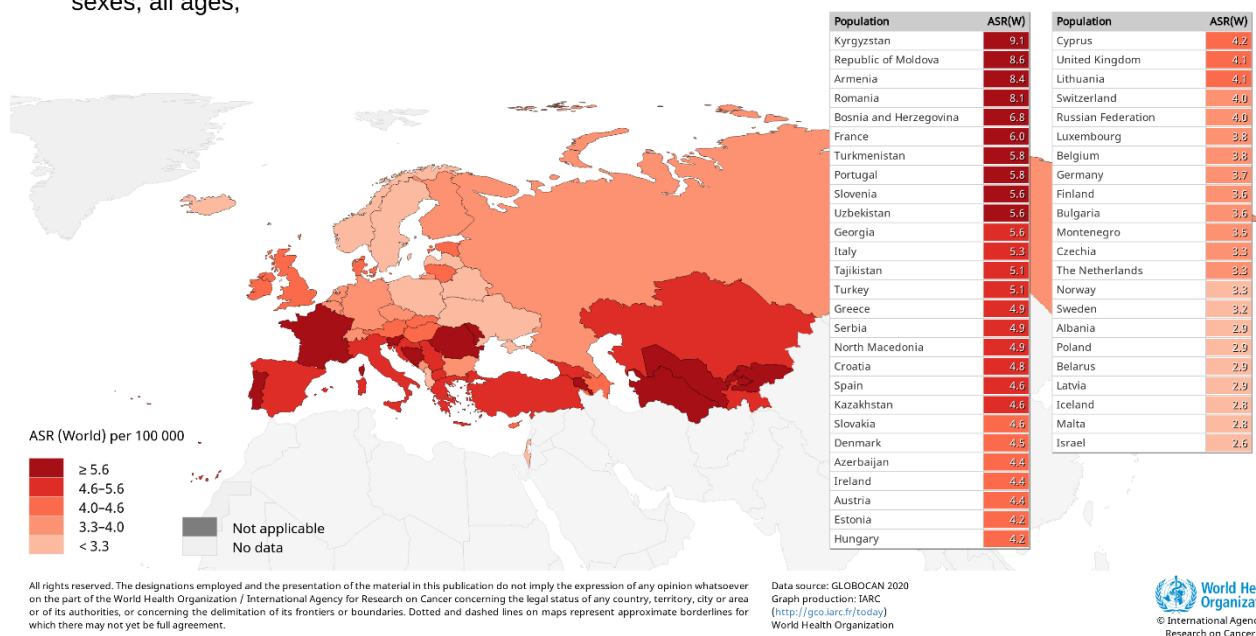


Figura 2. Tratta da <http://gco.iarc.fr/today>. Distribuzione dei tassi stimati di mortalità per tumore del fegato standardizzati per età (mondo) o ASR (W) per 100,000 abitanti in entrambi i sessi in Europa nel 2020.⁽⁶⁾

Il numero dei tumori epatici e delle vie biliari a livello mondiale è stimato a oltre 1 milione nel 2025, con un aumento dell'incidenza e della mortalità rispettivamente del 13.1% e del 13.3% dal 2020. (Figura 3 e 4).

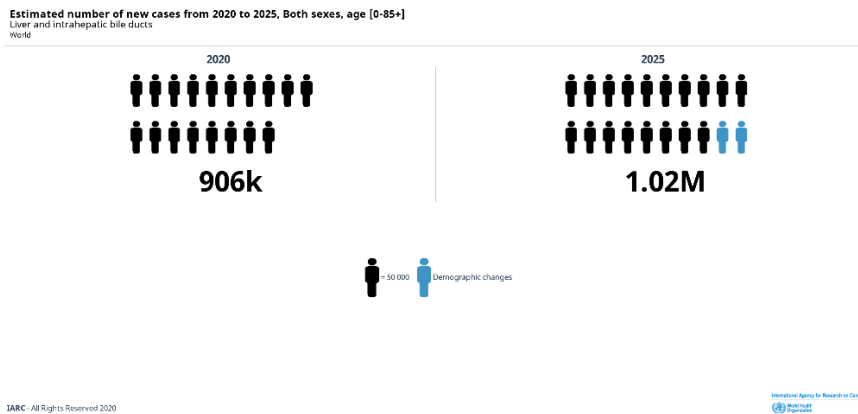


Figura 3. Tratta da <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Incidenza stimata dei tumori epatici e delle vie biliari a livello mondiale dal 2020 al 2025. Ogni uomo in figura rappresenta 50 mila casi.⁽⁷⁾

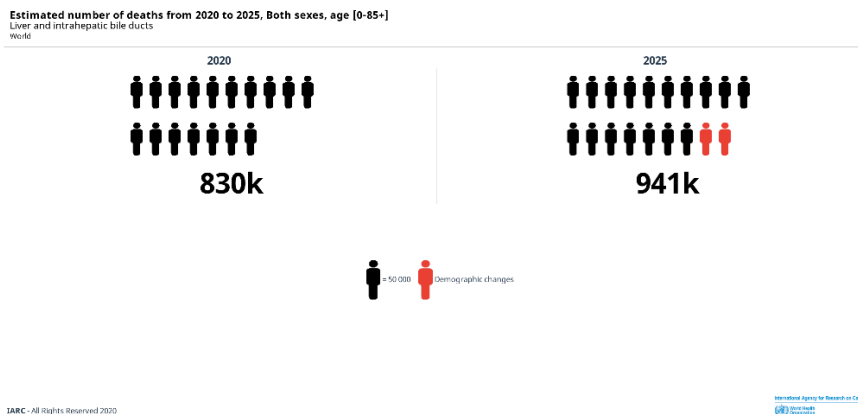


Figura 4. Tratta da <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Mortalità stimata da tumori epatici e delle vie biliari a livello mondiale dal 2020 al 2025. Ogni uomo in figura rappresenta 50 mila casi.⁽⁸⁾

Il rischio di HCC aumenta con l'età. (9) Il picco di incidenza del carcinoma epatocellulare è 75 anni. (2) L'incidenza di HCC negli uomini è da 2 a 4 volte superiore a quella nelle donne. (10) I meccanismi alla base della maggiore incidenza di tumori negli uomini rispetto alle donne sono molteplici e includono fattori genetici, ormonali, ambientali e occupazionali (fumo, dieta, esposizione solare, stress). La prevalenza di HCC negli uomini è superiore alle donne anche per la maggior quantità di interleuchine-6 (IL-6), che è inibita dagli estrogeni nelle donne. (11,12)

Il rapporto mortalità-incidenza per tumore del fegato è prossimo a uno, indicativo di prognosi sfavorevole. (13) La mortalità per tumore del fegato negli uomini è circa tre volte superiore a quella nelle donne. (1) La sopravvivenza dei pazienti con HCC a 5 e a 10 anni dalla diagnosi è rispettivamente del 20% e del 10%. (4) Se viene effettuata una diagnosi precoce, i pazienti con HCC possono essere sottoposti a resezione o trapianto epatico, con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 70%. (14) I pazienti con HCC in stadio intermedio e avanzato hanno una sopravvivenza media rispettivamente di 20-30 mesi e 10-19 mesi. (15) La prognosi dei pazienti con HCC non trattato è infausta indipendentemente dallo stadio tumorale, con una sopravvivenza media di 3-4 mesi. (16)

I fattori di rischio più comuni del carcinoma epatocellulare sono le infezioni virali (epatite B e C), l'abuso di alcol e la sindrome metabolica. (1) Altri fattori di rischio sono l'emocromatosi, il deficit di alfa-1-antitripsina, (17) le malattie autoimmuni del fegato (18), le aflatossine e il fumo. (10) Le epatiti B e C rappresentano circa l'85% delle cause di HCC a livello globale. La più alta prevalenza di epatite B si registra in Asia e in Africa, e dell'epatite C in Occidente e in Giappone. (4) La cirrosi rappresenta il maggior fattore di rischio per l'HCC. La prevalenza della cirrosi nei pazienti con HCC è del 85-95%. (19) Circa 1-8% dei pazienti con cirrosi è affetto da HCC ogni anno. (17) Il 20% degli HCC si manifesta su fegato sano. (20) Il carcinoma epatocellulare su steatosi epatica non alcolica (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) viene diagnosticato più frequentemente in uno stato avanzato e su fegato non cirrotico rispetto ad altre eziologie. (21,22) Negli

ultimi anni si è riscontrato un trend in crescita delle cause metaboliche di HCC rispetto a quelle virali. (23) La prevalenza di NAFLD è del 25% nella popolazione generale e raggiunge il 90% nei pazienti obesi. Negli Stati Uniti la prevalenza di NAFLD nei pazienti magri è di circa il 7%. L'obesità è una condizione di importanza tale da essere annoverata fra le nove patologie non trasmissibili di cui l'organizzazione mondiale della salute (WHO) si è prefissata di occuparsi nei prossimi anni. Nel 2030 la più alta prevalenza di steatoepatite non alcolica (NASH) in Europa è attesa in Italia con circa il 29% dei casi e nella fascia d'età fra i 55 e i 59 anni. (24) La steatoepatite non alcolica rappresenta una causa crescente di trapianto epatico per HCC negli Stati Uniti. (25)

La prevenzione dell'HCC si basa sulla vaccinazione contro l'epatite B nei neonati e nelle popolazioni ad alto rischio (26–28), sugli interventi attuati a livello internazionale per ridurre l'esposizione ai fattori rischio delle patologie epatiche, (29) e sul trattamento dell'epatite B e C. (17)

Ruolo della sorveglianza ecografica nella diagnosi precoce di carcinoma epatocellulare

La sorveglianza nei pazienti a rischio di carcinoma epatocellulare consente la diagnosi precoce di HCC (con odds ratio, OR di 2.11), maggiore eleggibilità al trattamento curativo (61.8% versus 38.2%, $P < 0.001$) e il conseguente significativo aumento della sopravvivenza (45.6% versus 28.8% a 3 anni con $P < 0.001$) rispetto ai pazienti non sottoposti a sorveglianza. (19)

Le linee guida internazionali concordano che la sorveglianza nei pazienti ad alto rischio di HCC dovrebbe essere eseguita ogni sei mesi con ecografia addominale.(17,30–32) I pazienti con cirrosi HCV-relata e HCC trattato con intento curativo mantengono il rischio di recidiva tumorale anche dopo aver ottenuto una risposta virologica sostenuta (*sustained virologic response*, SVR) al trattamento con agenti antivirali ad azione diretta (*direct antiviral agents*, DAA). Le linee guida europee raccomandano un follow-up con imaging ad intervalli di 3-4 mesi per i primi due anni, che può successivamente essere eseguito a cadenza semestrale. La sorveglianza è raccomandata anche nei pazienti con HCV su fibrosi Metavir F3 in quanto ad alto rischio di HCC. (17) I pazienti con cirrosi dovrebbero essere sottoposti a sorveglianza se l'incidenza stimata di HCC è almeno dell'1.5% l'anno. (32) I pazienti con HBV trattati con terapia antivirale con analoghi nucleot(s)idi e con persistente soppressione virologica hanno un rischio oncologico troppo basso per la sorveglianza (rischio cumulativo di HCC a 8 anni di circa il 4%). (4,33) Anche i pazienti con NAFLD in assenza di cirrosi hanno una incidenza annua stimata di HCC inferiore all'1%, non sufficiente per una sorveglianza costo-efficace. (8) Non ci sono raccomandazioni sulla sorveglianza in base all'età del paziente. (17)

Solo due studi clinici randomizzati controllati (*randomized control trial*; RCT) sono stati eseguiti confrontando sorveglianza ecografica e assenza di sorveglianza.(34,35) Il 90% dei pazienti, adeguatamente informati sulla sorveglianza, rifiutano la partecipazione a un RCT che confronta la sorveglianza ecografica con un

gruppo di controllo non sorvegliato. (36) Il razionale della sorveglianza dei pazienti a rischio di HCC e le difficoltà nella realizzazione di un RCT in questo setting vengono illustrate da un editoriale per *l'American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD). (37) Uno studio randomizzato controllato con oltre 18 mila pazienti con epatopatia HBV-relata ha mostrato una sopravvivenza significativamente maggiore dei pazienti sottoposti a sorveglianza ecografica e misurazione del valore di AFP a cadenza semestrale rispetto al gruppo di controllo non sorvegliato. Nonostante la scarsa aderenza al programma di sorveglianza, la mortalità per HCC dei pazienti sorvegliati è stata ridotta del 37% a due anni. (35) In un ulteriore studio asiatico, oltre 5 mila pazienti con epatopatia HBV-relata sono stati randomizzati a un gruppo di sorveglianza semestrale (ecografia e AFP) e uno di controllo. I pazienti sorvegliati hanno ricevuto diagnosi di HCC in stadio precoce in proporzione significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo (29.6% versus 6%). (34)

Uno studio prospettico ha sorvegliato 446 pazienti con cirrosi Child A/B concludendo che l'aggiunta di AFP alla sorveglianza ecografica aumenta la sensibilità dell'ecografia dal 43.9% al 90.2% con una riduzione della specificità dal 91.5% all'83.3%. (38) Secondo una metanalisi la sensibilità dell'ecografia nel riscontro di HCC in stadio precoce passa dal 45% al 63% con l'aggiunta di AFP, tuttavia l'ecografia da sola ha una maggiore specificità (92%) rispetto alla combinazione con il marcatore tumorale (84%). (39) Non vi sono differenze significative in termini di sopravvivenza fra i pazienti a rischio di HCC sorvegliati con ecografia oppure con ecografia associata al valore di AFP. (19) L'utilizzo di questo marker tumorale nella sorveglianza semestrale non è raccomandato per la scarsa sensibilità nei tumori di piccole dimensioni e il rapporto costo-efficacia non favorevole. (4) Le linee guida internazionali concordano sulla sorveglianza ecografica ma hanno opinioni contrastanti riguardo l'aggiunta di AFP, il cui utilizzo a scopo di sorveglianza non è raccomandato dalle linee guida europee. (17,31,32)

L'ecografia addominale consente la diagnosi precoce di HCC in pazienti a rischio con un OR di 2.04 (95% CI, 1.55-2.68) rispetto ai pazienti non sottoposti a sorveglianza. (19) Il gruppo *Italian Liver Cancer* (ITA.LI.CA) ha mostrato che i pazienti a rischio di HCC sottoposti a sorveglianza hanno una sopravvivenza significativamente più lunga rispetto ai pazienti con diagnosi di HCC casuale o sintomatica, anche dopo correzione per *lead-time bias*. (40) Tuttavia, solo 4 su 10 HCC vengono diagnosticati in stadio precoce. (39) Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi modelli per la stratificazione del rischio di HCC che potrebbero guidare nuove strategie per una sorveglianza costo-efficace in pazienti con HCV trattati con DAA con SVR, (41) NAFLD (42,43) e HBV. (44)

CEUS e sistema LI-RADS: una rivoluzione nella pratica clinica

L'ecografia con mezzo di contrasto (*contrast-enhanced ultrasound, CEUS*) è una metodica ampiamente utilizzata nella pratica clinica. (45) Non è necessario eseguire esami di laboratorio prima della CEUS in quanto i mezzi di contrasto ecografici non sono cardiotossici, epatotossici o nefrotossici, e non c'è evidenza di effetti sulla funzione tiroidea. (46,47) Le reazioni avverse ai mezzi di contrasto ecografici sono significativamente inferiori rispetto ai mezzi di contrasto a base di iodio o gadolinio. (48) Il SonoVue® (Bracco Suisse SA, Ginevra, Svizzera), un mezzo di contrasto ecografico costituito da microbolle di esafluoruro di zolfo, si è dimostrato sicuro in oltre 50.000 ecografie addominali con un tasso di eventi avversi gravi inferiori allo 0.01%. (49,50) Ulteriori vantaggi della CEUS includono la disponibilità della metodica, (51,52) l'assenza di rischi da esposizione radiante, (53) l'eliminazione rapida del mezzo di contrasto attraverso l'espiazione, (54,55) la capacità di individuare lesioni focali epatiche *real-time* e in maniera non-invasiva. (56) È possibile inoltre eseguire la CEUS al letto del paziente e guidare biopsie epatiche. (57) Secondo le linee guida ecografiche, la CEUS può essere utilizzata per la selezione di lesioni focali epatiche su fegato cirrotico da sottoporre a biopsia quando sono multiple o hanno diverso pattern di enhancement. (46)

La tollerabilità e la sicurezza del mezzo di contrasto ecografico permettono l'eventuale somministrazione di un ulteriore bolo nella stessa sessione qualora indicato. (58) Se eseguita da personale esperto, la CEUS può ridurre i costi evitando ulteriori imaging. (59) Il paziente ha il vantaggio di ricevere una refertazione immediata evitando stressanti tempi di attesa (51) o ansia causata da claustrofobia per altre metodiche contrastografiche. (60) La presenza esclusivamente intravascolare del mezzo di contrasto ecografico consente una migliore visualizzazione della morfologia vascolare delle lesioni focali epatiche rispetto a TC/RM e la possibilità di caratterizzare noduli con diagnosi indeterminata. (61,62)

I limiti della CEUS includono le difficoltà tecniche nell'esaminare noduli profondi soprattutto in caso di steatosi epatica, tuttavia scansioni in decubito laterale sinistro possono aiutare a ridurre questo limite. I noduli più piccoli visibili in CEUS vanno dai 3 ai 5 millimetri. (58) L'utilizzo di sonde ad alta frequenza può facilitare lo studio di noduli superficiali di piccole dimensioni in CEUS con una sensibilità dell'88.9%, specificità del 92.6% e accuratezza del 96.2%. (63) I risultati del trial multicentrico DEGUM mostrano una buona accuratezza diagnostica della CEUS per i noduli di dimensioni ≤ 10 millimetri (80.6%) e per i noduli con diametro compreso fra 10 e 20 millimetri (84.9%). Il valore predittivo positivo (VPP) e il valore predittivo negativo (VPN) per la diagnosi di lesioni focali epatiche maligne (n=154 con diametro ≤ 20 mm) in CEUS è stato rispettivamente del 92.3% e del 95.1%. La CEUS ha un VPP del 92.7% e un VPN dell'85.7% nella diagnosi di lesioni focali epatiche con diametro ≤ 10 mm (n=62). (64) Le lesioni focali epatiche subcapsulari possono essere di difficile visualizzazione in ecografia, tale limite può essere superato con scansioni intercostali o in decubito laterale sinistro. (58) Altri fattori limitanti l'esame ecografico includono il meteorismo e le alterazioni del parenchima dovute alla cirrosi epatica. (4) La CEUS è una metodica operatore-dipendente che richiede training e apparecchiature adeguate. (46,65) Sebbene tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (RM) abbiano sensibilità e specificità elevate nella diagnosi di HCC, (66,67) l'ecografia è considerata la metodica di scelta per la sorveglianza nei pazienti cirrotici per i noti vantaggi fra cui il rapporto costo-efficacia. (68)

L'ecografia consente la diagnosi di HCC con una specificità del 92% (95% intervallo di confidenza, *confidence interval CI* 85%–96%) e una sensibilità in ogni stadio dell'84% (95% CI 76%–92%) che scende al 47% negli stadi precoci (95% CI 33%–61%).(39) Una metanalisi di 25 studi (n= 14 prospettici) ha messo a confronto la performance della CEUS con TC/RM nella diagnosi delle lesioni focali epatiche, mostrando che l'accuratezza diagnostica della CEUS non differisce significativamente dalle altre metodiche. (69) Dai risultati di una metanalisi di 45 studi con oltre 8 mila pazienti, la CEUS ha mostrato una sensibilità e una specificità

rispettivamente del 93% (95%-CI: 91–95%) e del 90% (95%-CI: 88–92%) per la diagnosi delle lesioni focali epatiche maligne. (70) In uno studio prospettico multicentrico (n=9 centri) l'accuratezza diagnostica della CEUS per le lesioni focali epatiche è stata confrontata con TC/RM in 121 pazienti. La CEUS con SonoVue® è risultata 30.2% più sensibile nel riscontrare malignità, 16.1% più specifica nell'escludere malignità e 22.9% più accurata rispetto a TC/RM. (71)

Lo studio multicentrico prospettico DEGUM (n=14 ospedali) ha arruolato 1349 pazienti con lesioni focali epatiche riscontrate all'ecografia convenzionale allo scopo di valutare la performance diagnostica della CEUS rispetto al gold standard (269 TC, 269 RM, 1006 esami istologici). Il 17.3% dei pazienti arruolati (n=234) era affetto da cirrosi epatica. La CEUS è stata la prima metodica ad essere eseguita dopo aver identificato almeno una lesione focale in ecografia convenzionale, come spesso accade nella pratica clinica. L'accuratezza diagnostica della CEUS rispetto alla combinazione delle altre metodiche (esame istologico e/o TC e/o RM) è stata del 90.3%. (72) Secondo i risultati del trial multicentrico DEGUM non ci sono differenze statisticamente significative fra CEUS e TC/RM nella diagnosi di focalità epatiche nella pratica clinica. (59,73) CEUS e RM sono risultate concordanti nella differenziazione tumorale (nodulo benigno o maligno) e sulla diagnosi esatta del nodulo (es. emangioma, iperplasia nodulare focale, HCC, metastasi epatiche) rispettivamente nel 85.9% e nel 77.9% dei casi. (59) La concordanza fra CEUS e TC sulla differenziazione tumorale è risultata leggermente inferiore (80.5%) a quella fra CEUS e RM, con simile concordanza sulla diagnosi esatta del nodulo (75.2%). (73) L'accuratezza della CEUS nella diagnosi di HCC (n=29) è stata del 79.3% (Se 79.3%, Sp 79.2%) rispetto al 78% della RM (Se 82.8%, Sp 75.5%). (59) L'accuratezza della CEUS e della TC nella diagnosi di HCC (n=40) è stata rispettivamente del 94.2% (Se 86.1%, Sp 96.6%) e dell'89% (Se 69.4%, Sp 95%). (73)

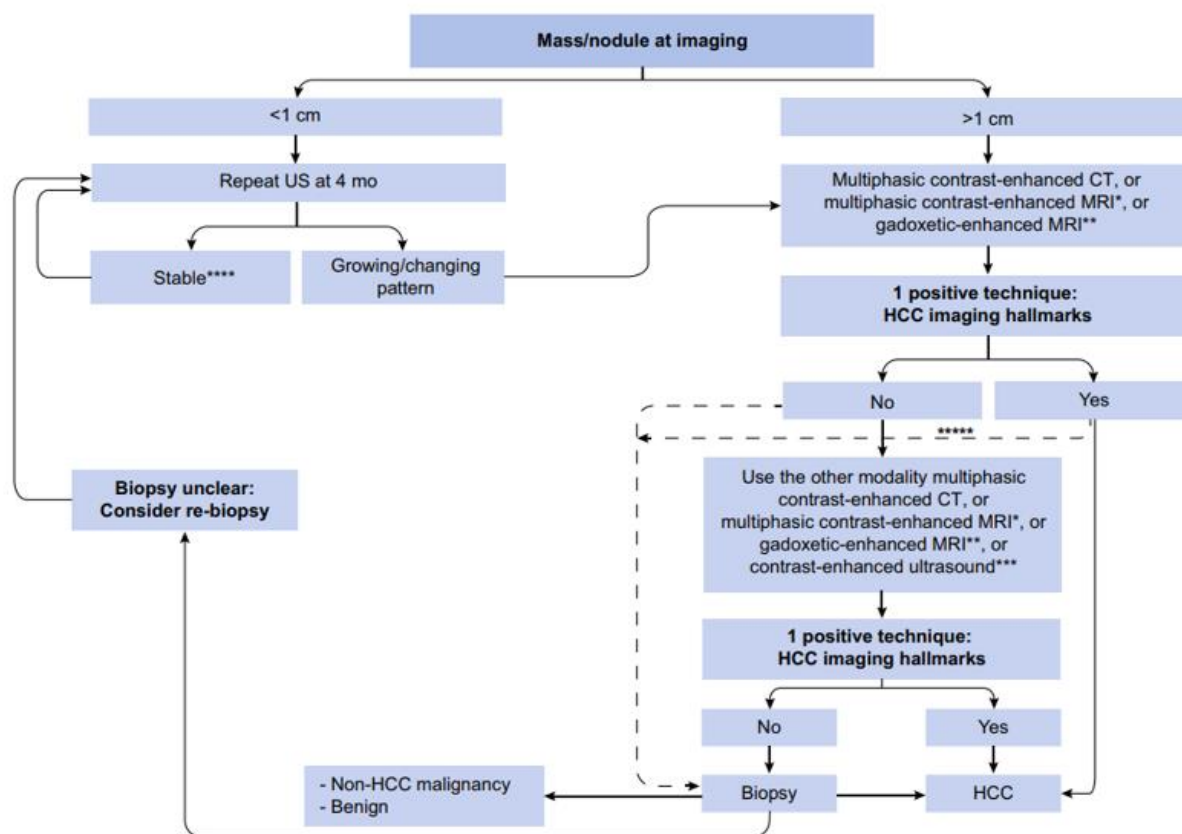
Uno studio multicentrico prospettico italiano ha valutato 575 lesioni focali epatiche (n= 114 HCC, n=16 colangiocarcinomi) in 485 pazienti non cirrotici in CEUS e successivamente in TC/RM. L'accuratezza diagnostica della CEUS è stata del 97.2% (Se 98.1%, Sp 95.7%) per la natura della lesione (maligna vs benigna) e dell'87.3% (Se 90.5%, Sp 85.4%) per la diagnosi esatta del nodulo rispetto a TC/RM.

Nell'87.6% dei pazienti ogni ulteriore indagine dopo la CEUS sarebbe stata superflua a fini diagnostici. (74) In uno studio multicentrico prospettico scozzese 127 pazienti con almeno una focalità epatica di recente riscontro in ecografia convenzionale (n= 152 noduli) sono stati sottoposti a CEUS una settimana prima o dopo il gold standard (TC, RM, biopsia). Gli investigatori *on-site* e *off-site blinded (in cieco)* hanno concordato che la CEUS riduce significativamente il numero delle lesioni indeterminate, migliora sensibilità e specificità, e riduce la necessità di ulteriori imaging. (75)

Wilson et al. hanno individuato le possibili spiegazioni della infrequente discordanza fra CEUS e TC/RM sull'enhancement delle lesioni focali epatiche. Il mezzo di contrasto della CEUS è esclusivamente intravascolare, mentre il mezzo di contrasto di TC/RM passa attraverso l'endotelio vascolare. Questo è particolarmente evidente nelle lesioni maligne che hanno un endotelio vascolare con elevata permeabilità. Un wash-out visibile in CEUS può essere mascherato in TC/RM per la presenza di mezzo di contrasto nell'interstizio tumorale in fase venosa portale (visualizzato come enhancement). La discordanza in fase arteriosa può essere spiegata dalla diversa acquisizione della iconografia nelle tre metodiche. La CEUS è una metodica *real-time* che consente l'acquisizione di circa 10-20 immagini al secondo, mentre le immagini TC/RM sono metodiche statiche. Infine, il grasso parenchimale ha un diverso aspetto nelle tre metodiche (fegato brillante per steatosi in ecografia, minore attenuazione e minore intensità del segnale in TC/RM). (76)

La CEUS è sicura, ben tollerata e con un'ottima accuratezza diagnostica. (77,78) Viene pertanto considerata una metodica valida per la diagnosi di HCC dalle linee guida asiatiche, (30,31,79) europee, (17) italiane (4,78,80), americane (32) ed

ecografiche. (46) Le linee guida americane hanno inizialmente rimosso la CEUS dall'algoritmo diagnostico per i possibili HCC falsi positivi in pazienti con colangiocarcinoma intraepatico. Il diverso approccio terapeutico per le due lesioni focali maligne primitive del fegato più comuni (HCC e colangiocarcinoma) impone una diagnosi accurata. (81) Gli studi pubblicati negli anni successivi hanno dimostrato che la CEUS permette di differenziare colangiocarcinoma e HCC grazie al pattern contrastografico (82–84), tuttavia la performance diagnostica della CEUS in questo contesto è oggetto di discussione. (85–87) Secondo le linee guida, il colangiocarcinoma in CEUS presenta un iperenhancement periferico (*rim-like hyperenhancement*) con ipoenhancement centrale in fase arteriosa, seguito da ipoenhancement in fase venosa portale e assenza di enhancement in fase tardiva. Un HCC su fegato cirrotico presenta tipicamente iperenhancement in fase arteriosa, isoenhancement in fase venosa portale e ipoenhancement in fase tardiva. (58) In un sottogruppo di noduli del trial prospettico DEGUM con conferma istologica di HCC (n=278) e colangiocarcinoma (n=42), la CEUS ha correttamente identificato quasi l'89% degli HCC e il 95.2% dei colangiocarcinomi.(88) Le linee guida europee e americane hanno incluso la CEUS fra le metodiche valide per la diagnosi di HCC nel 2018. (32,89) La CEUS è raccomandata come metodica diagnostica di seconda linea in caso di imaging panoramico non conclusivo. (17,30,31,46) Secondo l'algoritmo diagnostico proposto dalle linee guida europee (Figura 5) nei pazienti con cirrosi la CEUS andrebbe eseguita in caso di TC/RM non conclusive o controindicate.(17)



*using extracellular MR contrast agents or gadobenate dimeglumine. **Using the following diagnostic criteria: arterial phase hyperenhancement (APHE) and washout on the portal venous phase. ***Using the following diagnostic criteria: arterial phase hyperenhancement (APHE) and mild washout after 60 s. ****Lesion <1 cm stable for 12 months (three controls after four months) can be shifted back to regular six months surveillance. *****Optional for centre-based programmes.

Figura 5. Tratta dalle linee guida di epatologia europee (*European Association for the Study of the Liver, EASL*) sull'epatocarcinoma del 2018. Algoritmo diagnostico delle lesioni focali epatiche su fegato cirrotico.⁽¹⁷⁾

Le linee guida ecografiche mondiali elaborate dalla *World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology* (WFUMB) nel 2020 raccomandano l'utilizzo della CEUS come prima metodica in pazienti con insufficienza renale e in caso di riscontro di lesioni focali epatiche all'ecografia convenzionale in pazienti con o senza cirrosi epatica. Nei pazienti cirrotici la CEUS può essere la prima metodica per la diagnosi di lesioni focali maligne (HCC o non-HCC) ma in assenza di controindicazioni deve essere seguita da metodiche panoramiche (TC o RM) per uno staging accurato. (46)

Secondo le linee guida mondiali (WFUMB) ed europee (*European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology*, EFSUMB) una lesione focale epatica dovrebbe essere descritta in termini di grado e tempo di enhancement in CEUS. Il grado di enhancement descrive la vascolarizzazione della lesione (es. ipervascolare). A seconda dell'intensità del segnale nella lesione rispetto al parenchima circostante, la lesione può mostrare *iperenhancement* (intensità maggiore), *ipoenhancement* (intensità minore), *isoenhancement* (intensità uguale) o essere *nonenhancing* (priva di enhancement). L'enhancement viene descritto in ogni fase vascolare della CEUS: fase arteriosa (dai 10-20 secondi fino a 30-45 secondi dall'iniezione del mezzo di contrasto), fase venosa portale (fino a 2 minuti dopo l'iniezione) e fase tardiva (fino alla scomparsa delle microbolle dalla circolazione a circa 4-6 minuti). Il *wash-in* è il progressivo enhancement della lesione oggetto di studio dall'arrivo delle microbolle al picco di enhancement (*peak enhancement*), mentre il *wash-out* è la successiva riduzione di enhancement. (58) Il *wash-out onset* (inizio del wash-out) può essere precoce (*early wash-out*, < 60 secondi) o tardivo (*late wash-out*, ≥ 60 secondi dall'iniezione del mezzo di contrasto). Un wash-out di grado lieve e con inizio tardivo (*mild and late wash-out*) suggerisce un HCC (LR-5). Al contrario, un wash-out di grado marcato e/o con inizio precoce (*marked and/or early wash-out*) è indicativo di lesione probabilmente o certamente maligna ma non specifica per HCC (LR-M). (90)

Considerando il pattern contrastografico delle lesioni focali epatiche, l'*American College of Radiology* (ACR) ha elaborato il sistema *Liver Imaging Reporting and Data System*® (LI-RADS®) con l'obiettivo di standardizzare la raccolta dati e la refertazione delle metodiche di imaging (CEUS, TC, RM) per la diagnosi di HCC. (91) Il sistema CEUS LI-RADS classifica i noduli epatici (non trattati, visibili all'ecografia convenzionale e senza conferma istologica) secondo la probabilità di HCC nei pazienti ad alto rischio (Figura 6). Le classi vanno da LR-1 (nodulo certamente benigno) a LR-5 (HCC certo). Le classi intermedie indicano rispettivamente un nodulo probabilmente benigno (LR-2), con probabilità intermedia

di malignità (LR-3) o un probabile HCC (LR-4). LR-M suggerisce un nodulo probabilmente o certamente maligno ma non specifico per HCC. LR-TIV suggerisce una invasione vascolare neoplastica (TIV). (92)








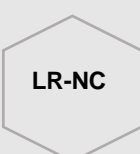
 LR-1	Certamente benigno (cisti, angioma, area di steatosi focale/risparmio steatosico) APHE globulare periferico è indicativo di angioma (CEUS LR-1)			
 LR-2	Probabilmente benigno -Nodulo solido con isoenhancement < 10 mm (se ≥ 10 mm, CEUS LR-3) -Non tipico per steatosi focale/risparmio steatosico, non formante massa con isoenhancement di qualsiasi dimensione -CEUS LR-3 con dimensioni stabili per ≥ 2 anni			
 LR-3		NO APHE		APHE (non ad anello, non globulare periferico)
 LR-4	Ø Nodulo (mm)	< 20	≥ 20	
 LR-5	Nessun WO	CEUS LR-3	CEUS LR-3	CEUS LR-4
	WO lieve e tardivo	CEUS LR-3	CEUS LR-4	CEUS LR-5
 LR-M	Probabilmente o certamente maligno ma non specifico per HCC. Presenta almeno uno dei seguenti criteri: APHE ad anello (rim enhancement) OPPURE washout precoce (< 60 sec) OPPURE washout marcato.			
 LR-TIV	Invasione vascolare neoplastica (TIV) certa			
 LR-NC	Non classificabile per la scarsa qualità o assenza delle immagini			

Figura 6. Classi CEUS LI-RADS. Probabilità intermedia di malignità (LR-3), HCC probabile (LR-4), HCC certo (LR-5). Ø nodulo (mm): dimensioni del nodulo in millimetri, iperenhancement in fase arteriosa (APHE), wash-out (WO). Schema basato sulle raccomandazioni CEUS LI-RADS di American College of Radiology (ACR), CEUS LI-RADS® v2017 CORE. (92)

Infine l'operatore può applicare, a sua discrezione, i criteri ancillari per aumentare l'accuratezza diagnostica o cambiare classe LI-RADS, eccetto passare a classe LR-5. I criteri ancillari suggestivi di malignità includono: crescita certa, struttura nodulo-in-nodulo (suggestivo di HCC) e aspetto a mosaico (suggestivo di HCC). Al contrario, una stabilità dimensionale ≥ 2 anni o una riduzione dimensionale suggeriscono benignità della lesione.(92)

Come evidente dallo schema i criteri fondamentali nella categorizzazione delle lesioni nelle varie classi sono la presenza di iperenhancement in fase arteriosa e la presenza ed il grado di washout nelle fasi portale e tardiva. Diversi studi hanno mostrato come la documentazione della presenza o meno di iperenhancement in fase arteriosa sia facilmente riconoscibile ed in modo ben riproducibile tra i vari operatori.(93,94) Il riconoscimento invece del washout, specie se appena percettibile ed in fase tardiva ed il suo grado sono purtroppo soggetti ad una variabilità nettamente maggiore con ridotta riproducibilità. (94–96) La documentazione pertanto della presenza e del grado di washout è al momento uno degli elementi di maggior criticità in quanto condiziona la attribuzione o meno di una lesione ad una classe come LR5 per la quale non sono previsti ulteriori indagini confirmatorie. È evidente pertanto come vi sia una necessità di nuovi strumenti tecnologici che possano aiutare l'operatore ad attribuire con maggior affidabilità una lesione a rischio di HCC indagata con CEUS all'una o all'altra classe.

Quantificazione digitale della perfusione tissutale con ecografia con mezzo di contrasto

Dynamic Contrast Enhanced Ultrasound (DCE-US) è una tecnica di imaging ecografico con mezzo di contrasto che consente la quantificazione della perfusione tissutale. Dopo l'iniezione del mezzo di contrasto ecografico, il software di quantificazione genera un grafico (*time-intensity curve, TIC*) che rappresenta l'intensità del segnale (in unità arbitrarie, AIU) nella regione di interesse definita dall'operatore (ROI) nel tempo (in secondi). Il grafico tempo-intensità (Figura 7) mostra il wash-in e wash-out del mezzo di contrasto nella ROI. Le linee guida EFSUMB riassumono i parametri della DCE-US, (Tabella 1) forniscono raccomandazioni sulla tecnica di esecuzione e indicazioni sull'interpretazione dei dati. (97)

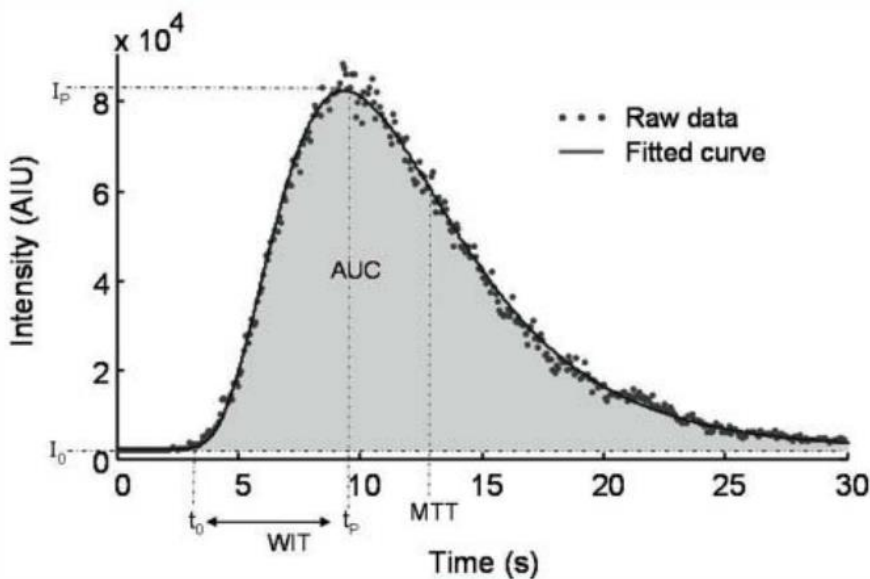


Figura 7. Grafico tempo-intensità. Tempo (secondi), Intensità (*absolute intensity units, AIU*), wash-in time (s) – **WIT, time zero offset (s) - t_0 , time to peak (s) - t_p , mean transit time (s) – **MTT**, zero intensity - I_0 , peak intensity (AIU) - I_p . Tratto da *Ultraschall in Med. 2012 “An EFSUMB Introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for Quantification of Tumour Perfusion”*.⁽⁹⁷⁾**

Tabella 1. Parametri della DCE-US: quantificazione della perfusione tissutale

Parametri (unità di misura) - abbreviazione	Significato
time zero offset (s) - t_0	Tempo dall'iniezione del mezzo di contrasto al primo segnale (l'arrivo delle microbolle) nella ROI
time to peak (s) - t_p	Tempo da intensità zero (prima che il contrasto arrivi nella ROI) alla massima intensità
wash-in time (s) - WIT	Tempo dal 5% al 95% di intensità
wash-out time (s) - WOT	Tempo dalla massima intensità a intensità zero durante la fase di wash-out
mean transit time (s) - MTT	Il tempo medio impiegato dalle microbolle per passare attraverso la ROI
peak intensity (AIU) - I_p	Valore di intensità massima in unità arbitrarie
area under the curve (AIU x s) - AUC	Area sotto la curva tempo-intensità (TIC)

AIU: *absolute intensity units*, **s:** secondi, **ROI:** regione di interesse, **TIC:** *time-intensity curve* (curva tempo-intensità). Tratto da *Ultraschall in Med. 2012 "An EFSUMB Introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for Quantification of Tumour Perfusion"*.⁽⁹⁷⁾

In letteratura sono descritti diversi modelli per la quantificazione della perfusione tissutale basati su principi fisici e fisiologici. Il modello logaritmico (*logonormal function*) è uno dei più usati e accurati perché prende in considerazione l'architettura della rete microvascolare. (97,98) Per la quantificazione della perfusione tissutale vengono utilizzati i video-clip della CEUS in formato *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM). (97) L'operatore delimita due regioni di interesse (una per la lesione e una per il parenchima circostante) alla stessa profondità nel parenchima epatico. La grandezza e la forma delle ROI non influenzano le curve tempo-intensità. (99) Idealmente le ROI dovrebbero essere visibili in ogni frame analizzato per poter ottenere una analisi accurata. I movimenti del fegato durante la respirazione rappresentano la principale fonte di errore nella quantificazione della perfusione tissutale, in quanto le ROI non possono essere

individuate nella zona scansionata durante tutta la durata del clip (che può durare diversi minuti). L'errore dovuto a movimenti respiratori può essere ridotto attraverso *motion compensation techniques* (tecniche di compensazione del movimento) mediante software e/o escludendo manualmente i frame in cui la lesione non è visualizzabile. (100–102) L'esclusione manuale delle immagini non utili ai fini dell'analisi richiede tempo e training adeguato, per cui è di difficile applicazione nella pratica clinica. In pochi minuti e con buoni risultati è possibile analizzare singole immagini (*still frames*) della lesione di interesse invece dell'intero clip. (97,103) Tuttavia non tutti i software consentono di analizzare singole immagini. (104,105)

DCE-US permette una valutazione oggettiva e affidabile delle lesioni focali. È una tecnica sicura, costo-efficace e riproducibile. (97) In letteratura sono descritte varie possibili applicazioni della DCE-US, fra cui la valutazione della risposta delle lesioni maligne a terapia sistemica o locoregionale (97,106–109) e la diagnosi di lesioni focali epatiche. (110–112) Le applicazioni della DCE-US nella valutazione del fegato e degli altri organi vengono illustrate dalle linee guida ecografiche. (45,46)

In conclusione, l'ultrasonografia è un campo in costante evoluzione capace di fornire informazioni sulla localizzazione e le caratteristiche delle lesioni focali epatiche in B-mode (ecografia convenzionale), la rigidità epatica (elastometria) e la vascolarizzazione (doppler). L'ecografia inoltre permette l'identificazione delle lesioni focali attraverso la sincronizzazione con altre metodiche (*fusion imaging*), la diagnosi (CEUS LI-RADS) e la quantificazione della perfusione tissutale (DCE-US). L'ecografia è una metodica multiparametrica, tanto da essere definita “*one-stop shop*” in una recente review. (113) La CEUS è una metodica operatore-dipendente, pertanto deve essere eseguita da ecografisti esperti. (96) La DCE-US è una tecnica promettente che potrebbe migliorare l'accuratezza diagnostica della CEUS, tuttavia sono necessari ulteriori studi per il suo utilizzo nella pratica clinica. In particolare uno dei primi contributi che potrebbe portare è quello di migliorare la sensibilità nel riscontrare alcune caratteristiche contrastografiche che contribuiscano alla

classificazione dei noduli nel sistema LI RADS e specificamente alla differenziazione tra le classi LR4 ed LR5 nei noduli con iperenhancement in fase arteriosa. Infatti in tali lesioni la presenza di washout in fase portale e tardiva codifica il nodulo come LR5 (cioè diagnostico per HCC), mentre la sua assenza lo codifica come LR4 (HCC probabile, ma non definito).

SCOPO DELLO STUDIO

Gli obiettivi di questo studio sono i seguenti:

1. Validare il sistema CEUS LI-RADS nella diagnosi di carcinoma epatocellulare in pazienti ad alto rischio di HCC usando come gold-standard la diagnosi istologica oppure in sua assenza accettate metodiche di imaging radiologico (tomografia computerizzata o risonanza magnetica) eseguite entro quattro settimane dalla CEUS
2. Valutare il ruolo di un software di quantificazione della perfusione tissutale per il riscontro e la gradazione del washout in noduli con iperenhancement arterioso e quindi conseguentemente per l'attribuzione alla classe CEUS LI RADS LR5 corrispondente alla diagnosi di carcinoma epatocellulare

PAZIENTI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati i dati raccolti da gennaio 2018 a marzo 2021 presso l'Ambulatorio di ecografia diagnostica ed interventistica – Medicina interna, malattie epatobiliari e immunoallergiche UOC Piscaglia, Policlinico di S. Orsola, Bologna. I dati costituiscono la analisi dei dati di Bologna, che fanno parte dello studio multicentrico prospettico, promosso dalla Thomas Jefferson University di Philadelphia (PA, US), che ha l'obiettivo primario di valutare la performance della CEUS nella diagnosi di carcinoma epatocellulare rispetto al gold-standard (esame istologico o TC/RM) nei pazienti a rischio di HCC (Tabella 2). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Area Vasta Emilia Centro con codice di approvazione 63/2017/U/Sper/AOUBo.

Tabella 2. Criteri di inclusione nello studio

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
Età \geq 21 anni	Gravidanza o allattamento
Capacità di esprimere consenso informato riguardo la partecipazione allo studio	Lesioni focali epatiche con diametro inferiore a 5 mm o superiore a 5 cm
Cirrosi o altri noti fattori di rischio per HCC, secondo le linee guida EASL e AASLD	Controindicazioni a CEUS
Lesioni focali epatiche non trattate e identificate in ecografia o TC/RM multifasica con mezzo di contrasto eseguite secondo pratica clinica nelle 4 settimane precedenti l'arruolamento nello studio OPPURE Lesioni focali epatiche non trattate programmate per follow-up con TC/RM multifasica con mezzo di contrasto, biopsia o trattamento chirurgico secondo la pratica clinica. La CEUS è stata eseguita nelle 4 settimane precedenti o successive l'imaging di follow-up oppure nelle 4 settimane precedenti la biopsia o il trattamento chirurgico.	Controindicazioni sia a TC che a RM
	Pazienti clinicamente instabili, malati terminali o il cui decorso clinico è imprevedibile
	Lesioni focali epatiche trattate con procedure endovascolari o percutanee
	Pazienti che hanno ricevuto un farmaco sperimentale nei 30 giorni precedenti la CEUS, o ne riceveranno uno entro 72 ore dalla CEUS.

Carcinoma epatocellulare (**HCC**), European Association for the Study of the Liver (**EASL**), l'American Association for the Study of Liver Diseases (**AASLD**), Ecografia epatica con mezzo di contrasto (Contrast-Enhanced Ultrasound, **CEUS**), Tomografia computerizzata (**TC**), Risonanza magnetica (**RM**).

La CEUS è stata eseguita da operatori con conoscenze e competenze tecniche adeguate alla pratica dell'ecografia, come da linee guida della EFSUMB. (114) Gli operatori, con una esperienza da 3 a 20 anni nell'esecuzione di ecografie con mezzo di contrasto su lesioni focali epatiche, hanno utilizzato gli ecografi MyLab Twice con sonda convex C1-8, MyLab9 con sonda convex C1-8 (Esaote, Genova, Italia) e Aixplorer con sonda convex XC6-1 (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, Francia). Dopo l'ecografia convenzionale, i pazienti hanno ricevuto una iniezione endovenosa di soluzione di esafluoruro di zolfo (SonoVue®, Bracco, Ginevra, Svizzera) in dose standard di 2.4 mL somministrata in bolo, seguita da flush con soluzione salina 0.9% da catetere venoso antecubitale (attraverso un ago cannula di calibro 18-22 Gauge). Se necessario, è stato somministrato un secondo bolo di 2,4 ml di mezzo di contrasto, seguito da un flush con soluzione salina.

Durante la CEUS è stato registrato un clip dall'arrivo del mezzo di contrasto nella zona di scansione fino a un minuto o al picco di enhancement. Successivamente sono stati registrati brevi clip di 5-10 secondi ad intervalli definiti dall'operatore per valutare un eventuale cambiamento di enhancement della lesione focale epatica oggetto di studio in fase portale e tardiva fino ad almeno 4 minuti. Le immagini della ecografia convenzionale e con mezzo di contrasto, e i clip della CEUS sono stati salvati in formato DICOM. Le lesioni focali epatiche sono state classificate dall'operatore al momento della CEUS secondo i criteri CEUS LI-RADS v2017. (115)

Qualora indicato è stata eseguita una TC o RM multifasica con contrasto. Il radiologo ha classificato le lesioni focali epatiche al momento dell'esame radiologico o con revisione a posteriori della iconografia, secondo i criteri TC/RM LI-RADS v2017 (116) fino a giugno 2018 e i criteri aggiornati TC/RM LI-RADS v2018 (117) a partire da luglio 2018. Sono stati raccolti i dati degli esami istologici derivanti da procedure eseguite secondo pratica clinica (biopsia, resezione e/o espianto epatico).

L'anamnesi è stata utilizzata per identificare i fattori di rischio per HCC, secondo le linee guida EASL e AASLD. (17,19) Sono stati inoltre raccolti i dati degli esami ematochimici recenti (emocromo, INR, alfafetoproteina, sodio, bilirubina, creatinina, albumina, transaminasi). La funzione epatica è stata calcolata con score Child-Pugh (118) e *Model For End-Stage Liver Disease* (MELD).(119) Lo stadio tumorale degli HCC è stato stabilito secondo *Barcelona Clinical Liver Cancer* (BCLC). (120) La rigidità epatica è stata misurata con elastografia ad ultrasuoni (*2D shear wave elastography, Aixplorer SuperSonic Imagine*), secondo le linee guida EFSUMB. (121)

Per valutare la possibilità di migliorare l'accuratezza diagnostica della CEUS nei pazienti a rischio di HCC è stata valutata la performance del software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera) nel riscontro di wash-out. Il software acquistato, al momento registrato al solo scopo di ricerca, ha consentito di analizzare retrospettivamente la perfusione tissutale di un sottogruppo di noduli di HCC sottoposti a CEUS i cui dati sorgente fossero idonei a questo tipo di analisi. In particolare sono state arruolate 37 lesioni che fossero risultate retrospettivamente idonee grazie a: a) disponibilità di immagini in formato DICOM delle fasi portale e tardiva, b) adeguata acquisizione tecnica ad essere analizzate, c) che presentassero iperenhancement in fase arteriosa, d) che avessero diametro superiore a 10 millimetri.

La quantificazione della perfusione tissutale è stata eseguita con il software LICEUS® utilizzando la iconografia CEUS in DICOM. Il software ha eseguito la calibrazione in base all'ecografo utilizzato per la CEUS e ha permesso di visualizzare i DICOM (immagini e clip) su una linea temporale. Dopo aver visualizzato i DICOM sul software, un operatore esperto ha controllato che il tempo di iniezione del mezzo di contrasto fosse correttamente identificato dal software e che le immagini CEUS fossero segnalate da un riquadro arancione (questo permette al software di distinguerle dalle immagini B-mode nella modalità *dual-screen*). Successivamente l'operatore ha selezionato le immagini-chiave per l'analisi di quantificazione della perfusione tissutale in modalità *dual-screen* (immagine B-mode e in CEUS)

rispettivamente: al picco di enhancement in fase arteriosa, a un minuto, e ogni 30 secondi fino alla fine della CEUS. Infine l'operatore ha individuato 2 regioni di interesse (*region of interest, ROI*) su ogni immagine-chiave, rispettivamente una ROI (in rosso) per delimitare il nodulo oggetto di studio e una ROI (in blu) che circonda parte del parenchima circostante (Figura 8). È possibile selezionare le immagini-chiave sia dalle *still frames* (immagini salvate dall'operatore al momento della CEUS) che dai clip registrati durante la CEUS.

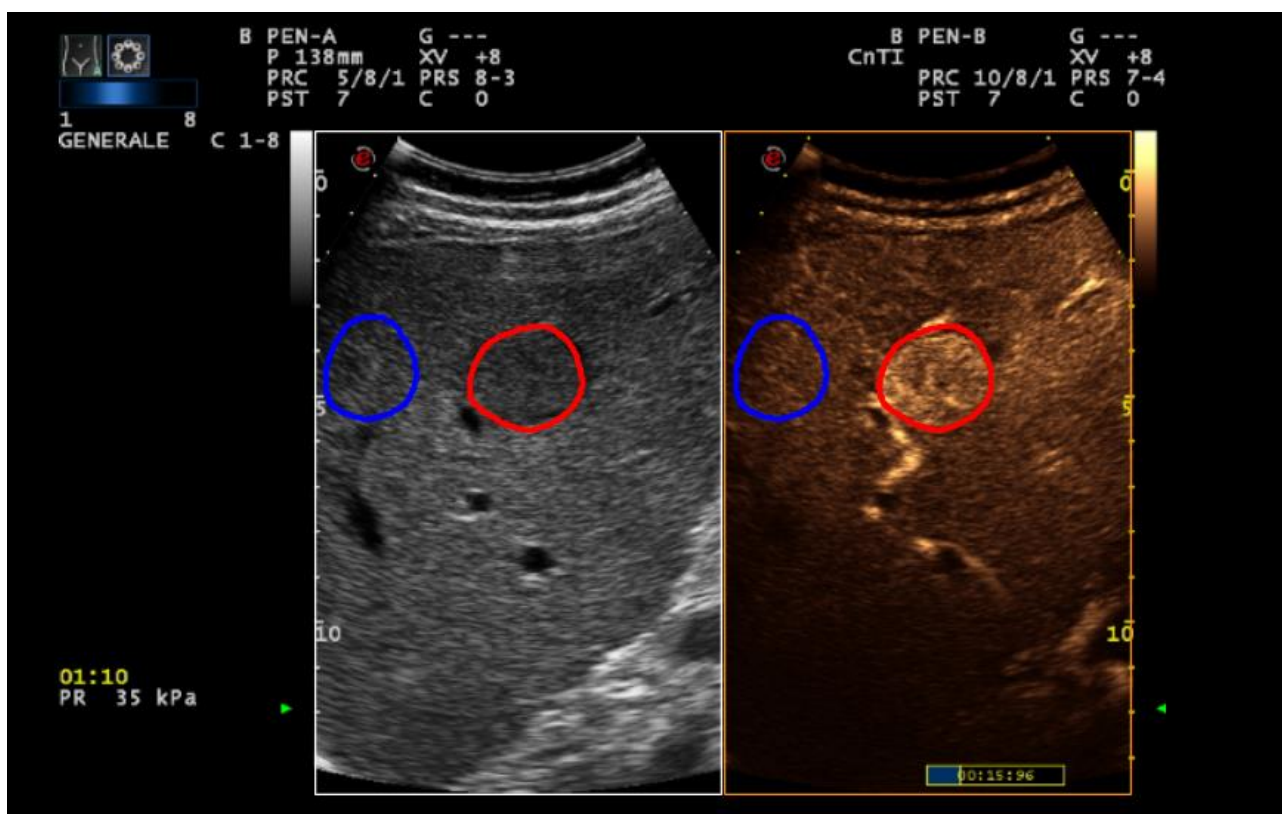


Figura 8. Epatocarcinoma, iperenhancement in fase arteriosa. In questa immagine in modalità *dual screen*, a sinistra viene mostrato il nodulo epatico in B-mode e a destra il nodulo con mezzo di contrasto (immagine CEUS segnalata da un riquadro arancione). Da notare le **due regioni di interesse (ROI, *region of interest*)**: la **ROI in rosso** circonda il nodulo studiato in CEUS, mentre la **ROI in blu** delimita parte del parenchima epatico circostante. Il tempo di iniezione del mezzo di contrasto (SonoVue®, Bracco, Ginevra, Svizzera) è indicato in basso a destra (15 secondi). Screenshot tratto dal software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera).

Il software permette di fare “copia-incolla” delle due ROI individuate nella prima immagine-chiave nelle successive immagini selezionate, l’operatore può successivamente posizionare le ROI in maniera più accurata. Le due ROI sono state selezionate alla stessa profondità nel parenchima epatico. Sono state escluse le immagini in cui il nodulo in studio non era chiaramente individuabile (ad esempio per interposizione di aria intestinale o per movimenti respiratori/cardiaci) e le immagini in cui non era possibile delimitare 2 ROI per prossimità a strutture vascolari e/o organi circostanti (ad esempio la colecisti). La Figura 9 mostra lo stesso nodulo epatico della Figura 8 in fase tardiva.

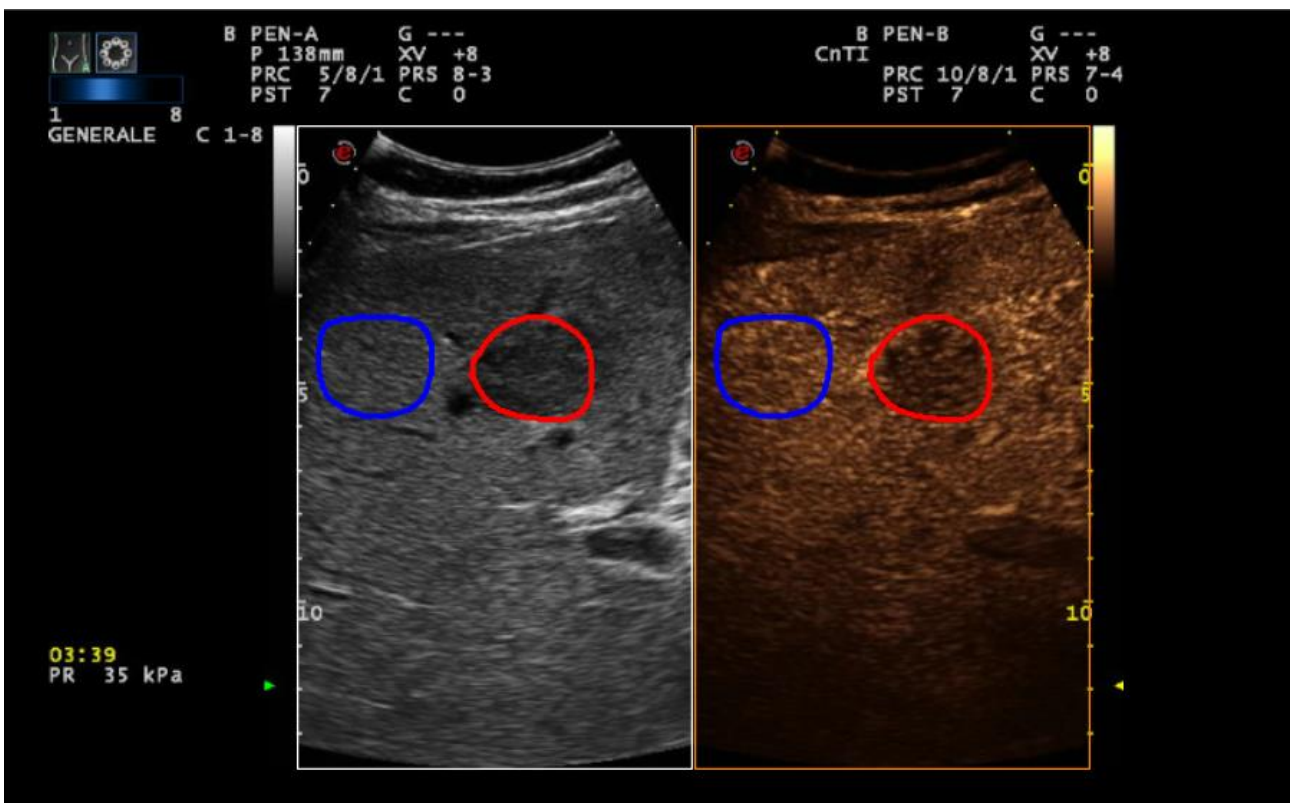


Figura 9. Epatocarcinoma, wash-out lieve e tardivo. In questa immagine in modalità *dual screen*, a sinistra viene mostrato il nodulo epatico in B-mode e a destra il nodulo con mezzo di contrasto (immagine CEUS segnalata da un riquadro arancione). Il tempo di iniezione del mezzo di contrasto (SonoVue®, Bracco, Ginevra, Svizzera) è 3 minuti e 39 secondi. Screenshot tratto dal software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera).

Utilizzando le due ROI individuate dall'operatore sulle immagini-chiave, il software ha quantificato la perfusione del nodulo rispetto al parenchima circostante in un rapporto logaritmico (nodulo/tessuto sano): un logaritmo pari a 0 indica che la perfusione del nodulo è uguale al parenchima circostante (indicativo di *isoenhancement*), un valore superiore a 1 indica che la perfusione del nodulo è superiore al parenchima circostante (indicativo di *iperenhancement*), un valore inferiore a 1 indica che la perfusione del nodulo è inferiore al parenchima circostante (indicativo di *ipoenhancement*), e un valore negativo indica che la perfusione del nodulo è nettamente inferiore rispetto al parenchima circostante (indicativo di wash-out). La perfusione del nodulo rispetto al resto del parenchima, nelle ROI selezionate dall'operatore (*log lesion/healthy* o logaritmo nodulo/tessuto sano), viene mostrata su un grafico temporale “*Echo-power Graph*” (Figura 10).

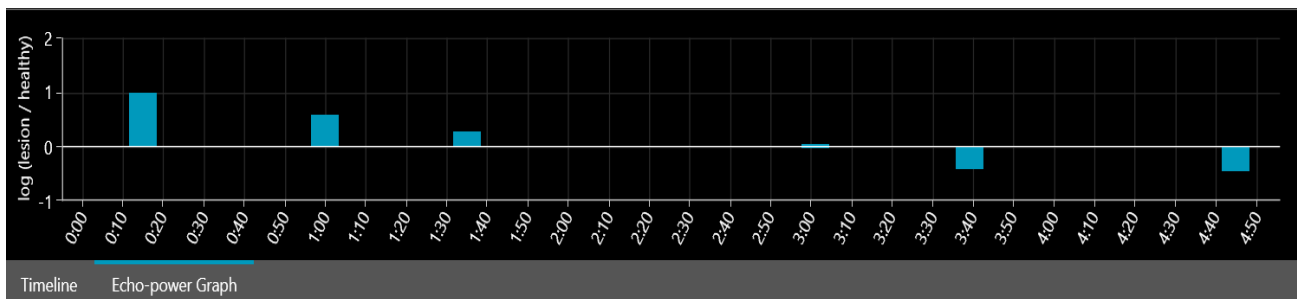


Figura 10. Il grafico temporale “Echo-power Graph” mostra la perfusione di un nodulo HCC durante la CEUS. In ascissa (y) è rappresentata la perfusione del nodulo rispetto al parenchima circostante in rapporto logaritmico e in ordinata (x) viene illustrata la durata della CEUS (4:45 secondi). In questo caso, l'operatore ha scelto 6 immagini chiave della CEUS (ognuna rappresentata da una colonna blu nel grafico): a 15 secondi, 1 minuto, 1 minuto e 35 secondi, 3 minuti, 3 minuti e 39 secondi, 4 minuti e 45 secondi. Il grafico indica che nelle prime due immagini-chiave (15 secondi e 1 minuto) la perfusione del nodulo è stata maggiore rispetto al parenchima circostante come da iperenhancement (logaritmo lesione/parenchima circostante rispettivamente pari a 1 e 0.6). Nella terza e quarta immagine-chiave (1 minuto e 35 secondi e 3 minuti) la perfusione del nodulo era simile al parenchima circostante (logaritmo lesione/parenchima pari a 0.3 e 0.07), poi il nodulo era progressivamente meno perfuso rispetto al parenchima circostante fino a quasi cinque minuti con valori sempre negativi (indicativi di wash-out), con valori di log lesione/ parenchima circostante rispettivamente di -0.43 (3 minuti e 39 secondi) e di -0.45 (4 minuti e 45 secondi). Screenshot tratto dal software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera).

Infine, la quantificazione della perfusione tissutale nelle due ROI selezionate viene mostrata su un file Excel sia con valori assoluti di enhancement (misurati in *arbitrary units, a.u.*) che in rapporto logaritmico (Figura 11).

Healthy parenchyma mean echo-power (a.u.)	Nodule mean echo-power (a.u.)	Nodule/parenchyma echo-power ratio	log(ratio)
10448,82896	28747,7595	2,751290084	1,012069923
15071,00276	27727,10304	1,839764977	0,609637833
14699,0041	19839,90051	1,349744538	0,299915344
11867,59273	12750,46299	1,074393373	0,071756198
15168,65758	9837,551508	0,648544636	-0,433024448
10415,34159	6616,920545	0,635305188	-0,453649785

Figura 11. Quantificazione della perfusione tissutale di un nodulo HCC. La prima colonna “*Healthy parenchyma mean echo-power (arbitrary units, a.u.)*” rappresenta l’intensità media del segnale nel parenchima epatico. La seconda colonna “*nodule mean echo-power (a.u.)*” rappresenta l’intensità media del segnale nel nodulo oggetto di studio. La terza colonna “*nodule/parenchyma echo-power ratio*” mostra il rapporto fra l’intensità del nodulo e del parenchima circostante. La quarta colonna “*log(ratio)*” è il rapporto logaritmico fra l’intensità del nodulo e del resto del parenchima. **Per questo studio sono stati utilizzati i valori dell’ultima colonna “log(ratio)”**. In questo caso in ogni colonna ci sono 6 valori (uno per ogni immagine-chiave selezionata dall’operatore). I valori negativi nel riquadro rosso sono indicativi di wash-out. Screenshot tratto dal software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera).

Per valutare la performance del software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera) nel riscontro di wash-out è stata utilizzata la mediana dei valori del *log(ratio)*, ossia il rapporto logaritmico fra l’intensità del nodulo e del resto del parenchima, delle due immagini-chiave con valore *log(ratio)* più basso a partire da 2 minuti dall’iniezione del mezzo di contrasto ecografico. In questo modo è stato attribuito un singolo valore ad ogni nodulo indicativo della differenza di enhancement fra la lesione e il parenchima circostante a partire da due minuti dall’iniezione del mezzo di contrasto.

L'analisi statistica è stata eseguita con software Excel Office 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) e software GraphPad Prism Versione 9.3.1 (471) per Windows (La Jolla California USA, www.graphpad.com). Le variabili nominali sono state indicate come rapporti e percentuali. Le variabili continue sono state espresse con mediana e range. L'accuratezza della CEUS nel riscontro di wash-out rispetto a TC/RM è stata valutata mediante tabelle di contingenza. La concordanza fra la classe CEUS e TC/RM LI-RADS è stata analizzata mediante k di Cohen. Sono stati calcolati accuratezza, sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo, rapporto di verosimiglianza positivo e negativo della classe CEUS LR-5 per la diagnosi di carcinoma epatocellulare. L'accuratezza diagnostica della CEUS rispetto al gold standard (TC/RM o esame istologico) è stata valutata mediante tabelle di contingenza. È stato individuato un *cut-off* per il valore di wash-out delle lesioni epatiche analizzate con software di quantificazione mediante curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Tutti i test sono stati considerati statisticamente significativi se $p < 0.05$.

RISULTATI

Caratteristiche descrittive dei pazienti

Nel centro di Bologna sono stati arruolati 140 noduli in 119 pazienti ad alto rischio di carcinoma epatocellulare, di cui 86 uomini (72.3%) e 33 donne (27.7%) con una età media di 69 (41-90) anni e un indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI) medio di 25,7 (13,9-38,3) kg/m². La maggioranza della popolazione era affetta da cirrosi epatica (82%) con una rigidità epatica media (n=91) di 16,3 (5,8-148) kPa. Più della metà dei pazienti (54,6%) aveva una epatopatia di origine virale con prevalenza di HCV (41%), seguita da HBV (11,7%) e HBV-delta (1,6%). Le altre epatopatie più comuni nella popolazione in studio erano rispettivamente NAFLD (25%) e alcol-relata (14%). Il 67% dei pazienti aveva una anamnesi negativa per HCC. Più dell'80% dei pazienti in studio aveva una epatopatia compensata (Child-Pugh A), il

14% era in classe Child-Pugh B e circa il 2% era in classe Child-Pugh C. Il 93% dei pazienti non aveva ascite all'inclusione nello studio. Il MELD-Na all'arruolamento in 117 pazienti era di 8 (6-34) punti. L'Alfafetoproteina aveva un valore medio di 4,5 (1,4-2863) ng/ml in 112 pazienti. (Tabella 3)

Tabella 3. Caratteristiche descrittive dei 119 pazienti arruolati nello studio

Età mediana (range), n=119		Uomini n= 86 (72.3%)	Donne n= 33 (27.7%)
	69 (41-90) anni	64 (41-89) anni	76 (46-90)
Razza			
Bianca	112 (94%)	79 (91,8)	33 (100%)
Asiatica	6 (5%)	6 (6,9%)	0
Afroamericana	1 (0,8%)	1 (1%)	0
BMI (kg/m²), mediana (range)			
	25,7 (13,9-38,3)	25,9 (13,9-38,3)	25 (17,6-32)
Eziologia della epatopatia			
Virale	n= 65 (54,6%)	n=39 (45%)	n=26
HCV	49 (41%)	27 (31%)	22 (78,7%)
HBV	14 (11,7%)	10 (11,6%)	4 (12%)
HBV-delta	2 (1,6%)	2 (2%)	0
NAFLD	30 (25%)	26 (30%)	4 (12%)
Alcol	17 (14%)	16 (18,6%)	1 (3%)
Criptogenetica	3 (2,5%)	3 (3,4%)	0
Autoimmune	1 (0,8%)	0	1 (3%)
Tossica	1 (0,8%)	1 (1%)	0
Colangite sclerosante primitiva	1 (0,8%)	0	1 (3%)
Multifattoriale (esotossica + HBV)	1 (0,8%)	1 (1%)	0

Storia di HCC			
Si	39 (32,7%)	27 (31,4%)	12 (36%)
No	80 (67%)	59 (68,6%)	21 (63,6%)
Cirrosi			
Si	98 (82%)	80 (93%)	28 (84,8%)
No	21 (17,6%)	16 (7%)	5 (15%)
Ascite			
Assente	111 (93%)	81 (94,2%)	30 (91%)
Lieve	5 (4,2%)	3 (3,4%)	2 (6%)
Moderata o Severa	3 (2,5%)	2 (2,3%)	1 (3%)
Child-Pugh			
A	99 (83,2%)	68 (79%)	31 (94%)
B	17 (14,2%)	16 (18,6%)	1 (3%)
C	3 (2,5%)	2 (2,3%)	1 (3%)
Mediana (range)			
MELD-Na (n = 117)	8 (6-34)	8 (6-25), n=84	8 (6-34), n=33
Rigidità epatica (kPa) n = 91	16,3 (5,8-148)	16,8 (5,8-148), n=66	16,3 (6,6 – 63,7), n=25
AFP (ng/mL) n = 112	4,45 (1,4-2863)	4,5 (1,4-1716), n=81	4,4 (1,4 – 286, 3), n= 31

Indice di massa corporea (**BMI**, *body mass index*), virus dell'epatite B (**HBV**), virus dell'epatite C (**HCV**), steatosi epatica non alcolica (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*, **NAFLD**), carcinoma epatocellulare (**HCC**), Alfafetoproteina (**AFP**).

Complessivamente in 67/119 pazienti (56%) è stata fatta diagnosi di HCC (n=72 noduli) all'arruolamento nello studio. I pazienti con HCC, in gran parte uomini (71,6%), avevano età media di 76 (46-90) anni e BMI di 25,8 (13,9-38,3) kg/m². Le epatopatie più comuni in questo gruppo erano HCV (46,3%) e NAFLD (26,8%). L'alfafetoproteina era in media 5,25 (1,9-2863) ng/ml in 62 pazienti. Più dell'80% dei pazienti aveva una cirrosi epatica compensata con MELD-Na di 8 (6-21) in 66 pazienti e una rigidità epatica di 18,4 (7,5-148) kPa in 49 pazienti. Per la maggioranza dei pazienti era la prima diagnosi di HCC (62,7%). In venticinque pazienti con storia di HCC trattato (resecato o ablato) è stato diagnosticato un HCC in

un'altra porzione del fegato, escludendo che si trattasse di nodulo satellite. Metà dei pazienti era in stadio BCLC A all'arruolamento. (Tabella 4).

Tabella 4. Caratteristiche dei 67 pazienti che avevano almeno un HCC studiato alla CEUS (n=72 HCC totali)

Numero pazienti con solo 1 HCC oggetto di studio: 62	
Numero pazienti con 2 HCC oggetto di studio: 5	
Genere (n=67)	
Uomo	48 (71,6%)
Donna	19 (28,3%)
Età	Mediana (range)
	76 (46-90) anni
Razza	
Bianca	65 (97%)
Asiatica	1 (1,5%)
Afroamericana	1 (1,5%)
BMI (kg/m²)	Mediana (range)
	25,8 (13,9-38,3)
Eziologia della epatopatia	
Virale	n=38 (56,7%)
HCV	31 (46,3%)
HBV	6 (8,9%)
HBV-delta	1 (1,5%)
NAFLD	18 (26,8%)
Alcol	8 (11,9%)
Criptogenetica	1 (1,5%)
Colangite sclerosante primitiva	1 (1,5%)
Multifattoriale (esotossica + HBV)	1 (1,5%)
Storia di HCC	
Si	25 (37,3%)
No	42 (62,7%)

Cirrosi	
Si	57 (85%)
No	10 (15%)
Child-Pugh	
A	56 (83,5%)
B	10 (14,9%)
C	1 (1,5%)
BCLC	
0	16 (23,8%)
A	34 (50,7%)
B	8 (11,9%)
C	8 (11,9%)
D	1 (1,5%)
	Mediana (range)
MELD-Na (n = 66)	8 (6-21)
Rigidità epatica (kPa) n = 49	18,4 (7,5-148)
AFP (ng/mL) n = 62	5,25 (1,9-2863)

Indice di massa corporea (**BMI**, body mass index), virus dell'epatite B (**HBV**), virus dell'epatite C (**HCV**), steatosi epatica non alcolica (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, **NAFLD**), carcinoma epatocellulare (**HCC**), Alfa-fetoproteina (**AFP**).

Caratteristiche descrittive dei noduli

Il diametro maggiore dei 140 noduli analizzati nello studio era mediamente di 20 (7-50) millimetri. La maggioranza dei noduli (63,5%) è stata identificata nella porzione destra del fegato (nell'ordine: segmento V e VI, VIII e VII). I noduli erano per lo più ipoecogeni (63%) e con margini regolari (93,5%), Tabella 5. Più della metà dei noduli presentava iperenhancement omogeneo in fase arteriosa (Tabella 6).

Tabella 5. Caratteristiche dei noduli in ecografia convenzionale

n = 139* noduli totali		CEUS LR-5 con diagnosi definitiva di HCC (n=46)
Diametro maggiore (mm)	Mediana (range)	
	20 (7-50)	23 (8-50)
Segmento epatico		
1	0	0
2	14 (10%)	3 (6,5%)
3	16 (11,5%)	3 (6,5%)
4	20 (14%)	11 (23,9%)
5	25 (17,9%)	9 (19,5%)
6	25 (17,9%)	7 (15,2%)
7	15 (10,7%)	6 (13%)
8	24 (17%)	7 (15,2%)
Aspetto in B-mode		
Composizione		
Solido	133 (95,6%)	46 (100%)
Cistico	4 (2,8%)	0
Misto	2 (1,4%)	0
Ecogenicità		
Ipoecogeno	88 (63%)	30 (65,2%)
Iperecogeno	23 (19%)	5 (10,8%)
Misto	17 (14%)	9 (19,5%)
Isoecogeno	7 (5,8%)	2 (4,3%)
Anecogeno	4 (3,3%)	0
Margini in B-mode		
Regolari	130 (93,5%)	43 (93,5%)
Irregolari	6 (5%)	3 (6,5%)
Infiltranti	3 (2,5%)	0

*Nota: una lesione non valutabile CEUS LR-NC (non chiaramente visibile in B-mode) e pertanto non inserita nella tabella 5.

Tabella 6. Caratteristiche contrastografiche dei noduli

Fase arteriosa	
Pattern globulare periferico	4 (2,8%)
Iperenhancement omogeneo	59 (42%)
Iperenhancement eterogeneo	16 (11,4%)
Isoenhancement	35 (25%)
Ipoenhancement	17 (12%)
No enhancement	5 (3,5%)
Enhancement ad anello	2 (1,4%)
Non valutabile*	2 (1,4%)
Wash-out	
Si	69 (49,3%)
No	69 (49,3%)
Non valutabile*	2 (1,4%)
Grado di wash-out	
Lieve e tardivo	60 (42,8%)
Marcato e/o precoce	9 (6,4%)
Tempo di wash-out (secondi)	
Mediana (range)	128 (35-300), n =69

*Non valutabile: 1 lesione non chiaramente visibile in ecografia, 1 lesione con visualizzazione subottimale per soma del paziente. I noduli CEUS LR-5 con diagnosi definitiva di HCC (n=46) mostravano iperenhancement omogeneo nell'82.6% dei casi (n=38) ed iperenhancement eterogeneo nel 17.4% (n=8) e wash-out lieve a tardivo a partire da 147,5 (70-300) secondi.

Diagnosi dei noduli

Delle 140 lesioni focali epatiche sottoposte a CEUS, 91 lesioni hanno ricevuto diagnosi al momento dell'arruolamento nello studio e 49 lesioni con diagnosi indeterminata sono state sottoposte a follow-up. (Tabella 7).

Tabella 7. Diagnosi al momento dell'arruolamento (n=140 noduli)

Diagnosi (n=91)	Numero noduli (%)	Gold-standard per la diagnosi	Classe CEUS LI-RADS
Emangioma	5 (3,5%)	RM (n=3) TC (n=2)	LR-1 (n=4) LR-3 (n=1)
Cisti semplice	4 (2,8%)	RM (n=3) TC (n=1)	LR-1 (n=4)
Ascesso	2 (1,4%)	istologia (n=2)	LR-NC (n=1) LR-5 (n=1)
HCC	72 (51,4%)	istologia (n=22) TC (n=28) RM (n=22)	LR-5 (n=46) LR-4 (n=12) LR-M (n=6) LR-3 (n=5) LR-NC (n=2) LR-TIV (n=1)
Colangiocarcinoma	2 (1,4%)	istologia (n=2)	LR-4 (n=1) LR-5 (n=1)
Metastasi	2 (1,4%)	istologia (n=2)	LR-M (n=2)
Parenchima cirrotico	2 (1,4 %)	istologia (n=2)	LR-3 (n=1) LR-NC (n=1)
Nodulo displastico ad alto grado	1 (0,7%)	istologia (n=1)	LR-5 (n=1)
Nodulo rigenerativo	1 (0,7%)	istologia (n=1)	LR-4 (n=1)
Diagnosi indeterminata (n=49) - classe LI RADS in TC/RM all'arruolamento*			
Noduli in follow-up, senza diagnosi istologica all'arruolamento	LR-NC = 21 (15%) LR-4 = 11 (7,8%) LR-3 = 6 (4,2%) LR-M = 2 (1,4%) LR-2 = 9 (6,4%)		

Tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (RM), carcinoma epatocellulare (HCC), LI-RADS Non classificabile (LR-NC). *Le 49 lesioni con diagnosi indeterminata all'arruolamento sono descritte in dettaglio in Tabella 12.

Al momento della CEUS l'operatore ha classificato le lesioni focali epatiche secondo il sistema CEUS LI-RADS (Tabella 8).

Tabella 8. Classe CEUS LI-RADS all'arruolamento

Classe CEUS LI-RADS	n = 140 noduli	Gold-standard
LR-1	8 (5,7%)	RM (n=6) TC (n=2)
LR-2	1 (0,7%)	RM (n=1)
LR-3	42 (30%)	istologia (n=9) TC (n=14) RM (n=19)
LR-4	23 (16,4%)	istologia (n=7) TC (n=5) RM (n=11)
LR-5	50 (35,7%)	istologia (n=15) TC (n=22) RM (n=13)
LR-M	8 (5,7%)	istologia (n=6) TC (n=1) RM (n=1)
LR-TIV	1 (0,7%)	TC (n=1)
LR-NC	5 (3,6%)	istologia (n=3) TC (n=1) RM (n=1)
Non valutabile*	2 (1,4%)	RM (n=2)

*Non valutabile: 1 lesione non chiaramente visibile in ecografia, 1 lesione con visualizzazione subottimale per soma del paziente.

LR-5

Durante lo studio sono stati diagnosticati 81 HCC, di cui 72 all'arruolamento e 9 al follow-up. Dei 72 HCC diagnosticati all'arruolamento (n=3 arruolati con esame istologico come gold-standard), 54 noduli erano in classe in classe TC/RM LR-5 (75%) e 46 noduli erano in classe CEUS LR-5 (63.8%), Tabella 9.

Tabella 9. Numero di HCC nelle classi CEUS LR-3, LR-4, LR-5

Ø Nodulo (mm)	NO APHE		APHE (non ad anello, non globulare periferico)	
	< 20	≥ 20	< 10	≥ 10
Nessun WO	LR-3 3	LR-3 2	LR-3 0	LR-4 10
WO lieve e tardivo	LR-3 0	LR-4 2	LR-4 0	LR-5 46

APHE: iperenhancement in fase arteriosa, **Ø:** diametro del nodulo, **WO:** wash-out.

Nel corso dello studio, il 30,5 % degli HCC individuati all'arruolamento sono stati sottoposti a diagnosi istologica (n=22/72). In totale in 46/50 noduli CEUS LR-5 (92%) è stata confermata la diagnosi di HCC (n=12, 26% con esame istologico). Degli altri 4 noduli CEUS LR-5 si è potuta ottenere diagnosi istologica in 3 noduli (un nodulo displastico ad alto grado, un colangiocarcinoma e un ascesso), mentre per un nodulo (TC LR-M) le condizioni cliniche non hanno permesso una diagnosi istologica. Complessivamente 20/22 HCC sono stati classificati rispettivamente secondo Edmondson e Steiner grado I (n=2), grado II (n=8), grado III (n=8) e grado IV (n=2). In 2/22 HCC non è riportato il grado Edmondson e Steiner, ma il grado WHO (1 ben differenziato e 1 scarsamente differenziato). (Tabella 10).

Tabella 10. Noduli HCC sottoposti a resezione/biopsia

HCC n=22	Classe LI-RADS		Diagnosi istologica (Resezione/biopsia epatica)	
	CEUS	TC/RM	Grado WHO	Edmondson e Steiner
1	LR-3	LR-5	1	1
2	LR-5	LR-5	0	2
3	LR-NC	LR-4	0	2
4	LR-5	LR-5	0	3
5	LR-5	LR-5	0	3
6	LR-5	LR-4	0	2
7	LR-3	LR-NC	0	2
8	LR-5	LR-5	0	3
9	LR-M	LR-5	0	2
10	LR-M	Diagnosi istologica per arruolamento	0	3
11	LR-M	LR-M	1	0
12	LR-5	Diagnosi istologica per arruolamento	2	2
13	LR-NC	Diagnosi istologica per arruolamento	0	1
14	LR-M	LR-M	0	3
15	LR-5	LR-5	3	0
16	LR-5	LR-5	0	2
17	LR-4	LR-5	1	3
18	LR-5	LR-4	3	4
19	LR-4	LR-5	0	2
20	LR-5	LR-5	2	3
21	LR-5	LR-5	3	4
22	LR-5	LR-5	1	3

Grado WHO (0: non riportato, 1: ben differenziato, 2: moderatamente differenziato, 3:

scarsamente differenziato). Grado Edmondson e Steiner (0: non riportato, 1: grado I, 2: grado II, 3: grado III, 4: grado IV). Tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (RM), ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), LI-RADS Non classificabile (LR-NC), carcinoma epatocellulare (HCC).

LR-M

I noduli CEUS LR-M (n=8) si sono confermati tutti maligni all'istologia (2 metastasi e 6 HCC). In totale le lesioni LR-M risultate maligne non-HCC nello studio erano 4, di cui 2 colangiocarcinomi intraepatici e 2 lesioni metastatiche (un adenocarcinoma indifferenziato e un carcinoma polmonare a piccole cellule). I colangiocarcinomi erano ipoecogeni, con diametro maggiore di 15 millimetri, enhancement in fase arteriosa (1 isoenhancement, 1 iperenhancement) e wash-out lieve e tardivo; rispettivamente CEUS LR-4 e LR-5. Entrambi i colangiocarcinomi erano in classe LR-4 in TC/RM. All'esame istologico i 2 colangiocarcinomi intraepatici (iCC) diagnosticati all'arruolamento erano rispettivamente moderatamente differenziato G2 e ben differenziato infiltrante secondo WHO 2018.

Le lesioni metastatiche erano ipoecogene, di maggiori dimensioni (29 e 45 millimetri) rispetto ai colangiocarcinomi. Entrambe le lesioni metastatiche sono state correttamente classificate come CEUS LR-M, rispettivamente per wash-out marcato e precoce – a 35 secondi (adenocarcinoma indifferenziato) e wash-out precoce – a 45 secondi (carcinoma polmonare a piccole cellule). In TC/RM le due lesioni metastatiche erano rispettivamente in classe LR-4 e LR-5. (Tabella 11) Due lesioni TC LR-M (CEUS LR-4 e LR-5) non sono state sottoposte a biopsia per condizioni cliniche non adeguate. (Tabella 12)

Tabella 11. Caratteristiche delle lesioni LR-M risultate maligne non HCC

CEUS								TC/RM				Istologia
Ø mm	US	AP	D	W O	W O (s)	WO grado	LR	Ø mm	AP	W O	LR	
15	ipo	IsoE	Omo	Si	147	Lieve	4	14	IsoE	Si	4	Colangiocarcinoma
15	ipo	IperE	Omo	Si	120	Lieve	5	9	IperE	Si	4	Colangiocarcinoma
45	ipo	IperE	Etero	Si	35	Marcato	M	54	IpoE	No	4	adenocarcinoma indifferenziato
29	ipo	IperE	Omo	Si	45	Lieve	M	25	IperE	Si	5	carcinoma polmonare a piccole cellule

Ø (mm): diametro massimo del nodulo in millimetri, **US:** ecogenicità del nodulo in B-mode (**ipo**, ipoecogeno: ecogenicità inferiore al parenchima circostante, **iper**, iperecogeno: ecogenicità superiore al parenchima circostante, **iso**, isoecogeno: ecogenicità uguale al parenchima circostante), **AP:** enhancement del nodulo in fase arteriosa (**ipoE**, ipoenhancement: vascolarizzazione inferiore al parenchima circostante, **iperE**, iperenhancement: vascolarizzazione superiore al parenchima circostante, **isoE**, isoenhancement: vascolarizzazione uguale al parenchima circostante), **D:** distribuzione dell'enhancement (**omo**: omogenea, **etero**: eterogenea), **WO:** wash-out, **WO (s):** inizio wash-out in secondi (*wash-out onset*), **WO grado:** grado del wash-out, **LR:** classe LI-RADS.

LR-1

In totale 11 lesioni benigne (7,8%) sono state diagnosticate rispettivamente come emangiomi (n=5), cisti epatiche (n=4) e ascessi (n=2). La CEUS ha correttamente identificato 4 emangiomi e 4 cisti (CEUS LR-1). Un emangioma (CEUS LR-3) è stato diagnosticato con imaging panoramico. I due ascessi hanno ricevuto diagnosi istologica.

Follow-up dei 49 noduli di natura indeterminata all'arruolamento

In totale 49 lesioni su 140 (35%) con diagnosi indeterminata all'arruolamento sono state sottoposte a follow-up. Fra queste, LR-NC (n=21), LR-4 (n=11), LR-2 (n=9), LR-3 (n=6), LR-M (n=2) in TC/RM. (Tabella 12)

LR-2

Delle 9 lesioni probabilmente benigne (LR-2) in TC/RM all'arruolamento (6.4%), 7 lesioni sono rimaste tali dopo 13.5 (6-24) mesi di follow-up con TC/RM e 2 lesioni sono diventate LR-3 (probabilità intermedia di HCC) dopo 21.5 (17-31) mesi di follow-up con RM. (Tabella 12)

LR-3

Complessivamente 6 lesioni TC/RM LR-3 all'arruolamento (4,2%) sono state sottoposte a un follow-up medio di 16 (12-21) mesi con TC/RM. (Tabella 12) Al follow-up le 6 lesioni sono risultate rispettivamente LR-3 (n=4) e LR-NC (n=2).

LR-4

In totale 23 lesioni focali epatiche (16,4%) sono state classificate come LR-4 in TC/RM all'inclusione nello studio. Fra queste 5/23 hanno ricevuto diagnosi istologica all'arruolamento, rispettivamente: colangiocarcinoma (n=2), HCC (n=2) e nodulo rigenerativo (n=1). In totale 7/23 lesioni TC/RM – LR-4 sono state sottoposte a trattamento locoregionale (CEUS LR-5). Complessivamente 11/23 lesioni TC/RM – LR-4 (in CEUS: n=5 LR-4, n= 5 LR-3, n=1 LR-NC) sono state sottoposte a follow-up. Delle 11 lesioni TC/RM – LR-4 in follow-up, rispettivamente: 5 lesioni sono risultate LR-5 dopo un follow-up medio di 15,2 mesi (3-28) con TC/RM; 4 lesioni sono risultate LR-4 dopo un follow-up medio di 13,5 mesi (9-21) con TC/RM; 1 lesione dimensionalmente invariata è risultata TC LR-3 dopo 12 mesi e 1 lesione è risultata un'area di alterata vascolarizzazione dopo 27 mesi in RM. Il follow-up medio delle lesioni TC/RM LR-4 (n=11) è stato di 15.3 (3-28) mesi. (Tabella 12).

LR-NC

In totale 21 lesioni LR-NC in TC/RM sono state sottoposte a follow-up (15% dei noduli in studio). La maggioranza delle lesioni LR-NC (15/21, 71%) è rimasta in classe LR-NC dopo un follow-up medio di 21,5 (3-36) mesi con TC/RM (n=9) o ecografia convenzionale (n=6). Delle 21 lesioni LR-NC in follow-up, 4 sono risultate rispettivamente: LR-3 dopo 8 mesi alla CEUS (n=1), LR-3 dopo 20 mesi alla TC (n=1), LR-5 (n=1) dopo 6 mesi alla TC, fegato macronodulare (n=1) dopo 12 mesi in TC e 2 lesioni LR-3 non sono state sottoposte a follow-up per decesso del paziente. Il follow-up medio delle lesioni TC/RM LR-NC (n=19) è stato di 19,4 (3-36) mesi (Tabella 12).

Tabella 12. Follow-up dei 49 noduli di natura indeterminata all'arruolamento

n=49	Classe LI-RADS			Ultimo follow-up disponibile				
	CEUS	TC	RM	Imaging	mesi	variato / invariato per dimensioni	Referto	OLT (istologico) o decesso
1	LR-4		LR-3	RM	12	invariato	LR-3	
2	LR-3		LR-4	RM	12	invariato	LR-4	OLT (HCC)
3	LR-4		LR-4	RM	28	variato (BCLC D)	LR-5	decesso
4	LR-3	LR-3		TC	12	invariato	LR-3	OLT (fegato cirrotico)
5	LR-3		LR-NC	RM	36	invariato	LR-NC	
6	LR-3	LR-NC		RM	36	invariato	LR-NC	
7	LR-3		LR-4	TC	28	variato (BCLC C)	LR-5	decesso

8	LR-4		LR-4	TC	12	invariato	LR-3	OLT (HCC)	
9	LR-3		LR-4	TC	12	invariato	LR-4	OLT (HCC)	
10	LR-4		LR-4	RM	12	invariato	LR-5		
11	LR-3	LR-NC		US	24	invariato	LR-NC		
12	LR-3		LR-NC	RM	36	invariato	LR-NC		
13	LR-3		LR-NC	TC	24	invariato	LR-NC		
14	LR-NC		LR-NC	US	8	invariato	LR-NC		
15	LR-3	LR-NC		TC	12	invariato	fegato macrono dulare		
16	LR-NC		LR-4	TC	9	invariato	LR-4	OLT (fegato cirrotico)	
17	LR-3		LR-NC	RM	17	invariato	LR-NC		
18	LR-3		LR-4	RM	27	invariato	area di alterata vascolarizzazione		
19	LR-3	LR-NC		paziente deceduto prima di follow-up					
20	LR-3	LR-NC							
21	LR-4		LR-4	RM	3	invariato	LR-5		
22	LR-3		LR-NC	US	24	invariato	LR-NC		
23	LR-3	LR-NC		TC	22	invariato	LR-NC		
24	LR-3	LR-3		TC	21	invariato	LR-NC		
25	LR-3	LR-3		TC	21	invariato	LR-NC		
26	LR-5	LR-M		Biopsia/resezione non eseguite per condizioni cliniche subottimali					decesso
27	LR-3		LR-3	US	18	invariato	LR-3		
28	LR-NC	LR-NC		TC	6	invariato	LR-5		
29	LR-3		LR-NC	CEUS	8	invariato	LR-3		
30	LR-3	LR-NC		TC	20	invariato	LR-3		
31	LR-3		LR-4	RM	21	invariato	LR-4		
32	LR-3	LR-NC		TC	28	invariato	LR-NC		

33	LR-4	LR-4		TC	5	invariato	LR-5	OLT
34	LR-3		LR-NC	TC	20	invariato	LR-NC	
35	LR-3	LR-NC		US	6	invariato	LR-NC	
36	LR-3		LR-NC	US	18	invariato	LR-NC	
37	LR-3	LR-NC		US	21	invariato	LR-NC	
38	LR-3		LR-3	RM	12	invariato	LR-3	
39	LR-3	LR-NC		TC	3	invariato	LR-NC	
40	LR-4	LR-M		CEUS	14	invariato	LR-4, non biopsiato per condizioni cliniche subottimali	
41	LR-4		LR-2	RM	12	invariato	LR-2	
42	LR-3		LR-2	RM	8	invariato	LR-2	
43	LR-3		LR-2	RM	12	invariato	LR-3	
44	LR-4		LR-2	RM	6	invariato	LR-2	
45	LR-3		LR-2	TC	24	invariato	LR-2	
46	LR-3		LR-2	RM	17	invariato	LR-2	
47	LR-3		LR-2	RM	31	invariato	LR-3	
48	LR-3		LR-2	RM	18	invariato	LR-2	
49	LR-2		LR-2	RM	10	invariato	LR-2	

Tomografia computerizzata (**TC**), risonanza magnetica (**RM**), ecografia convenzionale (**US**), ecografia con mezzo di contrasto (**CEUS**), LI-RADS Non classificabile (**LR-NC**), carcinoma epatocellulare (**HCC**), *Barcelona clinic liver cancer* (**BCLC**) staging, *Orthotopic Liver Transplantation* (**OLT**): trapianto di fegato.

Dopo 15 (6-31) mesi dall'arruolamento nello studio, 11 pazienti cirrotici con una età media di 61 (46-68) anni hanno ricevuto un trapianto epatico. I pazienti, di cui 9 uomini, avevano un BMI medio di 25,7 (19-38) kg/m² all'arruolamento. L'eziologia della cirrosi era rispettivamente NASH (n=3), HBV (n=3), HBV delta (n=1), HCV (n=1), alcol-relata (n=1) negli uomini; colangite sclerosante primitiva (n=1) e alcol-relata (n=1) nelle donne. Il MELD-Na all'arruolamento nello studio era mediamente di 11 (7-34) con Child-Pugh A (n=8), B (n=2) e C (n=1). (Tabella 13)

Tabella 13. Pazienti arruolati nello studio sottoposti a trapianto di fegato

OLT n=11	Classe LI-RADS		Follow-up (TC/RM)	Trapianto epatico		
	CEUS	TC/RM		Mesi	Grado WHO	Edmondson e Steiner
1	LR-3	LR-4	HCC a 12 mesi	16	1	3
2	LR-4	LR-5		16		
3	LR-4	LR-5		31		
4	LR-3	LR-5		15		
5	LR-4	LR-4	HCC a 25 mesi	25	2	3
6	LR-3	LR-4	HCC a 12 mesi	12	0	0
7	LR-4	LR-5		10	0	3
8	LR-4	LR-5		23	2	3
9	LR-4	LR-4	HCC a 5 mesi	6		
10	LR-5	LR-5		8		
11	LR-NC	LR-4	LR-4 a 9 mesi	9		fegato cirrotico

I noduli evidenziati in blu sono stati sottoposti a trattamento loco-regionale. OLT (*Orthotopic Liver Transplantation*): trapianto di fegato. **Follow-up (TC/RM)**: mesi di follow-up dall'arruolamento. **Mesi**: numero di mesi fra arruolamento nello studio (data della CEUS) e il trapianto epatico. **Grado WHO** (0: non riportato, 1: ben differenziato, 2: moderatamente differenziato, 3: scarsamente differenziato). **Grado Edmondson e Steiner** (0: non riportato, 1: grado I, 2: grado II, 3: grado III, 4: grado IV). Tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (RM), ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), carcinoma epatocellulare (HCC).

Validare il sistema CEUS LI-RADS nella diagnosi di carcinoma epatocellulare

La concordanza fra le metodiche di imaging (CEUS e TC/RM) è stata valutata secondo il flow-chart illustrato in Figura 12.

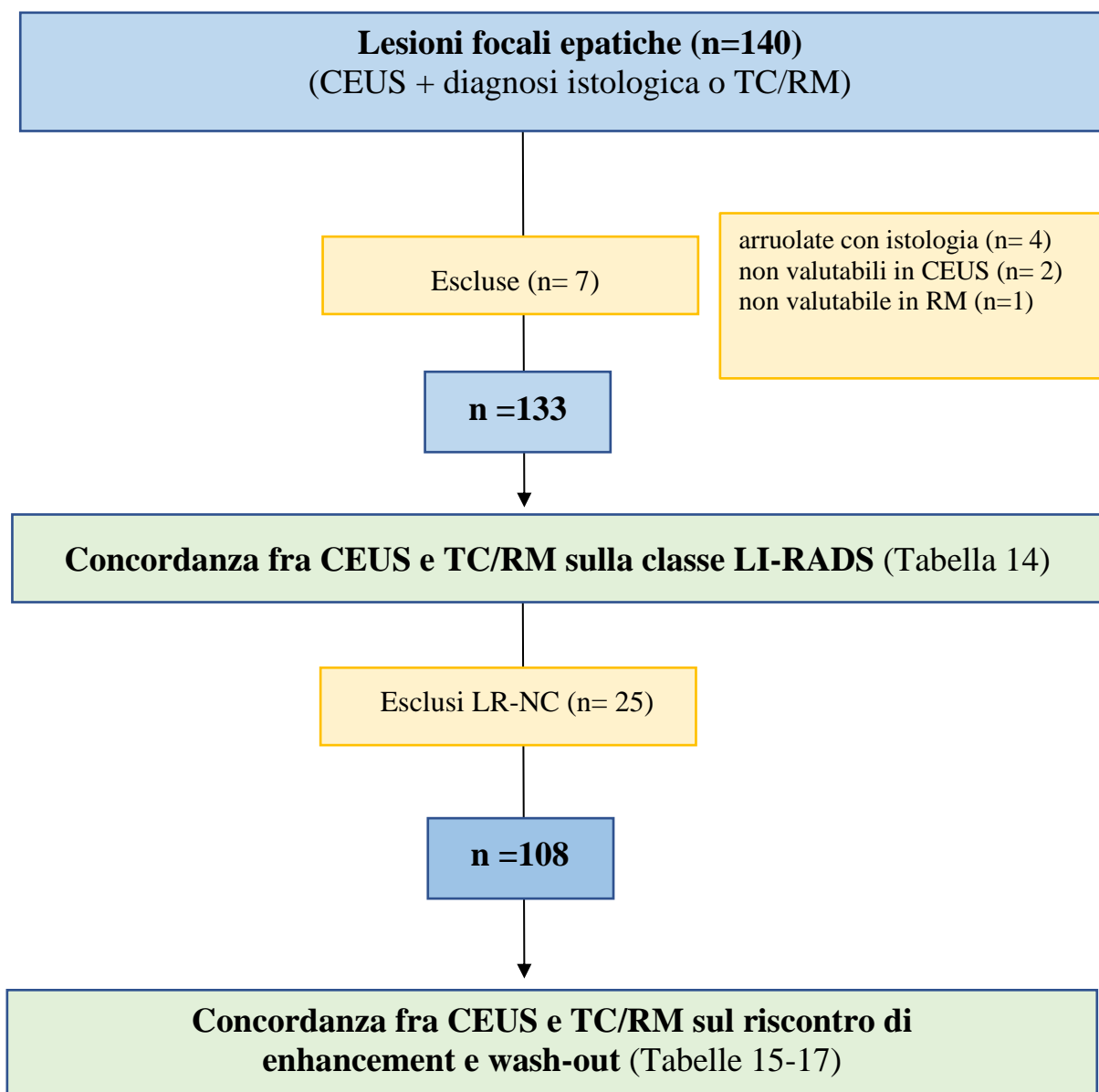


Figura 12. Concordanza fra CEUS e TC/RM sulla classe LI-RADS, sul riscontro di enhancement in fase arteriosa e di wash-out. Tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (RM), ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), LI-RADS Non classificabile (LR-NC).

Concordanza fra CEUS e TC/RM sulla classe LI-RADS

La concordanza fra CEUS e TC/RM è stata analizzata in 133/140 noduli studiati con TC/RM entro 4 settimane dalla CEUS. Sono stati esclusi 7 noduli, di cui n= 4 noduli (n =3 HCC e n=1 adenocarcinoma indifferenziato) per cui è stata utilizzata la diagnosi istologica per l'arruolamento nello studio, n= 2 noduli non valutabili in CEUS (n=1 lesione profonda per soma del paziente, n=1 lesione precedentemente studiata in RM e non chiaramente visualizzabile in ecografia convenzionale) e n=1 nodulo non valutabile in RM per scarsa compliance del paziente nel trattenere il respiro. Le metodiche di imaging (CEUS e TC/RM) sono state concordanti sulla classe LI-RADS in 65/133 noduli (48.8 %) di cui n=37 LR-5, con un coefficiente di concordanza (kappa di Cohen) di 0.353 (95% CI: 0.256 - 0.449), Tabella 14.

Tabella 14. Concordanza fra classe CEUS-LIRADS e TC/MR LI-RADS (n=133)

		TC/RM LI-RADS							
		LR-NC	LR-1	LR-2	LR-3	LR-4	LR-5	LR-M	LR-TIV
CEUS LI-RADS	LR-NC	3						1	
	LR-1		8						
	LR-2			1					
	LR-3	20		6	6	5	4	1	
	LR-4			2	1	7	12	1	
	LR-5	1				9	37	1	
	LR-M						4	2	
	LR-TIV								1

Tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (RM), ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), LI-RADS Non classificabile (LR-NC), LI-RADS probabilmente o certamente maligno, ma non specifico per HCC (LR-M), LI-RADS *Tumor in vein* o trombosi neoplastica (LR-TIV).

Concordanza classe LR-4

In totale 23/133 (17%) lesioni focali rientravano in classe CEUS LR-4 di cui 12 HCC (n=4 diagnosi istologica, n=5 RM, n=3 TC), 1 nodulo rigenerativo (TC LR-4, sottoposto a biopsia), RM LR-4 (n=1) con diagnosi istologica di colangiocarcinoma, noduli displastici ad alto grado (n=5 in RM/TC), una lesione TC LR-M non sottoposta a biopsia per condizioni cliniche subottimali, LR-2 (n=2) e LR-3 (n=1) in TC/RM sia all'arruolamento che al follow-up. In totale 5/133 lesioni RM LR-4 (CEUS LR-3) sono state sottoposte a un follow-up medio di 20 (12-28) mesi con TC/RM con diagnosi di LR-5 (n=1), area di alterata vascolarizzazione (n=1) e LR-4 (n=3, di cui n=2 con diagnosi istologica di nodulo displastico ad alto grado).

Concordanza classe LR-5

Considerando i 133 noduli utilizzati per l'analisi di concordanza fra CEUS e TC/RM, 48/133 lesioni focali erano CEUS LR-5 (36%), di cui 44 lesioni (91.6%) sono risultate HCC (n=37 LR-5 in TC/RM), 3 lesioni con diagnosi istologica (ascesso, colangiocarcinoma e nodulo displastico ad alto grado) e 1 lesione LR-M non sottoposta a biopsia per scarse condizioni cliniche. In totale 20/133 (15%) lesioni focali erano in classe LR-5 in TC/RM ma non in CEUS: 4 CEUS LR-3 (n=2 con diagnosi istologica di HCC), 12 CEUS LR-4 (n=3 sottoposti a terapia locoregionale, n=4 con diagnosi istologica di HCC), 4 CEUS LR-M (n=3 con diagnosi istologica di HCC, n=1 metastasi). La CEUS ha permesso di fare diagnosi di HCC in 9/133 lesioni focali (6.7%) in cui TC/RM hanno mostrato classe LR-4 (n=8) o LR-NC (n=1) all'arruolamento. Fra queste 9 lesioni CEUS LR-5, rispettivamente 6 lesioni sono state sottoposte a terapia locoregionale, 2 lesioni a resezione (HCC all'istologia) e una lesione è risultata RM LR-5 a 2 mesi dalla CEUS.

Concordanza fra CEUS e TC/RM sul riscontro di enhancement e wash-out

Escludendo i noduli LR-NC (n=25), le metodiche di imaging (CEUS e TC/RM) sono state concordanti in 62/108 noduli (57.4%) con coefficiente di concordanza (kappa di Cohen) di 0.397 (95% CI: 0.271 - 0.524). L'analisi sulla concordanza fra CEUS e TC/RM nel riscontro di enhancement in fase arteriosa di qualsiasi tipo (pattern globulare periferico, *iperenhancement* omogeneo, *isoenhancement*, *ipoenhancement*, enhancement ad anello, assenza di *enhancement*) e di wash-out di qualsiasi grado (lieve/marcato) e onset (precoce/tardivo) è stata eseguita su 108/133 noduli, escludendo i noduli LR-NC (n=25), Tabella 15.

Tabella 15. Concordanza fra il riscontro di enhancement in fase arteriosa in CEUS e TC/RM.

		TC/RM FASE ARTERIOSA					
		globulare	iperE	isoE	ipoE	rimE	noE
CEUS	globulare	4					
	iperE		65	2		1	
	isoE		7	12		2	
	ipoE		4	6	0		
	rimE				1	0	
	noE						4

Globulare: pattern globulare periferico in CEUS e pattern periferico discontinuo in TC/RM, **iperE:** iperenhancement, **isoE:** isoenhancement, **ipoE:** ipoenhancement, **rimE:** rim enhancement o enhancement anulare, **noE:** assenza di enhancement.

CEUS e TC/RM sono state concordanti nel riscontro del pattern di enhancement di 85/108 lesioni focali (78.7%) con kappa di Cohen pari a 0.588 (95% CI= 0.455-0.721). In totale 65/85 lesioni (76.4%) hanno mostrato iperenhancement in fase arteriosa di cui 57 HCC (87.6%), 4 noduli displastici ad alto grado, 1 colangiocarcinoma, 1 adenocarcinoma indifferenziato, 1 nodulo LR-3 e 1 ascesso.

Le lesioni che hanno mostrato isoenhancement sia in CEUS che in TC/RM (n=12, 14%) sono risultate probabilmente benigne nella maggioranza dei casi (n=5, LR-2), seguite da lesioni con probabilità intermedia di malignità (n=3, LR-3), noduli probabilmente HCC (n=3, LR-4) e 1 HCC. In totale 4/85 lesioni (4.7%) con pattern globulare periferico in CEUS e pattern periferico discontinuo in TC/RM sono state caratterizzate come emangiomi. Le lesioni che non hanno mostrato *enhancement* in fase arteriosa (n=4) sono state diagnosticate come cisti epatiche semplici. La Tabella 16 mostra la diagnosi delle lesioni con pattern di enhancement non concordante fra CEUS e TC/RM.

Tabella 16. Diagnosi delle lesioni con pattern di enhancement discordante fra CEUS e TC/RM.

TC/RM	CEUS	Diagnosi
iperE (n=11)	isoE (n=7)	HCC (n=2) HGDN (n=2) Emangioma (n=1) indeterminata (n=1) LR-3 (n=1)
	ipoE (n=4)	HCC (n=3) indeterminata (n=1)
isoE (n=8)	iperE (n=2)	HCC (n=1) HGDN (n=1)
	ipoE (n=6)	indeterminata (n=2) LR-3 (n=1) HGDN (n=3)
ipoE (n=1)	rimE (n=1)	indeterminata
rimE (n=3)	iperE (n=1)	HCC
	IsoE (n=2)	indeterminata (n=1) Parenchima cirrotico (n=1)

iperE: iperenhancement, **isoE**: isoenhancement, **ipoE**: ipoenhancement, **rimE**: rim enhancement o enhancement anulare, **HGDN**: nodulo displastico ad alto grado.

CEUS e TC/RM sono state concordanti nel riscontro di wash-out di 84/108 noduli (77.7%) con coefficiente di concordanza di 0.537 (95% CI: 0.377-0.696). Fra le 54/108 lesioni con wash-out sia in CEUS che in TC/RM, 47 lesioni erano HCC (87%), 4 noduli maligni non HCC (7.4%), 2 noduli displastici ad alto grado (3.7%) e un ascesso (1.8%). Le 7 lesioni con wash-out in CEUS ma non in TC/RM sono state diagnosticate come HCC nella maggioranza dei casi (n=4), seguite da 2 noduli displastici ad alto grado e 1 lesione probabilmente benigna. In totale 13/17 lesioni con wash-out in TC/RM ma non in CEUS sono state diagnosticate come HCC, seguite da 3 noduli displastici ad alto grado e una lesione LR-3. (Tabella 17)

L'accuratezza della CEUS nel riscontro di wash-out rispetto a TC/RM è del 77.7% con una sensibilità del 76%, specificità dell'81%, valore predittivo positivo dell'88.5% e valore predittivo negativo del 63.8%.

Tabella 17. Concordanza fra rilevamento di *wash-out* in CEUS e con metodiche radiologiche panoramiche (TC/RM)

		TC/RM		
		WO+	WO-	totale
CEUS	WO+	54 (50%)	7 (6.5%)	61
	WO-	17 (15.7%)	30 (27.7%)	47
	totale	71	37	108

WO+ wash-out presente, WO- wash-out assente

Accuratezza diagnostica della classe CEUS LR-5

L'accuratezza della classe CEUS LR-5 nella diagnosi di HCC è stata studiata su 130 lesioni focali sottoposte a TC/RM o diagnosi istologica. Sono state escluse 10/140 lesioni di cui 2 non valutabili in CEUS, 1 non valutabile in RM per scarsa compliance, 1 lesione senza diagnosi istologica per performance status non adeguato (CEUS LR-5 e TC LR-M), 6 lesioni CEUS LR-5 con TC/RM non conclusive e senza diagnosi istologica che sono state sottoposte a trattamento loco-regionale. (Tabella 18) In totale 63/130 lesioni (48,4%) hanno ricevuto diagnosi definitiva di HCC, di cui 40/63 (63,5%) utilizzando TC/RM (n=24 TC, n=16 RM) e 23/63 l'esame istologico (36,5%) come gold-standard.

Tabella 18. Accuratezza della classe CEUS LR-5 rispetto al gold standard (esame istologico o TC/RM) nella diagnosi di HCC

Accuratezza della classe CEUS LR-5 per la diagnosi di HCC	
Accuratezza	79,2%
Sensibilità	62,5%
Specificità	95,4%
Valore predittivo positivo	93%
Valore predittivo negativo	72,4%

La CEUS riveste un ruolo fondamentale nella pratica clinica per lo screening, la sorveglianza e la diagnosi di carcinoma epatocellulare. In questo studio sono state caratterizzate 140 lesioni focali epatiche in 119 pazienti ad alto rischio di carcinoma epatocellulare. In totale sono state diagnosticate 87 lesioni focali epatiche maligne (62%), rispettivamente 81 HCC (93% delle lesioni maligne, di cui 72 HCC all'arruolamento), 2 colangiocarcinomi, 2 metastasi e 2 lesioni LR-M non sottoposte a biopsia per condizioni cliniche subottimali. La CEUS ha confermato la diagnosi di

46 su 72 HCC (63,8%) in accordo con esame istologico e/o TC/RM all'arruolamento. La CEUS ha permesso di fare diagnosi di HCC in 9/140 lesioni focali (6.4%) con TC/RM non conclusive all'arruolamento. Fra queste 9 lesioni CEUS LR-5, rispettivamente 6 lesioni sono state sottoposte a terapia locoregionale, 2 lesioni a resezione (HCC all'istologia) e una lesione è risultata RM LR-5 a 2 mesi dalla CEUS. Un ulteriore HCC è stato diagnosticato mediante CEUS con RM non conclusiva per scarsa compliance e senza diagnosi istologica (1/140 lesioni, 0.7%). La CEUS ha permesso la diagnosi di 1 LR-TIV in accordo con TC/RM. (0.7%) La CEUS ha consentito la diagnosi di due metastasi (CEUS LR-M) all'arruolamento (2 su 140 lesioni focali, 1.4%), rispettivamente un adenocarcinoma indifferenziato e un carcinoma polmonare a piccole cellule (TC LR-5). La CEUS è stata l'unica metodica a mostrare wash-out in una lesione LR-4 in RM, successivamente sottoposta a resezione con diagnosi colangiocarcinoma. La CEUS ha confermato l'indicazione a biopsia (n=1, nodulo rigenerativo), a resezione (n=1, colangiocarcinoma) e al monitoraggio (n=4 lesioni con follow-up medio di 4 mesi) delle lesioni probabilmente HCC (LR-4) all'arruolamento. Nel complesso la CEUS è stata utile alla gestione di questi 6 pazienti ad alto rischio di carcinoma epatocellulare (4,3% dei pazienti in studio).

La CEUS è stata fondamentale per la diagnosi e il trattamento del 12,8% delle lesioni maligne (n=18) con TC/RM non diagnostiche e senza diagnosi istologica all'arruolamento. In accordo con il gold-standard, la CEUS ha supportato la diagnosi dell'88.8% delle lesioni LR-1 (8 su 9 lesioni focali), di una lesione LR-2, 6 lesioni LR-3, 7 lesioni LR-4 e 3 lesioni LR-NC.

Valutare l'efficacia di un software di quantificazione della perfusione tissutale nel riscontro di wash-out per la diagnosi di carcinoma epatocellulare in CEUS

Il software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera) ha consentito di analizzare retrospettivamente la perfusione tissutale di un sottogruppo di 37 noduli epatici sottoposti a CEUS con diametro maggiore di 25 (11-50) millimetri (Tabella 19)

Tabella 19. Caratteristiche dei 37 noduli analizzati con software di quantificazione della perfusione tissutale

Riscontro di wash-out			
All'occhio dell'operatore in CEUS	no (n=6)	no (n=4)	sì (n=27)
Valori di log(ratio) lesione/parenchima negativi in almeno una immagine-chiave su software di quantificazione	sì (n=6)	no (n=4)	sì (n=27)
Noduli			
	HCC (n=6)	LR-4 (n=3) LR-3 (n=1)	HCC (n=27)

Log (ratio) lesione/parenchima: il rapporto logaritmico fra l'intensità della lesione rispetto al resto del parenchima circostante.

Un operatore esperto ha delimitato 2 regioni di interesse (ROI) per ogni immagine-chiave, rispettivamente una ROI per il nodulo da analizzare e una ROI per circoscrivere parte del parenchima epatico circostante. Per l'analisi del wash-out è stata utilizzata la mediana del log (ratio) lesione/parenchima delle 2 immagini-chiave con valore più basso a partire da 2 minuti dall'iniezione di mezzo di contrasto. (Tabella 20, Figura 13)

Tabella 20. Immagini-chiave della CEUS analizzate con software di quantificazione della perfusione tissutale (n=37 noduli)

Numero di immagini-chiave selezionate, mediana (range)	
Totale	6 (3-9)
2 minuti in poi dall'iniezione di mezzo di contrasto	5 (2-8)
2 immagini-chiave utilizzate per l'analisi del wash-out, mediana (range)	
tempo dall'iniezione del mezzo di contrasto	3:48 (2:00 – 6:29) minuti
mediana del log (ratio) lesione/parenchima	-0,30 (- 1,20 – 0,93)

Log (ratio) lesione/parenchima: il rapporto logaritmico fra l'intensità della lesione rispetto al resto del parenchima circostante.

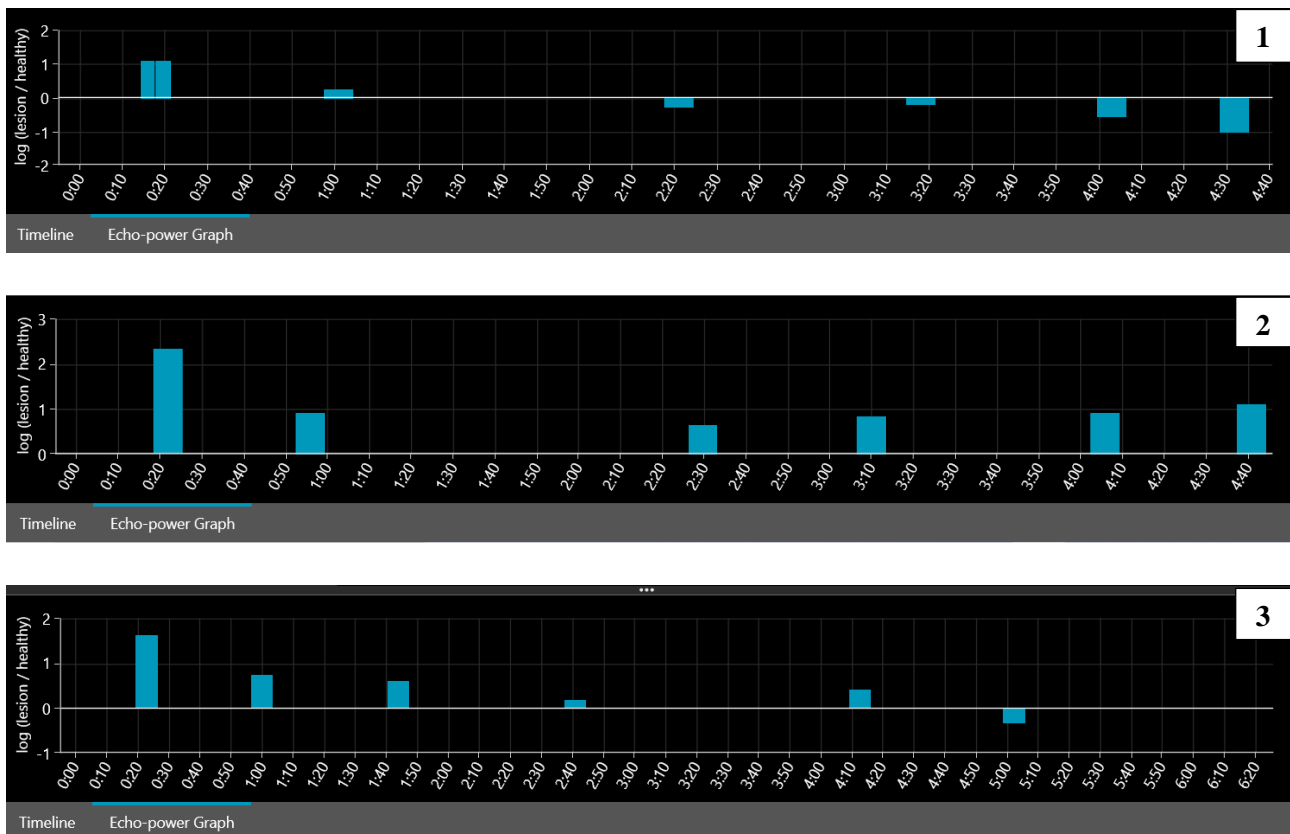


Figura 13. **Grafico 1:** nodulo di HCC tipico in CEUS, **grafico 2:** nodulo non maligno (senza wash-out né in CEUS né in TC/RM), **grafico 3:** nodulo HCC senza wash-out all'occhio dell'operatore in CEUS. Il software di quantificazione della perfusione tissutale ha permesso di individuare valori di log(ratio) lesione/parenchima negativi in almeno una immagine-chiave nei noduli HCC (grafici 1 e 3). Screenshot dal software LICEUS® (Bracco, Ginevra, Svizzera).

La CEUS ha una sensibilità del 81,8%, una specificità del 100% e una accuratezza diagnostica dell'83,7% nel riscontro di wash-out. La mediana dei log (ratio) lesione/parenchima (2 immagini-chiave con valore più basso a partire da 2 minuti dall'iniezione di mezzo di contrasto) dei 37 noduli epatici è stata utilizzata per individuare un *cut-off* (valore soglia) per il riscontro di wash-out con software di quantificazione. Un valore di log (ratio) lesione/parenchima < 0.45 ha una sensibilità del 97% (CI 84,6%-99,8%) e una specificità del 100% nel riscontro di wash-out con software di quantificazione (CI 51%-100%), area sotto la curva ROC di 0.99 e $p < 0.0015$. (Figura 14)

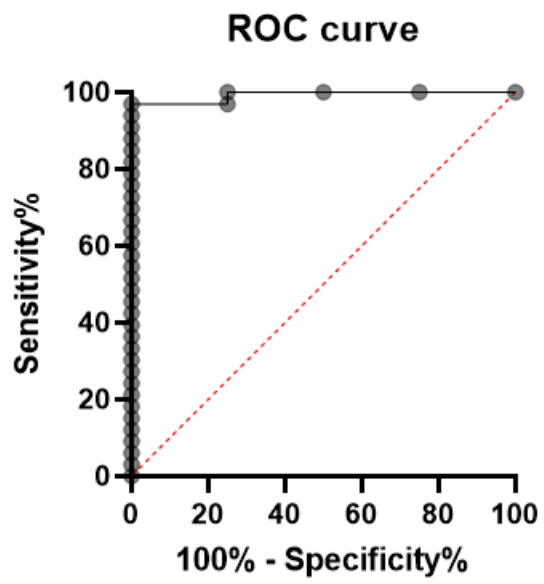


Figura 14. Curva ROC, sensibilità e specificità di software di quantificazione per il riscontro di wash-out.

DISCUSSIONE

In questo studio la classe CEUS LR-5 ha mostrato una specificità del 95,4% e un valore predittivo positivo del 93%, a fronte di una sensibilità del 62,5% e un valore predittivo negativo del 72,4% nella diagnosi di HCC. L'accuratezza diagnostica della classe CEUS LR-5 è stata del 79,2%. I nostri risultati sono simili a quelli riportati in letteratura. Una metanalisi di 11 studi con quasi 4 mila HCC ha valutato la performance diagnostica della CEUS, che ha mostrato una specificità e sensibilità rispettivamente del 92% (95% CI 83-96%) e del 69% (95% CI 64-73%) nella diagnosi di HCC. (122) In uno studio retrospettivo multicentrico con oltre mille noduli Terzi et al. hanno dimostrato che la classe CEUS LR-5 ha un valore predittivo positivo per HCC prossimo al 99% con una sensibilità del 62%. (94) In una metanalisi di 14 studi (n=11 retrospettivi) con circa 1700 HCC, la specificità e la sensibilità della classe LR-5 del sistema TC/RM LI-RADS del 2017 sono state rispettivamente del 92% (95% CI 88-95%) e del 67% (95% CI 62-72%). (123) Complessivamente la performance diagnostica della CEUS per le lesioni focali epatiche non differisce significativamente da quella di TC e RM. (69) Gli autori delle metanalisi riconoscono i limiti dovuti alla eterogeneità fra gli studi (es. prospettico vs retrospettivo, con o senza esame istologico, esperienza dell'operatore, diversi mezzi di contrasto, diverse linee guida LI-RADS a seconda dell'anno di pubblicazione). Da qui la necessità di uno studio multicentrico prospettico e con diagnosi istologica (non solo TC/RM) come gold standard per la validazione del sistema LI-RADS. (69,122–124)

In totale 72 lesioni analizzate nello studio hanno ricevuto diagnosi di HCC all'arruolamento, di cui 54 lesioni in classe TC/RM LR-5 (75%) e 22 lesioni con diagnosi istologica (30,5 %). Il 63,8% degli HCC (n=46) era in classe CEUS LR-5. Gli HCC nelle altre classi CEUS LI-RADS sono stati rispettivamente il 16,6% in classe LR-4 (n=12), l'8,3% in classe LR-M (n=6), il 6,9% in classe LR-3 (n=5), l'2,8% LR-NC (n=2) e 1,4% in classe LR-TIV (n=1). Nessun HCC era in classe CEUS LR-1 o LR-2. La CEUS permette di fare diagnosi di lesioni focali epatiche

benigne con un'ottima accuratezza diagnostica rendendo spesso superflue ulteriori metodiche di imaging. (51,124,125) In questo studio il tasso di HCC nelle classi non-LR-5 è stato inferiore rispetto a quello riportato in studi precedenti. In una recente metanalisi il tasso di HCC in una popolazione a rischio è stato rispettivamente del 26% in classe CEUS LR-3, 77% (LR-4), 97% (LR-5) e 57% (LR-M). Il tasso di HCC nelle classi TC/RM LR-3, LR-4, LR-5 e LR-M è stato rispettivamente del 34%, 67%, 92% e 22%. (123) Il tasso di HCC nelle classi TC/RM LI-RADS è simile a quello riportato in CEUS se si eccettua il tasso di HCC in classe LR-M (nettamente maggiore in CEUS). Nel nostro studio l'8,3% dei noduli HCC (n=6) sono rientrati in classe LR-M. I noduli CEUS LR-M (n=8) sono risultati tutti maligni (2 metastasi e 6 HCC). TC/RM sono risultate non conclusive nelle due lesioni metastatiche (LR-4 e LR-5), pertanto la CEUS è stata utile alla diagnosi. Tuttavia il numero dei noduli LR-M è troppo esiguo per poter trarre conclusioni sulla performance diagnostica della CEUS nel nostro lavoro. In totale 50 noduli sono rientrati in classe CEUS LR-5 (n=46 HCC, 1 nodulo TC LR-M non è stato sottoposto a biopsia per condizioni cliniche subottimali, e 3 noduli CEUS LR-5 hanno ricevuto diagnosi istologica rispettivamente di colangiocarcinoma, ascesso tubercolare e nodulo displastico ad alto grado). La diagnosi di tubercolosi epatica può essere particolarmente difficile in pazienti con lesione focale epatica singola e con fattori di rischio per HCC, come illustrato in un nostro lavoro scientifico. (126)

Considerando i 133 noduli utilizzati per l'analisi di concordanza fra CEUS e TC/RM, 42 noduli (31.5%) sono stati classificati come CEUS LR-3, di cui 20 noduli (47.6%) in classe LR-NC in TC/RM. Il numero considerevole di noduli CEUS LR-3 (isoenhancement in tutte le fasi contrastografiche) che sono risultati non visibili e quindi non classificabili in TC/RM (n=20) può essere dovuto ai seguenti fattori: 1) CEUS eseguita come prima metodica dopo il riscontro di focalità epatica su fegato cirrotico macronodulare in ecografia convenzionale come spesso accade nella pratica clinica e con tutte le difficoltà tecniche nell'esecuzione della CEUS in tale contesto (es. alterazioni del parenchima per la cirrosi di sfondo), 2) maggiore tendenza

all'esecuzione di CEUS nel contesto di uno studio prospettico. Tuttavia la maggioranza delle lesioni LR-NC in TC/RM si sono confermate tali al follow-up.

Le metodiche di imaging (CEUS e TC/RM) sono state concordanti sulla classe LI-RADS in 65/133 noduli (48.8 %) di cui n=37 LR-5, con un coefficiente di concordanza (kappa di Cohen) di 0.353 (95% CI: 0.256 - 0.449). Escludendo i noduli LR-NC (n=25), le metodiche di imaging (CEUS e TC/RM) sono state concordanti in 62/108 noduli (57.4%) con coefficiente di concordanza (kappa di Cohen) di 0.397 (95% CI: 0.271 - 0.524). Nonostante il coefficiente di concordanza subottimale, la CEUS è stata fondamentale per la diagnosi e il trattamento del 12,8% delle lesioni maligne (n=18) con TC/RM non diagnostiche e senza diagnosi istologica all'arruolamento. In accordo con il gold-standard, la CEUS ha supportato la diagnosi dell'88.8% delle lesioni LR-1 (8 su 9 lesioni focali), di una lesione LR-2, 6 lesioni LR-3, 7 lesioni LR-4 e 3 lesioni LR-NC.

CEUS e TC/RM hanno mostrato una buona concordanza nel riscontro del pattern di enhancement e di wash-out, con kappa di Cohen rispettivamente di 0.588 (95% CI= 0.455-0.721) e di 0.537 (95% CI: 0.377-0.696). La CEUS ha permesso la diagnosi di emangiomi (con tipico pattern globulare periferico) e cisti epatiche (assenza di perfusione). Inoltre la CEUS è stata l'unica metodica a mostrare wash-out in una lesione LR-4 in risonanza magnetica, successivamente sottoposta a resezione con diagnosi istologica di colangiocarcinoma.

La CEUS riveste un ruolo importante nella diagnosi di focalità epatiche e nella gestione dei pazienti a rischio di HCC nella pratica clinica, tuttavia la sensibilità di questa metodica rimane subottimale. A differenza di TC/RM, la CEUS non è riuscita a individuare il wash-out in 13 su 72 HCC analizzati nello studio (18%).

L'accuratezza della CEUS nel riscontro di wash-out rispetto a TC/RM è del 77.7% con una sensibilità del 76%, specificità dell'81%, valore predittivo positivo dell'88.5% e valore predittivo negativo del 63.8%. Per migliorare la sensibilità della CEUS nella diagnosi di HCC, abbiamo valutato la performance di un software di quantificazione della perfusione tissutale nel riscontro di wash-out nei noduli HCC in

cui la CEUS non ha mostrato questo aspetto fondamentale per la diagnosi ecografica. I risultati di questo studio suggeriscono un potenziale ruolo del software nel riscontro di wash-out. Questo studio pilota mostra l'efficacia di un software nel riscontro di wash-out (non individuato dall'operatore in CEUS) di noduli HCC. Tuttavia questa analisi è stata eseguita retrospettivamente, da un singolo operatore e su un numero limitato di noduli. Ulteriori studi con campione più ampio sono necessari per validare l'utilizzo del software nella pratica clinica (attualmente un prototipo usato al solo scopo di ricerca), valutando in particolare l'intra- e inter-riproducibilità delle analisi di quantificazione fra operatori in cieco (studio in corso), le possibili fonti di errore nell'analisi (es. dimensione e profondità delle regioni di interesse nel parenchima epatico; durata del clip ecografico, numero di immagini-chiave da analizzare) e la quantificazione del grado di wash-out.

CONCLUSIONI

La CEUS è una metodica sicura, non invasiva e con una specificità elevata nella diagnosi di HCC, a fronte di una sensibilità subottimale. In questo studio pilota un software di quantificazione della perfusione tissutale ha riscontrato wash-out in noduli HCC anche quando non visibile all'occhio dell'operatore. La DCE-US potrebbe migliorare l'accuratezza diagnostica della CEUS, tuttavia sono necessari studi prospettici e con campione adeguato per validare il suo impiego nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978–2012. *Int J Cancer*. 2020 Jul 15;147(2):317–30.
3. Gruppo di Lavoro AIOM – AIRTUM – SIAPEC-IAP. I numeri del cancro in Italia 2020 [Internet]. Available from: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/10/2020_Numeri_Cancro-operatori_web.pdf
4. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). Linee guida 2020 Epatocarcinoma. 2020;154.
5. IARC WHO. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, liver, both sexes, all ages. The global cancer observatory. Cancer today, data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020 - maps. Data source: GLOBOCAN 2020, Graph production: © International Agency for Research on Cancer 2022 (IARC) <http://gco.iarc.fr/today> - World Health Organization. [Internet]. [cited 2022 Jun 1]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
6. IARC WHO. Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, liver, both sexes, all ages. The global cancer observatory. Cancer today, data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020 - maps. Data source: GLOBOCAN 2020, Graph production: © International Agency for Research on Cancer 2022 (IARC) <http://gco.iarc.fr/today> - World Health Organization. [Internet]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
7. IARC WHO. Estimated number of new cases from 2020 to 2025, both sexes, age (0-85), liver and intrahepatic bile ducts, world. Cancer tomorrow. A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden worldwide from the current estimates in 2020 up until 2040. [Internet]. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
8. IARC WHO. Estimated number of deaths from 2020 to 2025, both sexes, age (0-85), liver and intrahepatic bile ducts, world. Cancer tomorrow. A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden worldwide from the current estimates in 2020 up until 2040. [Internet]. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
9. Sayiner M, Golabi P, Younossi ZM. Disease Burden of Hepatocellular Carcinoma: A Global Perspective. *Dig Dis Sci*. 2019 Apr;64(4):910–7.
10. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021 Jan;73(S1):4–13.
11. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. *Science*. 2007 Jul 6;317(5834):121–4.
12. Dorak MT, Karpuzoglu E. Gender Differences in Cancer Susceptibility: An Inadequately Addressed Issue. *Front Gene* [Internet]. 2012 [cited 2021 Nov 10];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2012.00268/abstract>
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.

14. Llovet JM, Fuster J, Bruix J, Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: Resection versus transplantation. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1434–40.
15. Llovet JM, De Baere T, Kulik L, Haber PK, Greten TF, Meyer T, et al. Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 May;18(5):293–313.
16. Khalaf N, Ying J, Mittal S, Temple S, Kanwal F, Davila J, et al. Natural History of Untreated Hepatocellular Carcinoma in a US Cohort and the Role of Cancer Surveillance. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017 Feb;15(2):273-281.e1.
17. Peter R. Galle, Alejandro Forner, Josep M. Llovet, Vincenzo Mazzaferro, Fabio Piscaglia, Jean-Luc Raoul, Peter Schirmacher, Valérie Vilgrain. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018;69:182–236.
18. Rigopoulou EI, Dalekos GN. Current Trends and Characteristics of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Autoimmune Liver Diseases. *Cancers*. 2021 Mar 1;13(5):1023.
19. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma: Heimbach et al. *Hepatology*. 2018 Jan;67(1):358–80.
20. Mamone G, Di Piazza A, Carollo V, Crinò F, Vella S, Cortis K, et al. Imaging of primary malignant tumors in non-cirrhotic liver. *Diagnostic and Interventional Imaging*. 2020 Sep;101(9):519–35.
21. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study: Piscaglia et al. *Hepatology*. 2016 Mar;63(3):827–38.
22. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: A pathological analysis. *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):851–9.
23. Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med*. 2016 Jan 14;67(1):103–17.
24. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *Journal of Hepatology*. 2019 Mar;70(3):531–44.
25. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019 Mar;17(4):748-755.e3.
26. Chang M-H. Decreasing incidence of hepatocellular carcinoma among children following universal hepatitis B immunization: Incidence of hepatoma after hepatitis B vaccination. *Liver International*. 2003 Oct;23(5):309–14.
27. Kim BK, Han K-H, Ahn SH. Prevention of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Oncology*. 2011;81(s1):41–9.
28. Chang M-H, Chen C-J, Lai M-S, Hsu H-M, Wu T-C, Kong M-S, et al. Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan and the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Children. *N Engl J Med*. 1997 Jun 26;336(26):1855–9.

29. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus JV, Webber L, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *Journal of Hepatology*. 2018 Sep;69(3):718–35.
30. Korean Liver Cancer Association K, National Cancer Center N. 2018 Korean Liver Cancer Association–National Cancer Center Korea Practice Guidelines for the Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gut and Liver*. 2019 May 15;13(3):227–99.
31. Omata M, Cheng A-L, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, et al. Asia–Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int*. 2017 Jul;11(4):317–70.
32. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases: Marrero et al. *Hepatology*. 2018 Aug;68(2):723–50.
33. Nguyen MH, Yang H-I, Le A, Henry L, Nguyen N, Lee M-H, et al. Reduced Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Tenofovir—A Propensity Score–Matched Study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019 Jan 1;219(1):10–8.
34. Chen J-G, Parkin DM, Chen Q-G, Lu J-H, Shen Q-J, Zhang B-C, et al. Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China. *J Med Screen*. 2003 Dec 1;10(4):204–9.
35. Zhang B-H, Yang B-H, Tang Z-Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2021 Dec 24];130(7). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-004-0552-0>
36. Poustchi H, Farrell GC, Strasser SI, Lee AU, McCaughan GW, George J. Feasibility of conducting a randomized control trial for liver cancer screening: Is a randomized controlled trial for liver cancer screening feasible or still needed? *Hepatology*. 2011 Dec;54(6):1998–2004.
37. Sherman M, Bruix J, Porayko M, Tran T, for the AASLD Practice Guidelines Committee. Screening for hepatocellular carcinoma: The rationale for the American Association for the Study of Liver Diseases recommendations. *Hepatology*. 2012 Sep;56(3):793–6.
38. Singal AG, Conjeevaram HS, Volk ML, Fu S, Fontana RJ, Askari F, et al. Effectiveness of Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 May;21(5):793–9.
39. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2018 May;154(6):1706-1718.e1.
40. Pelizzaro F, Vitale A, Sartori A, Vieno A, Penzo B, Russo F, et al. Surveillance as Determinant of Long-Term Survival in Non-Transplanted Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancers*. 2021 Feb 20;13(4):897.
41. Semmler G, Meyer EL, Kozbial K, Schwabl P, Hametner-Schreil S, Zanetto A, et al. HCC risk stratification after cure of hepatitis C in patients with compensated advanced chronic liver disease. *Journal of Hepatology*. 2021 Dec;S0168827821022340.
42. Ioannou GN. Epidemiology and risk-stratification of NAFLD-associated HCC. *Journal of Hepatology*. 2021 Dec;75(6):1476–84.

43. Bianco C, Jamialahmadi O, Pelusi S, Baselli G, Dongiovanni P, Zanoni I, et al. Non-invasive stratification of hepatocellular carcinoma risk in non-alcoholic fatty liver using polygenic risk scores. *Journal of Hepatology*. 2021 Apr;74(4):775–82.
44. Nahon P, Vo Quang E, Ganne-Carrié N. Stratification of Hepatocellular Carcinoma Risk Following HCV Eradication or HBV Control. *JCM*. 2021 Jan 19;10(2):353.
45. Sidhu P, Cantisani V, Dietrich C, Gilja O, Saftoiu A, Bartels E, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations for the Clinical Practice of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in Non-Hepatic Applications: Update 2017 (Long Version). *Ultraschall in Med*. 2018 Apr;39(02):e2–44.
46. Dietrich CF, Nolsøe CP, Barr RG, Berzigotti A, Burns PN, Cantisani V, et al. Guidelines and Good Clinical Practice Recommendations for Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in the Liver—Update 2020 WFUMB in Cooperation with EFSUMB, AFSUMB, AIUM, and FLAUS. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2020 Oct;46(10):2579–604.
47. Appis AW, Tracy MJ, Feinstein SB. Update on the safety and efficacy of commercial ultrasound contrast agents in cardiac applications. *Echo Research and Practice*. 2015 May;2(2):R55–62.
48. Cochran ST, Bomyea K, Sayre JW. Trends in Adverse Events After IV Administration of Contrast Media. *American Journal of Roentgenology*. 2001 Jun;176(6):1385–8.
49. Tang C, Fang K, Guo Y, Li R, Fan X, Chen P, et al. Safety of Sulfur Hexafluoride Microbubbles in Sonography of Abdominal and Superficial Organs: Retrospective Analysis of 30,222 Cases: Safety of Sulfur Hexafluoride Microbubbles. *J Ultrasound Med*. 2017 Mar;36(3):531–8.
50. Piscaglia F, Bolondi L. The safety of SonoVue® in abdominal applications: Retrospective analysis of 23188 investigations. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2006 Sep;32(9):1369–75.
51. Lanka B, Jang H-J, Kim TK, Burns PN, Wilson SR. Impact of Contrast-Enhanced Ultrasonography in a Tertiary Clinical Practice. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2007 Dec;26(12):1703–14.
52. Ciocalteu A, Iordache S, Cazacu SM, Urhut CM, Sandulescu SM, Ciurea A-M, et al. Role of Contrast-Enhanced Ultrasonography in Hepatocellular Carcinoma by Using LI-RADS and Ancillary Features: A Single Tertiary Centre Experience. *Diagnostics*. 2021 Nov 29;11(12):2232.
53. Brenner DJ. Computed Tomography — An Increasing Source of Radiation Exposure. *The New England Journal of Medicine*. 2007;8.
54. SonoVue® (sulfur hexafluoride) summary of products characteristics [Internet]. [cited 2022 Jan 8]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sonovue-epar-product-information_en.pdf
55. Bracco Imaging Canada Montreal, Quebec. SonoVue® (sulfur hexafluoride) product monograph. [Internet]. 2016 [cited 2022 Jan 8]. Available from: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00037573.PDF
56. Piscaglia F, Lencioni R, Sagrini E, Pina CD, Cioni D, Vidili G, et al. Characterization of Focal Liver Lesions with Contrast-Enhanced Ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2010 Apr;36(4):531–50.
57. Lorentzen T, Nolsoe C. The Role of US Contrast Agents in US-Guided Biopsy of Focal Liver Lesions: A Pictorial Review. *Ultrasound Int Open*. 2019 Jan;05(01):E11–9.
58. Claudon M, Dietrich C, Choi B, Cosgrove D, Kudo M, Nolsøe C, et al. Guidelines and Good Clinical Practice Recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the Liver – Update 2012. *Ultraschall in Med*. 2012 Nov 5;34(01):11–29.

59. Seitz K, Bernatik T, Strobel D, Blank W, Friedrich-Rust M, Strunk H, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) for the Characterization of Focal Liver Lesions in Clinical Practice (DEGUM Multicenter Trial): CEUS vs. MRI – a Prospective Comparison in 269 Patients. *Ultraschall in Med.* 2010 Jul 22;31(05):492–9.
60. Enders J, Zimmermann E, Rief M, Martus P, Klingebiel R, Asbach P, et al. Reduction of claustrophobia during magnetic resonance imaging: methods and design of the “CLAUSTRO” randomized controlled trial. *BMC Med Imaging.* 2011 Dec;11(1):4.
61. Wang DC, Jang H-J, Kim TK. Characterization of Indeterminate Liver Lesions on CT and MRI With Contrast-Enhanced Ultrasound: What Is the Evidence? *American Journal of Roentgenology.* 2020 Jun;214(6):1295–304.
62. Liu X, Jang H-J, Khalili K, Kim TK, Atri M. Successful Integration of Contrast-enhanced US into Routine Abdominal Imaging. *RadioGraphics.* 2018 Sep;38(5):1454–77.
63. Wang W-P, Dong Y, Cao J, Mao F, Xu Y, Si Q, et al. Detection and characterization of small superficially located focal liver lesions by contrast-enhanced ultrasound with high frequency transducers. *Med Ultrason.* 2017 Nov 29;19(4):349.
64. Strobel D, Bernatik T, Blank W, Schuler A, Greis C, Dietrich C, et al. Diagnostic Accuracy of CEUS in the Differential Diagnosis of Small (≤ 20 mm) and Subcentimetric (≤ 10 mm) Focal Liver Lesions in Comparison with Histology: Results of the DEGUM Multicenter Trial. *Ultraschall in Med.* 2011 Dec;32(06):593–7.
65. Dietrich C, Averkiou M, Nielsen M, Barr R, Burns P, Calliada F, et al. How to perform Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS). *Ultrasound Int Open.* 2018 Jan;04(01):E2–15.
66. Pocha C, Dieperink E, McMaken KA, Knott A, Thuras P, Ho SB. Surveillance for hepatocellular cancer with ultrasonography vs. computed tomography - a randomised study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Aug;38(3):303–12.
67. Kim SY, An J, Lim Y-S, Han S, Lee J-Y, Byun JH, et al. MRI With Liver-Specific Contrast for Surveillance of Patients With Cirrhosis at High Risk of Hepatocellular Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2017 Apr 1;3(4):456.
68. Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost Effectiveness of Alternative Surveillance Strategies for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2008 Dec;6(12):1418–24.
69. Xie L, Guang Y, Ding H, Cai A, Huang Y. Diagnostic Value of Contrast-Enhanced Ultrasound, Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging for Focal Liver Lesions: A Meta-Analysis. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2011 Jun;37(6):854–61.
70. Friedrich-Rust M, Klopffleisch T, Nierhoff J, Herrmann E, Vermehren J, Schneider MD, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound for the differentiation of benign and malignant focal liver lesions: a meta-analysis. *Liver Int.* 2013 May;33(5):739–55.
71. Trillaud H, Bruel J-M, Valette P-J, Vilgrain V, Schmutz G, Oyen R, et al. Characterization of focal liver lesions with SonoVue[®]-enhanced sonography: International multicenter-study in comparison to CT and MRI. *WJG.* 2009;15(30):3748.
72. Strobel D, Seitz K, Blank W, Schuler A, Dietrich C, Herbay A, et al. Contrast-enhanced Ultrasound for the Characterization of Focal Liver Lesions – Diagnostic Accuracy in Clinical Practice (DEGUM multicenter trial). *Ultraschall in Med.* 2008 Oct 1;29(05):499–505.

73. Seitz K, Strobel D, Bernatik T, Blank W, Friedrich-Rust M, Herbay A von, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) for the Characterization of Focal Liver Lesions – Prospective Comparison in Clinical Practice: CEUS vs. CT (DEGUM Multicenter Trial) Parts of this Manuscript were presented at the Ultrasound Dreiländertreffen 2008, Davos. *Ultraschall in Med.* 2009 Aug 17;30(04):383–9.
74. Romanini L, Passamonti M, Aiani L, Cabassa P, Raieli G, Montermini I, et al. Economic assessment of contrast-enhanced ultrasonography for evaluation of focal liver lesions: a multicentre Italian experience. *Eur Radiol Suppl.* 2007 Dec;17(S6):99–106.
75. Leen E, Ceccotti P, Kalogeropoulou C, Angerson WJ, Moug SJ, Horgan PG. Prospective Multicenter Trial Evaluating a Novel Method of Characterizing Focal Liver Lesions Using Contrast-Enhanced Sonography. *American Journal of Roentgenology.* 2006 Jun;186(6):1551–9.
76. Wilson SR, Kim TK, Jang H-J, Burns PN. Enhancement Patterns of Focal Liver Masses: Discordance Between Contrast-Enhanced Sonography and Contrast-Enhanced CT and MRI. *American Journal of Roentgenology.* 2007 Jul;189(1):W7–12.
77. Kim T-H, Kim SY, Tang A, Lee JM. Comparison of international guidelines for noninvasive diagnosis of hepatocellular carcinoma: 2018 update. *Clin Mol Hepatol.* 2019 Sep 25;25(3):245–63.
78. Raccomandazioni multisocietarie italiane (AISF, AIOM, IT-IHPBA, SIC, SIRM, SITO) per la gestione clinica integrata del paziente con epatocarcinoma [Internet]. 2016 [cited 2022 Jan 9]. Available from: <https://www.aiom.it/raccomandazioni-multisocietarie-italiane-per-la-gestione-clinica-del-paziente-con-epatocarcinoma/>
79. Kudo M, Matsui O, Izumi N, Iijima H, Kadoya M, Imai Y, et al. JSH Consensus-Based Clinical Practice Guidelines for the Management of Hepatocellular Carcinoma: 2014 Update by the Liver Cancer Study Group of Japan. *Liver Cancer.* 2014;3(3–4):458–68.
80. Bolondi L, Cillo U, Colombo M, Craxì A, Farinati F, Giannini EG, et al. Position paper of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF): The multidisciplinary clinical approach to hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease.* 2013 Sep;45(9):712–23.
81. Galassi M, Iavarone M, Rossi S, Bota S, Vavassori S, Rosa L, et al. Patterns of appearance and risk of misdiagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma in cirrhosis at contrast enhanced ultrasound. *Liver Int.* 2013 May;33(5):771–9.
82. Giorgio A, Calisti G, Giorgio V. CEUS and HCC: Are the 2008 EFSUMB Guidelines Still Valid or Has Their Wash-Out Already Started? *Ultraschall in Med.* 2011 Jun 10;32(03):315–6.
83. Dietrich C, Cui X, Boozari B, Hocke M, Ignee A. Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in the Diagnostic Algorithm of Hepatocellular and Cholangiocellular Carcinoma, Comments on the AASLD Guidelines. *Ultraschall in Med.* 2012 Jun 21;33(S 01):S57–66.
84. Chen L-D, Xu H-X, Xie X-Y, Xie X-H, Xu Z-F, Liu G-J, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: differential diagnosis with contrast-enhanced ultrasound. *Eur Radiol.* 2010 Mar;20(3):743–53.
85. Dietrich CF. Fortuitously discovered liver lesions. *WJG.* 2013;19(21):3173.
86. Bhayana D, Kim TK, Jang H-J, Burns PN, Wilson SR. Hypervascular Liver Masses on Contrast-Enhanced Ultrasound: The Importance of Washout. *American Journal of Roentgenology.* 2010 Apr;194(4):977–83.

87. Vilana R, Forner A, Bianchi L, García-Criado Á, Rimola J, Rodríguez de Lope C, et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):2020–9.
88. Wildner D, Bernatik T, Greis C, Seitz K, Neurath M, Strobel D. CEUS in Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocellular Carcinoma in 320 Patients – Early or Late Washout Matters: A Subanalysis of the DEGUM Multicenter Trial. *Ultraschall in Med*. 2015 Mar 26;36(02):132–9.
89. Kono Y, Sirlin CB, Fetzer DT, Kim TK, Rodgers SK, Piscaglia F, et al. Time to Clarify Common Misconceptions about the Liver Imaging Reporting and Data System for Contrast-enhanced US. *Radiology*. 2020 Apr;295(1):245–7.
90. Piscaglia F, Wilson S, Lyshchik A, Cosgrove D, Dietrich C, Jang H-J, et al. American College of Radiology Contrast Enhanced Ultrasound Liver Imaging Reporting and Data System (CEUS LI-RADS) for the diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: a pictorial essay. *Ultraschall in Med*. 2017 Jun;38(03):320–4.
91. ACR LI-RADS working group. LI-RADS v2016 [Internet]. 2016 [cited 2022 Jan 11]. Available from: https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/LI-RADS/CEUS-LIRADS_V3.pdf
92. ACR LI-RADS working group. CEUS LI-RADS® v2017 CORE (Per la CEUS con Mezzi di Contrasto Puramente Intravascolari) [Internet]. [cited 2022 Jan 11]. Available from: <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/LI-RADS/Translations/LI-RADS-2017-CEUS-Italian.pdf>
93. Sugimoto K, Moriyasu F, Shiraishi J, Saito K, Taira J, Saguchi T, et al. Assessment of arterial hypervascularity of hepatocellular carcinoma: comparison of contrast-enhanced US and gadoxetate disodium-enhanced MR imaging. *Eur Radiol*. 2012 Jun;22(6):1205–13.
94. Terzi E, Iavarone M, Pompili M, Veronese L, Cabibbo G, Fraquelli M, et al. Contrast ultrasound LI-RADS LR-5 identifies hepatocellular carcinoma in cirrhosis in a multicenter retrospective study of 1,006 nodules. *Journal of Hepatology*. 2018 Mar;68(3):485–92.
95. Auer TA, Fischer T, Garcia SRM, Penzkofer T, Jung E-M, Hamm B, et al. 1 Value of contrast-enhanced ultrasound 2 (CEUS) in Focal Liver Lesions (FLL) 3 with inconclusive findings on 4 cross-sectional imaging. :13.
96. Quaia E, Alaimo V, Baratella E, Pizzolato R, Cester G, Medeot A, et al. Effect of Observer Experience in the Differentiation Between Benign and Malignant Liver Tumors After Ultrasound Contrast Agent Injection. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2010 Jan;29(1):25–36.
97. Dietrich C, Averkiou M, Correas J-M, Lassau N, Leen E, Piscaglia F. An EFSUMB Introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for Quantification of Tumour Perfusion. *Ultraschall in Med*. 2012 Aug;33(04):344–51.
98. Strouthos C, Lampaskis M, Sboros V, Mcneilly A, Averkiou M. Indicator dilution models for the quantification of microvascular blood flow with bolus administration of ultrasound contrast agents. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr*. 2010 Jun;57(6):1296–310.
99. Ignee A, Jedrejczyk M, Schuessler G, Jakubowski W, Dietrich CF. Quantitative contrast enhanced ultrasound of the liver for time intensity curves—Reliability and potential sources of errors. *European Journal of Radiology*. 2010 Jan;73(1):153–8.
100. Lassau N, Chapotot L, Benatsou B, Vilgrain V, Kind M, Lacroix J, et al. Standardization of Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound for the Evaluation of Antiangiogenic Therapies: The French

- Multicenter Support for Innovative and Expensive Techniques Study. *Investigative Radiology*. 2012 Dec;47(12):711–6.
101. Goetti R, Reiner CS, Knuth A, Klotz E, Stenner F, Samaras P, et al. Quantitative Perfusion Analysis of Malignant Liver Tumors: Dynamic Computed Tomography and Contrast-Enhanced Ultrasound. *Investigative Radiology*. 2012 Jan;47(1):18–24.
 102. Averkiou M, Lampaskis M, Kyriakopoulou K, Skarlos D, Klouvas G, Strouthos C, et al. Quantification of Tumor Microvascularity with Respiratory Gated Contrast Enhanced Ultrasound for Monitoring Therapy. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2010 Jan;36(1):68–77.
 103. Salvatore V, Gianstefani A, Negrini G, Allegretti G, Galassi M, Piscaglia F. Imaging Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: Recent Advances of Contrast-Enhanced Ultrasonography with SonoVue. *Liver Cancer*. 2015 Dec 18;5(1):55–66.
 104. Jung E-M, Weber M-A, Wiesinger I. Contrast-enhanced ultrasound perfusion imaging of organs. *Radiologe*. 2021 Dec;61(S1):19–28.
 105. Cui X, Ignee A, Jdrzejczyk M, Dietrich C. Dynamic Vascular Pattern (DVP), a Quantification Tool for Contrast Enhanced Ultrasound. *Z Gastroenterol*. 2013 May 16;51(05):427–31.
 106. Amadori M, Barone D, Scarpi E, Oboldi D, Amadori E, Bandi G, et al. Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (D-CEUS) for the early prediction of bevacizumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur Radiol*. 2018 Jul;28(7):2969–78.
 107. Lassau N, Cosgrove D, Armand J-P. Early evaluation of targeted drugs using dynamic contrast-enhanced ultrasonography for personalized medicine. *Future Oncology*. 2012 Oct;8(10):1215–8.
 108. Zocco MA, Garcovich M, Lupascu A, Di Stasio E, Roccarina D, Annicchiarico BE, et al. Early prediction of response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: The role of dynamic contrast enhanced ultrasound. *Journal of Hepatology*. 2013 Nov;59(5):1014–21.
 109. Wiesinger I, Wiggermann P, Zausig N, Beyer L, Salzberger B, Stroszczynski C, et al. Percutaneous Treatment of Malignant Liver Lesions: Evaluation of Success Using Contrast- Enhanced Ultrasound (CEUS) and Perfusion Software. *Ultraschall in Med*. 2018 Aug;39(04):440–7.
 110. Wildner D, Schellhaas B, Strack D, Goertz RS, Pfeifer L, Fießler C, et al. 1 Differentiation of malignant liver tumors 2 by software-based perfusion quantification 3 with dynamic contrast-enhanced ultrasound. :13.
 111. Huang-Wei C, Bleuzen A, Bourlier P, Roumy J, Bouakaz A, Pourcelot L, et al. Differential Diagnosis of Focal Nodular Hyperplasia With Quantitative Parametric Analysis in Contrast-Enhanced Sonography: *Investigative Radiology*. 2006 Mar;41(3):363–8.
 112. Fröhlich E, Muller R, Cui X-W, Schreiber-Dietrich D, Dietrich CF. Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound for Quantification of Tissue Perfusion. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2015 Feb;34(2):179–96.
 113. Bartolotta TV, Taibbi A, Randazzo A, Gagliardo C. New frontiers in liver ultrasound: From mono to multi parametricity. *WJGO*. 2021 Oct 15;13(10):1302–16.
 114. Minimum Training Requirements for the Practice of Medical Ultrasound in Europe. *Ultraschall in Med*. 2010 Aug 19;31(04):426–7.

115. ACR LI-RADS working group. CEUS LI-RADS® v2017 CORE (For CEUS with Pure Blood Pool Agents) [Internet]. Available from: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/LI-RADS/CEUS-LI-RADS-v2017>
116. ACR LI-RADS working group. CT/MRI LI-RADS® v2017 CORE [Internet]. Available from: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/LI-RADS/CT-MRI-LI-RADS-v2017>
117. ACR LI-RADS working group. CT/MRI LI-RADS® v2018 CORE [Internet]. Available from: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/LI-RADS/CT-MRI-LI-RADS-v2018>
118. Child-Pugh classification of severity of cirrhosis [Internet]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=GAST%2F78401>
119. MELDNa Score for End-Stage Liver Disease [Internet]. Available from: <https://www.merckmanuals.com/medical-calculators/MELDNa.htm>
120. Liver cancer (BCLC staging) [Internet]. Available from: <https://radiopaedia.org/articles/liver-cancer-bclc-staging?lang=us>
121. Dietrich C, Bamber J, Berzigotti A, Bota S, Cantisani V, Castera L, et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall in Med.* 2017 Aug;38(04):e16–47.
122. Shin J, Lee S, Bae H, Chung YE, Choi J, Huh Y, et al. Contrast-enhanced ultrasound liver imaging reporting and data system for diagnosing hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Liver Int.* 2020 Oct;40(10):2345–52.
123. Lee S, Kim S, Roh YH, Choi J, Park M, Kim M. Diagnostic Performance of CT/MRI Liver Imaging Reporting and Data System v2017 for Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Liver Int.* 2020 Jun;40(6):1488–97.
124. Wu M, Li L, Wang J, Zhang Y, Guo Q, Li X, et al. Contrast-enhanced US for characterization of focal liver lesions: a comprehensive meta-analysis. *Eur Radiol.* 2018 May;28(5):2077–88.
125. Jo PC, Jang H-J, Burns PN, Burak KW, Kim TK, Wilson SR. Integration of Contrast-enhanced US into a Multimodality Approach to Imaging of Nodules in a Cirrhotic Liver: How I Do It. *Radiology.* 2017 Feb;282(2):317–31.
126. Forgione A, Tovoli F, Ravaioli M, Renzulli M, Vasuri F, Piscaglia F, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound LI-RADS LR-5 in Hepatic Tuberculosis: Case Report and Literature Review of Imaging Features. *Gastroenterology Insights.* 2021 Jan 17;12(1):1–9.