

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Veterinarie**

**Ciclo XXXI**

**Settore Concorsuale: 7/H4**

**Settore Scientifico Disciplinare: VET/08**

**RUOLO DELL'IMAGING ECOGRAFICO NEL PAZIENTE ONCOLOGICO**

**Presentata da: Manuela Quinci**

**Coordinatore Dottorato**

**Chia.mo Prof Arcangelo Gentile**

**Supervisore**

**Chia.ma Prof.ssa Alessia Diana**

**Esame finale anno 2019**

## **RUOLO DELL'IMAGING ECOGRAFICO NEL PAZIENTE ONCOLOGICO**

### **- RIASSUNTO –**

La ricerca svolta durante i tre anni di Dottorato si è incentrata su due studi riguardanti l'applicazione dell'*imaging* ecografico nell'ambito dell'oncologia veterinaria.

Nel primo studio è stata indagata la correlazione tra una peculiare alterazione ecografica della milza, definita *honeycomb* (HCP), e la diagnosi di linfoma nel gatto. Sono stati selezionati retrospettivamente 33 gatti con rilievo ecografico di HCP ed esame citologico o istologico della milza. Per ciascun soggetto incluso sono state revisionate le immagini ecografiche al fine di descrivere l'aspetto della milza e, quando possibile, confrontare la visualizzazione dell'HCP tra immagini ottenute con sonde lineari e sonde curvilinee. Parallelamente è stata condotta una revisione cito-istopatologica. In base ai nostri risultati l'HCP non è predittivo di linfoma splenico, ma si può associare anche a disordini linfoproliferativi benigni, a forme reattive ed a processi infiammatori acuti. Si raccomanda sempre l'impiego di sonde lineari ad alta frequenza per l'esame ecografico della milza nel gatto, perché favorisce la visualizzazione dell'HCP e delle alterazioni lievi dell'ecostruttura splenica.

Per quanto concerne il secondo studio, sono state confrontate l'utilità di impiego dell'ecografia bidimensionale (ECO2D) e dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) come guida per l'agoaspirazione (FNA) di masse addominali e toraciche e l'effetto sull'adeguatezza del campione citologico dei seguenti parametri: sede anatomica della massa, dimensioni, presenza di aree avascolari, esperienza dell'operatore. Sono stati quindi selezionati retrospettivamente due gruppi di cani e gatti con masse addominali e toraciche in cui l'FNA era stato eseguito rispettivamente con tecnica CEUS (43 soggetti) ed ECO2D (39 soggetti). I campioni citologici sono stati revisionati da due patologi che hanno formulato un giudizio in merito all'adeguatezza (campione adeguato sì o no). In base ai risultati dell'analisi di regressione logistica condotta, le metodiche CEUS ed ECO2D sono ugualmente efficaci ai fini dell'adeguatezza dell'FNA. La sede anatomica della lesione e la presenza di aree avascolari intralesionali influiscono in maniera determinante sull'FNA. In particolare, in presenza di aree avascolari la probabilità di ottenere un campione citologico adeguato si riduce notevolmente, per questo motivo a fronte di masse di dimensioni cospicue e di sospetta natura maligna l'esecuzione di una CEUS pilota prima della procedura di campionamento è sempre consigliabile.

## THE ROLE OF ULTRASONOGRAPHY IN VETERINARY ONCOLOGY

### - ABSTRACT –

The research project of my PHD was focused on the role of ultrasound in dogs and cats with oncologic diseases, and included the following two studies.

The objective of the first study was to evaluate the relationship between the sonographic honeycomb pattern (HCP) of the spleen and cyto-histological diagnosis in cats, and to assess the influence of the type of transducer on HCP visualization. Abdominal ultrasounds of cats with HCP were reviewed in order to record spleen size, shape and margin appearance, other parenchymal alterations and splenic hilar lymphadenopathy. When applicable, images acquired with high-frequency and curvilinear transducers were compared to see if HCP was more consistent on high resolution images. A retrospective review of the corresponding splenic cyto-histopathologic samples was also performed. Based on our findings, HCP in cats is not predictive of splenic lymphoma and it can be associated with both benign and malignant disorders. The use of high-frequency transducers is recommended to properly recognize HCP or subtle changes in splenic parenchyma.

The purpose of the second study was to compare the performances of contrast enhanced ultrasound (CEUS) and bidimensional ultrasound (US) guided fine needle aspiration (FNA) of abdominal and thoracic masses in dogs and cats, and to determine the effect of the following independent predictors: mass location, size, presence of avascular areas within the mass, operator's experience, on the adequacy of the cytological sample. Dogs and cats with abdominal and thoracic masses were retrospectively selected and included into 2 groups, according to the sampling technique: 43 patients were included in the CEUS-guided group and 39 in the US-guided group. All the cytological samples were reviewed by two pathologists and a final interpretation of the cytological adequacy (yes or no) was provided. According to the univariate and multivariate logistic regression analysis performed, both CEUS and US guidance are suitable for FNA of abdominal and thoracic masses. Among the other predictors, mass location and presence of avascular areas within the mass can affect the adequacy of the FNA. Thus, in case of large masses CEUS should be performed before the sampling procedure as the presence of avascular necrotic areas may lead to inadequate sampling.

## INDICE

### **RUOLO DELL'IMAGING ECOGRAFICO NEL PAZIENTE ONCOLOGICO**

Stato dell'arte.....	1
Bibliografia .....	5

### **SPLENOPATIA "HONEYCOMB" NEL GATTO: CORRELAZIONE TRA RILIEVI ECOGRAFICI BIDIMENSIONALI E DIAGNOSI PATOLOGICA**

Introduzione .....	8
Materiali e metodi .....	10
Risultati .....	12
Discussione.....	20
Conclusioni .....	23
Bibliografia .....	24

### **CONFRONTO TRA AGOASPIRAZIONE DI MASSE ADDOMINALI E TORACICHE MEDIANTE TECNICA ECOGRAFICA BIDIMENSIONALE (ECO2D) ED ECOCONTRASTOGRAFICA (CEUS)**

Introduzione .....	26
Materiali e metodi .....	28
Risultati .....	32
Discussione e conclusioni .....	43
Bibliografia .....	48

<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>51</b>
--------------------------	-----------

## **RUOLO DELL'IMAGING ECOGRAFICO NEL PAZIENTE ONCOLOGICO**

### **STATO DELL'ARTE**

La diagnostica per immagini riveste un ruolo essenziale nella pratica oncologica, fornendo metodiche indispensabili per la diagnosi, la stadiazione e successivamente per il monitoraggio delle lesioni neoplastiche primarie e metastatiche in corso di terapia (*Mattoon JS e Bryan JN, 2013*).

Grazie ai recenti avanzamenti tecnologici è possibile ottenere immagini di elevata qualità e disporre di metodiche avanzate quali la tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica (MRI), e tecniche di imaging funzionale come la PET (positron emission tomography). Le diverse tecniche di imaging, individualmente o in associazione (fusion imaging), consentono di ottenere immagini e, dunque informazioni, di natura anatomica o funzionale in merito al processo neoplastico (*Mattoon JS e Bryan JN, 2013*).

Nell'ambito delle diverse metodiche, l'ecografia rappresenta, allo stato attuale, una delle modalità diagnostiche di prima scelta in oncologia veterinaria. Infatti, nonostante la relativa recente introduzione di strumenti di diagnostica avanzati (TC e MRI) nella pratica oncologica veterinaria, la fruibilità di queste metodiche è ancora scarsa in ambito veterinario e limitata prevalentemente agli ospedali universitari o alle cliniche specialistiche oncologiche. L'ecografia è una modalità diagnostica non invasiva, esente dal rischio legato all'esposizione a radiazioni ionizzanti sia per il paziente sia per il veterinario e relativamente poco costosa se confrontata con TC e MRI. Per tutte queste caratteristiche, ma soprattutto per la sua capacità di visualizzare le strutture anatomiche in tempo reale ed in maniera tomografica, producendo quindi immagini che rappresentano sezioni degli organi similmente alla TC, l'ecografia è diventata una delle metodiche diagnostiche più diffuse nella pratica clinica veterinaria (*Andualem T, 2017*).

A partire dagli anni '90, l'uso dell'ecografia in ambito veterinario, con particolare riferimento ai piccoli animali, è stato progressivamente implementato sino a diventare parte integrante dell'iter diagnostico di svariate patologie, in particolare di quelle che interessano gli organi addominali e toracici (*McConnell F, 2008*). Una delle principali applicazioni dell'ecografia nei piccoli animali è la diagnosi e stadiazione delle neoplasie. La stadiazione della neoplasia primaria costituisce un punto cardine per il paziente oncologico, perché determinare l'estensione locale del fenomeno neoplastico e l'eventuale presenza di metastasi loco-regionali o distanti è indispensabile al fine di definire la prognosi e di stabilire un approccio terapeutico appropriato (*Biller B, 2016*).

Mentre in medicina umana la stadiazione delle neoplasie è basata prevalentemente sullo screening TC, l'ecografia addominale rappresenta il caposaldo dell'imaging oncologico in medicina veterinaria, dati i costi e le dimensioni più piccole dei pazienti che rendono l'ecografia uno strumento ancora più utile rispetto alla medicina umana per la valutazione dei linfonodi viscerali e dell'apparato gastro-enterico (*McConnell F, 2008; Mattoon JF e Bryan JN, 2013*). A questo proposito è stato dimostrato il valore aggiunto dell'ecografia addominale nel rilievo di linfadenopatia viscerale ed organomegalia in corso di linfoma nel cane: la maggiore sensibilità dell'ecografia rispetto all'esame fisico ed alla radiologia convenzionale incide in modo significativo sulla stadiazione di questa specifica condizione nel cane (*Flory AB, 2007*).

Uno dei vantaggi maggiori dell'ecografia, nei piccoli animali come in medicina umana, è il suo impiego come guida diretta per le procedure di agoaspirazione e biopsia che rappresentano un punto cruciale per la diagnosi e la stadiazione delle neoplasie (*Albury K, 2015*). Le procedure di campionamento bioptico ecoguidato sono diventate una pratica di routine nel cane e nel gatto, perché la visualizzazione ecografica permette di guidare l'ago con precisione ed in tempo reale nella regione di interesse di un organo o più precisamente di una lesione. A beneficio del paziente, la guida ecografica rende la procedura più rapida e sicura, necessitando il più delle volte solo una blanda sedazione. Dopo l'introduzione della guida ecografica per il campionamento bioptico, infatti, si è registrato un aumento del numero di campioni diagnostici parallelamente ad una riduzione delle tempistiche necessarie all'esecuzione della procedura stessa (*Nyland TG, 2015; Albury K, 2015*).

Se da una parte l'ecografia è uno strumento utile per la diagnosi di sede e la valutazione del grado di estensione del fenomeno neoplastico, il suo principale limite risiede nella scarsa specificità nel differenziare il comportamento biologico delle lesioni. Da un punto di vista ecostrutturale, le lesioni maligne e quelle benigne possono presentare caratteristiche spesso sovrapponibili, motivo per cui l'esame ecografico è poco accurato nel differenziarle. L'ausilio del color Doppler è valido nelle procedure di campionamento ecoguidato, perché favorisce la visualizzazione delle strutture vascolari adiacenti o proprie delle lesioni, tuttavia non fornisce informazioni aggiuntive in merito alla natura delle lesioni (*Mattoon JS e Bryan JN, 2013*).

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) al contrario è altamente efficace nella caratterizzazione delle lesioni focali e si è dimostrata uno strumento valido per la differenziazione tra patologie benigne e maligne in medicina umana. Esiste già una relativamente ampia letteratura riguardo l'utilità di impiego della CEUS in ambito oncologico; in particolare la ricerca di metastasi epatiche e la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche incidentali rappresentano attualmente il principale

campo di applicazione della CEUS in medicina umana (*Catalano O e Farina R, 2013*). Nondimeno, questa metodica è utile per la caratterizzazione delle lesioni a carico degli altri organi addominali e dei polmoni (*Qureshi NR, 2011; Caremani M, 2008; Gorg C, 2007; Sperandeo M, 2006; Gorg C, 2006*). La CEUS permette di studiare l'architettura vascolare delle lesioni, con pattern di enhancement in fase arteriosa correlabili all'angiografia TC e, grazie alla natura strettamente intravascolare dei mezzi di contrasto ecografici, fornisce informazioni aggiuntive in fase portale e tardiva utili alla caratterizzazione delle lesioni (*Catalano O e Farina R, 2013*). Diversi studi in letteratura umana hanno dimostrato che l'accuratezza diagnostica della CEUS per la diagnosi di lesioni neoplastiche primarie e metastatiche a livello epatico è comparabile a quella di metodiche avanzate come TC e MRI (*Woo Ryu S, 2014; Larsen LP, 2007; Esteban JM, 2002; Blomely MJK, 1999*). La CEUS è dunque una valida alternativa alla TC e MRI che offre i vantaggi non trascurabili della sicurezza, perché impiega mezzi di contrasto privi di effetti nefrotossici, della rapidità d'esecuzione e proprio come l'ecografia bidimensionale non prevede l'esposizione del paziente a radiazioni ionizzanti (*Chiorean L, 2016*).

Un altro aspetto rilevante in ambito oncologico umano è l'impiego della CEUS come guida diretta per il campionamento biptico delle lesioni. Secondo la più recente letteratura il campionamento CEUS-guidato in tempo reale delle masse o l'esecuzione di una CEUS pilota prima della procedura biptica, incrementa l'accuratezza diagnostica riducendo al contempo il numero di prelievi necessari ad ottenere campioni di tessuto adeguati (*Sparchez Z, 2012; Sparchez Z, 2011; Mitterberger M, 2007; Grossjohan HS, 2006; Sartori S, 2004*).

In medicina veterinaria, la capacità della CEUS di differenziare tra lesioni parenchimali benigne e maligne è stata indagata in un numero limitato di studi (*Rossi F, 2008; Webster N e Holloway A, 2008; Kanemoto H, 2009; Haers, 2010*), mentre la sua utilità di impiego come guida per l'esecuzione di procedure biptiche non è mai stata indagata.

I potenziali risvolti applicativi dell'imaging ecografico bidimensionale e CEUS, nel paziente oncologico sono, come si evince da questo breve riassunto, piuttosto numerosi.

Nell'ambito del dottorato di ricerca, sono stati affrontati due studi riguardanti l'applicazione dell'imaging ecografico nel paziente oncologico ed in particolare:

- la correlazione tra una peculiare alterazione ecografica della milza, definita *honeycomb*, e la diagnosi di linfoma nel gatto;

- il confronto tra l'utilità di impiego dell'ecografia bidimensionale e dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) come guida per il campionamento delle masse addominali e toraciche nel cane e nel gatto.



## **BIBLIOGRAFIA**

**Albury K (2015).** An overview of small animal veterinary sonography. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*; 31: 160-167.

**Andualem T, Alemu B, Tintagu T, Berhe N (2017).** Review on diagnostic approach of ultrasound in Veterinary practice. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*; 4: 134-142.

**Blomley MJK, Albrecht T, Cosgrove DO et al. (1999).** Improved imaging of liver metastases with stimulated acoustic emission in the late phase of enhancement with the US contrast agent SH U508A: early experience. *Radiology*; 210: 409-416.

**Caremani M, Benci A, Lapini L, Tacconi D et al. (2008).** Contrast enhanced ultrasonography (CEUS) in peripheral lung lesions: a study of 60 cases. *Journal of Ultrasound*; 11: 86-96.

**Catalano O, Farina R (2013).** La caratterizzazione delle lesioni focali epatiche. In Catalano O e Farina R, *Mezzi di contrasto in ecografia "CEUS". Metodologia di impiego ed applicazioni cliniche. Applicazioni epatiche.* E.L.I. Medica srl. Villaricca (NA), 117-180.

**Chiorean L, Tana C, Braden B et al (2016).** Advantages and limitations of focal liver lesion assessment with ultrasound contrast agents: Comments on the European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology (EFSUMB) guidelines. *Medical Principle and Practice*; 25: 399-407.

**Esteban JM, Molla MA, Tomas C, Maldonado L. (2002).** Improved detection of liver metastases with contrast-enhanced wideband harmonic imaging: comparison with CT findings. *European Journal of Ultrasound*; 15: 119-126.

**Flory AB, Rassnick KM, Stokol T et al. (2007).** Stage migration in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 21: 1041-1047.

**Gorg C, Kring R, Bert T (2006).** Transcutaneous contrast-enhanced sonography of peripheral lung lesions. *American Journal of Roentgenology*; 187: 420-429.

**Gorg C (2007).** Transcutaneous contrast-enhanced sonography of pleural-based pulmonary lesions. *European Journal of Radiology*; 64: 219-221.

**Grossjohan HS, Bachmann NM (2006).** Ultrasound contrast agents may help in avoiding necrotic areas at biopsy. *Ultraschall in der Medizin*; 27: 2-3.

**Haers H, Vignoli M, Paes G et al. (2010).** Contrast harmonic ultrasonographic appearance of focal space-occupying renal lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 51: 516-522.

**Kanemoto H, Ohno K, Nakashima K et al. (2009).** Characterization of canine focal liver lesions with contrast enhanced ultrasound using a novel contrast agent- Sonazoid. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 50: 188-194.

**Larsen LP, Rosenkilde M, Christensen H et al. (2007).** The value of contrast enhanced ultrasonography in detection of liver metastases from colorectal cancer: a prospective double-blinded study. *European Journal of Radiology*; 62: 302-307.

**Mattoon JS, Bryan JN (2013).** The future of imaging in veterinary oncology: Learning from human Medicine. *The Veterinary Journal*; 197: 541–552.

**McConell F (2008).** The use of ultrasonography in small animal veterinary practice. *Ultrasound*; 16: 146-154.

**Mitterberger M, Horninger W, Pelzer A et al. (2007).** A prospective randomized trial comparing contrast-enhanced targeted versus systematic ultrasound guided biopsies: impact on prostate cancer detection. *The Prostate*; 67: 1537-1542.

**Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER (2015).** Ultrasound-guided biopsy. In Nyland TG, Mattoon JS, *Small animal diagnostic ultrasound*. St. Luis, Missouri: Elsevier Saunders, 30-48.

**Qureshi NR, Hintze C, Risse F et al. (2011).** The feasibility of low mechanical index contrast enhanced ultrasound (CEUS) in distinguishing malignant from benign thoracic lesions. *Ultrasound in Medicine and Biology*; 37: 1747-1754.

**Rossi F, Leone VF, Vignoli M, Laddaga E, Terragni R (2008).** Use of contrast enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 49: 154–164.

**Sartori S, Nielsen I, Trevisani L et al. (2004).** Contrast-enhanced sonography as guidance for transthoracic biopsy of a peripheral lung lesion with large necrotic areas. *Journal of Ultrasound in Medicine*; 23: 133-136.

**Sparchez Z, Radu P, Kacsò G0 et al. (2012).** Contrast-enhanced ultrasound guided biopsy of superficial toraco-abdominal and neck lesions. Initial experience in 20 patients. *Medical Ultrasonography*; 14: 288-293.

**Sparchez Z, Radu P, Zaharia T et al. (2011).** Usefulness of contrast enhanced ultrasound guidance in percutaneous biopsies of liver tumors. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*; 20: 191-196.

**Sperandeo M, Sperandeo G, Varriale A et al. (2006).** Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) for the study of peripheral lung lesions: a preliminary study. *Ultrasound in Medicine and Biology*; 32: 1467-1472.

**Webster N, Holloway A (2008).** Use of contrast ultrasonography in the diagnosis of metastatic feline visceral haemangiosarcoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 10: 388–394.

# **SPLENOPATIA “HONEYCOMB” NEL GATTO: CORRELAZIONE TRA RILIEVI ECOGRAFICI BIDIMENSIONALI E DIAGNOSI PATOLOGICA**

## **INTRODUZIONE**

La splenopatia “*honeycomb*” (*honeycomb pattern*, HCP) è un’alterazione ecografica della milza caratterizzata da una diffusa disomogeneità dell’organo dovuta alla presenza di aree ipoecogene millimetriche, rotondeggianti e dai margini ben definiti, disseminate all’intero parenchima splenico (Nyland TG, 2015; Hetch S, 2015). Questo peculiare aspetto ecografico della milza può essere o meno associato a linfadenopatia tributaria (Nyland TG, 2015; Hetch S, 2015).

In Medicina Umana, il termine *honeycomb* si riferisce ad un’alterazione dell’ecostruttura della milza che si verifica in corso di linfangioma, una rara forma neoplastica benigna caratterizzata dalla proliferazione di numerose cisti a parete sottile contenenti un liquido limpido simile alla linfa. Questa condizione è frequente nel paziente pediatrico e rappresenta una malformazione congenita benigna caratterizzata dalla proliferazione aberrante di vasi linfatici (Peddu P, 2004).

In Medicina Veterinaria l’aspetto HCP del parenchima splenico non si riferisce alla presenza di lesioni cistiche multiple, ma ad una alterazione parenchimatosa diffusa che è stata storicamente associata a processi infiltrativi a carattere maligno (Hetch S, 2015; Dennis R, 2001; Larson MM, 2013). In particolare, nel cane il rilievo di una milza HCP, sebbene possibile anche in corso di patologie benigne, è ritenuto una tipica espressione ecografica del linfoma (Blackwood L, 2004; Rossi F, 2008; Crabtree AC, 2010).

Secondo uno studio che ha indagato la frequenza delle varie presentazioni ecografiche della milza in relazione alle diverse forme anatomiche del linfoma, l’HCP nel cane ha dimostrato un valore predittivo positivo (PPV) del 99% per il linfoma splenico e del 95 % per il linfoma multicentrico (Eberhardt F, 2015).

È bene, tuttavia, ricordare che le presentazioni ecografiche del linfoma splenico e del linfoma multicentrico in stadio IV con coinvolgimento splenico nel cane possono essere molto varie e comprendono, oltre l’HCP, anche i seguenti aspetti: diffusa ipoecogenicità del parenchima; ecotessitura diffusamente disomogenea; lesioni focali con aspetto a bersaglio e aree nodulari multiple anche di dimensioni cospicue. Per questo motivo l’esame citologico resta un punto cardine nell’iter diagnostico del linfoma del cane (Crabtree AC, 2010; Lamb CR, 1991).

Nel gatto la correlazione tra l'aspetto HCP della milza ed il linfoma è stata per lungo tempo esclusivamente aneddótica. Sebbene descritta nei principali testi di riferimento per la diagnostica per immagini dei piccoli animali, l'associazione dell'HCP con il linfoma nel gatto non era provata in maniera scientifica da studi mirati, ma basata sull'esperienza degli autori o applicata al gatto per traslazione dei risultati di studi condotti sul cane (*Hetch S, 2015; Dennis R, 2001; Larson MM, 2013*). In generale, malgrado l'ecografia addominale rappresenti una delle modalità diagnostiche di prima scelta per la valutazione della milza nei piccoli animali, perché non invasiva e dai costi relativamente contenuti, la letteratura veterinaria è carente in merito alla correlazione delle alterazioni ecografiche del parenchima splenico con la diagnosi patologica, in particolare se facciamo riferimento al gatto.

Solo recentemente è stato condotto uno studio multicentrico su base retrospettiva nel quale è stata indagata la correlazione tra le alterazioni focali e diffuse della milza e la diagnosi citologica in una popolazione di gatti (*Bertal M, 2018*). Nell'ambito delle alterazioni ecografiche descritte nella casistica è stato incluso anche l'aspetto HCP, definito dagli autori *moth-eaten*, ovvero tarlato. In particolare, nell'ambito di una popolazione totale di 170 gatti, 25 presentavano un aspetto ecografico HCP della milza. Secondo i risultati di questo studio, una diffusa disomogeneità del parenchima splenico sia HCP sia con aspetto cosiddetto "marmorizzato", non è necessariamente patognomica di un processo neoplastico maligno, ma può manifestarsi anche in presenza di entità patologiche di altra natura (*Bertal M, 2018*).

Fatta eccezione per il suddetto studio, non esistono altri lavori in letteratura veterinaria volti a definire il significato clinico dell'HCP della milza nel gatto ed a stabilirne la correlazione con la diagnosi patologica di linfoma.

Pertanto, gli obiettivi del presente lavoro sono stati i seguenti: determinare il valore predittivo positivo (PPV) dell'HCP per il linfoma splenico nel gatto e correlare l'HCP con la diagnosi definitiva (citologica e/o istologica). Parallelamente, sono state messe a confronto immagini ecografiche ottenute con sonde lineari ad alta frequenza e con sonde microconvex, al fine di stabilire se l'impiego di sonde ad alta frequenza possa incidere positivamente sulla visualizzazione ecografica della splenopatia HCP.

## MATERIALI E METODI

### **Popolazione di studio**

È stata condotta un'analisi retrospettiva delle cartelle cliniche dei gatti afferiti al Servizio di Diagnostica per Immagini del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, nel periodo compreso tra marzo 2009 ed aprile 2017, al fine di identificare soggetti con diagnosi ecografica di splenopatia HCP. Sono stati inclusi nella popolazione di studio solo i gatti in cui al rilievo ecografico di HCP si accompagnava un esame citologico o istologico della milza. Per ciascun soggetto incluso sono stati registrati i dati relativi al segnalamento, la storia clinica ed i rilievi dell'esame fisico, l'esame ecografico addominale inclusi la tipologia e la frequenza di emissione delle sonde ecografiche impiegate, l'esame citologico o istopatologico.

Sono stati esclusi i gatti con studi ecografici addominali incompleti o di scarsa qualità.

### **Protocollo di analisi ecografica**

Nel periodo preso in considerazione gli esami ecografici sono stati svolti con tre ecografi<sup>1</sup>, ciascuno equipaggiato con una sonda lineare (rispettivamente da 7-15 MHz, 5-18 MHz e 3-11MHz) ed una sonda microconvex (5-8 MHz, 8-12 MHz e 3-12 MHz). Tutti gli studi ecografici, archiviati come immagini e filmati in formato medicale (DICOM), sono stati revisionati da un radiologo veterinario con ampia esperienza in materia di ecografia dei piccoli animali, mediante un programma di visualizzazione dedicato<sup>2</sup>.

Per ciascun paziente, sono state analizzate le immagini ecografiche ed i filmati al fine di descrivere l'aspetto della milza ed i dati ottenuti sono stati riportati su un'apposita griglia riassuntiva in formato digitale. In particolare, l'analisi ecografica della milza comprendeva i seguenti aspetti:

- dimensioni;
- forma;
- margini;
- presenza di alterazioni dell'ecostruttura diverse dall'HCP;
- presenza di linfadenopatia ilare splenica.

1 iU22 ultrasound system (Philips Healthcare, Monza, Italy); Epiq 5G ultrasound system (Philips Healthcare, Monza, Italy); Mindray DC 8 ultrasound system (Mindray Bio-medical Electronics Co., Shenzhen, China).

2 Osirix, Pixmeo, Bernex - Svizzera.

Inoltre, in tutti gli studi ecografici in cui erano presenti immagini della milza ottenute con i due diversi tipi di sonde, lineare ad alta frequenza e microconvex, il radiologo ha eseguito un confronto su base soggettiva delle immagini, così da stabilire se l'HCP fosse più facilmente riconoscibile impiegando l'uno o l'altro tipo di sonda.

Le dimensioni della milza sono state valutate secondo un protocollo standard (Sayre RS, 2014), misurando lo spessore dell'organo con calibri elettronici dal versante mesenteriale a quello antimesenteriale, utilizzando l'emergenza dei rami venosi splenici visibili sul versante mesenteriale come repere anatomico. La misurazione è stata ottenuta rispettivamente a partire da una scansione longitudinale se eseguita a livello del corpo splenico o da una scansione trasversale se eseguita a livello delle estremità dorso-craniale e ventro-caudale. Tutte le misurazioni sono state effettuate sulle immagini della milza ottenute durante la fase iniziale del protocollo ecografico, ovvero prima dell'eventuale sedazione per l'agoaspirazione ecoguidata, in modo tale da evitare una possibile sovrastima delle dimensioni della milza conseguente al protocollo anestesiológico. È noto infatti che alcuni anestetici come l'acepromazina, il tiopentale o l'associazione propofol/alotano, possono causare una temporanea variazione delle dimensioni della milza (Reese SL, 2013; Leinonen MR, 2011). È stato definito splenomegalia il rilievo di uno spessore della milza maggiore di 7,1 mm a livello dell'estremità dorso-craniale, maggiore di 9,3 mm a livello del corpo e di 8,7 mm a livello dell'estremità ventro-caudale. La forma della milza è stata definita normale o alterata; i margini lisci o irregolari, rotondeggianti o affusolati. Per quanto riguarda la linfadenopatia splenica, è stata valutata la dimensione del linfonodo splenico e considerata aumentata per valori spessore superiore a 3,2 mm (Schreus E, 2008).

### **Analisi citologica ed istologica**

Tutti i preparati citologici, ottenuti mediante campionamento ecoguidato della milza con ago sottile (calibro pari a 22, 23 o 25 Gauge) e tecnica di ago-infissione, allestiti su appositi vetrini con colorazione May-Grümwald Giemsa, sono stati revisionati rispettivamente da un anatomo-patologo e da un patologo clinico. La diagnosi finale è stata formulata sulla base di un consenso tra i due operatori. Nei casi in cui sulla base dell'analisi citologica fosse stato avanzato il sospetto diagnostico di linfoma, è stato eseguito un test di clonalità (PAAR) mediante *polymerase chain reaction* (PCR) per l'identificazione dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene specifici sui linfociti T o B.

Inoltre, se disponibili sono stati esaminati anche eventuali preparati istologici ottenuti per via chirurgica (splenectomia) o *post-mortem*, associando quando necessario l'immunoistochimica per l'identificazione del fenotipo della popolazione linfoide.

### **Analisi statistica**

Per definire la popolazione di studio è stata impiegata una statistica descrittiva di base. Il PPV dell'HCP per il linfoma è stato calcolato come il numero di gatti con una diagnosi definitiva di linfoma, rispetto al numero totale di gatti inclusi nella popolazione di studio, ovvero con HCP della milza.

## **RISULTATI**

### **Popolazione di studio**

In accordo con i criteri di inclusione stabiliti, sono stati inseriti nella popolazione di studio 33 gatti, di cui 30 gatti domestici a pelo corto, un Abissino, uno Scottish Fold ed un Maine Coon. Tra questi 18 erano maschi castrati, 3 maschi interi, 8 femmine sterilizzate e 4 femmine intere. L'età era compresa tra i 4 mesi ed i 16 anni, con un valore di mediana pari a 9 anni, mentre il peso variava da 1,5 a 9 Kg, con una mediana di 4,5 Kg.

Tutti i gatti sono stati portati alla visita iniziale per sintomi piuttosto aspecifici quali la disoressia o anoressia (18/33), l'abbattimento (11/33), il vomito (11/33), il dimagrimento (9/33). I segni clinici riscontrati alla visita erano altrettanto aspecifici e comprendevano: ipertermia (10/33); depressione del sensorio (7/33); linfoadenomegalia periferica o viscerale identificata alla palpazione dell'addome (7/33). In merito alla revisione dei referti ematologici, la trombocitopenia è stata il rilievo più frequente nell'ambito della popolazione di studio (18/33); le restanti alterazioni ematobiochimiche più comuni sono state nell'ordine di frequenza: iperazotemia (16/33), leucocitosi neutrofilica (8/33) ed eosinofilia (6/33). In 27/33 casi è stato inoltre eseguito un profilo coagulativo ristretto comprensivo dei parametri tempo di protrombina (PT) e tempo parziale di tromboplastina attivata (aPTT). In quattro di questi gatti era presente un lieve aumento dell'aPTT, mentre il PT è risultato elevato in due gatti.



## Analisi ecografica

In 24 dei 33 casi totali, gli studi ecografici comprendevano immagini o video della milza ottenuti con entrambi i tipi di sonda, lineare e microconvex, mentre in 9/33 la milza è stata visualizzata con un solo tipo di sonda, rispettivamente con sonda microconvex in quattro casi e con sonda lineare in cinque casi.

Dalla revisione delle immagini è emerso che la splenopatia HCP era sempre chiaramente riconoscibile in tutte le immagini ottenute mediante sonde lineari ad alta frequenza, al contrario non era visibile nelle immagini ottenute con sonda microconvex in totale di nove casi (**Fig. 1**). Nell'ambito di questi, la diagnosi definitiva è stata di linfoma in due casi, di iperplasia linfoide in quattro casi e rispettivamente di sarcoma istiocitario, ematopoiesi extramidollare e splenite neutrofilica e nei restanti tre.

Per ognuno dei gatti della popolazione di studio, gli aspetti ecografici della milza con la rispettiva diagnosi finale, sono descritti dettagliatamente nelle **Tabelle 1, 2, 3** dove la popolazione di studio è stata suddivisa in tre categorie diagnostiche: forme neoplastiche; forme iperplastiche e reattive; forme infiammatorie.

Dalle immagini ed i video revisionati è stato possibile misurare lo spessore della milza dalla scansione longitudinale del corpo in tutti i casi ed in tre casi è stato possibile eseguire la misurazione dello spessore anche a livello dell'estremità dorso-craniale. Poiché in nessun caso erano disponibili immagini dell'estremità ventro-caudale dell'organo, non è stato possibile eseguire alcuna misurazione a questo livello. In base ai valori ottenuti da queste misurazioni, è stata descritta una splenomegalia nel 69,7% della popolazione totale, cioè in 23 gatti, di cui 8 gatti con linfoma, 9 con iperplasia linfoide, 3 con ematopoiesi extramidollare, 2 con splenite neutrofilica ed uno con sarcoma istiocitario. La forma della milza era normale in tutti salvo che in quattro gatti (16,7% della popolazione), due dei quali con una diagnosi finale di linfoma, uno di iperplasia linfoide, uno di splenite neutrofilica. I margini della milza sono stati definiti irregolari in 14 gatti, quattro dei quali affetti da linfoma. In quattro gatti all'HCP si associavano altre alterazioni focali del parenchima splenico, in particolare in un gatto è stata riscontrata una concomitante lesione ipoecogena nodulare di 7,4 mm che deformava il profilo splenico. Nei restanti tre casi sono stati descritti noduli iperecogeni di piccole dimensioni.

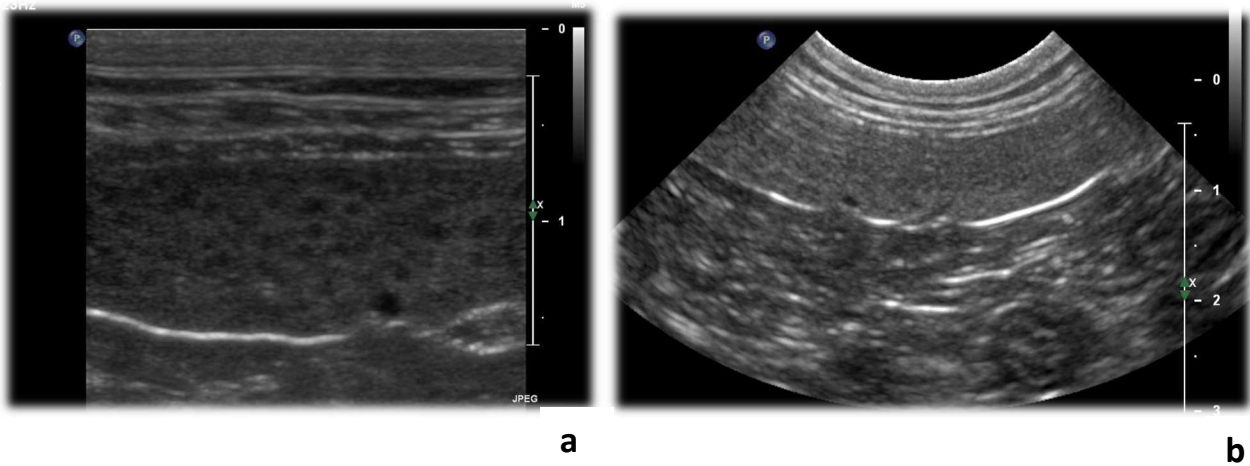
La linfadenopatia splenica si associava all'HCP solamente in sei gatti, di cui solo due con diagnosi di linfoma, i restanti erano gatti con splenite o iperplasia linfoide.

In merito alla revisione delle immagini ecografiche dei restanti organi addominali, le alterazioni di più frequente riscontro nell'ambito della popolazione di studio sono state: alterazioni diffuse o focali dell'ecostruttura e dell'ecogenicità dei reni (12/33) e del fegato (7/33); enteropatia caratterizzata da alterazioni diffuse dell'ecogenicità o dello spessore relativo della parete delle anse intestinali (6/33); ispessimento murale del piccolo intestino con perdita della stratigrafia di parete, associato a linfadenopatia tributaria (4/33).

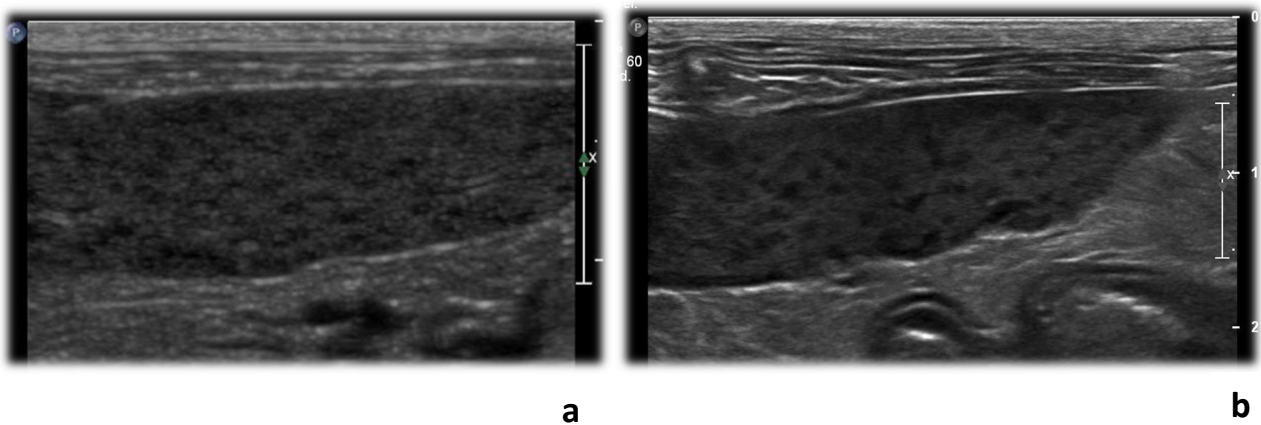
### **Analisi citologica ed istologica**

In cinque casi erano disponibili campioni istologici ottenuti *post-mortem* (4/33) o per via chirurgica (1/33), che hanno permesso la diagnosi finale di un sarcoma istiocitario, di una splenite granulomatosa criptococcica, di un linfoma a cellule B e di due casi di iperplasia linfoide. In 28 casi la diagnosi è stata invece determinata grazie ad esame citologico (9/33; 32%) o mediante esame citologico associato a PARR (19/33; 68%). In sintesi nell'ambito di questi 28 casi, il linfoma è stato diagnosticato in sette casi, nello specifico si trattava di un linfoma LGL, tre linfomi di tipo T e tre linfomi di tipo B. Nei restanti casi la diagnosi finale è stata di condizioni benigne, tra le quali la più frequente è stata l'iperplasia linfoide (13/28), seguita dalla splenite neutrofilica (4/28), l'ematopoiesi extramidollare (3/28) ed infine la splenite piogranulomatosa (1/28) (**Figura 2**).

Nel complesso il linfoma è stato diagnosticato in otto dei 33 gatti inclusi nella popolazione di studio, con un PPV dell'HCP per il linfoma pari al 24,2%. La lista completa delle diagnosi è riassunta nella **Tabella 4**.



**Figura 1.** Aspetto ecografico HCP della milza in un gatto con diagnosi di iperplasia linfoide – confronto tra immagini ottenute con sonda lineare e sonda microconvex. L’HCP è chiaramente riconoscibile nell’immagine ottenuta con sonda lineare (a) mentre nell’immagine ottenuta con sonda microconvex si osserva esclusivamente una lieve disomogeneità dell’ecotessitura splenica (b). (Archivio Ecografico Servizio Diagnostica per Immagini – Dipartimento d Scienze Mediche Veterinarie).



**Figura 2.** Aspetto ecografico della milza di due gatti con splenopatia HCP. La diagnosi finale è stata rispettivamente di iperplasia linfoide (a) e splenite piogranulomatosa (b). (Archivio Ecografico Servizio Diagnostica per Immagini – Dipartimento d Scienze Mediche Veterinarie).

**Tabella 1.** Aspetti ecografici descrittivi della milza, alterazioni extraspleniche e diagnosi definitiva nel gruppo di gatti con milza HCP affetti da forme neoplastiche.

No.	Dimensioni	Forma	Margini	Altre alterazioni spleniche	Linfadenopatia splenica	Alterazioni extraspleniche	Diagnosi finale
1	aumentate	alterata	irregolari / arrotondati	nodulo ipoecogeno (4 mm)	No	nefropatia diffusa	linfoma B
2	aumentate	normale	irregolari / affusolati	nodulo iperecogeno (2,3 mm)	Si	enteropatia focale; linfadenopatia digiunale; nefropatia multifocale	linfoma LGL
3	aumentate	alterata	irregolari / arrotondati	nodulo iperecogeno (3,5 mm)	Si	nefropatia diffusa; gastropatia focale; enteropatia digiunale diffusa; pancreopatia multifocale; epatopatia diffusa; linfadenopatia viscerale	linfoma T
4	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	No	nefropatia multifocale; enteropatia focale; versamento addominale	linfoma B
6	aumentate	normale	lisci / arrotondati	noduli iperecogeni multipli (6 mm)	No	nefropatia diffusa; enteropatia diffusa; linfadenopatia digiunale	linfoma T
7	aumentate	alterata	irregolari / arrotondati	-	Si	nefropatia diffusa; enteropatia digiunale diffusa	linfoma T
8	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	No	nessuna	linfoma T
9	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	No	epatopatia diffusa; fango biliare	sarcoma istiocitario
10	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	Si	colangio-epatopatia diffusa; enteropatia diffusa; linfadenopatia mesenterica craniale; pancreopatia diffusa	linfoma B

**Tabella 2.** Aspetti ecografici descrittivi della milza, alterazioni extraspleniche e diagnosi finale nel gruppo di gatti con milza HCP affetti da forme iperplastiche e reattive.

No.	Dimensioni	Forma	Margini	Altre alterazioni spleniche	Linfadenopatia splenica	Alterazioni extraspleniche	Diagnosi finale
1	aumentate	normale	irregolari /arrotondati	-	no	nefropatia diffusa; epatopatia diffusa	iperplasia linfoide
2	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	nefropatia diffusa; enteropatia diffusa	iperplasia linfoide
3	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	no	nessuna	ematopoiesi extramidollare
4	aumentate	normale	irregolari / arrotondati	-	no	nefropatia diffusa	iperplasia linfoide
5	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	enteropatia diffusa	iperplasia linfoide
6	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	no	versamento addominale	iperplasia linfoide
7	aumentate	normale	irregolari / affusolati	-	no	enteropatia multifocale; linfadenopatia viscerale	ematopoiesi extramidollare
8	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	nessuna	iperplasia linfoide
9	normali	normale	lisci / affusolati	-	si	nefropatia diffusa; gastroenteropatia diffusa; linfadenopatia viscerale; versamento addominale	iperplasia linfoide
10	aumentate	normale	irregolari / affusolati	-	no	massa (2 cm) ipogastrica	iperplasia linfoide
11	aumentate	normale	irregolari / arrotondati	-	si	nefropatia diffusa; enteropatia digiunale diffusa	iperplasia linfoide
12	aumentate	normale	irregolari / arrotondati	-	no	epatopatia diffusa; enteropatia diffusa; linfadenopatia viscerale	iperplasia linfoide
13	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	no	colangio-epatopatia diffusa; enteropatia diffusa	ematopoiesi extramidollare
14	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	nefropatia diffusa; gastro- enteropatia diffusa; epatopatia diffusa	iperplasia linfoide
15	normali	normale	irregolari / affusolati	-	no	enteropatia diffusa; linfadenopatia digiunale	iperplasia linfoide
16	aumentate	normale	irregolari / affusolati	-	no	cisti renali	ematopoiesi extramidollare
17	aumentate	normale	irregolari / affusolati	-	no	nefropatia diffusa; epatopatia diffusa; enteropatia diffusa; versamento addominale	iperplasia linfoide

**Tabella 3.** Aspetti ecografici descrittivi della milza, alterazioni extraspleniche e diagnosi definitiva nel gruppo di gatti con splenopatia HCP affetti da forme infiammatorie.

No.	Dimensioni	Forma	Margini	Altre alterazioni spleniche	Linfadenopatia splenica	Alterazioni extraspleniche	Diagnosi finale
1	aumentate	alterata	lisci / arrotondati	-	si	enteropatia focale; linfadenopatia digiunale	splenite neutrofilica
2	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	massa (1,4 cm) ipogastrica	splenite granulomatosa
3	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	epatopatia diffusa	splenite neutrofilica
4	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	no	nefropatia diffusa; versamento addominale	splenite neutrofilica
5	normali	normale	lisci / affusolati	-	no	linfadenopatia viscerale; epatopatia diffusa	splenite neutrofilica
6	aumentate	normale	lisci / arrotondati	-	si	linfadenopatia viscerale; enteropatia diffusa; nefropatia focale	splenite piogranulomatosa

**Tabella 4.** Tabella riassuntiva delle diagnosi definitive dei 33 gatti con aspetto ecografico *honeycomb* della milza.

<b>Diagnosi finale</b>	<b>No. di casi (%)</b>
Linfoma	8 (24.2%)
Iperplasia linfoide	15 (45.4%)
Sarcoma istiocitario	1 (3.0%)
Ematopoiesi extramidollare	3 (9.1%)
Splenite	6 (18.2%)

## DISCUSSIONE

L'honeycomb pattern della milza è un'alterazione ecografica diffusa del parenchima splenico, generalmente associata a forme neoplastiche infiltranti, quali il linfoma, nel cane e nel gatto (*Hetch S, 2015; Dennis R, 2001; Larson MM, 2013*). Diversamente da quanto atteso, nella popolazione di questo studio l'HCP ha dimostrato un PPV (24%) molto basso per il linfoma nel gatto. Questo risultato è nettamente in contrasto con quanto descritto nel cane, nel quale l'HCP è stato dimostrato essere altamente predittivo per il linfoma splenico (*Eberhardt F, 2015*). Analogamente a quanto emerso dai risultati di questo studio, in un recente lavoro è stata descritta una mancata correlazione tra un'ecostruttura diffusamente disomogenea della milza nel gatto, ad HCP o aspetto marmorizzato, ed una diagnosi citologica di neoplasia maligna (*Bertal M, 2018*).

Nel nostro studio il 70% dei casi era rappresentato da forme linfoproliferative, due terzi delle quali erano forme benigne (iperplasia linfatica) e solamente un terzo linfomi. Da un punto di vista microscopico la distinzione tra queste due entità patologiche può essere molto complessa o addirittura impossibile in certi casi, senza l'ausilio di tecniche diagnostiche più avanzate come l'immunoistochimica o la PARR. È dunque logico pensare che anche da un punto di vista ecografico i disordini linfoproliferativi benigni e maligni della milza possano determinare alterazioni ecostrutturali simili. Per queste ragioni, quando all'ecografia addominale si riscontra un'alterazione della milza HCP nel gatto è necessario prendere in considerazione diverse diagnosi differenziali oltre al linfoma, inclusi condizioni linfoproliferative benigne, quadri infiammatori o reattivi.

Tra le altre patologie riscontrate in questo studio si annoverano spleniti a diversa eziologia, ematopoiesi extramidollare e sarcoma istiocitario. Una delle spleniti era di origine criptococcica. È interessante notare che un simile aspetto della milza con ecostruttura variegata, è stato descritto in uno studio precedente in una popolazione di 15 gatti con diagnosi di splenite micotica sostenuta da *Histoplasma capsulatum* (*Atiee G, 2014*). Le spleniti micotiche sono caratterizzate da noduli granulomatosi disseminati che all'esame ecografico possono conferire una diffusa disomogeneità al parenchima splenico.

L'ematopoiesi extramidollare si definisce un'anormale sintesi di cellule ematopoietiche in sedi diverse dal midollo osseo. Questa condizione può associarsi ad altre patologie della milza o manifestarsi in risposta ad un deficit di produzione delle cellule ematiche da parte del midollo osseo. A livello microscopico, l'ematopoiesi extramidollare si presenta nella maggior parte dei casi come aree focali multiple distribuite al parenchima splenico o epatico. Tuttavia, in alcuni casi l'estensione delle aree di ematopoiesi può raggiungere proporzioni tali da determinare un'alterazione della milza



visibile ecograficamente in forma di noduli o diffusa disomogeneità. Questa considerazione è avvalorata da un precedente studio, dove nell'ambito delle alterazioni ecografiche associate alla diagnosi citologica, l'ematopoiesi extramidollare è stata descritta in un gruppo di sette gatti come un aspetto disomogeneo della milza o presenza di noduli ipoecogeni multipli (*Hanson JA, 2005*).

Quando sono state confrontate le immagini ecografiche ottenute con i diversi tipi di trasduttore, al fine di valutare se il tipo di sonda impiegata potesse influire sulla visualizzazione dell'HCP, sono state notate sostanziali differenze tra le sonde microconvex e quelle lineari. Infatti, l'HCP era sempre chiaramente visibile in tutte le immagini ottenute con sonde lineari ad alta frequenza, mentre era evidente solo nel 61,9% della popolazione nelle immagini ottenute con sonde microconvex. Questo risultato è coerente con l'ipotesi che le sonde ad alta frequenza favoriscono la visualizzazione di alterazioni diffuse dell'ecostruttura della milza, anche in caso di una disomogeneità lieve, incrementando così la visualizzazione dell'HCP.

Allo stesso modo in un precedente studio retrospettivo (*Bertal M, 2018*), alterazioni diffuse dell'ecostruttura come l'HCP ed un aspetto marmorizzato, sono state riscontrate più frequentemente nelle immagini ottenute con sonde lineari ad alta frequenza. Tuttavia, facendo riferimento in particolare al gruppo di gatti che nella loro popolazione disponevano di immagini della milza ottenute con entrambi i tipi di sonda, non è stata descritta alcuna significativa differenza nella visualizzazione dell'HCP. Al contrario, se consideriamo il gruppo di gatti nel presente studio in cui è stato possibile fare un confronto tra le immagini ottenute con i due diversi tipi di trasduttore, è stato riscontrato un numero considerevole di casi in cui l'HCP non era chiaramente visibile nelle immagini ottenute con sonda microconvex (9/24). Questa discrepanza tra i due studi è probabilmente conseguente al basso numero di casi dello studio di *Bertal et al.*, nei quali si disponeva di immagini acquisite con entrambi i tipi di sonda, fattore che non ha permesso di eseguire un'analisi di confronto diretta.

Nel nostro studio, l'alterazione ecografica che più frequentemente si è associata al rilievo dell'HCP è la splenomegalia, che è stata osservata nel 100% dei gatti affetti da linfoma e solo nel 60% di quelli con diagnosi diverse dal linfoma. La bassa specificità di questo rilievo può essere in parte spiegata dalla peculiare architettura microvascolare della milza nel gatto. La milza del gatto si definisce non-sinusoidale perché i capillari arteriosi terminano direttamente nella polpa rossa tra i cordoni splenici, dalla quale poi si originano le venule come vasi aperti (*Sayre RS, 2015; Reese SL, 2013; Schmidt EE, 1983*). Questa particolare anatomia vascolare rende la milza del gatto meno capace di accumulare sangue rispetto a quella del cane. Per questa ragione la splenomegalia nel gatto,

diversamente che nel cane, è difficilmente dovuta ad una risposta fisiologica, ma si associa generalmente a condizioni patologiche, quale che sia la loro eziologia. Ad ulteriore sostegno di questa ipotesi, la splenomegalia nel gatto è stata già descritta in corso di processi rigenerativi, infiammatori o neoplastici (*Atiee G, 2014; Hanson JA, 2005; Spangler WL and Culbertson MR, 1992*). Nei lavori precedenti, tuttavia, la valutazione delle dimensioni della milza era sempre stata basata su un'interpretazione soggettiva. Al contrario, malgrado la natura retrospettiva dello studio presente, tutte le misurazioni della milza sono state eseguite attenendosi ad un protocollo standard (*Sayre RS and Spaulding KA, 2014*) in modo da ottenere un dato che fosse il più possibile oggettivo. Tutti i restanti aspetti ecografici presi in considerazione, come l'alterazione della forma o l'irregolarità dei margini, si sono dimostrati dei segni aspecifici di splenopatia poiché riscontrati ugualmente in gatti con forme rigenerative e neoplastiche.

In questo studio non è stata valutata l'ecogenicità relativa della milza, rispetto a quella del parenchima epatico e della corticale renale, perché molti dei gatti inclusi nella popolazione presentavano alterazioni ecografiche ed ematologiche dei reni e del fegato che avrebbero dunque potuto interferire con la valutazione. Inoltre, è stato dimostrato che un aumento dell'ecogenicità della corticale renale nei gatti maschi castrati è comune, anche in assenza di una patologia sottostante (*Yeager AE, 1989*).

La linfadenopatia splenica è stata un rilievo infrequente in questo studio, anche nell'ambito del gruppo di gatti con diagnosi di linfoma. Tuttavia data la scarsità di dati pubblicati in merito all'incidenza della linfadenopatia in corso di diverse patologie spleniche, non è possibile fare alcuna comparazione.

Oltre alle alterazioni di pertinenza della milza, la revisione degli esami ecografici ha messo in evidenza alterazioni contestuali degli altri organi addominali. In particolare, coerentemente con la presentazione del linfoma nel gatto, su otto gatti affetti da linfoma sette presentavano un coinvolgimento multiorganico confermato su base citologica.

I principali limiti di questo studio risiedono nel numero relativamente limitato di casi e nella sua natura retrospettiva, motivo per il quale gli studi ecografici sono stati eseguiti da operatori diversi e con diverso livello di esperienza.

## CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati di questo studio, l'HCP ha dimostrato un valore predittivo positivo piuttosto basso per il linfoma splenico e non può considerarsi patognomonico di questa patologia nel gatto. Infatti, malgrado la maggior parte dei gatti in questa popolazione fosse affetta da disordini linfoproliferativi, il linfoma è stato confermato solamente in 9/33 gatti e la splenopatia HCP è stata riscontrata anche in gatti con forme reattive benigne, compresi processi infiammatori acuti ed ematopoiesi extramidollare. Pertanto, il campionamento ecoguidato finalizzato all'esame citologico ed eventualmente associato alla valutazione della clonalità o alla fenotipizzazione della popolazione linfoide, resta un punto cardine nell'iter diagnostico del linfoma splenico nel gatto.

Infine, le sonde lineari ad alta frequenza si sono dimostrate uno strumento molto valido per il rilievo della splenopatia HCP, pertanto se ne raccomanda sempre l'impiego per l'esame ecografico della milza nel gatto.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Atiee G, Kvitko-white H, Spaulding K et al. (2014).** Ultrasonographic appearance of histoplasmosis identified in the spleen in 15 cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 55: 310-314.

**Bertal M, Carmel EN, Diana A, et al. (2018).** Association between ultrasonographic appearance of splenic parenchyma and cytology in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 20: 23-29.

**Blackwood L, German AJ, Stell AJ et al. (2004).** Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice*; 45: 259-262.

**Crabtree AC, Sprangler E, Beard D et al. (2010).** Diagnostic accuracy of gray-scale ultrasonography for the detection of hepatic and splenic lymphoma in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 51: 661-664.

**Dennis R, Kirberger RM, Wrigley R e Barr F (2001).** Other abdominal structures – abdominal wall, peritoneal and retroperitoneal cavities, parenchymal organs. In Dennis R, Kirberger RM, Wrigley R e Barr F, *Handbook of small animals radiologic differential diagnosis*. WB Saunders, 209-235.

**Eberhardt F, Kohler C, Krastel D et al. (2015).** Sonographically detectable splenic disorders in dogs with malignant lymphoma. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimitiere*; 43: 215-220.

**Hanson JA, Papageorges M, Girard E et al. (2005).** Ultrasonographic appearance of splenic disease in 101 cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 42: 441-445.

**Hetch S, Mai W (2015).** Spleen. In Penninck D, D'Anjou MA, *Atlas of small animal ultrasonography*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc., 239-258.

**Lamb CR, Hartzband LE, Tidwell AS, Pearson SH (1991).** Ultrasonographic findings in hepatic and splenic lymphosarcoma in dogs and cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 32: 117-120.

**Larson MM (2013).** The liver and spleen. In Thrall DE, *Textbook of diagnostic radiology*. St Luis, Missouri: Elsevier Saunders, 679-704.

**Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, O'Brien RT (2011).** Effect of anaesthesia on contrast-enhanced ultrasound of the feline spleen. *The Veterinary Journal*; 190: 273-277.

**Nyland TG, Mattoon JS (2015).** Spleen. In Nyland TG, Mattoon JS, Small animal diagnostic ultrasound. St. Luis, Missouri: Elsevier Saunders, 400-437.

**Peddu P, Shah M, Sidhu PS (2004).** Splenic abnormalities: a comparative review of ultrasound, microbubble-enhanced ultrasound and computed tomography. *Clinical Radiology*; 59: 777-792.

**Reese SL, Zekas LJ, Iazbik MC, et al. (2013).** Effect of sevoflurane anaesthesia and blood donation on the sonographic appearance of the spleen in 60 healthy cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 54: 168-175.

**Rossi F, Leone V, Vignoli M et al. (2008).** Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 49: 154-164.

**Sayre RS, Spaulding KA (2014).** Formulation of a standardized protocol and of the size and appearance of the spleen in healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 16: 326-332.

**Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC (1983).** The intermediate circulation in the nonsinusoidal spleen of the cat, studied by scanning electron microscopy of microcorrosion casts. *Journal of Morphology*; 178: 125-38.

**Schreus E, Vermote K, Barberet V et al. (2008).** Ultrasonographic anatomy of abdominal lymph nodes in the normal cat. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 49: 68-72.

**Spangler WL, Culbertson MR (1992).** Prevalence and type of splenic disease in cats: 455 cases (1985-1991). *Journal of American Veterinary Medical Association*; 201: 773-776.

**Yeager AE, Anderson WI (1989).** Study of association between histologic features and echogenicity of architecturally normal cat kidneys. *American Journal of Veterinary Research*; 50: 860-863.

# CONFRONTO TRA AGOASPIRAZIONE DI MASSE ADDOMINALI E TORACICHE MEDIANTE TECNICA ECOGRAFICA BIDIMENSIONALE (ECO2D) ED ECOCONTRASTOGRAFICA (CEUS)

## INTRODUZIONE

L'utilità dell'ecografia bidimensionale (ECO2D) come guida per il campionamento delle lesioni focali è ampiamente riconosciuta in medicina veterinaria e le procedure di agoaspirazione o ago-infissione (FNA) ecoguidate sono ormai diventate una prassi nell'iter diagnostico delle masse di sospetta natura neoplastica nel cane e nel gatto (*Mattoon JS, 2015*). I principali vantaggi che hanno reso l'ECO2D uno strumento d'ausilio così importante per le procedure di FNA, risiedono nella ormai ampia disponibilità degli strumenti ecografici nella pratica clinica veterinaria, nella rapidità e sicurezza della metodica e nella possibilità di monitorare in tempo reale gli organi durante e dopo la procedura di campionamento (*Mattoon JS, 2015*). Sebbene in medicina veterinaria la letteratura volta ad indagare in maniera specifica e sistematica l'accuratezza diagnostica dell'FNA ECO2D-guidato di masse sia relativamente poco ampia, alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia di questa metodica per la diagnosi delle lesioni focali di organi addominali e toracici nei piccoli animali (*McAloney CA, 2018; Bahr LK, 2013; Ballegeer E, 2007; Bonifanti U, 2004*). Va precisato tuttavia che molti sono i fattori che influenzano l'accuratezza diagnostica dell'FNA ECO2D-guidato, come ad esempio l'organo di pertinenza della lesione, la natura della lesione (infiammatoria, neoplastica, degenerativa) e le sue dimensioni (*Bahr LK, 2013; Bonifanti U, 2004; Lievem JK, 1999*). Nel caso di masse di natura maligna ad accrescimento rapido, è frequente la presenza di vaste aree di necrosi, che possono ridurre le *performance* dell'FNA portando al prelievo di campioni inadeguati per la valutazione citologica. L'ECO2D, infatti, non permette di distinguere in modo efficace aree di necrosi all'interno di una massa, soprattutto nei casi in cui non sia ancora avvenuta la colliquazione del tessuto necrotico. Va da sé che in questi casi la guida ECO2D per l'FNA possa risultare poco efficace (*Solbiati L, 2004*). L'esame ecocontrastografico (CEUS), per contro, ha la capacità di evidenziare il microcircolo degli organi e delle lesioni. Questa metodica è dunque in grado di differenziare, nel contesto di una massa, le aree di tessuto perfuse e dunque vitali, da quelle avascolari suggestive di necrosi, colliquazione, emorragia o fibrosi il cui prelievo inficerebbe l'adeguatezza del campione citologico (*Sparchez Z, 2010; Grossjohan HS, 2006*).

In letteratura umana esistono numerose pubblicazioni riguardo al ruolo della CEUS nelle procedure di prelievo bioptico, che ne descrivono l'utilità di impiego sia come guida diretta sia come esame preliminare per il campionamento di un organo o di una lesione. Il principale ambito di applicazione della biopsia CEUS-guidata in medicina umana è la caratterizzazione delle lesioni epatiche. Diversi lavori hanno indagato l'applicabilità e l'efficacia di questa metodica, dimostrandone la superiorità rispetto alla tecnica ECO2D, anche nel caso di lesioni focali scarsamente visibili all'esame ecografico bidimensionale (*Sparchez Z, 2011<sup>a</sup>*). In uno studio in cui è stata valutata l'utilità della CEUS eseguita prima della biopsia di lesioni epatiche focali è stato riscontrato un aumento dell'accuratezza diagnostica pari a circa il 20% in più rispetto alla sola guida ECO2D (*Wu W, 2006*). In un altro lavoro, la biopsia di tumori epatici eseguita simultaneamente alla CEUS ha raggiunto livelli di accuratezza diagnostica del 100% (*Sparchez Z, 2011<sup>b</sup>*). Oltre ad ottimizzare la scelta del sito di prelievo, il vantaggio della biopsia epatica CEUS-guidata è quello di favorire la visualizzazione e quindi il campionamento di lesioni scarsamente visibili all'ecografia (<sup>3</sup>*Sparchez Z, 2011; Yoon SH, 2010*). Parallelamente al suo sviluppo nell'ambito dell'epatologia, la tecnica CEUS-guidata è stata applicata in un contesto più generale al prelievo bioptico di lesioni a sede diversa ed il valore aggiunto di questa metodica rispetto alla tradizionale guida ecografica è stato dimostrato per la diagnosi di masse dei tessuti molli, di lesioni a sede polmonare e mediastinica, pancreatica e prostatica (*Wei W, 2015; Sparchez Z, 2012; Cao BS, 2011; De Marchi A, 2010; Mitterberger M, 2007; Sartori S, 2004*). Facendo riferimento a questi ulteriori campi di applicazione, un importante beneficio della procedura CEUS-guidata è la riduzione del numero di biopsie necessarie ad ottenere una diagnosi definitiva, aspetto cruciale nello screening per l'adenocarcinoma prostatico nell'uomo che richiede un approccio sistematico con biopsie multiple (*Mitterberger M, 2007*).

In medicina veterinaria la letteratura riguardante la CEUS è molto meno corposa rispetto a quella umana e gli studi pubblicati si focalizzano prevalentemente sul suo impiego per lo studio della perfusione degli organi in condizioni di normalità o in presenza di lesioni. Non esiste tuttavia una letteratura veterinaria specifica sull'utilizzo della CEUS come guida per l'FNA delle lesioni, fatto salvo per uno studio preliminare sulla somministrazione sottocutanea di mezzo di contrasto ecografico per l'individuazione e successiva biopsia dei linfonodi sentinella delle ghiandole mammarie, in un gruppo di tre cani sani (*Hylton RG, 2010*).

L'obiettivo del presente studio è stato quello di confrontare l'adeguatezza dei campioni citologici di masse a sede intra-addominale e toracica ottenuti con tecnica di campionamento CEUS-guidata ed ECO2D-guidata in una popolazione di cani e gatti. In secondo luogo, è stato indagato l'effetto di una

serie di fattori quali l'organo sede di lesione, le dimensioni della massa in rapporto al peso del soggetto, il livello di esperienza dell'operatore che ha eseguito l'FNA, singolarmente ed in associazione, sull'adeguatezza del campione citologico.

## MATERIALI E METODI

### **Popolazione di studio**

Questo studio è stato condotto secondo un disegno retrospettivo caso-controllo.

Sono state esaminate le cartelle cliniche di cani e gatti afferiti all'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna nel periodo compreso tra settembre 2015 e agosto 2018, al fine di identificare soggetti portatori di masse a sede intra-addominale e toracica.

Sono stati selezionati soggetti con rilievo ecografico di lesioni focali singole o multiple delle dimensioni di almeno 1 cm (diametro o asse maggiore della lesione  $\geq 1$  cm), a carico di uno o più organi addominali e/o toracici, per i quali si disponeva di campioni citologici delle lesioni ottenuti mediante ago-infissione (FNA) CEUS-guidata. In base agli organi sede delle lesioni, è stato successivamente selezionato un gruppo di controllo in cui sono stati inseriti cani e gatti per i quali la procedura di FNA è stata eseguita mediante guida ECO2D. Per poter confrontare l'accuratezza diagnostica delle due tecniche di campionamento citologico, FNA CEUS-guidato ed FNA ECO2D-guidato, è stata effettuata una stima della dimensione del campione in due proporzioni mediante un software di analisi statistica<sup>1</sup>, al fine di ottenere un potere statistico del 90% (alpha level 0,05; B level 0,20) con l'ipotesi di 70% e 95% di risultati positivi (campioni citologici adeguati) rispettivamente per l'ECO2D e la CEUS. È stato pertanto inserito un numero minimo di 43 masse in ciascuno dei due gruppi (Gruppo CEUS, Gruppo ECO2D). Per ciascuno dei soggetti inclusi sono stati registrati i dati relativi al segnalamento (specie, razza, sesso, età, peso). Sono stati esclusi dalla popolazione i seguenti casi:

- cani e gatti in cui l'FNA non è stato eseguito perché le lesioni non erano ecograficamente accessibili;
- cani e gatti in cui l'FNA non è stato eseguito a causa di gravi alterazioni del profilo ematico e coagulativo;
- soggetti portatori di lesioni focali delle dimensioni inferiori ad 1 cm o di lesioni diffuse degli organi in assenza di masse o noduli.



### **Protocollo ecografico e tecnica di campionamento CEUS ed ECO2D**

In tutti i pazienti inclusi nello studio la diagnosi di massa a sede addominale o toracica è stata ottenuta mediante un esame ecografico completo della regione che ha permesso di identificare le lesioni focali e di caratterizzarle in termini di forma, ecostruttura, dimensioni e localizzazione anatomica. Durante il periodo preso in considerazione, gli studi ecografici sono stati eseguiti con due strumenti<sup>2</sup>, entrambi equipaggiati con sonde lineari e curvilinee multifrequenza.

Nel gruppo CEUS, il prelievo citologico è stato effettuato dopo l'esecuzione di una CEUS pilota sull'organo d'interesse, finalizzata ad identificare l'area più idonea al campionamento. Gli studi CEUS sono stati eseguiti secondo il protocollo ospedaliero in accordo con uno studio preliminare sulla caratterizzazione CEUS delle masse toraciche (*Linta N, 2017*), utilizzando una sonda lineare ad alta frequenza (L3-12 MHz) o una convex multifrequenza (C2-9 MHz o C2-5 MHz), a seconda dell'organo di pertinenza della lesione e della sua profondità. È stato impiegato un mezzo di contrasto ecografico di seconda generazione<sup>3</sup> che è stato somministrato attraverso un catetere venoso posizionato nella vena cefalica, alla dose di 0,05 ml/Kg PV nei cani e di 0,5 ml nei gatti. L'inoculazione è stata eseguita manualmente in bolo rapido e subito seguita da un bolo di 5 ml di soluzione fisiologica. Le immagini sono state ottenute mediante un software contrasto-specifico (*Pulse Inversion Harmonic and Power Modulation Combined – PMPI*) nella modalità *split screen* che permette di visualizzare simultaneamente l'immagine ecocontrastografica e quella bidimensionale di riferimento. I filmati e le immagini CEUS ottenuti sono stati salvati ed archiviati in formato digitale medico (DICOM). Durante la CEUS pilota è stata fatta una valutazione estemporanea delle lesioni ed in particolare del pattern di enhancement, della eventuale presenza di aree avascolari e dei vasi adiacenti alla lesione, ed è stata così identificata l'area più idonea per l'FNA. Al termine della procedura CEUS il prelievo citologico è stato eseguito con ago sottile nell'area bersaglio identificata. Nei cani e gatti del gruppo ECO2D, l'FNA è stato eseguito guidando l'ago nella lesione esclusivamente sotto guida ECO2D.

### **Protocollo di analisi CEUS ed ECO2D**

Tutte le immagini CEUS ed ECO2D sono state riesaminate utilizzando un programma di visualizzazione DICOM dedicato<sup>4</sup>, prendendo in considerazione i seguenti parametri relativi alle lesioni focali:

#### **Parametri CEUS**

- valutazione della distribuzione del mezzo di contrasto durante la fase di *wash in*, al picco di intensità e durante il progressivo dilavamento: soggettivamente omogenea o disomogenea;
- tipo di enhancement della lesione rispetto al parenchima circostante al picco (iper, iso, ipoenhancement);
- presenza di aree avascolari intralesionali;
- eventuali rilievi suggestivi di malignità come la presenza di aree di enhancement tubulari tortuose compatibili con neoangiogenesi intralesionale, presa di contrasto e/o dilavamento precoce della lesione rispetto al restante parenchima.

#### Parametri ECO2D

- ecostruttura: omogenea/disomogenea;
- ecogenicità: ipoecogena, isoecogena, iperecogena rispetto alle strutture adiacenti;
- forma: ovalare, rotondeggiante;
- distribuzione: focale/multifocale;
- dimensioni: asse maggiore ed asse minore della lesione, misurati mediante calibri elettronici ed espressi in cm;
- presenza/assenza di aree ipoecogene suggestive di possibili zone necrotiche intralesionali.

#### Protocollo di analisi citologica

Tutti i preparati citologici, ottenuti con le due diverse tecniche di campionamento ed allestiti su appositi vetrini con colorazione May-Grünwald Giemsa, sono stati revisionati da un anatomopatologo e da un patologo clinico che hanno espresso un giudizio in merito all'adeguatezza del campione sulla base di un consenso. L'adeguatezza dei campioni citologici è stata valutata secondo la scala di punteggio descritta in **Tabella 1**, prendendo in considerazione per ciascun campione i seguenti parametri: contaminazione ematica; cellularità; preservazione cellulare; presenza di detriti necrotici. È stato espresso, in fine, un giudizio dicotomico sull'adeguatezza (campione adeguato si/no).

Nei casi in cui possibile è stata inoltre formulata una diagnosi citologica.

**Tabella 1.** Griglia dei parametri impiegati per a valutazione di adeguatezza dei preparati citologici e relativo sistema di punteggio. HPF - campo ad alto potere (obiettivo 40x, lente 10x).

Parametri citologici	Punteggio			
	0	1	2	3
Contaminazione ematica	Assente < 2 eritrociti / HPF	Lieve > 50% eritrociti in monostrato	Moderata > 50% eritrociti in monostrato	Elevata > 50 % eritrociti a contatto tra loro e in più strati
Cellularità	Scarsa < 10 cellule / HPF	Bassa 10-20 cellule / HPF	Moderata 20-50 cellule / HPF	Elevata > 50 cellule / HPF
Preservazione cellulare	Scarsa < 25% cellule ben conservate	Moderata 25-50% cellule ben conservate	Buona > 50% cellule ben conservate	
Detriti necrotici	Assenti	Occasionali < 25% dei campi 100x	Frequenti 25-50% dei campi 100x	Abbondanti > 50% dei campi 100x
<b>Campione adeguato</b>	<b>No</b>	<b>Si</b>		

### **Analisi statistica**

L'accuratezza diagnostica è stata definita usando come termine di riferimento l'adeguatezza dei campioni citologici sulla base dei criteri sopradescritti e calcolata come la proporzione dei campionamenti adeguati rispetto al numero totale delle lesioni esaminate. Per studiare il possibile effetto di diversi fattori sull'accuratezza del campionamento citologico è stata condotta un'analisi logistica univariata, considerando l'accuratezza come variabile dipendente. I risultati sono stati espressi come Odds Ratio (OR) con intervallo di confidenza del 95% (95% CI).

I predittori considerati sono stati i seguenti: metodo di campionamento (CEUS o ECO2D); specie del soggetto portatore della lesione (cane o gatto); organo sede della lesione; grado d'esperienza dell'operatore che ha eseguito l'FNA ( $\geq 2$  anni o  $< 2$  anni); nell'ambito dei casi CEUS la presenza di

aree avascolari alla CEUS e di presunte tali nell'immagine 2D di riferimento visibile nella modalità *split screen*; dimensioni della lesione. Per valutare l'effetto di quest'ultima variabile, ovvero delle dimensioni della lesione, sull'accuratezza del campione citologico è stato calcolato il rapporto tra il volume della lesione ed il peso corporeo del soggetto; il volume è stato misurato con la seguente formula:  $\frac{4}{3} * 3,14 * r^3$  dove r rappresenta la media dei due diametri della lesione ottenuti dalla misurazione ecografica. Tra le variabili studiate nell'analisi univariata, quelle che hanno dimostrato avere un effetto maggiore sull'accuratezza, con valori di  $P \leq 0,25$  sono state successivamente inserite in un modello di analisi logistica multivariata.

Tutte le analisi sono state effettuate mediante un software commerciale dedicato<sup>5</sup>.

## RISULTATI

### **Popolazione di studio**

In accordo con i criteri di inclusione sono stati selezionati un totale di 82 soggetti, 43 per il gruppo CEUS (33 cani e 10 gatti) e 39 (23 cani e 16 gatti) per il gruppo ECO2D. I relativi dati segnaletici sono stati riassunti nella **Tabella 2**. Nell'ambito del gruppo CEUS, 5 soggetti presentavano un coinvolgimento di due organi. Nel gruppo ECO2D, invece, 3 dei soggetti inclusi avevano lesioni a carico di due organi diversi e 2 soggetti presentavano un interessamento di tre organi. Il totale delle lesioni incluse nello studio è stato pertanto di 48 nel gruppo CEUS e 46 nel gruppo ECO2D. In merito alla localizzazione anatomica delle lesioni, sono state incluse: 33 lesioni a sede epatica (rispettivamente 18 casi CEUS e 15 ECO2D); 14 a sede polmonare (10 CEUS, 4 ECO2D); 12 lesioni intestinali (9 CEUS, 3 ECO2D); 10 lesioni spleniche (3 CEUS, 7 ECO2D); 10 dei linfonodi addominali (3 CEUS, 7 ECO2D); 8 lesioni mediastiniche craniali (3 CEUS, 5 ECO2D) e 7 renali (2 CEUS, 5 ECO2D).

1 MedCalc, MedCalc Software, Ostend, Belgium

2 iU22 ultrasound system (Philips Healthcare, Monza, Italy); Epiq 5G ultrasound system (Philips Healthcare, Monza, Italy);

3 SonoVue® - Bracco, Milano

4 ShowCase software, Trillium Technology, Ann Arbor, MI

### **Rilievi CEUS ed ECO2D**

In base alla revisione dei filmati CEUS, 16/48 lesioni presentavano una distribuzione del mezzo di contrasto disomogenea al picco di enhancement con evidenza di aree avascolari in 24/48 casi (50%). Un comportamento vascolare con caratteri suggestivi di malignità è stato osservato in 30/48 lesioni (62,5%). In 20 di questi 30 casi è stato possibile ottenere un campione citologico adeguato ed una diagnosi citologica di neoplasia maligna, mentre in 6/30 ad un quadro CEUS di sospetta malignità corrispondeva un campione citologico inadeguato. Infine, in 4/30 casi nonostante i campioni citologici fossero adeguati è stata formulata una diagnosi citologica dubbia. I rilievi ecocontrastografici di ognuno dei casi appartenenti al gruppo CEUS sono stati sintetizzati nella **Tabella 3**.

Per ognuno dei soggetti inclusi nei due gruppi, tutti i rilievi ecografici bidimensionali sono stati invece riportati dettagliatamente nelle **Tablelle 4 e 5**, mentre il giudizio sull'adeguatezza del campione citologico per tutte le lesioni incluse nei due gruppi è stato sintetizzato nella **Tabella 6**. In base alla revisione delle immagini ecografiche bidimensionali, la distribuzione delle lesioni nel contesto dell'organo interessato era focale nel 67% dei casi e multifocale nel restante 33%. La forma delle lesioni riscontrata più frequentemente è stata quella rotondeggiante (68% delle lesioni). Le dimensioni medie (valore medio tra le dimensioni dell'asse maggiore e minore) delle lesioni variavano da un minimo di 1,2 cm ad un massimo di 9,5 cm nel gruppo CEUS e da un minimo di 1 cm ad un massimo di 15 cm nel gruppo ECO2D. Il 63,8% delle lesioni presentava un'ecostruttura disomogenea. Questo rilievo è stato riscontrato parimenti nel gruppo CEUS dove le lesioni ad ecostruttura disomogenea erano 30/48 (62,5%) e nel gruppo 2D dove sono state osservate 33/46 (71,7%) lesioni disomogenee. Nell'ambito del gruppo CEUS questa disomogeneità si è associata alla visualizzazione di aree avascolari intralesionali in 20/30 casi, mentre in 4 casi (2 lesioni polmonari e 2 epatiche) in cui all'ecografia bidimensionale l'ecostruttura era omogenea la CEUS ha poi dimostrato la presenza di aree avascolari **Figura 1**.

### **Revisione citologica**

In seguito alla valutazione dei preparati citologici secondo il protocollo di analisi sopradescritto, sono stati ottenuti campioni adeguati per la valutazione citologica nell'81,3% (39/48) dei casi nel gruppo CEUS e nell'87% (40/46) dei casi ECO2D. Tra i casi per i quali i due patologi hanno espresso un giudizio positivo di adeguatezza del campione è stato possibile formulare una diagnosi citologica in 23/39 casi nel gruppo CEUS ed in 38/40 nel gruppo ECO2D. Mentre in 4/39 casi ed in 3/40 casi

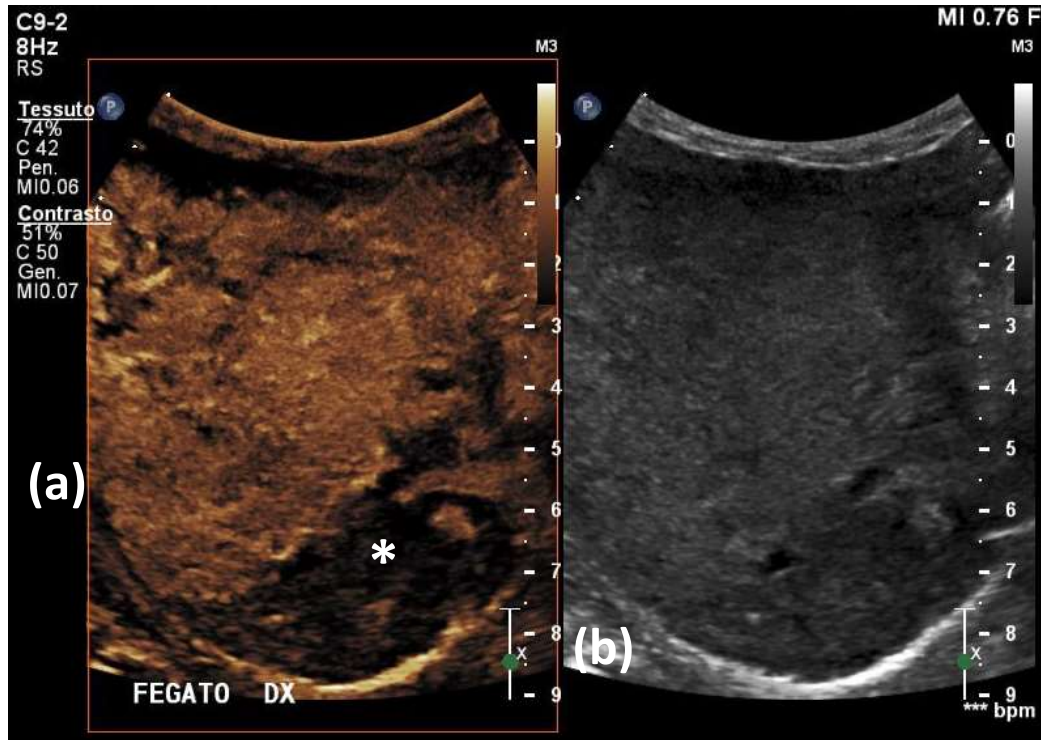
rispettivamente nel gruppo CEUS ed ECO2D, nonostante il campione citologico fosse adeguato l'interpretazione citologica era dubbia e non è stato possibile formulare con certezza un giudizio in merito alla natura maligna o benigna della lesione. Le diagnosi citologiche per entrambi i gruppi sono elencate nella **Tabella 7**, mentre nella **Tabella 8** sono indicate le diagnosi citologiche e la relativa pertinenza anatomica delle lesioni.

### **Analisi statistica**

In base ai risultati dell'analisi univariata non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di adeguatezza tra i campioni ottenuti con tecnica di campionamento CEUS-guidata ed ECO2D-guidata. Infatti, la prima è risultata accurata nell'81,3% (39/48) dei casi e la seconda nell'87% (40/46) dei casi. In merito alle altre variabili prese in considerazione, la pertinenza anatomica delle lesioni ha dimostrato avere un effetto significativo sull'accuratezza del campionamento citologico. In particolare l'accuratezza è risultata maggiore nel caso delle lesioni a sede epatica (pari al 91%), mentre i livelli di accuratezza più bassi sono stati registrati nel caso delle lesioni renali ed intestinali (rispettivamente pari al 57% ed al 58%). La specie, il volume della massa in relazione al peso corporeo del soggetto, né tantomeno il livello di esperienza dell'operatore che ha eseguito l'FNA hanno determinato un effetto statisticamente significativo sull'accuratezza. La presenza di zone avascolari alla CEUS nel contesto della lesione ha dimostrato un effetto negativo sull'adeguatezza, con livelli di accuratezza del campione citologico pari al 67% in presenza di aree avascolari ed all'85% in loro assenza **Tabella 9**.

I risultati relativi al modello di regressione logistica multivariata sono stati riportati nella **Tabella 10**. Come si evince da quanto descritto nella suddetta tabella, solo uno dei predittori inseriti nel modello, ovvero la localizzazione polmonare della lesione, ha dimostrato avere un'associazione indipendente con l'accuratezza.

**Figura 1.** Confronto tra ecostruttura di una massa epatica all'esame CEUS (a) ed ECO2D (b), immagine in modalità *split screen*. La massa presenta un'ecostruttura omogenea all'esame ecografico bidimensionale, mentre dopo somministrazione di mezzo di contrasto si osserva un'ampia area avascolare (\*). Archivio Ecografico Servizio Diagnostica per Immagini – Dipartimento d Scienze Mediche Veterinarie).



**Tabella 2.** Popolazione di studio: dati segnaletici dei pazienti inclusi nei due gruppi, CEUS ed ECO2D.

	Specie		Razza		Sesso	Età mediana (anni)	Peso mediano (Kg)
	Cane (n)	Gatto (n)	Razza pura (n)	Meticci (n)	M/F		
<b>CEUS</b>	33	10	18	25	23/20	11	14,3
<b>ECO2D</b>	23	16	15	24	20/19	11,5	8,9

**Tabella 3.** Rilievi ecocontrastografici ed adeguatezza del campione delle lesioni incluse nel gruppo CEUS. Mdc mezzo di contrasto; ipo ipoenhancement; iso isoenhancement; iper iperenhancement; na non applicabile.

Sede	N.	Distribuzione mdc omogenea/disomogenea			Enhancement al picco			Aree avascolari		Campione adeguato	
		wash in	picco	wash out	ipo	iso	iper	si	no	si	no
Fegato	18	10/8	13/5	10/8	4	8	6	8	10	16	2
Rene	2	1/1	1/1	1/1	2	0	0	2	0	1	1
Milza	3	2/1	3/0	3/0	2	1	0	1	2	3	0
Linfonodi addominali	3	3/3	3/3	3/3	na	na	na	1	2	3	0
Intestino	9	7/2	7/2	6/3	na	na	na	3	6	6	3
Mediastino craniale	3	1/2	2/1	1/2	na	na	na	1	2	3	0
Polmone	10	7/3	3/7	1/9	na	na	na	8	2	7	3



**Tabella 4.** Rilievi ecografici bidimensionali delle lesioni incluse nel gruppo CEUS.

Sede	No.	Forma		Ecostruttura		Ecogenicità			Distribuzione	
		rotondeggiante	ovalare	omogenea	disomogenea	ipoecogeno	isoecogeno	iperecogeno	focale	multifocale
Fegato	18	15	3	9	9	9	5	4	5	13
Rene	2	2	0	0	2	1	0	1	1	1
Milza	3	0	3	0	3	2	0	1	2	1
Linfonodi addominali	3	2	1	1	2	3	0	0	2	1
Intestino	9	6	3	5	4	9	0	0	9	0
Mediastino craniale	3	1	2	0	3	1	1	1	3	0
Polmone	10	7	3	3	7	7	0	3	9	1

**Tabella 5.** Rilievi ecografici bidimensionali delle lesioni incluse nel gruppo ECO2D.

Sede	No.	Forma		Ecostruttura		Ecogenicità			Distribuzione	
		rotondeggiante	ovalare	omogenea	disomogenea	ipoecogeno	isoecogeno	iperecogeno	focale	multifocale
Fegato	15	11	4	5	10	2	3	10	8	7
Rene	5	3	2	0	5	2	2	1	4	1
Milza	7	7	0	2	5	2	4	1	4	3
Linfonodi addominali	7	4	3	6	1	5	1	1	5	2
Intestino	3	2	1	1	2	1	2	0	3	0
Mediastino craniale	5	3	2	2	3	3	1	1	5	0
Polmone	4	1	3	2	2	3	0	1	3	1

**Tabella 6.** Numero di campioni citologici adeguati e non per ciascuno degli organi presi in considerazione: confronto tra gruppo CEUS ed ECO2D.  
Tot numero di lesioni totale per ciascun organo.

Sede	CEUS			ECO2D		
	Tot	Campione adeguato		Tot	Campione adeguato	
		Si	No		Si	No
Fegato	18	16	2	15	14	1
Rene	2	1	1	5	3	2
Milza	3	3	0	7	7	0
Linfonodi addominali	3	3	0	7	7	0
Intestino	9	6	3	3	1	2
Mediastino craniale	3	3	0	5	4	1
Polmone	10	7	3	4	4	0

**Tabella 7.** Elenco delle diagnosi citologiche formulate in seguito alla revisione dei campioni ottenuti con tecnica di FNA CEUS-guidata ed ECO2D-guidata.

<b>Diagnosi citologica</b>	<b>Gruppo CEUS</b>	<b>Gruppo ECO2D</b>
Linfoma	10	8
Carcinoma	7	7
Sarcoma istiocitario	3	2
Liposarcoma	1	0
Sarcoma	0	2
Neoplasia neuroendocrina	1	1
Mastocitoma	0	1
Timoma	0	1
Neoplasia a cellule rotonde (linfoma o sarcoma istiocitario)	1	0
Degenerazione epatocellulare	8	4
Ematopoiesi extramidollare	1	4
Flogosi piogranulomatosa	1	2
Flogosi neutrofilica	0	1
Iperplasia linfoide	1	1
Linfoadenite	0	1
Colestasi	0	1
Organo nella norma	0	2

**Tabella 8.** Diagnosi citologica e sede anatomica delle lesioni nei due gruppi.

		DIAGNOSI CITOLOGICA	SEDE ANATOMICA						TOT
		Fegato	Rene	Milza	Linfonodi addominali	Intestino	Mediastino craniale	Polmone	
GRUPPO CEUS	Linfoma	-	-	-	3	5	1	1	10
	Carcinoma	2	-	-	-	1	-	4	7
	Sarcoma istiocitario	1	-	1	-	-	1	-	3
	Liposarcoma	1	-	-	-	-	-	-	1
	Neoplasia neuroendocrina	1	-	-	-	-	-	-	1
	Neoplasia a cellule rotonde (linfoma o sarcoma istiocitario)	-	-	-	-	-	-	1	1
	Degenerazione epatocellulare	8	-	-	-	-	-	-	8
	Ematopoiesi extramidollare	-	-	1	-	-	-	-	1
	Flogosi piogranulomatosa	-	-	-	-	-	-	1	1
	Iperplasia linfoide	-	-	1	-	-	-	-	1
GRUPPO ECO2D	Linfoma	1	2	1	2	1	1	-	8
	Carcinoma	3	1	-	1	-	-	2	7
	Sarcoma istiocitario	-	-	1	-	-	-	1	2
	Sarcoma	-	-	-	1	-	1	-	2
	Neoplasia neuroendocrina	1	-	-	-	-	-	-	1
	Mastocitoma	-	-	-	1	-	-	-	1
	Timoma	-	-	-	-	-	1	-	1
	Degenerazione epatocellulare	4	-	-	-	-	-	-	4
	Ematopoiesi extramidollare	-	-	4	-	-	-	-	4
	Flogosi piogranulomatosa	1	-	-	-	-	-	1	2
	Flogosi neutrofilica	-	-	-	-	-	1	-	1
	Iperplasia linfoide	-	-	-	1	-	-	-	1
	Linfoadenite	-	-	-	1	-	-	-	1
	Colestasi	1	-	-	-	-	-	-	1
Organo nella norma	1	-	1	-	-	-	-	2	

**Tabella 9.** Analisi univariata: accuratezza dei campioni citologici sulla popolazione totale ed effetto della metodica di campionamento, della specie, delle caratteristiche della lesione e dell'esperienza dell'operatore sull'accuratezza del campione. Il livello di significatività è stato fissato per valori di  $P \leq 0,05$ . I risultati statisticamente significativi sono evidenziati in grassetto. Ne non elaborabile; na non applicabile.

		Totale	Non accurati	Accurati	Odds ratio	Valore P
		<i>n</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>intervallo confidenza 95%</i>	
<b>Metodo</b>	CEUS	48	9 (18,70%)	39 (81,30%)	1 (valore di riferimento)	0,45
	2D	46	6 (13,04%)	40 (86,96%)	1,54 (0,50-4,73)	
<b>Specie</b>						
<b>Specie</b>	cane	62	12 (19,30%)	50 (80,70%)	1 (valore di riferimento)	
	gatto	32	3 (9,40%)	29 (90,60%)	2,32 (0,60-8,91)	0,22
<b>Localizzazione</b>						
	rene	7	3 (42,90%)	4 (57,10%)	1 (valore di riferimento)	0,12
	fegato	33	3 (9,10%)	30 (90,90%)	7,49 (1,11-50,65)	<b>0,04</b>
	intestino	12	5 (41,70%)	7 (58,30%)	1,05 (0,16-6,92)	0,96
	mediastino craniale	8	1 (12,50%)	7 (87,50%)	5,25 (0,40-68,94)	0,21
	polmone	14	3 (21,40%)	11 (78,60%)	2,75 (0,38-19,67)	0,31
	linfonodi addominali	10	0	10	ne	
	milza	10	0	10	ne	
<b>Esperienza operatore</b>						
<b>Esperienza operatore</b>	> 2 anni	36	3 (8,30%)	33 (91,70%)	1 (valore di riferimento)	0,12
	≥ 2 anni	58	12 (20,70%)	46 (79,30%)	2,86 (0,75-10,98)	
<b>Aree avascolari CEUS</b>						
<b>Aree avascolari CEUS</b>	si	24	7 (29,20%)	17 (70,80%)	1 (valore di riferimento)	<b>0,08</b>
	no	24	2 (8,30%)	22 (91,70%)	4,53 (0,83-24,64)	
<b>Presunte aree avascolari 2D</b>						
<b>Presunte aree avascolari 2D</b>	si	9	3 (33,30%)	6 (66,70%)	1 (valore di riferimento)	0,23
	no	39	6 (15,40%)	33 (84,60%)	2,75 (0,53-14,12)	
<b>Vol massa/peso corporeo kg</b>						
<b>Vol massa/peso corporeo kg</b>			20,5 (±36,70)	33,20 (±56,70)	1,01 (0,99-1,02)	0,42

**Tabella 10.** Variabili indipendenti predittive di accuratezza del campione citologico secondo un modello multivariato di regressione logistica. Il polmone come sede di lesione è l'unica tra le variabili incluse che ha dimostrato significatività ( $P \leq 0,05$ ).

		Odds ratio corretta intervallo confidenza 95%	Valore P
<b>Organo</b>	rene	1 (valore di riferimento)	0,44
	fegato	2,88 (0,09-96,19)	0,35
	intestino	0,43 (0,01-22,59)	0,17
	polmone	1.20(0.04-38.54)	<b>0,01</b>
<b>Specie</b>			
<b>Specie</b>	cane	1 (valore di riferimento)	0,74
	gatto	1,39 (0,20-9,70)	
<b>Aree avascolari CEUS</b>			
<b>Aree avascolari CEUS</b>	si	1 (valore di riferimento)	0,21
	no	3,91 (0,47-32,5)	
<b>Presunte aree avascolari 2D</b>			
<b>Presunte aree avascolari 2D</b>	si	1 (valore di riferimento)	0,63
	no	1,72 (0,18-16,32)	

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il riscontro di masse addominali e toraciche all'esame clinico o durante altre procedure diagnostiche rappresenta una situazione piuttosto comune nella pratica clinica veterinaria dei piccoli animali. In alcuni casi, per ottenere una diagnosi definitiva è necessario ricorrere a procedure invasive e dispendiose come le biopsie laparotomiche. L'agoaspirazione (FNA) ottenuta con l'ausilio delle metodiche di diagnostica per immagini ed in particolare dell'ecografia è poco invasiva e raramente associata a complicanze (*Liffman R, 2017*). Tale metodica infatti, associata alla storia clinica ed ai rilievi laboratoristici rappresenta uno strumento indispensabile per ridurre la lista delle diagnosi differenziali e definire il trattamento e la prognosi del paziente. Numerosi sono i fattori che possono influire sull'accuratezza diagnostica dell'FNA, in primo luogo la sede della massa. In generale la possibilità di ottenere una diagnosi o informazioni clinicamente utili da campioni ottenuti con FNA è più bassa per lesioni a carico di organi interni che per lesioni superficiali a sede cutanea e sottocutanea (*Skeldon N, 2009*). Altre differenze in termini di adeguatezza del campione ottenuto possono dipendere dalla tecnica di esecuzione dell'FNA, dalla natura e dalle dimensioni della massa, dalla presenza di aree necrotiche o colliquate, dal livello di esperienza dell'operatore (*Cohen M, 2003; Bonfanti U, 2004; Ballegeer EA, 2007*). Nel presente studio è stato indagato l'effetto di tutte queste variabili sull'adeguatezza del campione citologico ottenuto mediante FNA.

Questo è inoltre il primo studio in cui è stato valutato l'impiego della guida CEUS per il campionamento citologico di masse addominali e toraciche nei piccoli animali, confrontandone l'utilità rispetto al campionamento citologico ECO2D-guidato.

Diversamente da quanto ipotizzato non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra la metodica CEUS e quella ECO2D in termini di probabilità di ottenere un campione citologico adeguato. Questi risultati sono in contrasto con quanto descritto in medicina umana, dove diversi lavori hanno dimostrato il valore aggiunto della CEUS rispetto all'ECO2D per le procedure di campionamento delle masse e la sua capacità di implementare l'accuratezza diagnostica delle biopsie ecoguidate fino al 100% nel caso di masse epatiche (*Sparchez Z, 2011<sup>b</sup>*). Questa discrepanza con i nostri risultati può essere imputata alla diversa metodologia di campionamento ed al diverso disegno di studio. Mentre nel nostro studio è stato eseguito il campionamento citologico delle lesioni con ago sottile e tecnica di ago-infissione, nei lavori di medicina umana è stata indagata l'utilità della guida CEUS abbinata all'esecuzione di biopsie delle masse con aghi Trucut o sistemi semi-automatici (*Wei W, 2015; Sparchez Z, 2012; Cao BS, 2011; Sparchez Z, 2011<sup>b</sup>; De Marchi A, 2010; Mitterberger M, 2007; Sartori S, 2004*). La selezione dei casi in tutti questi lavori inoltre,

prevedeva l'inclusione di pazienti con masse di pertinenza di un solo organo; diversamente nel nostro lavoro sono stati selezionati cani e gatti con masse di varia pertinenza anatomica ed in proporzione la numerosità delle lesioni era diversa se consideriamo i diversi organi studiati. Per queste ragioni una comparazione diretta con i dati pubblicati in medicina umana risulta piuttosto limitata.

In merito alla sede anatomica della lesione, il fegato è l'organo che ha dimostrato i livelli di adeguatezza del campionamento citologico più elevati. In ambito veterinario l'accuratezza e l'utilità clinica della citologia epatica variano molto in funzione dell'eziologia. In uno studio pubblicato nel 2013 da *Bahr et al.* in cui è stata valutata l'accuratezza dell'FNA in corso di lesioni epatiche focali, i livelli di accuratezza più alti sono stati riscontrati nel caso di patologie neoplastiche e quadri degenerativi vacuolari. Coerentemente con questi rilievi, nella nostra casistica le lesioni epatiche dalle quali sono stati ottenuti campioni adeguati comprendevano prevalentemente quadri di degenerazione epatocellulare e neoplasie maligne. In secondo luogo, in termini di frequenza, le lesioni a sede epatica sono state le più rappresentate nella nostra casistica (rispettivamente 18 nel gruppo CEUS e 15 nel gruppo ECO2D). Anche nel caso delle lesioni polmonari il numero di campioni citologici adeguati è risultato elevato e laddove è stato possibile formulare una diagnosi citologica il reperto è stato quasi sempre compatibile con neoplasia maligna (6/10 casi CEUS e 3/4 ECO2D), in accordo con quanto descritto in letteratura veterinaria (*DeBerry JD, 2002; Wood EF, 1998*). Inoltre, è interessante notare che il polmone come sede anatomica della lesione è stato l'unica variabile indipendente a dimostrare significatività nel modello multivariato. Il rene e l'intestino sono gli organi che hanno dimostrato avere l'effetto minore sulla probabilità di ottenere un campione citologico adeguato (OR rispettivamente pari a 1 ed 1,05). Nel caso delle lesioni renali i risultati del presente studio sono discrepanti rispetto a due recenti lavori scientifici in cui è stata indagata l'utilità diagnostica dell'FNA renale nel cane e nel gatto, in base ai quali il successo diagnostico dell'FNA renale era pari a circa il 70% (*McAloney CA, 2017; McAloney CA, 2018*). Tuttavia, diversamente dal nostro studio, in entrambi questi lavori sono stati inclusi campioni citologici ottenuti sia da lesioni focali sia da alterazioni diffuse del parenchima renale. La diversa selezione dei casi può dunque spiegare la discrepanza tra i risultati. Inoltre, il gruppo di lesioni renali del nostro studio era piuttosto esiguo. Per quanto riguarda le masse a sede intestinale, il fatto che potessero produrre un numero di campioni adeguati ed inadeguati simile era un dato atteso. Infatti, in due precedenti studi in cui è stata indagata l'accuratezza diagnostica dell'FNA ECO2D-guidato delle neoplasie del tratto gastroenterico sono stati riscontrati intervalli di sensibilità della metodica molto ampi, rispettivamente



variabili dal 33% al 66% nell'uno e dal 44 al 71% nell'altro studio (*Cohen M, 2003; Bonfanti U, 2006*). Un intervallo così ampio di valori è stato giustificato dagli autori dal fatto che entrambi gli studi includevano neoplasie intestinali di diversa origine con una diversa tendenza ad esfoliare: maggiore nel caso di neoplasie a cellule rotonde ed epiteliali, minore nel caso di tumori stromali. Nell'ambito della nostra casistica erano presenti 12 masse intestinali e solo da 7 di queste sono stati ottenuti campioni citologici adeguati ai quali poi, in accordo con la letteratura, sono corrisposte le diagnosi citologiche di linfoma (n 5) e carcinoma (n 2). È plausibile dunque ipotizzare che i restanti 5 casi in cui il campionamento è risultato inadeguato fossero per l'appunto neoplasie di origine stromale o in alternativa forme infiammatorie croniche con eventuale presenza di una componente fibrotica e conseguente scarso grado di esfoliazione cellulare.

Nel caso degli FNA ottenuti da milza e linfonodi addominali tutti i campioni sono risultati adeguati per l'analisi citologica. Poiché l'accuratezza dell'FNA in questo studio è stata espressa come OR, cioè come associazione positiva e negativa dell'adeguatezza del campione rispetto all'organo, non è stato possibile applicare un simile test statistico per valutare l'associazione causa-effetto tra l'adeguatezza del campione e i due organi in questione in mancanza di campioni inadeguati. Stando all'attuale bibliografia non sembra esserci un consenso in merito all'accuratezza dell'FNA della milza in medicina veterinaria: alcuni lavori descrivono una bassa accuratezza, altri una buona concordanza tra esame citologico ed istologico della milza (*Watson AT, 2011; Ballegeer EA, 2007; O'Keefe DA, 1987*). La letteratura veterinaria è carente invece riguardo all'accuratezza diagnostica dell'FNA di linfonodi addominali. In una recente *review* sull'FNA dei diversi organi addominali gli autori descrivono sulla base della loro esperienza una maggiore percentuale di campioni non diagnostici provenienti dai linfonodi addominali rispetto a quelli ottenuti dai linfonodi superficiali (*Liffman R, 2017*).

In merito all'effetto dell'esperienza dell'operatore sull'adeguatezza del campione citologico, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra la categoria di operatori più esperti e meno esperti. In letteratura veterinaria non esistono studi specifici volti ad indagare il ruolo dell'esperienza dell'operatore sull'accuratezza del campionamento citologico ecoguidato di masse intra-addominali e toraciche e pertanto è stata presa a riferimento la letteratura umana, anch'essa non particolarmente esaustiva sull'argomento. In uno studio in cui sono state valutate le *performance* di due gruppi di operatori con diverso livello d'esperienza nell'esecuzione di biopsie epatiche non è stata riscontrata alcuna differenza ai fini della diagnosi istologica. È possibile che negli ultimi anni la curva di apprendimento degli operatori sia diventata più rapida, anche grazie

all'avanzamento tecnologico delle strumentazioni ecografiche ed alla fruibilità di sistemi di guida dell'ago per le sonde ecografiche. Si tratta nello specifico di dispositivi muniti di una doccia per l'inserimento dell'ago che applicati alla sonda ecografica permettono una collimazione ottimale dell'ago con il fascio di ultrasuoni durante le procedure biotiche. Questi sistemi di guida costituiscono una valida alternativa all'esecuzione dell'FNA ecoguidato con tecnica "a mano libera" nei casi in cui l'approccio dell'organo bersaglio sia tecnicamente complesso. Nel nostro studio inoltre, tutti gli operatori che hanno eseguito gli FNA, provenivano da un *background* simile e lavoravano presso la stessa struttura ricevendo quindi lo stesso tipo di addestramento. La nostra ipotesi è dunque che questi aspetti possano aver compensato il minor livello d'esperienza.

Né le dimensioni relative delle masse tantomeno la specie hanno influito in maniera significativa sull'adeguatezza dell'FNA. A tal proposito è probabile che gli stessi criteri di inclusione dei casi abbiano giocato un ruolo importante. Sono state infatti incluse nella casistica esclusivamente lesioni di dimensioni superiori ad 1 cm, chiaramente visibili all'esame ecografico e tecnicamente accessibili per il campionamento ECOD o CEUS-guidato.

Un rilievo interessante emerso dall'analisi statistica univariata riguarda l'effetto negativo della presenza di aree avascolari nel contesto delle masse. Le aree avascolari sono zone della massa che all'esame CEUS non manifestano enhancement e sono dunque ascrivibili a tessuto non vitale come nel caso di necrosi, emorragia o colliquazione (*Grossjohan HS, 2006*). Nonostante fossero state visualizzate all'esame CEUS e di conseguenza evitate durante l'FNA la loro presenza ha comunque ridotto l'adeguatezza diagnostica del campione. Il fatto che la CEUS sia stata eseguita prima e non simultaneamente all'esecuzione dell'FNA può essere una spiegazione, perché è possibile che l'ago sia stato inserito al limite tra il tessuto perfuso e la zona avascolare o che la zona avascolare non sia stata opportunamente evitata durante il campionamento successivo alla CEUS. Tuttavia nel 71% dei casi in cui sono state identificate aree avascolari alla CEUS sono stati ottenuti campioni citologici adeguati, dunque l'abilità della CEUS di identificare zone intralesionali non perfuse è indubbiamente un importante vantaggio della metodica di campionamento CEUS-guidata rispetto a quella ECO2D. Questo studio presenta alcuni limiti che è bene sottolineare. Innanzitutto il disegno retrospettivo può aver influito sulla selezione dei casi ed in particolare il fatto che il numero di casi esaminati per ciascun organo fosse diverso tra i due gruppi può aver influenzato il confronto tra la metodica CEUS e quella ECO2D. Allo stesso modo il fatto che numericamente i campioni citologici ottenuti dai diversi organi non fossero omogenei (in particolare il numero di lesioni epatiche analizzate è stato sostanzialmente maggiore rispetto a quello delle lesioni a carico di tutti gli altri organi) può aver

condizionato i risultati. Un altro limite è stato l'utilizzo di due strumenti ecografici diversi durante il periodo preso in considerazione. Il miglioramento tecnologico può aver consentito un incremento della qualità dell'immagine ecografica e CEUS che può aver influito sulla visualizzazione delle lesioni ed eventualmente delle aree avascolari. Infine, la non disponibilità di una diagnosi definitiva costituisce un ulteriore limite.

In conclusione questo è il primo studio che ha messo a confronto la guida CEUS e quella ECO2D per l'esecuzione dell'FNA di masse intraddominali e toraciche nel cane e nel gatto. Entrambe le metodiche si sono dimostrate efficaci nell'ottenimento di campioni adeguati per la valutazione citologica, senza alcuna significativa differenza statistica. Tra gli altri predittori di adeguatezza del campione citologico, l'organo sede di lesione ha avuto un effetto determinante con la probabilità di adeguatezza citologica più elevata nel caso del fegato. Come ipotizzato la presenza di aree avascolari di tessuto non vitale nel contesto della massa influisce negativamente sull'adeguatezza dell'FNA, pertanto in presenza di masse di dimensioni cospicue e di sospetta natura maligna l'esecuzione di una CEUS pilota prima della procedura di campionamento è sempre consigliabile. Ulteriori studi prospettici sono necessari per definire l'accuratezza diagnostica della metodica CEUS-guidata, confrontandone le performance con l'ECO2D in presenza di gruppi di casi numericamente omogenei.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Ballegeer EA, Forrest LJ, Dickinson RM et al. (2007).** Correlation of ultrasonographic appearance of lesions and cytologic and histologic diagnoses in splenic aspirates from dogs and cats: 32 cases (2002-2005). *Journal of American Veterinary Medical Association*; 230: 690-696.

**Bahr LK, Sharkey LC, Murakami T et al. (2013).** Accuracy of US-Guided FNA of focal liver lesions in dogs: 140 cases (2005–2008). *Journal of American Animal Hospital Association*; 49: 190-196.

**Bonfanti U, Bertazzolo W, Bottero E, et al. (2006).** Diagnostic value of cytologic examination of gastrointestinal tract tumors in dogs and cats: 83 cases (2001–2004). *Journal of American Veterinary Medical Association*; 229:1130-1133.

**Bonfanti U, Bussadori C, Zatelli A et al. (2004).** Percutaneous fine-needle biopsy of deep thoracic and abdominal masses in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*; 45: 191-198.

**Cao BS, Wu JH, Li XL et al. (2011).** Sonographically guided transthoracic biopsy of peripheral lung and mediastinal lesions – Role of contrast-enhanced sonography. *Journal of Ultrasound in Medicine*; 30: 1470-1490.

**Cohen M, Bohling MW, Wright JC, et al. (2003).** Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases (1999–2000). *Journal of American Veterinary Medical Association*; 222: 964-967.

**DeBerry JD, Norris CR, Samii VF et al. (2002).** Correlation between fine-needle aspiration cytopathology and histopathology of the lung in dogs and cats. *Journal of American Medical Hospital Association*; 38: 327-336.

**De Marchi A, Brach del Prever EM, Linari A et al. (2010).** Accuracy of core-needle biopsy after contrast-enhanced ultrasound in soft-tissue tumours. *European Radiology*; 20: 2740-2748.

**Grossjohan HS, Bachmann NM (2006).** Ultrasound contrast agents may help in avoiding necrotic areas at biopsy. *Ultraschall in der Medizin*; 27: 2-3.

**Hylton RG, Freeman L, Rohleder JJ, Snyder PW (2010).** Feasibility of contrast-enhanced ultrasound-guided biopsy of sentinel lymph nodes in dogs. *Journal of Veterinary Radiology and Ultrasound*; 51: 628-633.

**Lievem JH, De Rycked VM, Henrji J (1999).** Ultrasound-guided tissue-core biopsy of liver, spleen and kidney in normal dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 40: 294-299.

**Liffman R, Courtman N (2017).** Fine needle aspiration of abdominal organs: a review of current recommendations for achieving a diagnostic sample. *Journal of Small Animal Practice*; 58: 599-609.

**Linta N, Baron Toaldo M, Bettini G et al. (2017).** The feasibility of contrast enhanced ultrasonography (CEUS) in the diagnosis of non-cardiac thoracic disorders of dogs and cats. *BMC Veterinary Research*; 13: 141-151.

**Mattoon JS, Pollard R, Wills T, T Nyland TG (2015).** Ultrasound-guided aspiration and biopsy procedures. In Nyland TG, Mattoon JS, *Small animal diagnostic ultrasound*. St. Luis, Missouri: Elsevier Saunders, 50-77.

**McAlloney CA, Sharkey CL, Feeney DA et al. (2017).** Diagnostic utility of renal fine-needle aspirate cytology and ultrasound in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*; 20: 544-553.

**McAlloney CA, Sharkey CL, Feeney DA et al. (2018).** Evaluation of the diagnostic utility of cytologic examination of renal fine-needle aspirates from dogs and the use of ultrasonographic features to inform cytologic diagnosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*; 252: 1247-1256.

**Mitterberger M, Horninger W, Pelzer A et al. (2007).** A prospective randomized trial comparing contrast-enhanced targeted versus systematic ultrasound guided biopsies: impact on prostate cancer detection. *The Prostate*; 67: 1537-1542.

**O'Keefe DA, Couto CG, (1987).** Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 1: 102-109.

**Roth L (2001).** Comparison of liver cytology and biopsy diagnosis in dogs and cats: 56 cases. *Veterinary Clinical Pathology*; 30: 35-38.

**Sartori S, Nielsen I, Trevisani L et al. (2004).** Contrast-enhanced sonography as guidance for transthoracic biopsy of a peripheral lung lesion with large necrotic areas. *Journal of Ultrasound in Medicine*; 23: 133-136.

**Skeldon N, Dewhurst E (2009).** The perceived and actual diagnostic utility of veterinary cytological samples. *Journal of Small Animal Practice*; 50: 180-185.

**Solbiati L, Ierace T, Tonolini M, Cova L (2004).** Guidance and monitoring of radiofrequency liver tumor ablation with contrast-enhanced ultrasound. *European Journal of Radiology*; 51: 19-23.

<sup>a</sup> **Sparchez Z, Radu P, Zaharia T et al. (2011).** Usefulness of contrast enhanced ultrasound guidance in percutaneous biopsies of liver tumor. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*; 20: 191-196.

<sup>b</sup> **Sparchez Z, Radu P, Zaharia T et al. (2011).** Role of contrast enhanced ultrasound (CEUS) in percutaneous biopsy of liver tumors. *Journal of Hepatology*; 52: 234.

**Sparchez Z, Radu P, Kacsò G et al. (2012).** Contrast-enhanced ultrasound guided biopsy of superficial toraco-abdominal and neck lesions. Initial experience in 20 patients. *Medical Ultrasonography*; 14: 288-293.

**Watson AT, Penninck D, Knoll JS et al. (2011).** Safety and correlation of test results of combined ultrasound-guided fine needle aspiration and needle core biopsy of the canine spleen. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 52: 317-322.

**Wei Y, Yu X, Liang P et al. (2015).** Guiding and controlling percutaneous pancreas biopsies with contrast-enhanced ultrasound: target lesions are not localized on B-mode ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*; 41: 1561-1569.

**Wood EF, O'Brien RT, Yung KM (1998).** Ultrasound-guided fine-needle aspiration of focal parenchymal lesions of the lung in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 12: 338-342.

**Wu W, Chen M, Yin S et al. (2006).** The role of contrast-enhanced sonography of focal liver lesions before percutaneous biopsy. *American Journal of Radiology*; 187: 752-761.

**Yoon SH, Ho Lee K, Kim SY et al. (2010).** Real-time contrast-enhanced ultrasound-guided biopsy of focal hepatic lesions not localized on B-mode ultrasound. *European Radiology*; 20: 2047-2056.

## CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state studiate due applicazioni dell'imaging ecografico in ambito oncologico dei piccoli animali.

Nel primo studio è stato indagato il significato clinico del rilievo ecografico HCP della milza nel gatto, con l'obiettivo di correlarlo ad una diagnosi patologica e determinarne il PPV per il linfoma splenico. Sulla base del nostro studio, l'HCP non è risultato essere predittivo di linfoma splenico; questo rilievo si può infatti associare anche a disordini linfoproliferativi benigni, a forme reattive ed a processi infiammatori acuti. Si raccomanda sempre l'impiego di sonde lineari ad alta frequenza per l'esame ecografico della milza nel gatto, perché favorisce la visualizzazione dell'HCP e delle alterazioni lievi dell'ecostruttura splenica.

Nel secondo studio sono state confrontate le tecniche CEUS ed ECO2D per l'FNA di masse addominali e toraciche e l'effetto di alcuni parametri predittori di adeguatezza del campione citologico. Le metodiche CEUS ed ECO2D si sono dimostrate ugualmente efficaci ai fini del campionamento citologico. Tra gli altri predittori di adeguatezza del campione, la sede anatomica della lesione e la presenza di aree avascolari intralesionali hanno influito in maniera determinante sull'FNA. In presenza di aree avascolari la probabilità di ottenere un prelievo citologico adeguato si riduce notevolmente, per questo motivo a fronte di masse di dimensioni cospicue e di sospetta natura maligna l'esecuzione di una CEUS pilota prima della procedura di campionamento è sempre consigliabile.