

## Analisi *in vitro* del comportamento di un eco-contrasto di seconda generazione diluito in soluzione fisiologica

Alfredo GODDI - Raffaele NOVARIO\*\*  
Fabio TANZI\*\* - Riccardo DI LIBERTO\*  
Paolo NUCCI\*

**Scopo.** Studiare le caratteristiche di risposta di un mezzo di contrasto di seconda generazione diluito in soluzione fisiologica a varie concentrazioni, per diverse condizioni di insonazione, temperatura e pH.

**Materiale e metodi.** Per valutare il comportamento dell'eco-contrasto in diverse condizioni di concentrazione, di temperatura, di pH e di insonazione sono stati pianificati alcuni test utilizzando come fantocci dei palloncini in latex. I fantocci, riempiti con una miscela contenente soluzione di cloruro di sodio 0,9% e una sospensione di microbolle di esafioruro di zolfo stabilizzato con fosfolipidi (SonoVue®), sono stati sottoposti ad ecografia utilizzando la tecnica dell'imaging armonico a bassa pressione acustica.

Sulle immagini ecografiche è stato calcolato il valore medio del livello di grigio e la sua deviazione standard; i dati ottenuti sono stati utilizzati per costruire delle curve di ecogenicità del mezzo di contrasto nelle diverse condizioni valutate.

**Risultati.** Dai test effettuati risulta che l'eco-contrasto mantiene un'adeguata ecogenicità anche diluito in soluzione fisiologica a concentrazioni estremamente basse, dell'ordine dello 0,15%. Il grado di ecogenicità alle diverse concentrazioni rimane accettabile per il tempo medio di esecuzione di un'indagine ecografica. Tali caratteristiche non sono influenzate dalla tecnica di insonazione del fantoccio contenente la miscela eco-contrasto/NaCl.

Il pH della soluzione fisiologica non influenza la sopravvivenza delle microbolle. Il fattore temperatura risulta significativo quando vengono superati i 33-37°C; tale condizione favorisce la rottura delle microbolle con conseguente progressiva riduzione dell'ecogenicità dopo 10-15' sino all'annullamento quasi completo dopo 30'.

L'attenuazione del segnale US determinata dalle microbolle al variare della diluizione dell'eco-contrasto non ha un andamento lineare. In condizioni di bassa amplificazione degli echi l'attenuazione è significativamente maggiore alla concentrazione dello 0,6% rispetto alle concentrazioni dello 0,2% e 0,4%. Per ognuna delle tre concentrazioni sottoposte al test, ma in modo particolare per le concentrazioni dello 0,2%-0,4%, è stato osservato un inaspettato incremento della trasmissione in profondità del segnale US rispetto alla soluzione fisiologica pura.

**Conclusioni.** I risultati di questa sperimentazione evidenziano che un mezzo di contrasto di seconda generazione può essere utilizzato anche a basse concentrazioni se diluito in soluzione fisiologica. Ciò apre la porta a nuove prospettive diagnostiche per l'utilizzo dell'imaging armonico con eco-contrasto; in particolare se ne può proporre l'impiego a livello degli organi cavi e negli studi funzionali. I risultati *in vitro* dovranno essere confermati dalle applicazioni cliniche che sono in fase di analisi e sperimentazione.

PAROLE CHIAVE: Ecografia - Ultrasuoni - Mezzi di contrasto - Stabilità - SonoVue®.

## *In vitro analysis of ultrasound second generation contrast agent diluted in saline solution*

**Purpose.** To evaluate the changes in response of a second-generation sonographic contrast agent diluted in saline solution at different concentrations when different scanning techniques, and saline solution temperatures and pH were used.

**Materials and methods.** A series of tests was devised to analyse the behaviour of the sonographic contrast agent at different concentrations, temperatures, pH and scanning techniques. Latex balloons were used as phantoms. These were filled with 0.9% Sodium Chloride solution mixed with a suspension of sulphur hexafluoride microbubbles stabilised with phospholipids (SonoVue®) and scanned with the harmonic imaging technique at low acoustic pressure.

For each image obtained, we calculated the mean grey-scale level values and the standard deviations of grey-scale level were calculated within a ROI on the US images obtained; the resulting data were used to create echogenicity curves of UCA the echo-enhancer over time at the different conditions tested.

**Results.** We noted that SonoVue® maintains adequate backscatter properties even at low concentration (0.15%) in N/S solution. The amount of echogenicity can be considered adequate for the average duration of an ultrasound examination. These properties are not affected by the scanning technique used on the phantom containing the UCA contrast agent/NaCl solution.

The pH of the saline solution does not affect the survival of the microbubbles. Temperature becomes a significant value beyond 33-37°C; this condition favours rupture of the microbubbles with subsequent reduction of the echogenicity after 10-15 min, and complete disappearance after 30 min.

US beam attenuation related to the concentration of the microbubbles in the saline solution volume has a non-linear behaviour; at low amplification levels, attenuation becomes more significant when using SonoVue® concentrations higher than 0.4%.

Unexpected greater improvement in US beam transmission was experienced for each of the three SonoVue® concentrations tested, and especially for 0.2% and 0.4%, compared to saline solution alone.

**Conclusions.** Our results show that a second-generation contrast agent may be used even diluted at low concentration in saline solution. This characteristic opens up new diagnostic perspectives possibilities for the use of contrast-enhanced harmonic imaging; in particular, its can be suggested used in hollow organs and functional studies. These *in vitro* results require by confirmation by clinical applications which are under evaluation and experimentation.

KEY WORDS: Ultrasound - Contrast agents - Stability - SonoVue®.

SME - Diagnostica per Immagini - Varese - \*Servizio di Fisica Sanitaria a - Policlinico S. Matteo - Pavia - \*\*Servizio di Fisica Sanitaria - Azienda Ospedale di Circolo - Varese.

Pervenuto alla Redazione il 5.5.2003; revisionato il 30.7.2003; restituito corretto il 30.9.2003; accettato per la pubblicazione il 24.11.2003.

Indirizzo per la richiesta di estratti: Dott. A. Goddi - SME-Diagnostica per Immagini - Via Pirandello, 31 - 21100 Varese VA - Tel. 0332/224145 - Fax 0332/210420. E-mail: goddi.alfredo@libero.it

## Introduzione

I mezzi di contrasto ecografici di seconda generazione hanno completato il loro sviluppo solo recentemente; allo stato attuale in Italia viene commercializzato unicamente l'eco-contrasto denominato SonoVue® (Bracco, MI, Italy).

Alcune delle proprietà e delle caratteristiche dei mezzi di contrasto di seconda generazione sono note dalla letteratura [1], altre non sono ancora state rese note o indagate. Riteniamo che una miglior conoscenza del comportamento delle microbolle di eco-contrasto possa fornire utili informazioni sulle modalità d'uso e su eventuali altre future applicazioni in campo diagnostico. Scopo del nostro studio è stato pertanto valutare *in vitro* le caratteristiche di ecogenicità di un mezzo di contrasto di seconda generazione quando utilizzato a basse concentrazioni, previa diluizione con soluzione fisiologica. Sono state inoltre indagate le caratteristiche di attenuazione del fascio US determinate dall'eco-contrasto ad elevata diluizione e le proprietà di sopravvivenza delle microbolle di eco-contrasto in diverse condizioni fisiche e chimiche, variando la temperatura e il pH della miscela eco-contrasto/soluzione fisiologica.

## Materiale e metodi

Per analizzare il comportamento del mezzo di contrasto sono stati realizzati degli appositi fantocci utilizzando dei palloncini in latex, materiale elastico a basso coefficiente di attenuazione per gli ultrasuoni. L'estremità prossimale del palloncino è stata fissata ad un tubo di connessione dotato di estremità prossimale e distale luer-lock, per consentire il riempimento mediante siringhe o comuni deflussori per soluzione salina (fig. 1).

Il mezzo di contrasto utilizzato per lo studio è un ecoriflettore di seconda generazione appartenente alla famiglia dei perfluorinati, costituito da esafloruro di zolfo sotto forma di microbolle stabilizzate con fosfolipidi (SonoVue® - Bracco, MI, Italy). Questi tipi di microbolle sono in grado di entrare in risonanza e modificare il proprio volume senza rompersi, quando vengono insonate con impulsi ultrasonori a bassa pressione acustica. Grazie a questa proprietà le microbolle emettono segnali eco di frequenza armonica rispetto a quella insonante, in grado di essere ricevuti da apparecchiature dotate di adeguati software per l'imaging armonico.

L'apparecchio ecografico utilizzato (Sequoia 512 ImageGate; Acuson-Siemens Group, CA, USA) era fornito di software per l'imaging armonico in grado di visualizzare le microbolle in real-time grazie alla tecnologia «Coherent Contrast Imaging» (CCI).

Tenendo conto del picco di frequenza di risonanza delle microbolle di SonoVue®, è stato utilizzato un trasduttore convex multifrequenza con larghezza di banda 1-4 MHz, insonando le bolle a 1,56 MHz (armonica in ricezione: 3 MHz). Il controllo della potenza di emissione del segnale ultrasonoro è stato regolato in modo da minimizzare la possibile rottura delle microbolle, riducendo la pressione acustica a valori corrispondenti ad un indice meccanico di 0,17.

Le immagini ed i video-clip così ottenuti sono stati archiviati su supporto magneto-ottico rispettivamente in formato DICOM 3.0 e in formato proprietario. Un software dedicato (ViewProNet, Acuson-Siemens Group, CA, USA), ha per-

## Introduction

*Second-generation ultrasound contrast agents (UCAs) have only recently been developed and the only contrast agent currently marketed in Italy is SonoVue® (Bracco, MI, Italy).*

*Some of the properties and characteristics of second-generation contrast agents have been described in the literature [1], whereas others have not yet been publicised or investigated. A better knowledge of the behaviour of contrast agent microbubbles can provide useful information on their use and possible future applications in diagnostic imaging. The purpose of our study was to investigate in vitro the echogenicity characteristics of a second-generation contrast agent used at low concentrations, after dilution in with saline solution. In addition, we investigated the attenuation features of the highly-diluted contrast agent and the persistence survival properties of the contrast-agent microbubbles under different physical and chemical conditions, by varying the temperature and pH of the mixture of contrast agent and saline solution.*

## Materials and methods

*To analyse the behaviour of the US contrast agent we created special phantoms with using latex balloons. Latex is an elastic material with a low US attenuation coefficient. The proximal end of the balloon was fixed to a connection tube with proximal and distal luer-lock to allow filling by syringe or through infusion line for saline solution (fig. 1).*

*The contrast agent used in the study was a second-generation echo-reflector of the perfluorinate family, based on sulphur hexafluoride microbubbles stabilised with phospholipids (SonoVue® - Bracco, MI, Italy). This type of microbubble can resonate and change their volume without bursting when insonated at low acoustic pressure. Thanks to this property, the microbubbles produce harmonic signals in response to the insonation signal; these harmonic signals that can be received by US units with adequate software for harmonic imaging.*

*The US unit used in this study (Sequoia 512 ImageGate; Acuson-Siemens Group, CA, USA) is equipped by with harmonic imaging software capable of visualising the microbubbles in real time thanks to "Coherent Contrast Imaging" (CCI) technology.*

*Considering the resonance frequency peak of the SonoVue® microbubbles, a convex multifrequency transducer with a 1-4 MHz bandwidth was used to insonate the bubbles at 1.56 MHz (harmonic reception: 3 MHz). The ultrasound emission power was adjusted to minimise the risk of possible microbubble rupture by reducing acoustic pressure to values corresponding to a mechanical index of 0.17.*

*The images and video clips obtained were stored on magneto-optical disks in DICOM 3.0 and proprietary format, respectively. With a dedicated software programme (ViewProNet, Acuson-Siemens Group, CA, USA) these were subsequently converted into standard non-medical formats to allow the use of graphic editors suitable for the study of image analysis.*

messo la loro conversione in formati non medicali standard per consentire l'utilizzo di pacchetti grafici particolarmente adatti allo studio delle caratteristiche delle immagini.

Allo scopo di estrarre dalle immagini i parametri più significativi sono state appositamente scritte delle macroistruzioni utilizzando il linguaggio Image Pro Plus® BASIC (IPBASIC®, Media Cybernetics, USA). Le macroistruzioni consentono di definire una regione di interesse su ciascuna immagine per ricavare il valore medio del livello di grigio e la sua deviazione standard; il primo dato è stato utilizzato come indice dell'aumento di ecogenicità a seguito dell'introduzione del mezzo di contrasto e il secondo dato come indice della distribuzione più o meno omogenea della sostanza nel fantoccio. Tenendo conto che i livelli di grigio ottenuti dipendono anche dalla regolazione dell'ecografo, in tutte le acquisizioni sono stati mantenuti costanti i parametri di controllo.

Il test n. 1 era mirato all'identificazione della minima concentrazione di mezzo di contrasto necessaria per ottenere un'immagine ecografica della miscela eco-contrasto/soluzione fisiologica con caratteristiche di ecogenicità adeguate per uso diagnostico. Il test è servito inoltre a verificare l'omogeneità della miscela stessa.

Per valutare l'effetto della concentrazione del mezzo di contrasto sull'ecogenicità della soluzione sono state preparate tre serie di nove fantocci contenenti 250 ml di soluzione salina 0,9% addizionata con SonoVue® a diverse concentrazioni; ogni serie comprendeva la medesima distribuzione di concentrazioni di mezzo di contrasto in un range compreso tra 0,5% e 0,1%.

Ogni fantoccio è stato sottoposto ad ecografia con imaging armonico a bassa pressione acustica, comunemente indicata come «a basso indice meccanico» o «Low MI», secondo i parametri di regolazione qui indicati: profondità campo di vista (FOV): mm 80; lunghezza focale (FL) - doppia focalizzazione: mm 40-70; frame rate (FR): 21 Hz; range dinamico (DR): 67 dB; potenza (Pow) -21 dB; indice meccanico (MI) 0,17; guadagno (Gain): -15 dB. Le rispettive immagini ecografiche sono state memorizzate su supporto magnetico per la successiva analisi. Sulle immagini memorizzate è stato calcolato il valore medio del livello di grigio all'interno di una ROI quadrata di dimensioni fisse, posizionata costantemente alla medesima profondità; i dati numerici ottenuti sono stati comparati ad uno standard di riferimento contenuto in un fantoccio usualmente impiegato per i controlli di qualità delle apparecchiature. In particolare quale riferimento è stato utilizzato il valore medio del livello di grigio di un inserto iperecogeno contenuto nel fantoccio Gammex RMI 403 GS (Gammex, Middleton, WI, USA). Il fantoccio Gammex riproduce le caratteristiche di ecogenicità di un tessuto parenchimale (coefficiente d'attenuazione  $0,5 \pm 0,05$  dB/cm/MHz) e contiene numerosi tipi di inserti simulanti dei noduli cistici o solidi; tre degli inserti «solidi» sono caratterizzati da contrasto rispetto al fondo rispettivamente pari a +12 dB, +6 dB, -6 dB (dati forniti dal costruttore e certificati per un range di frequenze comprese tra 1 e 20 MHz) (fig. 2). In particolare si è fatto riferimento all'inserto a maggior ecogenicità caratterizzato da un contrasto di +12 dB rispetto al fondo. Le immagini del fantoccio sono state ottenute in seconda armonica nativa (Frequenza armonica 4MHz; DR 67 dB; Pow 0 dB; MI 1,6; Gain 2 dB) utilizzando un algoritmo (Tissue Equalization Technology) che analizza l'eco in frequenza prima della formazione dell'immagine, differen-



Fig. 1. — Palloncino in latex utilizzato come fantoccio per l'esecuzione dei test. Il palloncino è connesso ad un tubo dotato di raccordo per siringhe o deflussori per soluzione salina.

*Latex balloon used as a phantom to perform the echo-enhancer tests. The balloon is connected to an i.v. tube allowing filling by syringe or through infusion line for saline solution.*

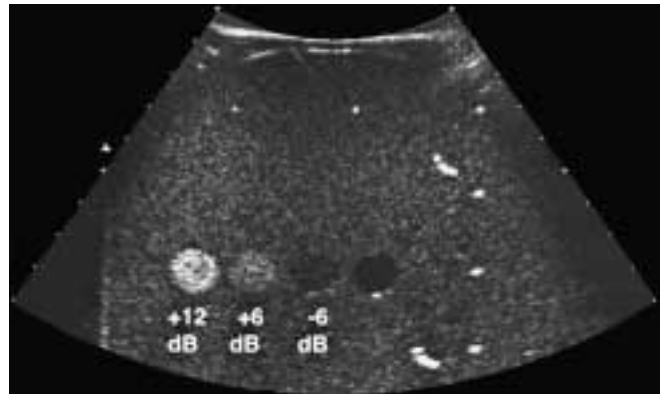


Fig. 2. — Immagine ecografica del fantoccio Gammex RMI 403 GS che riproduce le caratteristiche di ecogenicità di un tessuto parenchimale e contiene alcuni inserti simulanti dei noduli cistici o solidi; tre degli inserti «solidi» sono caratterizzati da contrasto pari a +12 dB, +6 dB, -6 dB rispetto al fondo (dati forniti dal costruttore e certificati per un range di frequenze comprese tra 1 e 20 MHz).

*US image of the Gammex RMI 403 GS phantom reproducing the echogenicity characteristics of a parenchyma and containing targets simulating cystic or solid nodes; three of the solid targets have a contrast gradient of +12 dB, +6 dB, -6 dB respectively compared to the background (data provided by the manufacturer and certified for a range of frequencies between 1 to 20 MHz).*

*To extract the most significant parameters from the images, a series of macroinstructions were written in Image Pro Plus® BASIC language (IPBASIC®, Media Cybernetics, USA). These allow a region of interest (ROI) to be defined on each image so as to obtain the mean grey-scale values and standard deviations. The first value is used as an index for the increase in echogenicity following introduction of the contrast agent, the second is an index for the more or less homogeneous distribution of the substance in the phantom. Since the grey-scale levels obtained also depend on the US unit settings, the same settings were maintained for all of the acquisitions.*

*Test no. 1 was aimed at identifying the minimum concentration of contrast agent required to obtain an image of the*

ziando il segnale proveniente dai tessuti rispetto al segnale proveniente dal non-tessuto (a titolo di esempio: rumore, artefatti, riflessi speculari), per ottimizzare l'immagine ai fini di una maggior qualità e miglior riproducibilità.

La variazione di ecogenicità della miscela SonoVue®/soluzione fisiologica alle diverse concentrazioni è stata utilizzata per costruire la curva di ecogenicità relativa del mezzo di contrasto in funzione della concentrazione.

Il test n. 2 è stato pianificato partendo dal presupposto che la perdita di energia del segnale eco conseguente al fenomeno della diffusione generato da un'elevata concentrazione di microbolle impedisce la valutazione del campo profondo. Allo scopo di identificare il punto di equilibrio tra un'adeguata ecogenicità della soluzione e il mascheramento del campo profondo si è cercato di stabilire in modo indiretto l'entità dell'attenuazione al variare della diluizione di SonoVue®. Sono state pertanto misurate le variazioni di ecogenicità di un fantoccio Gammex posizionato posteriormente ai fantocci in latex contenenti eco-contrasto a diverse concentrazioni.

Per l'esecuzione del test sono state preliminarmente ottenute delle immagini ecografiche in seconda armonica del fantoccio Gammex RMI 403 GS, a tre diversi livelli di amplificazione degli echi, tali da evitare fenomeni di saturazione del segnale (CCI; FOV mm 130; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0,17; Gain: -15 dB/-10 dB/-5 dB), interponendo un fantoccio in latex contenente 250 ml di soluzione fisiologica pura tra la sonda e la superficie del fantoccio Gammex. Quale riferimento sono state misurate l'ecogenicità del fondo pseudoparenchimale del fantoccio e quella dell'inserito iperecogeno dotato di gradiente di contrasto +12 dB rispetto al fondo. Completata la prima fase, sono state acquisite le immagini ecografiche del fantoccio Gammex, nelle medesime condizioni di regolazione sopradescritte, interponendo dei fantocci contenenti SonoVue® a bassa concentrazione: 0,2%, 0,4% e 0,6% (rispettivamente 0,5 ml, 1 ml e 1,5 ml in 250 ml di NaCl). Per evitare errori di misura dell'attenuazione, la distanza tra la sonda e i reperi contenuti nel fantoccio Gammex è stata mantenuta rigorosamente costante per tutti i test fissando il trasduttore con un'apposita pinza (fig. 3).

Sono state misurate l'ecogenicità del fondo pseudoparenchimale del fantoccio Gammex e dell'inserito iperecogeno dotato di gradiente di contrasto +12 dB rispetto al fondo, calcolando il valore medio del livello di grigio di una ROI quadrata inscritta nell'inserito iperecogeno e di una ROI di analoghe dimensioni selezionata alla medesima profondità nella componente pseudoparenchimale. I valori medi dei livelli di grigio rilevati interponendo il fantoccio senza eco-contrasto e i tre fantocci con diverse concentrazioni di SonoVue® sono stati confrontati per ognuno dei tre livelli di amplificazione utilizzati.

Il test n. 3 è stato dedicato alla misurazione delle proprietà di durata delle microbolle quando sottoposte ad un fascio US a bassa pressione acustica in uno spazio confinato. Basandosi sui risultati dei test n. 1 e 2, i fantocci utilizzati per il test n. 3 sono stati riempiti con 250 ml di soluzione fisiologica alla temperatura di 23°C aggiungendola di SonoVue® sino a raggiungere la concentrazione dello 0,2%; le due sostanze sono state miscelate mediante agitazione manuale del fantoccio.

I fantocci contenenti la miscela sono stati sottoposti al fascio US per 30 minuti consecutivi (CCI, FOV mm 130; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0,17; Gain: -15 dB); le relative immagini necessarie per la suc-

*mixture of contrast agent and saline solution having adequate echogenicity for diagnostic use. The test was also used to check homogeneity of the mixture itself.*

*To evaluate the effect of the concentration of the contrast agent on the echogenicity of the solution, three series of nine phantoms containing 250 ml of 0.9% saline solution mixed with SonoVue® at different concentrations were prepared. For each series the distribution of contrast agent concentrations, ranging from 0.5 to 0.1%, were the same.*

*Each phantom was subjected to harmonic imaging with low acoustic pressure, commonly referred to as Low Mechanical Index (or Low MI), with the following settings: field of view (FOV): 80 mm; focal length (FL) – double focus: 40-70 mm; frame rate (FR): 21 Hz; dynamic range (DR): 67 dB; power (Pow) -21 dB; mechanical index (MI) 0.17; gain: -15 dB. The US images were stored on magneto-optical disks for analysis. The mean grey-scale value was calculated on the images within a square fixed-size ROI constantly positioned at the same depth; the numerical data obtained were compared with a reference standard contained in a phantom normally used for quality control. More specifically, as a reference we used the mean grey-scale value of a hyperechoic target contained in a Gammex RMI 403 GS phantom (Gammex, Middleton, WI, USA). The Gammex phantom mimics the echogenicity of a parenchyma (attenuation coefficient  $0.5 \pm 0.05$  dB/cm/MHz) and contains several targets simulating cystic or solid nodes. Three of the "solid" targets are characterised by a contrast gradients of +12 dB, +6 dB, -6 dB, respectively, compared to the background (data provided by the manufacturer and certified for a frequency range between 1 and 20 MHz) (fig. 2). In particular, we took into account the most echogenic target, with a contrast of +12 dB compared to the background. Images of the phantom were obtained with native second harmonic (Harmonic Frequency 4 Mhz; DR 67 dB; Pow 0 dB; MI 1.6; Gain 2 dB) using an algorithm (Tissue Equalization Technology) that analyses the radio-frequency echo data before image formation, differentiating the signal coming from the tissues from non-tissue signals (for example: noise, artefacts, specular reflections), to obtain better image quality and reproducibility.*

*The variations in echogenicity of the SonoVue® and saline mixture at different concentrations was used to create an echogenicity curve for the contrast agent based on concentration.*

*Test no. 2 was based on the assumption that the loss of echo energy resulting from the scatter generated by a high concentration of microbubbles prevented evaluation of the deep field. In order to find the balance between adequate echogenicity of the solution and masking of the deep field, we tried to indirectly establish the extent of attenuation at different dilutions of SonoVue®. Thus we measured the variations in echogenicity of a Gammex phantom placed behind the latex phantoms containing different concentrations of echo-enhancer.*

*Before the test, we obtained second harmonic images of the Gammex RMI 403 GS phantom at three different levels of echo amplification that would avoid signal saturation (CCI; FOV 130 mm, FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0.17; Gain: -15 dB/-10 dB/-5 dB) by placing a latex phantom with 250 ml pure saline solution*



Fig. 3. — Fantoccio Gammex RMI 403 GS insonato interponendo al di sotto della sonda un palloncino in latex contenente 250 ml di soluzione fisiologica pura oppure addizionata di SonoVue® a varie concentrazioni. La distanza tra sonda e reperi contenuti nel fantoccio Gammex è stata mantenuta rigorosamente costante durante tutti i test fissando il trasduttore con un'apposita pinza.

*Gammex RMI 403 GS phantom insonated after inserting a latex balloon filled with 250 ml pure saline or saline mixed with SonoVue® at different concentrations under the probe. The distance between the probe and the targets in the Gammex phantom was maintained constant in all tests by fixing the transducer with a special blocking device.*

cessiva analisi del livello medio di grigio sono state memorizzate al tempo 0 ed a 5, 10, 20 e 30 minuti.

Ipotizzando che nell'ambito di un volume discreto il numero di microbolle soggette a rottura possa essere correlato con la tecnica di scansione, il test è stato eseguito seguendo due diverse modalità: nella prima (test n. 3A) il trasduttore è stato tenuto in posizione fissa; nella seconda (test n. 3B) il trasduttore è stato fatto oscillare lungo l'asse di elevazione per tutta la durata dell'esposizione.

Dopo aver calcolato il valore medio del livello di grigio e la deviazione standard sono state costruite le rispettive curve di decadimento indotto alla temperatura ambiente di 23°C.

Il test n. 4, mirato ad individuare gli eventuali effetti della temperatura della soluzione fisiologica sulla rottura spontanea delle microbolle, è stato condotto confrontando l'ecogenicità di cinque fantocci contenenti soluzione fisiologica (250 ml) addizionata di SonoVue® (concentrazione 0,2%) alle temperature di 23°, 27°, 30°, 33° e 37°C. Le immagini ecografiche in seconda armonica (CCI; FOV mm 130; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0,17, Gain: -15 dB) sono state ottenute al tempo 0 ed a 5, 10, 20 e 30 minuti immergendo i fantocci in una speciale vasca termostata (Teuco-Guzzini Group SpA, MC, Italy) appositamente costruita per mantenere costante la temperatura per almeno 30 minuti (fig. 4). L'analisi dell'ecogenicità delle soluzioni alle cinque diverse temperature ha permesso di costruire e confrontare le curve di sopravvivenza delle microbolle.



Fig. 4. — Vasca termostata appositamente costruita da Teuco-Guzzini Group SpA, per mantenere costante per almeno 30' la temperatura dei fantocci immersi in acqua durante i test di durata delle microbolle alle diverse temperature.

*A specially designed thermal basin made by Teuco-Guzzini Group SpA, (MC, Italy) was used to maintain the phantoms at a steady temperature for at least 30 minutes during the microbubble survival tests at different temperatures.*

*between the probe and the surface of the Gammex phantom. As a reference, we measured the echogenicity of the pseudo-parenchymal background of the phantom and that of the hyperechogenic target with a +12 dB contrast gradient. After completing the first phase, we obtained images of the Gammex phantom at the settings described above, interposing phantoms containing low-concentration SonoVue®: 0.2%, 0.4%, and 0.6% (0.5 ml, 1 ml and 1.5 ml in 250 ml NaCl, respectively). To avoid errors, the same distance between the probe and the targets in the Gammex phantom was maintained for all tests by fixing the transducer with a special device (fig. 3).*

*The echogenicity of the pseudo-parenchymal background of the Gammex phantom and of the hyperechogenic target with a +12 dB contrast gradient were measured by calculating the mean grey-scale value of a square ROI inscribed in the hyperechogenic target and of a same size ROI selected at the same depth in the pseudo-parenchymal component. The mean grey-scale values determined by interposing the phantom without the echo-enhancer and the three phantoms with different concentrations of SonoVue® were compared for each of the three amplification levels used.*

*Test no. 3 consisted in measuring the persistence of the microbubbles subjected to a low acoustic pressure US beam in a limited area. On the basis of the results of tests no. 1 and no. 2, the phantoms used for test no. 3 were filled with 250 ml saline solution at 23°C mixed with SonoVue® up to a concentration of 0.2%. The two substances were mixed by manual shaking of the phantom.*

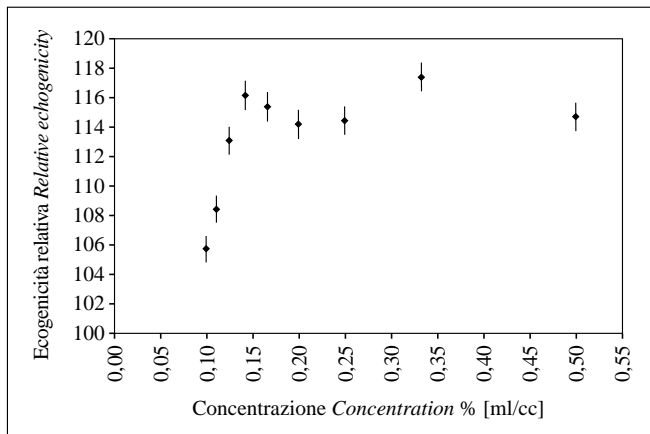


Fig. 5. — Grafico relativo all'ecogenicità di SonoVue® diluito in soluzione fisiologica a differenti concentrazioni. I valori di ecogenicità rilevati sono espressi in percentuale rispetto all'ecogenicità dell'inserto iperecogeno del fantoccio Gammex RMI 403 GS. I punti delle curve rappresentano il valore medio dei livelli di grigio nelle immagini ecografiche ottenute insonando i palloncini contenenti la miscela eco-contrasto/NaCl. La deviazione standard rappresenta l'omogeneità della miscela. *Echogenicity curve for different concentrations of SonoVue® in saline solution compared to echogenicity of the target in the Gammex RMI 403 GS phantom. Dots represent the mean value gray-scale level on the US images obtained by the balloons containing the mixture of echo-enhancer and NaCl. Standard deviation represents homogeneity of solution.*

Il test n. 5 è stato progettato per valutare gli effetti del pH della soluzione fisiologica sulla sopravvivenza delle microbolle di eco-contrasto e conseguentemente sull'ecogenicità della miscela. A tale scopo sono stati preparati quattro fantocci contenenti 250 ml di soluzione fisiologica addizionandola alternativamente con acido cloridrico o soda caustica per ottenere una scala di valori di pH (rispettivamente pH 4,5; 6; 7 e 8). Dopo aver verificato il valore di pH delle rispettive soluzioni con un piaccametro digitale, sono stati iniettati 0,5 ml di SonoVue® in ognuno dei fantocci (concentrazione 0,2%); la miscela è stata omogeneizzata mediante agitazione manuale. I fantocci sono stati sottoposti al fascio US (CCI; FOV mm 130; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0,17, Gain: -15 dB) ad intervalli di 5', ottenendo le immagini ecografiche al tempo 0 e ogni 5' fino al quarantesimo minuto. Sulle immagini memorizzate è stato successivamente analizzato il grado di ecogenicità della miscela per confrontare le rispettive curve di decadimento spontaneo nel tempo.

## Risultati

Il test n. 1 ha dimostrato che SonoVue® può essere diluito sino a concentrazioni dello 0,15% prima che si manifesti una significativa variazione dell'ecogenicità rispetto alle concentrazioni maggiori; per concentrazioni inferiori allo 0,15% si verifica una rapida caduta della curva di ecogenicità della miscela SonoVue®/NaCl (fig. 5).

L'analisi della deviazione standard dei singoli valori medi dell'ecogenicità nelle tre serie di fantocci esaminati ha dimostrato che la disomogeneità della miscela non si modifica al variare della concentrazione del mezzo di contrasto.

Il test n. 2 ha dimostrato che in condizioni di bassa ampli-

The phantoms containing the mixture were insonated for 30 consecutive minutes (CCI, FOV 130 mm; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0.17; Gain: -15 dB); the images required for the subsequent analysis of the mean grey-scale value were stored at 0, 5, 10, 20 and 30 minutes.

Hypothesising that, within a discrete volume, the number of microbubbles undergoing rupture may depend upon the scanning technique, the test was performed using two methods: in the first (test no. 3A), the transducer was locked in one position; whereas in the second (test no. 3B), the transducer was made to oscillate along the elevation axis for all the duration of the exposure.

After calculating the mean grey-scale value and standard deviation, the curves of decay induced by a room temperature of 23°C were created.

Test no. 4 was aimed at identifying the possible effects of the temperature of saline solution on the spontaneous rupture of the microbubbles. The test was performed by comparing the echogenicity of five phantoms containing saline solution (250 ml) with SonoVue® (0.2% concentration) at 23°, 27°, 30°, 33° and 37°C. Second harmonic ultrasound images (CCI; FOV 130 ml; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0.17; Gain: -15 dB) were obtained at 0, 5, 10, 20 and 30 minutes, keeping the phantoms immersed in a thermal basin (Teuco-Guzzini Group SpA, MC, Italy) specially designed to maintain a constant temperature for at least 30 minutes (fig. 4). The analysis of the echogenicity of the solution at the five different temperatures enabled the creation and comparison of the survival curves of the microbubbles.

Test no. 5 evaluated the effects of the saline solution's pH on the survival of the microbubbles and consequently on the echogenicity of the mixture. For that purpose, four phantoms filled with 250 ml saline solution were prepared, adding alternatively hydrochloric acid or sodium hydroxide to obtain a scale of pH values (pH 4.5, 6.7 and 8 respectively). After checking the pH values of the solutions with a digital pH meter, 0.5 ml SonoVue® was injected into each phantom (0.2% concentration) and the mixture homogenized by manual shaking. The phantoms were insonated (CCI; FOV 130 mm; FL: 70-130; FR: 21 Hz; DR: 67 dB; Pow -21 dB; MI 0.17; Gain: -15 dB) at 5-minute intervals, obtaining images at time 0 and every 5 minutes up to the fortieth minute. The echogenicity level of the mixture was subsequently analysed on the images to compare the spontaneous decay curves over time for each pH value.

## Results

Test no. 1 demonstrated that SonoVue® can be diluted up to 0.15% concentrations before any significant variation in echogenicity occurs compared to higher concentrations. For concentrations lower than 0.15%, a rapid drop in the echogenicity curve of the SonoVue®/NaCl mixture was observed (fig. 5).

Analysis of the standard deviation of the single mean echogenicity values in the three series of phantom demonstrated that non-homogeneity of the mixture does not change when the concentration of contrast agent is varied.

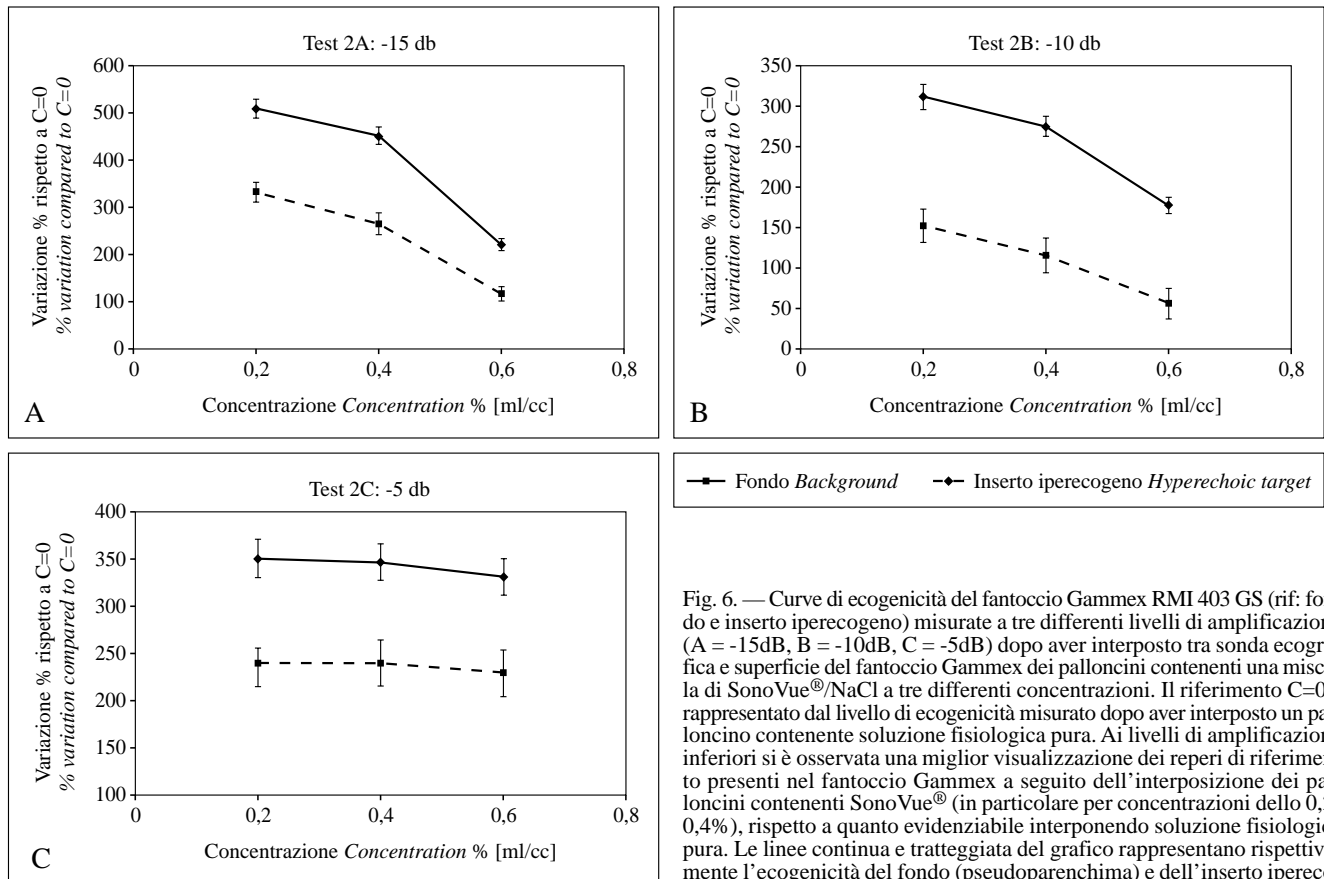


Fig. 6. — Curve di ecogenicità del fantoccio Gammex RMI 403 GS (rif: fondo e inserto iperecogeno) misurate a tre differenti livelli di amplificazione (A = -15dB, B = -10dB, C = -5dB) dopo aver interposto tra sonda ecografica e superficie del fantoccio Gammex dei palloncini contenenti una miscela di SonoVue®/NaCl a tre differenti concentrazioni. Il riferimento C=0 è rappresentato dal livello di ecogenicità misurato dopo aver interposto un palloncino contenente soluzione fisiologica pura. Ai livelli di amplificazione inferiori si è osservata una miglior visualizzazione dei reperi di riferimento presenti nel fantoccio Gammex a seguito dell'interposizione dei palloncini contenenti SonoVue® (in particolare per concentrazioni dello 0,2-0,4%), rispetto a quanto evidenziabile interponendo soluzione fisiologica pura. Le linee continua e tratteggiata del grafico rappresentano rispettivamente l'ecogenicità del fondo (pseudoparenchima) e dell'inserto iperecogeno del fantoccio Gammex.

Echogenicity curves of the Gammex RMI 403 GS phantom (ref: background and hyperechoic target) measured at three different levels of amplification (A = -15dB, B = -10dB, C = -5dB) after placing latex balloons containing three different concentrations of SonoVue®/NaCl mixture between the probe and the Gammex phantom surface. Reference C=0 is the echogenicity level measured after interpositioning of a balloon containing pure saline solution. At the lowest amplification levels Gammex phantom targets were better visualized after interposing the balloons containing SonoVue® (especially at concentrations of 0.2 and 0.4%), compared to saline solution alone. Continuous and dashed lines represent background (pseudo-parenchymal) and hyperechoic target echogenicity, respectively.

ficazione degli echi (-10 dB e -15 dB) l'attenuazione del segnale US creata dalle microbolle alla concentrazione dello 0,6% è significativamente maggiore rispetto a quella osservata alle concentrazioni dello 0,2% e 0,4%; livelli di amplificazione di -5 dB compensano l'attenuazione determinata dalle microbolle alla maggiore concentrazione testata.

Inaspettatamente l'interposizione dei fantocci contenenti mezzo di contrasto ha permesso una visualizzazione dei reperi del fantoccio Gammex migliore rispetto all'interposizione del fantoccio contenente esclusivamente soluzione fisiologica (figg. 6A-C).

Il test n. 3 ha dimostrato che l'ecogenicità di una miscela SonoVue®/NaCl allo 0,2%, insonata alla temperatura di 23°C, rimane costante per circa 20 minuti se il fascio US intercetta una porzione limitata del volume di microbolle (tecnica di scansione fissa) e per circa 15 minuti se si scansiona l'intero volume della miscela (tecnica di scansione oscillante) (figg. 7A, B). In entrambi i casi l'ecogenicità della miscela resta comunque di entità adeguata per l'intera durata del test.

Le due curve di decremento temporale dell'ecogenicità della miscela SonoVue®/NaCl sono indice della concentra-

Test no. 2 demonstrated that under condition of low echo amplification (-10 dB and -15 dB), attenuation of the US signal caused by the microbubbles at a 0.6% concentration is significantly higher than that observed at concentrations of 0.2% and 0.4%; levels of amplification of -5 dB compensate for the attenuation caused by the microbubbles at the highest concentration tested.

Unexpectedly, interposition of the phantoms with contrast agent allowed better visualization of the targets on the Gammex phantom than did interposition of the phantom filled with saline solution alone (fig. 6A-C).

Test no. 3 demonstrated that the echogenicity of a SonoVue®/NaCl mixture at 0.2%, insonated at 23°C, remains constant for about 20 minutes if the US beam intercepts a small portion of the volume of microbubbles (fixed scanning technique) and for about 15 minutes if the entire volume is scanned (oscillating scanning technique) (fig. 7A, B). In both cases, however, echogenicity of the mixture remains adequate for the entire duration of the test.

The two decay curves of the echogenicity of the SonoVue®/NaCl solution indicate the residual concentra-

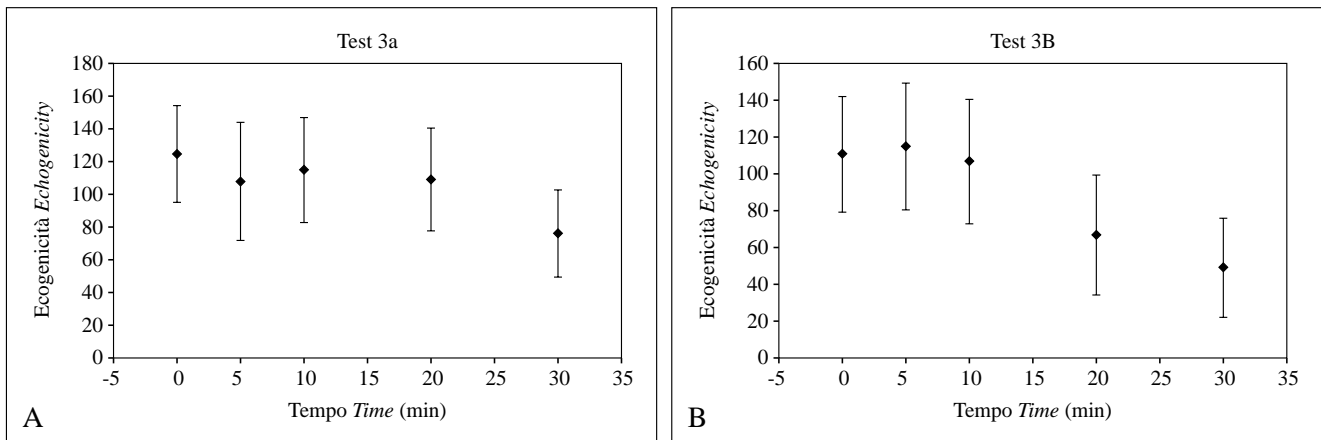


Fig. 7. — Grafico relativo all'ecogenicità di due miscele di SonoVue<sup>®</sup>/NaCl insonata per 30' utilizzando differenti tecniche di scansione: A) trasduttore fisso, B) trasduttore oscillante. I due grafici mostrano che l'ecogenicità resta costante per circa 20' se il fascio US insona un piccolo volume di microbolle. Al contrario, insonando l'intero volume l'ecogenicità si riduce in modo significativo dopo 20'.

*Echogenicity curves of two SonoVue<sup>®</sup>/NaCl solutions exposed to ultrasound beam for 30 min using different scanning techniques: A) fixed transducer, B) oscillating transducer. These two graphs show that echogenicity remains constant for about 20 min if the US beam scans a small volume of microbubbles. On the contrary, if the entire volume is scanned, echogenicity is greatly reduced after 20 min.*

zione residua del mezzo di contrasto, a sua volta correlata con il numero di microbolle sopravvissute alla pressione acustica del fascio US.

Il test n. 4 ha valutato il fenomeno della rottura spontanea delle microbolle a diverse temperature. L'ecogenicità della miscela si mantiene relativamente costante per tutta la durata del test alle temperature di 23°-27°C e per circa 20' alla temperatura di 30°C. A 33° e 37°C si è osservata una progressiva riduzione dell'ecogenicità a partire da 10-15', con annullamento quasi completo dopo 30' (fig. 8).

Il test n. 5 ha documentato valori di ecogenicità relativamente costanti per le miscele SonoVue<sup>®</sup>/NaCl a differenti pH, valutate per circa 40' minuti dall'inizio del test. Solo oltre tale limite si è osservata una riduzione di ecogenicità conseguente a rottura delle microbolle nelle soluzioni con pH acido (fig. 9).

## Discussione

La seconda generazione di eco-contrastanti è costituita da perfluorinati, gas inerti a bassa solubilità, stabilizzati mediante incapsulamento con sostanze organiche [2]. Le microbolle di perfluorinato hanno la proprietà di entrare in risonanza, senza rompersi, quando vengono insonate a specifiche frequenze e con basse potenze del fascio US [3]. Gli impulsi US a bassa pressione acustica (comunemente, anche se impropriamente, indicati come "a basso indice meccanico") determinano infatti un'oscillazione del guscio delle microbolle correlata con i fenomeni di compressione ed espansione del gas contenuto nella microbolla. Questo comportamento elastico, durante la fase di espansione della microbolla corrispondente all'onda di pressione acustica negativa, genera un segnale eco distorto contenente anche frequenze più alte della frequenza insonante [4-6]. Utilizzando differenti tecniche di elaborazione (imaging armonico, pulse inversion, phase inversion) si possono ottenere segnali che rappresentano solo le informazioni relative alle frequenze maggiori, armoniche della frequenza fondamentale. Dato che alle basse pressioni

tion of the echo-enhancer, which is in turn related to the number of microbubbles surviving the acoustic pressure of the US beam.

Test no. 4 evaluated spontaneous rupture of the microbubbles at different temperatures. Echogenicity of the mixture remains constant throughout the test at 23°-27°C and for about 20 min at 30°C. At 33°C and 37°C echogenicity started to decrease at 10-15 min and progressively fell until it almost completely disappeared after 30 min (fig. 8).

Test no. 5 demonstrated relatively constant echogenicity values for SonoVue<sup>®</sup>/NaCl solutions at different pH levels evaluated for about 40 min from the beginning of the test. Only after that time was a reduction in echogenicity due to the microbubbles breaking in acid solutions observed (fig. 9).

## Discussion

Second-generation ultrasound contrast agents consist of perfluorinated, low-solubility inert gasses, stabilised by encapsulation with organic substances [2]. When insonated at specific frequencies and low US beam power, perfluorinated microbubbles become resonant without breaking [3]. Low acoustic pressure US pulses (commonly, though incorrectly, referred to as "low mechanical index" pulses) cause oscillation of the microbubble shells as a result of compression and expansion of the gas contained in the microbubble. During the expansion phase, which corresponds to the wave of negative acoustic pressure, this elastic behaviour generates a distorted echo containing frequencies even higher than sonication frequencies [4-6]. Using different processing techniques (harmonic imaging, pulse inversion, phase inversion), signals can be obtained that represent only the data for the higher frequencies, the harmonics of the fundamental frequency. Because at the low acoustic pressures applied to cause microbubble oscillation, the harmonic signal generated by stationary tissues

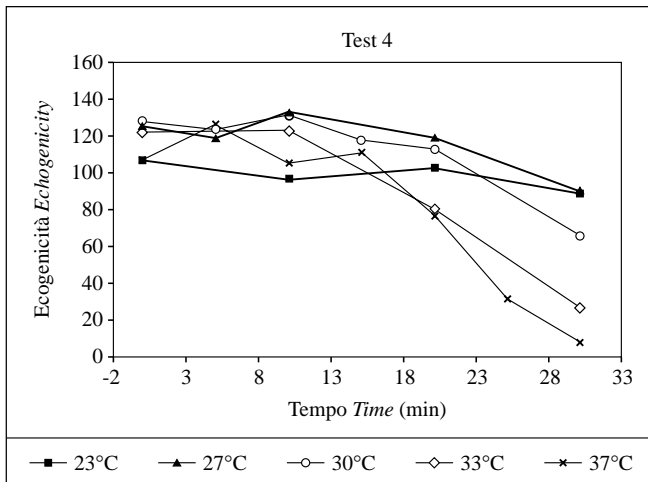


Fig. 8. — Curve di ecogenicità di SonoVue®/NaCl misurate per 30' a diverse temperature. L'ecogenicità rimane pressoché costante a 23° e 27°C. A 33° e 37°C l'ecogenicità decade in modo significativo dopo circa 10-15'. Il fenomeno è probabilmente conseguente alla rottura delle bolle dovuta all'aumento di pressione esercitato dal gas sul guscio delle bolle. A 30°C l'ecogenicità resta costante fino a 20' e successivamente decresce in modo progressivo.

*Echogenicity curves of SonoVue®/NaCl solutions at various temperatures over a 30 min period. Echogenicity remains fairly constant at 23° and 27°C. At 33°C and 37°C echogenicity drops significantly after about 10-15 min. This is probably related to the bubbles bursting due as a result of increased pressure exerted by the gas on the bubble shell. At 30°C echogenicity remains fairly constant up to 20 min and then progressively decreases.*

acustiche applicate per ottenere l'oscillazione delle microbolle, il segnale armonico generato dai tessuti stazionari ha intensità molto bassa, tale da non essere documentabile anche con le amplificazioni del segnale relativamente elevate utilizzate per rilevare il segnale del contrasto, si può considerare che gli echi ricevuti siano prevalentemente di pertinenza delle microbolle. Questo crea una sorta di cancellazione di tutto ciò che non corrisponde all'eco-contrasto, rendendo possibile la visualizzazione delle microbolle con un elevato rapporto segnale/rumore [6]. È ovviamente necessario che l'apparecchiatura ecografica utilizzata sia predisposta per elaborare gli echi di frequenza armonica e per consentire la regolazione fine della potenza di emissione del fascio US.

Il primo mezzo di contrasto di seconda generazione attualmente disponibile in commercio in Italia è SonoVue® (Bracco SpA, MI, Italy), costituito da esafluoruro di zolfo sotto forma di microbolle stabilizzate con fosfolipidi.

Al di là delle informazioni sul prodotto ad oggi fornite dalla ditta produttrice, non si conoscevano ancora in modo completo le caratteristiche di comportamento delle microbolle di SonoVue® nelle diverse condizioni di diluizione e di insonazione, nonché al variare di alcune condizioni fisiche e chimiche quali la temperatura e il pH della soluzione fisiologica eventualmente utilizzata per diluire l'eco-contrasto. Obiettivo dello studio è stato pertanto analizzare le variazioni dell'immagine ecografica delle microbolle nelle diverse condizioni sopradescritte.

Il test n. 1 ha permesso di dimostrare che SonoVue® mantiene un'adeguata ecogenicità anche quando diluito a bassa

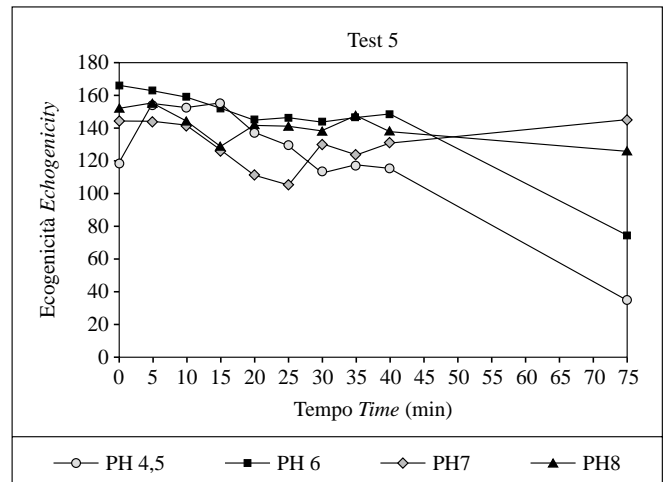


Fig. 9. — Curve di ecogenicità di quattro soluzioni di SonoVue®/NaCl a differenti pH. Nonostante i differenti comportamenti l'ecogenicità rimane al di sopra del valore soglia del 100% per un periodo di circa 40'. *Echogenicity curves of the four different SonoVue®/NaCl pH solutions. Despite the different behaviour patterns, echogenicity remains over the threshold value of 100% during a 40 min period.*

*is so low that it cannot be documented even with relatively high signal amplifications, as are used to detect contrast signal, it may be assumed that the echoes received are prevalently related to the microbubbles. Thus all signals not pertaining to the echo-enhancer are cancelled, allowing visualization of the microbubbles with a high signal-to-noise ratio [6]. The US unit used should of course be capable of processing harmonic frequency echoes and should allow fine tuning of the emission power of the US beam.*

*The second-generation contrast agent currently available in Italy is SonoVue® (Bracco SpA, MI, Italy), based on sulphur hexafluoride microbubbles stabilised with phospholipids.*

*Apart from the product specifications supplied by the manufacturer, no exhaustive data were available on the behaviour characteristics of SonoVue® microbubbles at different dilutions and insonation conditions, or when given physical and chemical conditions, such as temperature and pH of the saline solution used to dilute the echo-enhancer were changed. Therefore, the aim of our study was to analyse the variations in the microbubble image under the different conditions described above.*

*Test no. 1 demonstrated that SonoVue® maintains an adequate echogenicity even when diluted to low concentrations in saline solution. In particular, concentrations of 0.15% can be reached before echogenicity of the SonoVue®/NaCl solution is reduced. Beyond this threshold, even small variations in the concentration will result in a marked reduction of echogenicity. For concentrations between 0.15% and 0.5%, echogenicity of the mixture apparently remained constant, probably as a result of receiver saturation due to the intensity of the echo. This, however, does not affect the results of the test, which aimed at identifying the lowest concentration that could be used to obtain a diagnostic-quality image.*

concentrazione in soluzione fisiologica: in particolare si possono raggiungere concentrazioni dello 0,15% prima che si osservino riduzioni dell'ecogenicità della miscela SonoVue®/NaCl; oltre tale limite, anche piccole variazioni della concentrazione determinano una marcata riduzione dell'ecogenicità della miscela. Per concentrazioni comprese tra 0,15% e 0,5% l'ecogenicità della miscela si è mantenuta apparentemente costante, verosimilmente per la saturazione del ricevitore determinata dall'intensità del segnale eco. Il dato non è comunque influente sul risultato del test il cui obiettivo era individuare la minor concentrazione utile per ottenere un'immagine ecografica di significato diagnostico.

Come noto il meccanismo base con cui le microbolle danno vita al segnale eco è rappresentato dalla diffusione [3]. L'entità del segnale diffuso è funzione di una serie di fattori quali il tipo di gas contenuto nella bolla, la composizione del guscio delle microbolle, la frequenza del segnale US insonante e la pressione acustica.

Il fenomeno della diffusione dell'onda US è responsabile dell'attenuazione del segnale in profondità; come noto dalla letteratura quando viene utilizzata una significativa quantità di mezzo di contrasto ecografico può verificarsi una marcata attenuazione del segnale US che determina una riduzione degli echi, specialmente nel campo profondo [2].

Il test n. 2 ha confermato che l'entità dell'attenuazione del segnale US determinata dalle microbolle di eco-contrasto si modifica al variare della diluizione, ma ha anche documentato che il fenomeno non ha caratteristiche lineari. In condizioni di bassa amplificazione degli echi (-10 dB e -15 dB) l'attenuazione è significativamente maggiore per concentrazioni di eco-contrasto superiori allo 0,4% rispetto alle concentrazioni comprese tra 0,2% e 0,4%. Per le tre concentrazioni sottoposte al test, ma in modo particolare per le concentrazioni dello 0,2%-0,4%, SonoVue® non solo non determina attenuazione del segnale US, ma contrariamente alle previsioni, aumenta la trasmissione degli US risultando addirittura maggiormente transonico della stessa soluzione fisiologica. Quanto osservato fa ipotizzare che in particolari condizioni, correlate alla concentrazione delle bolle e alla frequenza degli impulsi insonanti, la trasmissione del fascio US possa essere favorita dall'eco-contrasto. Dato che il fenomeno non risponde alle aspettative previste, dovrà essere oggetto di ulteriori approfondimenti.

La valutazione degli effetti delle tecnica di scansione ecografica sulla sopravvivenza delle microbolle (test n. 3), ha evidenziato una maggior rottura di microbolle quando il trasduttore viene fatto oscillare continuamente lungo il piano di elevazione (asse z); il rilievo è verosimilmente correlato con la maggior probabilità statistica di provocare la rottura delle microbolle quando si scansiona un volume di soluzione più ampio. Dal punto di vista clinico la tecnica di scansione andrà sempre correlata con il tipo di organo da esaminare e con il quesito clinico.

Il test n. 4, deputato a valutare gli effetti della temperatura sulla sopravvivenza delle microbolle, ha documentato che la curva di decadimento delle microbolle a 37°C è nettamente peggiore della curva di decadimento a 30°C; il dato è spiegabile con la maggior tensione del guscio delle bolle creata dalla dilatazione del gas in conseguenza dell'aumento di temperatura. Temperature comprese tra 23°C e 30°C riducono la probabilità di rottura delle microbolle. Nella pra-

*As is known, diffusion is the mechanism by which the microbubbles originate the ultrasound signal [3]. The type of signal depends upon a number of factors, such as type of gas contained in the bubble, composition of the shell, frequency of the sonication signal and acoustic pressure.*

*The diffusion of the US wave is responsible for attenuation of the deep signal. As reported in the literature, when a significant amount of echo-enhancer is used, a marked attenuation of the US signal may occur which determines a reduction of the echoes especially in the deep field [2].*

*Test no. 2 confirmed that the attenuation of the US signal determined by echo-enhancer microbubbles changes as the dilution varies, but it also demonstrated that the relation is not linear. With low echo amplification (-10 dB and -15 dB), attenuation is significantly higher at echo-enhancer concentrations over 0.4% than at concentrations between 0.2 and 0.4%. For the three concentrations tested, but in particular for concentrations of 0.2%-0.4%, SonoVue® not only does not cause US signal attenuation but, contrary to expectations, it increases US transmission and therefore proves to be even more transonic than saline solution. These observations lead to hypothesize that in particular conditions related to microbubble concentration and pulse frequency, transmission of the US beam can be facilitated by the echo-enhancer. This unexpected result requires validation by further studies.*

*Evaluation of the effects of the scanning technique on microbubble survival (test no. 3) showed greater levels of microbubble rupture when the transducer oscillates continuously along the elevation plane (z axis); this fact is probably related to the greater likelihood of causing microbubble rupture when larger solution volumes are scanned. In clinical practice, the scanning techniques always depends on the organ being examined and on the clinical query.*

*Test no. 4 was devised to evaluate the effects of temperature on microbubble survival. The test showed that the decay curve of the microbubbles at 37°C is definitely worse than the decay curve at 30°C. This can be explained by the greater tension of the microbubble shells created by the gas expanding as a result of the increase in temperature. Temperatures between 23°C and 30°C reduce the likelihood of the microbubbles breaking. In the clinical practice, the advantages deriving from the dilution of the contrast agent in saline solution at low temperature should be assessed to improve survival of the microbubbles.*

*It is interesting to note that the spontaneous rupture of the microbubbles is not affected by the saline solution pH (test no. 5). This is not of secondary importance as saline solution bottles are supplied with pH values between 4.5 and 7.*

## Conclusions

*Our tests demonstrated that SonoVue® is not affected by pH variations and temperatures below 30°C. The microbubbles, instead, tend to break spontaneously when body temperature is reached. One of the most significant findings of this study is certainly that the echo-enhancer maintains adequate*

tica clinica, il vantaggio offerto dalla diluizione del mezzo di contrasto in soluzione fisiologica a bassa temperatura andrà valutato al fine di migliorare la durata delle microbolle.

È interessante osservare che la rottura spontanea delle microbolle non è influenzata dal pH della soluzione fisiologica (test n. 5). Il fatto non è di importanza secondaria in quanto i flaconi di soluzione fisiologica sono forniti con pH variabile in un range compreso tra 4,5 e 7.

## Conclusioni

I test da noi eseguiti hanno documentato che SonoVue® è insensibile alle variazioni di pH e alle temperature inferiori a 30°C; le microbolle tendono invece a rompersi spontaneamente quando viene raggiunto il livello proprio della temperatura corporea. Una delle risultanze più significative dello studio è sicuramente che l'eco-contrasto mantiene un'adeguata ecogenicità agli US anche qualora venga diluito in soluzione fisiologica a concentrazioni molto basse. Tale comportamento apre interessanti prospettive per l'utilizzo degli ecocontrastanti secondo modalità diverse oppure per applicazioni diagnostiche differenti da quelle fino ad ora proposte; una delle possibili applicazioni potrebbe essere l'introduzione in organi cavi, quali la vescica o il tubo digerente; un altro importante campo nel quale può essere necessario somministrare mezzi di contrasto diluiti è quello degli studi funzionali.

Per valutare l'effettiva validità di queste nuove applicazioni saranno necessari altri test *in vitro* e *in vivo*.

*ecogenicity to US even when diluted in saline solutions at very low concentrations. This behaviour opens up important possibilities for the use of echo-enhancers with different techniques or for new diagnostic applications which have not been suggested so far. One of the possible applications could be the introduction into hollow organs, such as the urinary bladder or the digestive tube. Another important field that could require administration of diluted contrast agents is that of functional studies.*

*Further in vitro and in vivo studies are necessary to evaluate the effective validity of these new applications.*

## Bibliografia/References

- 1) Morel DR, Schwieger I, Hohn L *et al*: Human Pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue®, a new contrast agent for ultrasound imaging. *Invest Radiol* 35: 80-85, 2000.
- 2) Robbin ML: Ultrasound contrast agents. *Radiol Clin of North Am* 39: 399-414, 2001.
- 3) Goldberg BB, Liu Ji-Bin, Forsberg F: Ultrasound contrast agents: A review. *Ultrasound Med Biol* 20: 319-333, 1994.
- 4) Burns PH: Contrast agents for ultrasound imaging and Doppler, ed 2. St. Louis, Mosby, 1998.
- 5) Wilson SR, Burns PN, Muradali D *et al*: Harmonic hepatic US with microbubble contrast agent: Initial experience showing improved characterization of

hemangioma, hepatocellular carcinoma, and metastasis. *Radiology* 215: 153-161, 2000.

6) Novario R, Goddi A, Tanzi F *et al*: Physics and technology of medical diagnostic ultrasound. *La Rivista del Nuovo Cimento* 26: 41-43, 2003.

Dott. A. Goddi  
SME-Diagnostica per Immagini  
Via Pirandello, 31  
21100 Varese VA  
Tel. 0332/224145  
Fax 0332/210420  
E-mail: goddi.alfredo@libero.it