



Optimización del marcaje del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino como antibiótico para el diagnóstico de infecciones. Estudio de la acumulación *in vitro* y su aplicación clínica

Daniel Rodríguez Puig

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

OPTIMIZACIÓN DEL MARCAJE DEL
 ^{99m}Tc -CIPROFLOXACINO COMO ANTIBIÓTICO
PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES.
ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN *IN VITRO* Y SU
APLICACIÓN CLÍNICA.

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Radiología y Anatomía.

Programa de Radiología Diagnóstica, Terapéutica y Nuclear.

Línea de investigación: Diagnóstico y tratamiento por técnicas de imagen.

Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina.

Directores:

Prof. Francesca Pons Pons

Dr. David Fuster Pelfort

Autor: Daniel Rodríguez Puig



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament d'Obstetrícia i Ginecologia,
Pediatría, Radiologia i Anatomia

Casanova, 143
08036 Barcelona
Tel/Fax: 93-403 93 71
E-mail: dep-opr@ub.edu
Facultat de Medicina

FRANCESCA PONS PONS, Catedràtica de Radiologia i Medicina Física de la Universitat de Barcelona i **DAVID FUSTER PELFORT**, Especialista Sènior del Servei de Medicina Nuclear de l'Hospital Clínic,

CERTIFIQUEN

Que **Daniel Rodríguez Puig**, llicenciat en Farmàcia, ha realitzat sota la nostra direcció la present tesi doctoral, titulada: *“Optimizació del marcaje del ^{99m}Tc-Ciprofloxacino como antibiòtico para el diagnòstico de infecciones. Estudio de la acumulación in vitro y su aplicació clínica”*, i que aquesta reuneix les condicions necessàries per a la seva lectura i defensa pública.

Prof. Francesca Pons Pons

Dr. David Fuster Pelfort

Barcelona, 12 de desembre de 2011

Agradecimientos

A la **Prof. Francesca Pons** y al **Dr. David Fuster**, mis directores de tesis, por su constante dedicación y gran ayuda en todo momento. Gracias por motivarme y darme suficiente energía durante este último año tan intenso.

Al **Dr. Carlos Piera** por introducirme en la Radiofarmacia y despertar mi ilusión en este apasionante mundo. Ha sido un placer Carlos. Por fin llegó el momento y te lo dedico con cariño.

Al **Prof. Joan Suades** de la Universitat Autònoma de Barcelona por aportar sus conocimientos químicos y ayudarme a tomar decisiones en los primeros pasos.

Al **Dr. Álex Soriano**, del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic, por su interés, rigurosidad científica, total colaboración y disponibilidad.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Clínic, especialmente al **Dr Sierra**, por su valiosa aportación. Gracias Josep.

Al Servicio de Traumatología del Hospital Clínic, particularmente al **Dr. García**, por su entusiasmo y dedicación.

A todas y cada una de las personas que integran el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínic por su calidad humana y el trato que siempre me han dado desde el principio.

Gracias compañeros y amigos, sin vosotros no hubiera sido posible.

A mi familia y personas queridas por vuestro apoyo incondicional y comprensión.

¡Muchísimas gracias!

Glosario

AGEMED: Agencia Española del Medicamento.

Bmr: Bacillus resistentes a múltiples fármacos.

°C: Grados Celsius. Unidad de temperatura.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

¹⁸F: Flúor-18. Radioisótopo.

FDG: Fludesoxiglucosa.

Formilo-Met-Leu-Fe: N-formilmetionina-Leucil-Fenilalanina. Péptido quimiotáctico.

FSA: Ácido formamidín sulfínico.

⁶⁷Ga: Galio-67. Radioisótopo.

GBq: Gigabequerelio. Unidad de desintegración radiactiva.

GyrA: Subunidad A de la girasa de *E. coli*.

GyrB: Subunidad B de la girasa de *E. coli*.

HCl: Ácido clorhídrico.

HMPAO: Hexametilpropilenamino oxima (exametazima).

H₂O: Agua.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HYNIC: Hidrazinonicotinamida.

¹²³I: Yodo-123. Radioisótopo.

IgG1: Inmunoglobulina G1. Anticuerpo.

¹²³I-IL-2: Interleucina 2 marcada con Yodo-123.

IL-1: Interleucina 1

IL-1ra: Antagonista del receptor de Interleucina 1

IL-8: Interleucina 8.

¹¹¹In: Indio-111. Radioisótopo.

ITLC-SG: Cromatografía instantánea en capa fina con Sílica-Gel.

keV: Kiloelectronvoltio. Unidad de energía de la radiación.

kg: Kilogramo. Unidad de masa.

LAL-test: Ensayo de endotoxinas mediante el lisado de amebocitos del Limulus.

LS-MS: Gammagrafía de leucocitos marcados y gammagrafía de médula macrofágica.

M: Molar. Unidad de concentración.

MAG₃: Mercaptoacetil-triglicina.

Mar: Resistente a múltiples antibióticos.

marA: Región génica A de Mar.

MBq: Megabequerelio. Unidad de desintegración radiactiva.

mCi: Milicurios. Unidad de desintegración radiactiva.

mg: Miligramo. Unidad de masa.

ml: Mililitro. Unidad de volumen.

mM: Milimolar. Unidad de concentración.

Mn: Manganeso. Elemento químico.

MnO₄⁻: Permanganato.

⁹⁹Mo: Molibdeno-99. Radioisótopo.

µg: Microgramos. Unidad de masa.

µm: Micrometros. Unidad de longitud.

N: Normal. Unidad de concentración.

NaBH₄: Borhidruro sódico.

NaCl: Cloruro sódico.

Na₂S₂O₄: Ditionito sódico.

NaTcO₄: Pertecneciato sódico.

NCA: Antígeno no específico de reacción cruzada.

ng: Nanogramo. Unidad de masa.

NorA: Gen de resistencia a quinolonas de *S. aureus*.

OmpF: Proteína F de la membrana externa. Porina.

ParC: Subunidad de la topoisomerasa IV.

ParE: Subunidad de la topoisomerasa IV.

PCR: Proteína C reactiva.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

QRDR: Región determinante de resistencia a quinolonas.

Re: Renio. Elemento químico.

ReO₄⁻: Perrenato.

R_f: Factor de retención.

RP-18: Fase reversa C-18. Tipo de fase estacionaria en cromatografía.

SF: Suero fisiológico.

SnCl₂: Cloruro de estaño(II)

Tc: Tecnecio. Elemento químico.

^{99m}Tc: Tecnecio-99 metaestable. Radioisótopo.

^{99m}TcO₄⁻: Pertecneciato de Tecnecio-99 metastable.

TLC: Cromatografía en capa fina.

²³⁵U: Uranio-235. Radioisótopo.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PRÓTESIS ARTICULAR DE CADERA Y DE RODILLA.....	1
1.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE INFECCIÓN Y AFLOJAMIENTO ASÉPTICO.....	6
1.3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN MEDICINA NUCLEAR	9
1.3.1. Gammagrafía ósea con ^{99m} Tc-difosfonatos	9
1.3.2. Gammagrafía con ⁶⁷ Ga	10
1.3.3. Gammagrafía con leucocitos marcados	12
1.3.4. Gammagrafía con radiofármacos en investigación.....	17
1.3.5. Gammagrafía con antibióticos marcados	20
1.3.6. Tomografía de emisión de positrones con ¹⁸ F-Fludesoxiglucosa	28
1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS QUINOLONAS.....	30
1.5. PARTICULARIDADES EN EL MARCAJE DE MOLÉCULAS CON ^{99m} Tc	33
1.5.1. ^{99m} Tc libre	35
1.5.2. ^{99m} Tc reducido hidrolizado	35
1.5.3. Ligandos de intercambio	36
1.5.4. Estructura de complejos de ^{99m} Tc	36
1.5.5. Equipos reactivos para el marcaje de compuestos con ^{99m} Tc.....	37
1.5.6. Cromatografía en capa fina	38
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	40
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	42
4. OBJETIVOS	43
5. INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS	44
5.1. Preparación y control de calidad del ^{99m} Tc-Ciprofloxacino	44
5.2. Acumulación in vitro en bacterias.....	53
5.3. Aplicación clínica en prótesis osteoarticulares	58
6. DISCUSIÓN.....	69

7. CONCLUSIONES.....	79
8. BIBLIOGRAFÍA.....	80

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRÓTESIS ARTICULAR DE CADERA Y DE RODILLA

La cirugía protésica de cadera y rodilla ha experimentado un importante crecimiento en las últimas décadas. Ello es debido a un envejecimiento y mayor expectativa de vida de la población, la frecuente bilateralidad del proceso, la mejora del material y diseños de las prótesis y a una técnica quirúrgica más avanzada. Es una cirugía con evidente beneficio para el paciente, ya que elimina espectacularmente el dolor y mejora su calidad de vida.

La artroplastia moderna ofrece prótesis modulares, lo que significa que el cirujano puede modificar sus componentes en función de las necesidades del paciente. Están hechas principalmente de metal, ya sea en forma de aleaciones (cromo-cobalto, cromo-cobalto-molibdeno, titanio-aluminio-vanadio) o metal puro (titanio) y plástico (polietileno). Sus componentes pueden unirse al hueso de varias maneras, como en el caso de las cementadas con polimetilmetacrilato o bien dependiendo de la formación de hueso nuevo alrededor de la prótesis, como por ejemplo aplicando hidroxiapatita en su superficie o mediante materiales protésicos con recubrimiento poroso.

Tal y como se ha comentado, el número de artroplastias de cadera y rodilla ha aumentado con resultados clínicos excelentes, sin embargo, las prótesis sufren un desgaste natural con el tiempo que suele acabar con la necesidad de un recambio protésico. Existen diferentes causas que pueden conducir a un fallo de la prótesis, que pueden ir desde una sencilla osificación heterotópica hasta una fractura o dislocación, aunque son relativamente raros y pueden ser diagnosticados radiográficamente (1). Sin embargo, como consecuencia de una mayor vida media de las prótesis articulares,

la aparición de un aflojamiento aséptico es cada vez más frecuente y su diagnóstico por técnicas de imagen suele ser más complejo. La causa más habitual se encuentra en la reacción inflamatoria a uno o varios componentes de la prótesis (2) cuyos restos pueden atraer y activar repetidamente fagocitos tisulares presentes normalmente alrededor de las prótesis, hasta llegar a una estimulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas que dañan al hueso y cartílago (3) y activan el sistema inmunitario, alcanzando un punto que aparece osteolisis con pérdida del soporte óseo. Histológicamente se desarrolla una pseudomembrana de tipo sinovial cuya composición es variable. Los histiocitos son las células en mayor número pero también se han identificado células gigantes, linfocitos y células plasmáticas (4,5,6)

El diagnóstico diferencial del aflojamiento aséptico debe realizarse con la infección de la prótesis, ya que sus manifestaciones clínicas son muy parecidas. Tan sólo una pequeña fracción de los pacientes sometidos a este tipo de cirugía experimenta infección de la prótesis, aunque constituye un serio problema clínico. En el diagnóstico de este tipo de infecciones, la historia clínica, el examen físico, los parámetros clínicos, la radiografía convencional, la aspiración de líquido articular y los cultivos microbiológicos tienen baja sensibilidad y suelen ser inespecíficos (7,8,9). Además, la presencia de prótesis metálicas causa artefactos en las técnicas de imagen con mayor resolución anatómica como la Tomografía Computerizada o la Resonancia Magnética (10).

Clasificación de infección de prótesis:

Coventry en 1975 (11) y más tarde Fitzgerald *et al* (12) describieron un sistema para clasificar las infecciones en prótesis total de cadera.

Las de tipo I se originan durante la operación y son asintomáticas durante el periodo post-operatorio inmediato. Son infecciones post-operativas tempranas. El paciente

normalmente está bajo seguimiento durante el primer mes después de la intervención y el diagnóstico se puede hacer basándose en la historia clínica y examen físico. Pueden aparecer signos sistémicos y el dolor es continuo. La herida puede ser eritematosa, inflamada y puede haber drenaje purulento. Este tipo de infección no suele representar un problema diagnóstico.

Las de tipo II también se originan durante el acto quirúrgico pero el inicio de los síntomas está retardado (infecciones crónicas tardías). El paciente está normalmente bajo seguimiento entre seis meses y dos años después de la operación. Este tipo de infección se asocia con una funcionalidad deteriorada y dolor creciente. Los hallazgos en el examen no son específicos, son similares a los asociados con el aflojamiento aséptico y requiere habitualmente de la realización de técnicas diagnósticas complementarias.

Las de tipo III son las infecciones hematógenas. Son las menos frecuentes. Ocurren a partir de los dos años o más y pueden existir desencadenantes como por ejemplo las infecciones del tracto urinario asociadas a catéter. Existe generalmente un cuadro febril acompañado con un deterioro repentino del hueso. Estas infecciones son más probables que ocurran en pacientes con tratamiento inmunosupresor ya sea por trasplante, por artropatía inflamatoria o bien en pacientes con bacteriemias recurrentes (13).

Patogénesis de la infección de prótesis. Formación de biofilms:

Para facilitar un diagnóstico y tratamiento óptimo de la infección, es importante entender la patogénesis del fenómeno de la formación del biofilm. También ayuda a entender por qué los signos y síntomas se alivian con un tratamiento antibacteriano corto pero reaparecen pronto después del cese del mismo. Todas las prótesis experimentan cambios fisiológicos después de ser implantados. El acontecimiento más

temprano, y probablemente el más importante clínicamente, es la competencia entre la integración de las células tisulares con la adhesión bacteriana en la misma superficie. Los fluidos fisiológicos inmediatamente cubren las superficies del material, en primer término con proteínas séricas y plaquetas. La albúmina, el mayor componente sérico, se deposita rápidamente sobre el material de la prótesis y previene la activación inespecífica de los neutrófilos y el depósito de proteínas en las superficies. La adhesión de *S. aureus* a los materiales de la prótesis está mediada por adhesinas, las cuales fomentan el acoplamiento en superficies poliméricas o metálicas. La adhesión de microorganismos progresa hasta la agregación de éstos formando un biofilm. Se trata de comunidades estructuradas de bacterias que se adhieren mediante matrices poliméricas propias a una superficie inerte o viva (14). Los biofilms crecen lentamente y resisten a las respuestas celulares y humorales. Además, las bacterias quedan protegidas y son menos susceptibles a la acción de los antibióticos. Existen microorganismos que desarrollan una substancia extracelular amorfa de naturaleza polisacárida que facilita la adhesión, captura los nutrientes y protege frente a los antibióticos ya que bloquea su penetración y disminuye la quimiotaxis de los granulocitos (15).

Fisiopatología de la inflamación e infección:

La inflamación es una reacción compleja del tejido frente a una agresión que puede haberse causado por agentes físicos, químicos, inmunológicos o incluso por radiación. Si el daño está causado o implica microorganismos vivos, ello conduce a la infección. Independientemente de la causa que sea, la inflamación es una respuesta inespecífica y protectora frente a un daño. Generalmente, la respuesta inflamatoria se caracteriza por una hiperemia local (rubor, calor), edema o hinchazón (tumor) y algunas veces dolor. Puede ser aguda o crónica. La aguda es la consecuencia inmediata al daño y se

asocia con cambios regionales o sistémicos como vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y exudado. Estos eventos también van acompañados de fenómenos locales como quimiotaxis y diapedesis, los cuales son mayoritariamente regulados por mediadores endógenos producidos por las células (16)

Complicaciones de la cirugía protésica:

Los pacientes candidatos a cirugía para colocación de prótesis articular presentan una importante afectación de la articulación: dolor persistente, limitación funcional y que no mejoran con tratamiento médico. Es una intervención paliativa y que carece de un claro impacto de la supervivencia, pero en pacientes gravemente sintomáticos comporta un importante alivio del dolor y una mejora funcional.

Es incuestionable que se trata de una cirugía satisfactoria, pero, desgraciadamente no está exenta de complicaciones. Ello implica la necesidad de un seguimiento clínico meticuloso con la finalidad de poder diagnosticarlas y tratarlas.

El aflojamiento aséptico y la infección son las principales complicaciones en este tipo de cirugía. El diagnóstico diferencial es muy importante ya que implica una pauta terapéutica diferente. En el aflojamiento aséptico, en un mismo acto quirúrgico se extrae y se recambia la prótesis, mientras que en el séptico, lo más frecuente es extraer la prótesis, dejar transcurrir un tiempo y cuando ya no hay infección reimplantar una nueva. A menudo, este diagnóstico es muy dificultoso, pues ambas entidades presentan una misma clínica y los hallazgos anatomopatológicos pueden ser similares.

La reacción inflamatoria del proceso infeccioso es casi idéntica a la del aflojamiento aséptico. En ambos, hay una respuesta inmune a un cuerpo extraño que origina una osteólisis, pero difieren en un aspecto importante y es que los neutrófilos

prácticamente siempre están ausentes en el aflojamiento aséptico (< 10%) y están casi siempre presentes en la infección.

El aflojamiento es la complicación más frecuente en los diez años posteriores a la cirugía. En cadera, un 50% de los aflojamientos corresponden al componente femoral y un 15% al acetabular. En rodilla, el aflojamiento suele ser en el componente tibial.

La infección es la complicación más grave. Un tercio de las mismas se manifiestan en los tres primeros meses postcirugía, otro tercio en el primer año y el resto a partir del año. La incidencia de infección tras la primera cirugía es alrededor del 1% para la prótesis de cadera y del 2% para la de rodilla. Este porcentaje aumenta tras una segunda revisión quirúrgica, siendo del 3% para las prótesis de cadera y del 5% para las de rodilla. Las infecciones crónicas son las más frecuentes y las más difíciles de diagnosticar.

1.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE INFECCIÓN Y AFLOJAMIENTO ASÉPTICO

La infección de una artroplastia cursa clínicamente con dolor (habitualmente a lo largo del primer año de implante), calor, derrame e hinchazón. El paciente suele presentar una ligera leucocitosis y una elevación de la velocidad de sedimentación. Radiológicamente, se observa una interfase entre el hueso y el material protésico que se diagnostica como una línea radiolúcida que se hace ancha e irregular. Se acompaña de una neoformación ósea reactiva perióstica. Los cultivos bacteriológicos del derrame pueden ser positivos.

Ante esta situación clínica, debe incluirse en su diagnóstico diferencial la posibilidad de una infección de la prótesis articular, que si se confirma va a ser necesario recambiar. Si los síntomas clínicos antes descritos son evidentes, la conducta quirúrgica es la

extracción del componente protésico infectado y colocar un recambio de la prótesis con protección antibiótica directamente durante el acto quirúrgico o la colocación temporal de un separador que contiene antibióticos (recambio en dos tiempos). Tras la cirugía, se administra al paciente tratamiento antibiótico durante 2-3 meses y en un segundo término se le coloca un nuevo implante protésico.

El análisis histológico de las membranas periprotésicas o de la neocápsula articular muestra que está constituida por una superficie cubierta por fibrina, por debajo de la que existe un tejido de granulación con frecuentes leucocitos polimorfonucleares. Más profundamente se reconoce una banda de tejido conjuntivo, con fibrosis, con nidos de histiocitos con pigmento férrico intracitoplasmático y con un discreto infiltrado inflamatorio crónico. No existe, o es mínima, la reacción granulomatosa de cuerpo extraño frente a partículas de los materiales de desgaste (17,18,19).

El aflojamiento aséptico de una artroplastia suele iniciarse clínicamente con dolor varios años después del implante protésico. Radiográficamente se detecta un aumento de la línea radiolúcida periprotésica que puede acompañarse de intensas y focales líneas de osteolisis, aunque no permiten distinguirlo de una complicación infecciosa. El tratamiento de un aflojamiento aséptico protésico articular es quirúrgico, desmontando el componente movilizado así como la membrana conjuntiva periprotésica y reimplantando, en el mismo acto, la nueva prótesis.

El mecanismo fisiopatológico que explica el aflojamiento aséptico protésico es una respuesta al desgaste de micropartículas que provienen de los materiales del diseño (metal, polietileno y/o "cemento"), que se acumulan en la neocápsula y posteriormente ocupan la línea entre el hueso y el implante. Allí originan una reacción tisular histiocitaria y granulomatosa de cuerpo extraño. Las micropartículas son fagocitadas por los histiocitos en los que producen una activación y producción de sustancias tales como factor de necrosis tumoral o factor de crecimiento. Estos productos, a su

vez, estimulan la secreción, por los osteoblastos vecinos, de prostaglandinas que tienen un efecto de reabsorción de hueso, tanto en esta situación como en otras diferentes (artritis reumatoide). La gruesa banda fibrohistiocitaria, interpuesta entre el hueso y el implante protésico, unido a la reabsorción del hueso endosteal, favorecen la movilización mecánica del implante, lo que a su vez origina más materiales de desgaste y un círculo vicioso progresivo. Las membranas que analiza el patólogo tienen una estructura histológica bien estructurada. En la superficie puede observarse una neosinovial con depósitos focales de fibrina. Por debajo del epitelio existe una proliferación de histiocitos mononucleados que se disponen en sábana. En su seno, y de manera focal, se pueden identificar los tres tipos de materiales ya reseñados.

De forma inhabitual, el aflojamiento aséptico debuta o se manifiesta como un pseudotumor, en las proximidades de una artroplastia total. Consiste en una masa en crecimiento, con una apariencia histológica similar a la de las membranas periprotésicas. Incluso se ha descrito como formada por granulomas pseudosarcoideos, pero con una afectación exclusivamente local, y sin afectación pulmonar o visceral.

También debe conocerse la posibilidad de circulación de los materiales sintéticos ya descritos a órganos a distancia (ganglios inguinales e intraabdominales, hígado y bazo), donde da origen a una idéntica reacción granulomatosa de cuerpo extraño que la descrita en las membranas periprotésicas.

1.3. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN MEDICINA NUCLEAR

La Medicina Nuclear pretende realizar el diagnóstico diferencial de la infección y el aflojamiento aséptico mediante radiofármacos que alcancen el tejido diana.

El radiofármaco ideal para estudios de imagen de la infección tendría que poseer las siguientes características: alta sensibilidad por el foco de infección, diferenciar entre infección e inflamación y entre infección aguda y crónica, no ser tóxico y ni inmunogénico, alta especificidad, rápido aclaramiento de la circulación, fácil preparación, bajo coste y amplia disponibilidad.

1.3.1. Gammagrafía ósea con ^{99m}Tc -difosfonatos

Es una técnica accesible y fácil de realizar. Ofrece una imagen de la actividad metabólica ósea. Cualquier causa que estimule la neoformación ósea se manifiesta gammagráficamente en una hipercaptación del radiofármaco.

Tras la implantación de una prótesis, existe una estimulación ósea periprotésica que se traduce en una hipercaptación del radiofármaco. Estudios realizados muestran que en pacientes asintomáticos dicha captación puede persistir durante años. Su duración depende en parte del tipo de prótesis (el tiempo de prótesis porosas es superior al de cementadas).

En cadera ha sido descrito que el hallazgo de una hipercaptación focal en vástago, trocánter o acetábulo es típica de aflojamiento mecánico, mientras que una hipercaptación difusa periprotésica es más sugestiva de infección. Este patrón difuso es debido a la presencia de una osteolisis generalizada, pero hay que tener presente

que ésta también puede existir en el aflojamiento aséptico, secundaria al propio proceso inflamatorio. En rodillas, los patrones de captación periprotésicos son aún más variables.

Así pues, nos encontramos con unos hallazgos gammagráficos inespecíficos que no permiten realizar un diagnóstico diferencial entre ambas entidades. Teniendo presente que los dos tercios de las infecciones protésicas ocurren durante el primer año tras la implantación, independientemente del tipo de localización, y que la captación periprotésica puede ser muy variable, tan sólo una gammagrafía ósea normal descarta la posibilidad de una complicación relacionada con la prótesis. Por tanto, un estudio positivo debe ser interpretado con mucha cautela, ya que es difícil poder diferenciar si esta captación corresponde a cambios postquirúrgicos, a un aflojamiento aséptico o a un proceso infeccioso.

1.3.2. Gammagrafía con ^{67}Ga

Como radiofármaco, se utiliza en forma de citrato de ^{67}Ga . Tras su inyección intravenosa, se acumula como análogo del hierro mediante su unión a la transferrina sérica. Este complejo se extravasa en el lugar de la inflamación a causa del aumento local de permeabilidad vascular. En el tejido inflamado, el ^{67}Ga pasa a la lactoferrina que es excretada localmente por los leucocitos o los sideróforos producidos por los microorganismos (20). El citrato de ^{67}Ga se ha utilizado ampliamente en la práctica clínica en diversas infecciones agudas y crónicas y en la inflamación no infecciosa (21). Sin embargo, tiene varios inconvenientes que limitan su aplicación clínica. La especificidad es escasa, debido a la excreción intestinal fisiológica y a la acumulación en tumores y zonas de remodelado óseo (22,23). Además, el radiofármaco tiene unas características de imagen desfavorables como un periodo de semidesintegración largo (78 horas) y una radiación gamma de alta energía (93-889 keV) que provoca la

absorción de dosis altas de radiación. Estas características desfavorables y el desarrollo de otros radiofármacos han derivado en la sustitución de los estudios con ^{67}Ga por la gammagrafía con leucocitos marcados, si bien existen algunas excepciones. La gammagrafía con leucocitos marcados tiene un valor limitado en pacientes con sospecha de osteomielitis vertebral y parece que el estudio secuencial con ^{67}Ga es la mejor forma de diagnosticar este trastorno (21). Asimismo, en pacientes inmunodeprimidos, el estudio con citrato de ^{67}Ga es el de elección para detectar infecciones oportunistas de las vías respiratorias (21). También se usa en la fiebre de origen desconocido, por su capacidad de detectar procesos inflamatorios agudos y crónicos y también neoplasias (21,24)

Tras la colocación de la prótesis, el ^{67}Ga se muestra positivo en ausencia de infección debido a la remodelación ósea secundaria a su implantación. De igual forma que la gammagrafía ósea, es una exploración sensible pero poco específica.

La introducción del estudio combinado de gammagrafía ósea ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -difosfonatos) con gammagrafía ^{67}Ga y comparando los estudios de ambas exploraciones consiguieron aumentar la exactitud diagnóstica de infección al 70-80%. Para ello se establecieron unos patrones de congruencia/incongruencia de captación entre ambos trazadores. Consideraron negativo para infección cuando la imagen de la gammagrafía con ^{67}Ga es normal, independientemente del resultado de la gammagrafía ósea, o bien cuando la distribución espacial de los dos radiofármacos es congruente. Consideraron positivo para infección cuando los estudios presentaban una distribución espacial incongruente o bien cuando la distribución es espacialmente congruente pero la intensidad de la captación de ^{67}Ga es superior a la del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -difosfonato. La situación más habitual corresponde a un patrón congruente en que debe valorarse de forma visual si existe una mayor captación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -difosfonato o de ^{67}Ga , lo que supone una importante dificultad técnica y de difícil interpretación.

1.3.3. Gammagrafía con leucocitos marcados

1.3.3.1. Leucocitos marcados *in vitro*

Los estudios de imagen que utilizan leucocitos autólogos marcados *in vitro* se desarrollaron en el decenio de los años setenta. Se extrae una muestra de sangre (\approx 50 ml) y se separan los leucocitos de los eritrocitos. A continuación, se marcan con isótopos radiactivos (^{111}In o $^{99\text{m}}\text{Tc}$) y se inyectan de nuevo al paciente. Con los procedimientos de marcaje habituales, sólo se dañan unos pocos granulocitos, contrariamente a los linfocitos, que resultan dañados en su mayoría. Las células dañadas son eliminadas de la circulación rápidamente (25). Tras la administración intravenosa, los leucocitos radiomarcados quedan inicialmente secuestrados en los pulmones, pero después salen rápidamente de ellos. El marcador radiactivo es eliminado rápidamente de la sangre y en la mayor parte de los casos la captación en infiltrados granulocíticos es considerable, mientras que una parte importante de los leucocitos se acumulan en el bazo y el hígado. Los leucocitos autólogos se pueden marcar con ^{111}In -oxina (26) o con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (27). Los leucocitos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO han sustituido a los marcados con ^{111}In -oxina en la mayor parte de las indicaciones debido a las mejores características físicas del isótopo radiactivo. Como resultado de la biodistribución de los leucocitos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, es preferible usar los marcados con ^{111}In -oxina para la evaluación de los riñones, la vejiga y la vesícula biliar. También cuando son necesarias las imágenes tardías, como en el caso de infecciones crónicas (28). La precisión diagnóstica es buena, pero la preparación de las células marcadas es difícil y se necesita personal experimentado unas 3 horas. Además, la necesidad de manipular sangre potencialmente contaminada puede ser un factor de riesgo en el contagio de enfermedades (29).

Las principales indicaciones clínicas de los leucocitos radiomarcados son la enfermedad inflamatoria intestinal, la osteomielitis, el seguimiento de pacientes con infecciones de prótesis vasculares u ortopédicas e infecciones de partes blandas (28,30,31).

Siempre ha existido la preocupación por la posibilidad de que las gammagrafías con leucocitos marcados puedan pasar por alto las infecciones crónicas, puesto que éstas originan una respuesta de las células granulocíticas más pequeña que las infecciones agudas. Sin embargo, en un estudio realizado en 155 pacientes se demostró que la sensibilidad en la detección de infecciones agudas (90%) no era significativamente diferente a la sensibilidad para la detección de infecciones crónicas (86%) (32).

El mecanismo de captación de los leucocitos marcados a nivel de los focos infecciosos depende de la quimiotaxis del complejo y forma parte de la respuesta inmunológica normal frente a una infección. Depende también del número y del tipo de células marcadas. La mayoría de células que se marcan son neutrófilos y, por tanto, la exploración será útil sobre todo en procesos inflamatorios con predominio de infiltración neutrófila. Basándonos en este aspecto, la gammagrafía con leucocitos marcados debería ser la exploración ideal para diagnosticar la infección protésica, debido a que los neutrófilos siempre están presentes en esta infección y a que los leucocitos no se depositan en regiones en las que únicamente hay un aumento del recambio óseo sin infección, como es el caso del aflojamiento.

La interpretación del estudio con leucocitos marcados requiere una comparación entre la región de interés y una zona ósea de referencia. En el caso de las prótesis, la captación del radiofármaco periprotésica se compara habitualmente con la captación ósea de radiofármaco adyacente o con la del lado contralateral. Se ha observado que, si bien un estudio negativo prácticamente excluye una infección, un estudio positivo no siempre necesariamente corresponde a proceso infeccioso (sensibilidad 80-90% y

especificidad 30-40%). La gran cuestión que se nos puede plantear sería que si no hay infección, por qué se observa captación de leucocitos. La respuesta está en que existe un pool leucocitario en médula ósea y el depósito de leucocitos corresponde a una captación fisiológica medular.

En adultos, la médula ósea hematopoyéticamente activa está localizada en el esqueleto axial y en la epífisis proximal de huesos largos, por lo que en principio cualquier depósito de leucocitos fuera de estas localizaciones podría ser sugestivo de infección. Sin embargo, se ha observado que existen una serie de procesos que pueden variar su configuración espacial normal y entre ellos está la colocación de una prótesis osteoarticular. Al implantar una prótesis se produce un desplazamiento y una conversión de médula ósea grasa en hematopoyética. Por consiguiente, hay que tener en cuenta que una captación de leucocitos puede ser debida a un foco medular o a un foco infeccioso.

Para poder realizar fielmente un diagnóstico certero se vio necesario comparar la gammagrafía con leucocitos marcados con otra gammagrafía que utilizase un radiofármaco que se captase por la médula ósea; los coloides (radiocoloides). Por consiguiente, se introdujo la exploración conjunta de una gammagrafía con leucocitos marcados y una gammagrafía de médula ósea con coloide (^{99m}Tc -microcoloide). De este modo se llega a excluir que la captación positiva de leucocitos fuera debida a captación fisiológica por parte del pool leucocitario de la médula ósea desplazado por la prótesis. Se establecen unos patrones de congruencia/incongruencia entre ambas exploraciones. Un patrón congruente no es sugestivo de infección y corresponde a una captación de los radiofármacos similar y coincidente. La captación leucocitaria se interpreta como fisiológica y corresponde a médula ósea normal desplazada. Un patrón incongruente sí que es sugestivo de infección. Ocurre cuando hay captación de leucocitos pero no de coloide o bien cuando la captación leucocitaria muestra una intensidad superior a la del coloide. Basándose en estos patrones se puede obtener

una sensibilidad el 100% y una especificidad el 97% tanto en prótesis de cadera como de rodilla. Se ha descrito que la sensibilidad de la técnica es independiente de la terapia antibiótica y, además, sugiere que los resultados falsos negativos pueden deberse a una cronicidad del proceso y los falsos positivos a una severa respuesta inflamatoria celular. La demora en el tiempo hasta llegar al diagnóstico y el mayor número de pruebas a realizar, así como el procedimiento más laborioso y no exento de riesgos para quien realiza el marcaje *in vitro* de leucocitos, son una desventaja para el uso combinado de dichas exploraciones.

1.3.3.2. Leucocitos marcados *in vivo*

Un método para marcar los leucocitos *in vivo* es mediante uso de anticuerpos monoclonales marcados radiactivamente frente a antígenos de superficie específicos presentes en los granulocitos. Tiene como ventaja frente a los leucocitos marcados *in vitro* que los procedimientos de marcaje son más fáciles y no es necesario manipular sangre potencialmente contaminada. No obstante, presentan desventajas, como el elevado peso molecular, que resulta en una mayor lentitud en su difusión para alcanzar la diana, alarga la semivida plasmática y provoca captación en el hígado debido al sistema retículoendotelial.

El uso de anticuerpos de origen murino a veces induce la producción de anticuerpos humanos anti-ratón, los cuales pueden causar reacciones alérgicas y alterar la farmacocinética cuando se administran inyecciones repetidas (33). Sin duda, se trata de una limitación para llevar a cabo estudios de seguimiento. El uso de fragmentos de anticuerpos o su humanización podría ayudar a superar la mayor parte de estas limitaciones ya que, teóricamente, la inmunogenicidad es menor y la depuración sanguínea más rápida.

Se localizan en procesos infecciosos en mayor medida por la extravasación inespecífica que provoca el aumento local de permeabilidad vascular (34,35) además

de, naturalmente, por su unión específica al antígeno correspondiente. Su comportamiento es similar al del granulocito. Presentan ciertas ventajas frente a los leucocitos marcados como por ejemplo la no manipulación de la sangre, fácil preparación, unión selectiva a los granulocitos. Existen anticuerpos antigranulocitos completos como el Besilesomab (^{99m}Tc ; Scintimun®) que se trata de una IgG1 que se une al antígeno de superficie NCA-95 de la membrana de granulocitos y promielocitos humanos. También existen fragmentos de anticuerpos como el Leukoscan®, el cual es un fragmento de anticuerpo monoclonal murino derivado de un completo IgG1. Se une fuertemente al antígeno de superficie cruzada NCA-90 presente en los granulocitos humanos. Presenta una menor captación en médula ósea que el anticuerpo completo y es el más usado.

La interpretación de la imagen gammagráfica con ambos radiofármacos es similar. Suele realizarse a partir de las 4 horas postinyección. La exploración se considera positiva de infección cuando la captación del radiofármaco en la región protésica es superior a la de tejidos blandos, al tejido circundante o al hueso contralateral; y no considera sugestiva de infección cuando la captación es similar y no se detectan focos hipercaptantes. En prótesis de rodilla se ha descrito una captación de características inespecíficas llamada *cap shape sign* (o en forma de gorro) que refleja actividad sinovial articular y no necesariamente infección.

Se han observado falsos negativos en infecciones crónicas de bajo grado y con severa neutropenia y falsos positivos en pacientes con metalosis, granuloma periprotésico, aflojamiento severo de la prótesis y hemartrosis sinovial. El tratamiento antibiótico, antiinflamatorio e inmunosupresor no parece afectar la capacidad diagnóstica de esta exploración.

Respecto al estudio combinado de gammagrafía con leucocitos marcados y gammagrafía de médula ósea, muestra unos resultados de especificidad algo

inferiores y la interpretación es algo más dificultosa, pero ha demostrado ser una buena alternativa en aquellos centros que no disponen de la infraestructura para realizar el marcaje de leucocitos.

1.3.4. Gammagrafía con radiofármacos en investigación

Péptidos quimiotácticos bacterianos:

El formilo-Met-Leu-Fe fue uno de los primeros evaluados para visualizar focos infecciosos. Los péptidos quimiotácticos son sustancias producidas por las bacterias y que se unen a receptores de granulocitos y monocitos con gran afinidad (36). Todos los análogos, marcados con ^{99m}Tc o con ^{111}In , mostraron una localización preferente en infecciones focales en la primera hora siguiente a la infección (37,38). Sin embargo, se comprobó también que dosis bajas del péptido inducían una granulocitopenia pasajera. Se desarrollaron varios antagonistas para evitar esta actividad biológica no deseada del péptido quimiotáctico radiomarcado pero éstos presentaban captaciones más bajas en los focos infecciosos, en la mayoría de los casos a causa de la menor afinidad de los receptores (39,40). Así pues, estudios preclínicos han demostrado que es posible la visualización de la infección mediante péptidos quimiotácticos marcados radiactivamente, aunque su captación por los focos infecciosos es escasa y parece que los efectos sobre los recuentos de leucocitos dificultan un mayor desarrollo clínico.

Interleucina 1:

Se une con gran afinidad a receptores específicos expresados en los granulocitos, monocitos y linfocitos. Estudios en ratones con infecciones focales por *S. aureus* mostraron acumulación de IL-1 marcada con yodo radiactivo en el lugar de la infección (41). Desafortunadamente, sus efectos biológicos (hipotensión, cefaleas), incluso a

dosis muy bajas (10 ng/kg), hacen imposible la aplicación clínica. Por este motivo, se investigó el antagonista del receptor de la IL-1, el cual es producido de forma natural (IL-1ra), como posible agente en estudios de imagen. Dicho antagonista se une a receptores de la interleucina 1 con una gran afinidad pero, al no activar la vía de la transducción de la señal, no cabe esperar efectos biológicos adversos. En un estudio comparativo en conejos con infección por *E. coli*, la captación del antagonista (IL-1ra) radiomarcado con yodo fue similar a la de la propia IL-1 (42). En pacientes con artritis reumatoide se consiguió visualizar correctamente las articulaciones inflamadas usando IL-1ra marcado con ^{123}I . Sin embargo, este agente se eliminaba principalmente por vía hepatobiliar, por lo que es poco adecuado para la visualización de lesiones infecciosas e inflamatorias en el abdomen (43).

Interleucina 8:

Es una pequeña proteína quimiotáctica que se une con gran afinidad a los receptores de los neutrófilos (44). La capacidad de la IL-8 radiomarcada para visualizar la inflamación fue descrita por primera vez en 1997 (45). En un estudio piloto realizado en 8 pacientes diabéticos, se demostró que la IL-8 marcada con yodo podía visualizar infecciones activas en los pies (46). También se ha desarrollado un radiofármaco de IL-8 marcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, utilizando HYNIC como quelante (47,48). La gran actividad específica del preparado permite la inyección de dosis muy bajas, por lo que no es esperable que exista una citopenia ni siquiera temporal.

Factor plaquetario 4:

Se trata de una citoquina quimiotáctica. Existen análogos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ los cuales se han usado para comprobar su aplicación en la detección gammagráfica de infecciones e inflamaciones (49). Debido a la alta captación fisiológica en los

pulmones, este radiotrazador no estará indicado en diagnosticar infecciones pulmonares.

Antagonistas del Leucotrieno B₄:

El leucotrieno B₄ es un potente factor quimiotáctico que activa los granulocitos y macrófagos y es un mediador, tanto en enfermedades inflamatorias agudas como crónicas. Tiene gran afinidad por los receptores expresados en los neutrófilos humanos. Se sintetizó un antagonista marcado con ^{99m}Tc para administrar a conejos y permitió la visualización de infecciones por *E. coli*. (50) y también para visualizar endocarditis experimentales en canes (51). Sin embargo, el radiotrazador es un compuesto altamente lipófilo, que se elimina principalmente por vía hepatobiliar y causa una captación elevada intestinal. Otro compuesto más hidrófilo y marcado con ¹¹¹In se sintetizó y administró en conejos con infección intramuscular por *E. coli*, pudiéndose visualizar correctamente. El radiofármaco se eliminó exclusivamente por los riñones y no se observó acumulación de radiactividad intestinal (52).

Interleucina 2:

La inflamación crónica se caracteriza por infiltración de monocitos y linfocitos. Así pues, para visualizar procesos inflamatorios crónicos, se deberían aplicar ligandos de receptores sobre estas células mononucleares. La IL-2 marcada radiactivamente se dirige a los receptores de IL-2 expresados en los linfocitos T activados. Marcada con ¹²³I se ha usado en pacientes con diabetes tipo I con resultados satisfactorios (53,54). Estudios realizados en pacientes con tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, Crohn y enfermedad celíaca demostraron la localización de la IL-2 marcada con ¹²³I o ^{99m}Tc en el lugar de la infiltración linfocítica (55). En pacientes con enfermedad de Crohn activa, la captación focal de ¹²³I-IL-2 en la pared intestinal disminuyó después del tratamiento con corticosteroides y esta técnica podría ser útil para controlar el

efecto del tratamiento (56). Los resultados en pacientes con enfermedad celíaca fueron compatibles con el número de células con receptores de IL-2 positivos infiltrados, determinado por histología en la mucosa del yeyuno (57). También se observó acumulación en las glándulas tiroideas de pacientes con tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves (58).

1.3.5. Gammagrafía con antibióticos marcados

^{99m}Tc-ciprofloxacino:

Se trata del más usado y estudiado tanto a nivel preclínico como clínico. El ciprofloxacino es un antibiótico de la familia de las quinolonas indicado para combatir numerosas infecciones. Con el ^{99m}Tc-ciprofloxacino es con el que se han obtenido resultados más interesantes, puesto que el foco infeccioso se puede detectar incluso antes que la migración leucocitaria sea evidente. Como se ha visto anteriormente, la gammagrafía con leucocitos marcados también es capaz de detectar infecciones, pero no logra diferenciarlas de una inflamación aséptica. El ^{99m}Tc-ciprofloxacino es más específico para infección bacteriana, ya que se une a la DNA girasa de bacterias vivas pudiéndolas visualizar directamente. Este agente, desarrollado en la década de los noventa, combina las excelentes propiedades físicas del ^{99m}Tc y la capacidad de unión a bacterias del ciprofloxacino. Inicialmente, con estudios *in vitro* y preclínicos con animales de experimentación, se demostró que se acumulaba en los abscesos causados por bacterias vivas y, en cambio, no en inflamación aséptica o abscesos con bacterias muertas (59).

El primer estudio clínico realizado incluyó 56 pacientes con sospecha de infecciones bacterianas y alcanzó un 84% de sensibilidad y un 96% de especificidad en el total de la serie, los cuales fueron mejor que los obtenidos mediante los leucocitos marcados (81% y 77% respectivamente). Los falsos negativos en las imágenes con ^{99m}Tc-

ciprofloxacino se atribuyeron al tratamiento previo recibido por los pacientes antes de someterse a la prueba. Las imágenes se evaluaron a la hora, cuatro horas y ocasionalmente a las 24 horas después de la administración intravenosa del antibiótico marcado y a las cuatro y 24 horas en el caso de leucocitos marcados con ^{111}In . Los autores creyeron que esta técnica tenía una serie de ventajas respecto a los leucocitos marcados. En primer lugar, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino no requiere manejo de sangre con la correspondiente disminución del riesgo de infección por VIH o hepatitis por parte del operador. En segundo lugar, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino es técnicamente más fácil y el marcaje menos laborioso. En tercer lugar, este método es independiente del estado celular del paciente. Además, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino no es captado por la médula ósea (60).

Otro estudio clínico incluyó 99 pacientes, 61 de ellos con sospecha de infección ósea. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino mostró un 89% de sensibilidad y un 90% de especificidad. En sólo en 15 individuos se realizaron las imágenes a las 24 horas y se consideraron innecesarias (61).

En otro estudio se obtuvo una sensibilidad de sólo un 70,3% mientras que la especificidad fue del 93,1%. No hubo diferencias significativas respecto a si los pacientes seguían o no tratamiento antibiótico entre los grupos positivos y los negativos a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino. Hubo 3 falsos positivos que coincidían con artritis reumatoide y psoriásica en las manos. La experiencia del autor fue que la mayor parte de las imágenes correspondientes a falsos positivos, vistos a las 4 horas post-inyección en las inflamaciones crónicas sin componente infeccioso, eran negativas en las imágenes de las 24 horas (62).

En experimentos con animales el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacino es captado solamente por las bacterias y no en abscesos estériles. Inflamaciones sin infección como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn fueron negativas con el antibiótico marcado, pero

fueron positivas con los leucocitos marcados. Los resultados *in vitro* indican que los leucocitos no captan o captan sustancialmente menos ^{99m}Tc -ciprofloxacino que las bacterias, incluso a pesar de presentar resistencias al antibiótico, puesto que se observaron cinco casos de resistencias con imágenes positivas (62).

Amaral *et al* (63) describieron una discordancia entre leucocitos marcados y ^{99m}Tc -ciprofloxacino concluyendo que este último sería mejor en infecciones del esqueleto axial.

En 2001, dos grupos publicaron buenos resultados con ^{99m}Tc -ciprofloxacino en infecciones ortopédicas en comparación con los leucocitos marcados con ^{99m}Tc -HMPAO en 51 pacientes (64) o con la combinación de gammagrafía ósea más ^{67}Ga en 22 pacientes (65). En el primer estudio, el ^{99m}Tc -ciprofloxacino fue positivo en 11 de 12 infecciones en un subgrupo de 18 pacientes con 23 sospechas de infecciones (entre cadera, rodillas y fémur) mientras que los leucocitos detectaron 7. La sensibilidad y especificidad fueron altas, aunque solamente realizaron adquisiciones a las 24 horas en los casos sospechosos. En el total de la serie, 16 de 24 rodillas estudiadas mostraron acumulación en la cavidad sinovial que a veces disminuía a las 24 horas.

En el segundo estudio, sólo se efectuaron imágenes a la 1 y 4 horas. Constaba de 15 pacientes con prótesis de cadera y 4 de rodilla. Los mejores resultados se alcanzaban cuando un ligero aumento de la captación del ^{99m}Tc -ciprofloxacino se consideraba negativo para infección dado que, al considerarlo positivo de infección la sensibilidad aumentaba (de 85% a 92%) pero la especificidad disminuía drásticamente (de 92% a 23%). La gammagrafía con ^{67}Ga mostraba un 78% de sensibilidad y especificidad del 100%. Los autores concluyeron que una ligera captación no se ha de considerar infección sino que ha de haber captación significativa.

En un trabajo realizado por Dumarey *et al.* (66) con 30 pacientes con sospecha de osteomielitis o artritis séptica y 41 controles se puntuaba la captación de ^{99m}Tc -

ciprofloxacino de 0 a 2. Considerando un valor de 2 como positivo de infección, la sensibilidad era del 84,2% y la especificidad del 54,5%. Considerando, además, un valor de 1 como infección, la especificidad bajó hasta el 27,3%. El estudio incluía 3 niños cuyos cartílagos en crecimiento mostraron captación. Se vieron falsos positivos en prótesis de rodilla no infectadas, pseudoartrosis con necrosis de implante óseo, reumatismo y fibrosis post-operatoria en la zona lumbar. En el grupo control con 41 pacientes sin enfermedad infecciosa ni inflamatoria, se observó captación en el 17% en caderas, 49% en espina lumbar, 58% en articulaciones sacro-iliacas, 58% en rodillas, 75% en muñecas y 82,1% en hombros. La conclusión de los autores fue considerar correcta la sensibilidad de la técnica, pero no la especificidad para la infección de hueso y articulación. El hecho de asignar una puntuación de este tipo no es demasiado acertado, además teniendo en cuenta el número de falsos positivos.

En un estudio multicéntrico patrocinado por la Agencia Internacional de la Energía Atómica, que incluía 879 pacientes con 194 prótesis articulares, se encontraron muchos falsos positivos, especialmente durante el primer año y particularmente en pacientes con artropatías activas en articulaciones grandes como la artritis reumatoide y cuando solamente se adquirieron imágenes a la hora y 4 horas. Los mejores resultados se obtuvieron en osteomielitis (sensibilidad del 90,5% y especificidad del 72,8%; n=228) y en infecciones de prótesis osteoarticulares (sensibilidad del 96% y especificidad del 91,6%; n=194) (67). El gran número de falsos positivos son un punto a tener en cuenta y en este estudio no dan una respuesta. Quizás la preparación del radiofármaco contenía una proporción de radiocoloides pequeña pero suficiente para alterar estos parámetros diagnósticos.

La biodistribución y dosimetría también fueron evaluadas en otros trabajos (68). Aproximadamente un 60% de la actividad inyectada se recuperaba en orina a las 24 horas. La pared de vejiga urinaria, tiroides, la parte alta y baja del intestino grueso y el útero recibieron la mayor dosis absorbida. Se observó baja captación cerebral,

pulmonar, medular y hepática, permitiendo la adquisición de imágenes de cuerpo entero.

Otros antibióticos marcados con ^{99m}Tc :

^{99m}Tc -enrofloxacino: el enrofloxacino es un antibiótico de la familia de las quinolonas, inhibe la DNA girasa y es activo frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Siaens *et al* (69) lograron marcarlo para explorar infecciones inducidas en ratas.

^{99m}Tc -pefloxacino: es una quinolona marcada (70) que se ha administrado a ratas infectadas por *E. coli* y a ratas con sólo inflamación, observándose una mayor captación en los roedores infectados.

^{99m}Tc -ceftizoxima: la ceftizoxima es una cefalosporina de tercera generación con un amplio espectro de acción contra productores de beta-lactamasas. El antibiótico se une a la pared celular e inhibe la síntesis de peptidoglucano. En el año 2002, Gomes *et al* lo marcaron e inyectaron en ratas con músculo infectado por *E. coli*, observándose una captación identificable (71).

^{99m}Tc -vancomicina: es un glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular. Se investigó su actividad biológica en un modelo de infección o inflamación en ratas (72) reportando una mayor captación en los animales infectados por *S. aureus* que en aquéllos con una inflamación inducida por turpentina.

^{99m}Tc -kanamicina: es un antibiótico bactericida que inhibe la síntesis de proteínas en microorganismos sensibles. Fue marcado por Roohi *et al* (73) y

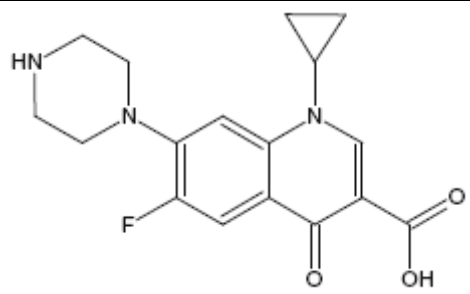
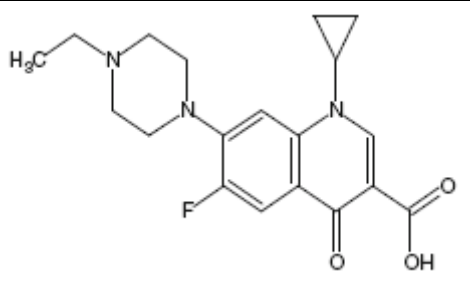
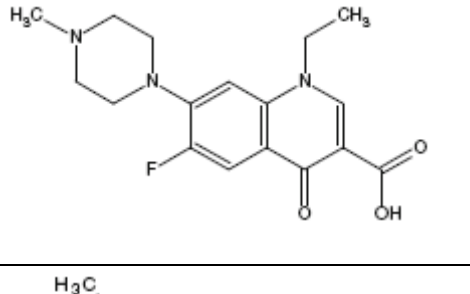
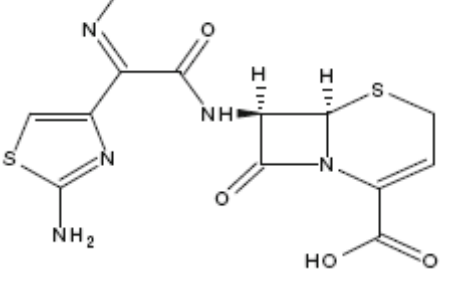
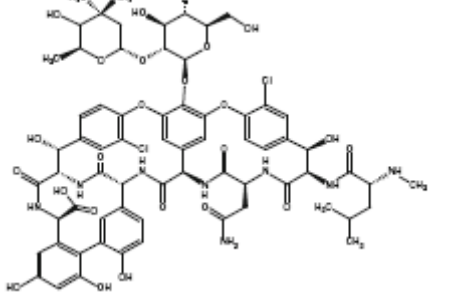
administrado en animales de experimentación infectados por *S. aureus* con resultados favorables, es decir, captaciones a nivel de la infección.

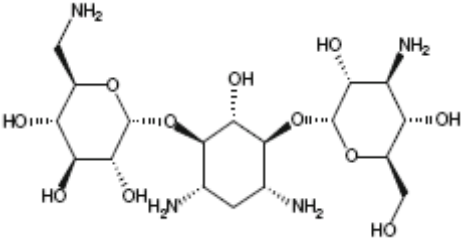
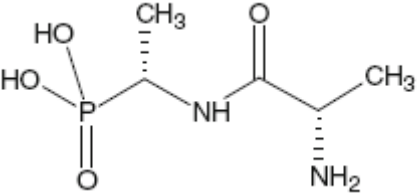
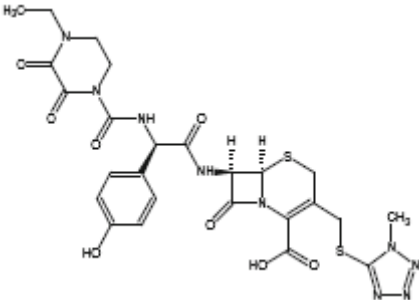
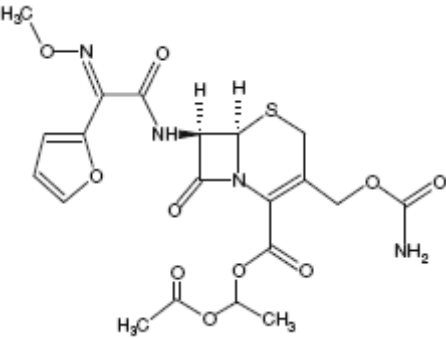
^{99m}Tc-alfosfalina: la alfosfalina es un ácido dipéptido fosfónico que inhibe selectivamente la biosíntesis de peptidoglucano y es activo frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Tsopelas *et al.* (74) evaluaron su acumulación en ratas infectadas por *S. aureus*. Encontraron que, se excreta principalmente por vía renal (>60% pasadas 4 horas). Se planteó su utilidad en osteomielitis.

^{99m}Tc-cefoperazona: es una cefalosporina de tercera generación, activa frente a un gran número de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, tanto grampositivas como gramnegativas. En un trabajo llevado a cabo por Motaleb (75) se administró el antibiótico marcado a ratas infectadas por *S. aureus*. La máxima captación en la infección se alcanzó a los 45 minutos.

^{99m}Tc-cefuroxima axetilo: Se trata de una cefalosporina de amplio espectro. Lambrecht *et al.* (76,77) marcaron el antibiótico para evaluar su potencial uso en modelos de roedores infectados. Se retuvo en las áreas infectadas con buenos valores a las 4 horas postinyección.

A continuación se muestran las estructuras químicas de los antibióticos sin marcar (78):

<i>Antibiótico</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Estructura química</i>
Ciprofloxacino	Inhibición DNA girasa bacteriana	
Enrofloxacin	Inhibición DNA girasa bacteriana	
Pefloxacin	Inhibición DNA girasa bacteriana	
Ceftizoxima	Interfiere en la formación del peptidoglicano	
Vancomicina	Inhibición síntesis pared celular	

<i>Antibiótico</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Estructura química</i>
Kanamicina	Inhibición síntesis de proteínas	
Alafosfalina	Inhibe síntesis peptidoglicano de la pared bacteriana	
Cefoperazona	Interfiere en la formación del peptidoglicano	
Cefuroxima axetilo	Interfiere en la formación del peptidoglicano	

1.3.6. Tomografía de emisión de positrones con ¹⁸F-Fludesoxiglucosa

La Tomografía de emisión de positrones (PET) con ¹⁸F-Fludesoxiglucosa (FDG) nos indica la presencia de células inflamatorias hiperglicolíticas y ello sugiere que nos permitiría realizar el diagnóstico o exclusión de la infección de prótesis. Se han realizado diversos estudios en pacientes portadores de prótesis articular para valorar su eficacia en el diagnóstico de infección. En uno de ellos se observa que un aumento de captación del radiofármaco en la interfase hueso-prótesis, independientemente de la intensidad de captación, sugiere infección. La sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica de la PET para detectar infección en prótesis de rodilla fue 90,9%, 72% y 77,8%. En prótesis de cadera fue 90%, 89,3% y 89,5% respectivamente (79).

En otro estudio, se diferencia sepsis de aflojamiento dependiendo de la intensidad de captación de la FDG en la interfase. Si la captación es intensa significa infección, si es intermedia aflojamiento y si se localiza en la sinovial es compatible con una sinovitis (80).

Otros autores establecen unos patrones de captación de FDG y cuando ésta se localiza en la interfase del acetábulo se trata de un aflojamiento acetabular, si se localiza en la interfase lateral del segmento proximal o distal del fémur corresponde a un aflojamiento femoral, mientras que si se detecta en el segmento medio sugiere infección. Obtienen unos resultados de exactitud del 72-78% en el aflojamiento y del 89% en infección (81).

En una opinión opuesta a los tres estudios citados, otros grupos de trabajo llegan a la conclusión de que la PET no puede diferenciar el proceso inflamatorio del aflojamiento aséptico del de un proceso infeccioso, independientemente de la localización de la prótesis, dado que los dos procesos son metabólicamente activos y por tanto muestran

hipercaptación del radiofármaco (82). Un estudio comparativo entre PET y la gammagrafía con leucocitos marcados más la gammagrafía medular pone de manifiesto que la PET no aporta beneficios al estudio combinado con leucocitos marcados más la gammagrafía medular y que no hay patrón característico de aflojamiento séptico/aséptico en la PET (83).

Mediante una búsqueda sistemática de los estudios más relevantes publicados en las bases de datos PubMed, MEDLINE y Embase se realizó un metaanálisis (84). Dos revisores asesoraron de forma independiente la calidad metodológica de cada estudio. Se documenta la sensibilidad y especificidad de cada estudio desglosándolo en subgrupos en aquellos casos en que la muestra es heterogénea y así lo requiere. Se incluyen 11 estudios (635 prótesis de cadera o rodilla). La sensibilidad y especificidad global de la PET para detectar infección fue de 82% y 86%, respectivamente. Los resultados del metaanálisis indican que las características de los estudios analizados permiten etiquetar la valoración de este metaanálisis como de calidad moderada/alta. Sin embargo, se recomienda cautela en la interpretación de los resultados dada la heterogeneidad de los trabajos. Para validar la técnica PET con FDG en el diagnóstico diferencial de infección de prótesis articulares de cadera y rodilla se requieren futuros estudios que comparen la PET con la gammagrafía con leucocitos marcados para decidir cual de ellos es más coste-efectivo. Este trabajo demuestra que la experiencia de la PET en este campo es todavía muy limitada, con estudios heterogéneos, especialmente en los criterios de inclusión y en la valoración de los hallazgos observados en las imágenes de la PET. No se distinguen las cifras obtenidas teniendo en cuenta la ubicación de la prótesis.

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A LAS QUINOLONAS

Las bacterias resistentes a las quinolonas alcanzan relevancia en la práctica clínica como resultado de la terapia con estos agentes. Su efecto citotóxico depende de que penetre a través de la membrana bacteriana y alcancen su diana celular (DNA girasa o topoisomerasa IV) para inducir la muerte de la célula. Los mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas pueden agruparse en tres categorías:

1. Resistencias de tipo cromosómico que dan lugar a mutaciones en segmentos definidos de los genes que codifican para la DNA girasa (especialmente en la subunidad A) y a la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (“*Quinolone Resistance-Determining Region*”) (85)
2. Resistencias por alteraciones en la membrana externa bacteriana que disminuyen la penetración intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan en alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, lo que impide la entrada del quimioterápico en la bacteria.
3. Resistencias basadas en la expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores activos.

En relación con el primer mecanismo mencionado, los estudios iniciales, centrados en *E. coli*, demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce normalmente por mutaciones en regiones definidas en las proteínas GyrA o GyrB (86,87,88). Las mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC o ParE tienen lugar tras las acontecidas en la girasa, y generalmente producen altos grados de resistencia a estos fármacos (89). Por ello, se identificó a la girasa como principal diana de las quinolonas.

Las mutaciones en la girasa o topoisomerasa IV no son los únicos mecanismos de resistencia que desarrollan los microorganismos frente a la acción de los agentes antibacterianos, pues las resistencias pueden estar condicionadas también por los procesos de transporte a través de la membrana (90). Así, el papel fundamental que ejercen los canales de las porinas en la difusión de las quinolonas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, quedó respaldado por la observación de que numerosos mutantes *Mar* (*multiple antibiotic resistant*), que mostraban resistencias a estos agentes, tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli* (91). Ello sugiere que las quinolonas hidrofílicas deben entrar en la célula bacteriana, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF.

Estas cepas mutantes *Mar* de *E. coli* expresan resistencias codificadas por cromosomas frente a una gran variedad de antibióticos hidrofílicos e hidrofóbicos estructuralmente no relacionados. Entre los cambios que presentan estos mutantes *Mar* en la membrana externa destaca la importante reducción de la porina OmpF. Estas observaciones implican que la reducción de OmpF requiere mutaciones en la región génica *marA* (92), es decir, las mutaciones en los locus *marA* confieren resistencia a varios grupos de antibióticos, entre ellos las quinolonas, por un mecanismo que reduce la permeabilidad al disminuir la expresión de la OmpF. Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos grados de resistencia a las quinolonas y producen habitualmente resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados (91).

Como norma general, se considera que un tamaño voluminoso, la carga negativa y un aumento de la hidrofobicidad retrasan la penetración de los antibacterianos en los microorganismos gramnegativos a través de los canales de las porinas (93). Por otro lado, las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de

difusión a través de lipopolisacáridos (94). Algunos autores han demostrado que la hidrofobicidad de los compuestos parece tener relevancia tanto en grampositivos como gramnegativos, mientras que el elevado peso molecular es un factor limitante sólo para los microorganismos gramnegativos.

Posteriormente se conoció la implicación en la resistencia a las quinolonas del tercer mecanismo señalado: la bomba de expulsión activa. Las quinolonas son sustratos de este transportador que actúa extrayendo el fármaco desde el medio intracelular al extracelular e impide así la acumulación. El sistema de expulsión se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y cataliza un proceso dependiente de energía ligado a un gradiente de protones (95).

Entre las bacterias grampositivas se han identificado bombas de flujo en *B. subtilis* (Bmr) y *S. aureus* (NorA) (96,97), cuyas resistencias de éste último microorganismo pueden asociarse a un aumento de la transcripción del gen norA, el cual codifica las proteínas de membrana participantes en los procesos de expulsión. Destaca pues, que el grado de expresión de este gen determina la sensibilidad tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas. El efecto de la expresión del gen norA sobre la actividad de las quinolonas depende de su afinidad por el transportador NorA, que se manifiesta fundamentalmente para las fluoroquinolonas hidrofílicas y confiere bajo grado de resistencia.

Se han descrito otros transportadores similares que afectan a la sensibilidad a las quinolonas en otras especies bacterianas, tal como ocurre con determinados genes de *P. aeruginosa* que proporciona resistencia al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico (98).

En resumen, la expresión de los transportadores de expulsión puede determinar la sensibilidad antimicrobiana y está reconocida como causa de resistencia a quinolonas.

o quelatos con varios ligandos. El número de coordinación de los complejos de tecnecio puede variar entre 4 y 9.

El ^{99m}Tc se encuentra disponible en forma de pertecneciato sódico ($[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$) a partir de los generadores de Molibdeno-Tecnecio ($^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$). En el pertecneciato ($[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$), el tecnecio se encuentra en estado de oxidación +7, con un comportamiento químico parecido al permanganato (MnO_4^-) y al perrenato (ReO_4^-). La configuración del pertecneciato es la de una pirámide tetraédrica con el átomo de tecnecio en el centro y 4 átomos de oxígeno en los vértices. La reactividad química del $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$ es muy baja y no se puede marcar radiactivamente ningún compuesto por la simple adición del pertecneciato. En la mayoría de los mecanismos de marcaje se requiere la adición de un agente reductor para llevar al tecnecio del $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$ a estados de oxidación inferiores y más reactivos. Inicialmente, se usaron como agentes reductores el ácido ascórbico, ion ferroso o ácido clorhídrico, pero estas sustancias a menudo resultaban en una reducción incompleta, requiriéndose una etapa de purificación posterior para eliminar el exceso de pertecneciato que no había reaccionado. Como mejora, se usaron agentes reductores más potentes como, por ejemplo, borhidruro sódico (NaBH_4) y ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), que son útiles en pH alcalino, o cloruro de estaño (SnCl_2) en pH ácido. Este último ha resultado ser el más potente y el más usado aprovechando el adecuado carácter reductor frente al pertecneciato. De esta forma no se necesita eliminar el pertecneciato que queda en exceso. También se utilizan otras sales de estaño, como el fluoruro de estaño o el tartrato de estaño (101). En el eluido del generador la concentración de átomos radiactivos de ^{99m}Tc es muy pequeña, del orden de nanomoles, por lo que la cantidad de agente reductor requerido es muy baja. Sin embargo, en la mayoría de formulaciones para la preparación de radiofármacos de tecnecio, se añade exceso de agente reductor.

1.5.1. ^{99m}Tc libre

Las especies reducidas del tecnecio son muy reactivas químicamente y se combinan con gran variedad de quelantes, entre ellos, el ciprofloxacino puesto que su estructura química posee dos grupos carbonilo y un grupo hidroxilo, potencialmente ávidos para formar enlaces de coordinación (102). El quelante contribuye a la formación del enlace covalente coordinado cediendo un par de electrones. A pesar de que el agente reductor está en exceso, en determinadas ocasiones puede obtenerse una pureza radioquímica anormalmente inferior a la habitual como consecuencia de exceso de pertecneciato libre ($[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$). La presencia de oxígeno del aire en el vial donde se encuentra el producto a marcar y el agente reductor, antes de la adición del pertecneciato eluído del generador, puede inducir la oxidación de parte del reductor disminuyendo su disponibilidad para reducir al tecnecio. Además, la presencia de oxígeno acompañando actividades elevadas de ^{99m}Tc puede provocar la radiólisis de las moléculas presentes en la muestra, agua u otras, produciendo radicales libres hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), alcoxi ($\text{RH}\cdot$), y peroxi ($\text{RO}_2\cdot$). Estas especies interaccionan con los quelatos de tecnecio desligándolo de nuevo. Los efectos indeseables descritos pueden ser minimizados teniendo en cuenta determinadas precauciones, como la de utilizar siempre concentraciones en exceso de agente reductor, eliminar el oxígeno haciendo pasar corriente de nitrógeno por los viales de reacción o añadir pequeñas cantidades de antioxidantes como el ácido ascórbico o ácido gentísico (103).

1.5.2. ^{99m}Tc reducido hidrolizado

El ^{99m}Tc , una vez reducido, puede llegar a hidrolizarse en soluciones acuosas, con lo que en la muestra del radiofármaco aparecerán como impureza radioquímica formas reducidas hidrolizadas. El pH del medio, el tiempo y la presencia de otros agentes determinarán la cantidad y variedad de dichas especies. Las más frecuentes son

$^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}^{2+}$, $^{99m}\text{TcOOH}^+$. Estas formas hidrolizadas interferirán en la visualización de los órganos a estudio. Por otra parte, el cloruro de estaño usado como reductor habitualmente se hidroliza con facilidad a pH entre 6 y 7 formando coloides insolubles, los cuales pueden encontrarse solos o unidos al tecnecio disminuyendo el rendimiento de la reacción de marcaje.

En la práctica, los compuestos químicos que podemos encontrar en una preparación de un radiofármaco tecneciado son: $^{99m}\text{TcO}_4$ libre (no reducido por el estaño); especies hidrolizadas de tecnecio ($^{99m}\text{TcO}_2$) y del estaño ($\text{Sn}(\text{OH})_2$) y ^{99m}Tc -quelato que es el radiofármaco en cuestión. Para que un radiofármaco pueda ser utilizado en la práctica clínica, la suma de las impurezas ha de ser mínima.

1.5.3. Ligandos de intercambio

El intercambio de ligando, también llamado transquelación, incluye inicialmente la formación de un primer complejo de tecnecio con un quelante o ligando débil en medio acuoso, para posteriormente reaccionar con un segundo quelante o ligando capaz de proporcionar un enlace más estable (p.ej. tartrato en el marcaje de MAG_3 o el de ciprofloxacino propuesto en esta tesis). La diferencia entre las constantes de afinidad de ambos ligandos hace que ambas reacciones tengan lugar. Son ligandos de constante de afinidad baja, es decir débiles, el gluconato, tartrato, citrato y EDTA.

1.5.4. Estructura de complejos de ^{99m}Tc

El estado de oxidación del tecnecio es desconocido en muchos de los complejos en que interviene. El conocimiento de la estructura de los posibles complejos de tecnecio proporciona importantes progresos en la aplicación de los radiofármacos con fines

diagnósticos y contribuye a la ampliación de las técnicas isotópicas en Medicina Nuclear.

1.5.5. Equipos reactivos para el marcaje de compuestos con ^{99m}Tc

La comercialización de equipos reactivos, también llamados *kits*, ha facilitado la práctica de la Radiofarmacia. Los kits se presentan con largos periodos de caducidad y, una vez almacenados en las condiciones requeridas, se puede disponer de ellos en cualquier momento. En la mayoría de los kits, el marcaje se lleva a cabo por la simple adición del [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] al vial. Como agentes reductores, aunque el que aparece mayoritariamente es el cloruro de estaño, también se pueden encontrar fluoruros, citratos, tartratos y pirofosfatos de estaño. Las cantidades de sales de estaño que aparecen en los kits han de ser más que suficientes para conseguir la reducción completa del [$^{99m}\text{TcO}_4^-$], ya que éste se encuentra en concentraciones nanomolares.

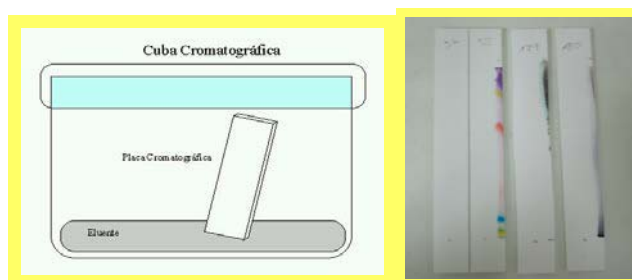
Actualmente, la mayoría de radiofármacos utilizados en la práctica clínica, están disponibles en forma de kit indican cómo se prepara y cómo se realiza el control de calidad. En la preparación del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino también se ha introducido el concepto de kit, pero en lugar de tener 1 vial con todos los compuestos liofilizados, se ha preparado con 3 viales y en cada uno de ellos se ha pesado previamente la cantidad de sustancia en polvo por separado. Así pues, consiste en 1 vial con ciprofloxacino clorhidrato, 1 vial con ácido tartárico y 1 vial con cloruro de estaño. A partir de cada vial se realizan diferentes disoluciones y diluciones hasta adicionar el tecnecio.

1.5.6. Cromatografía en capa fina

Los métodos de cromatografía en capa fina son los más comúnmente usados para identificar las diferentes especies en las preparaciones radiofarmacéuticas, especialmente en las preparaciones de radiofármacos marcados con ^{99m}Tc .

Cantidades del orden de microlitros de la preparación radiactiva se depositan en el origen de una tira o placa cromatográfica (fase estacionaria), la cual se deposita verticalmente en una cubeta cromatográfica que contiene un disolvente apropiado (fase móvil). Dicho disolvente no ha de mojar la gota depositada en el origen. La cubeta cromatográfica ha de estar cerrada para mantener una atmósfera saturada de disolvente en su interior. Las fuerzas electrostáticas de adsorción y capilaridad entre la fase estacionaria y los componentes de la muestra que son arrastrados hacia arriba por la fase móvil, hacen que se separen las diferentes especies que conviven en la preparación en función de su afinidad por ambas fases. Por tanto, las fuerzas electrostáticas atractivas de la fase estacionaria y la polaridad de la fase móvil, son los dos factores determinantes en la separación de los diferentes compuestos radioquímicos en una muestra.

A continuación se muestra un esquema de una cubeta cromatográfica y de las tiras y placa usadas en el control de calidad del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino (fase reversa RP-18 y sílica-gel ITLC-SG):



La placa cromatográfica es la fase estacionaria y se sumerge verticalmente por un extremo. El eluyente es la fase móvil que sube por la placa por capilaridad y separa los distintos componentes en función de su afinidad por las 2 fases.

Después del desarrollo, es decir, cuando la fase móvil ya ha ascendido por la fase estacionaria, la tira o placa se retira de la cubeta, se seca y se analiza mediante un radiocromatógrafo u otro método que sirva para estudiar la distribución de la radiactividad a lo largo de la tira o placa. En nuestro caso para el ^{99m}Tc -Ciprofloxacino se usó un radiocromatógrafo Bioscan AR-2000, el cual da una lectura en continuo de la distribución de la radiactividad en toda la tira o placa. Posee un brazo detector por donde entra la radiactividad y excita un gas del tipo PR-10 (90% Argón + 10% Metano).



El frente de disolvente es la distancia que recorre la fase móvil desde el origen de la tira cromatográfica mientras que el frente relativo o R_f de un compuesto es la distancia que dicho

componente recorre respecto al total recorrido por la fase móvil. Así pues, un $R_f = 0$ significa que el compuesto no recorre nada, un $R_f = 1$ significa que el compuesto recorre lo mismo que el disolvente y un $R_f = 0,5$ quiere decir que el compuesto recorre la mitad de lo que ha recorrido la fase móvil.

Casi el 80% de los radiofármacos están marcados con ^{99m}Tc . Sus características físico-químicas hacen que sea un isótopo adecuado para ser usado de forma rutinaria en Medicina Nuclear: semivida de 6 horas, emisión fotónica de 140 keV (buena penetración tisular y se puede colimar y detectar fácilmente), baja radiación para el paciente, gran disponibilidad de generadores para uso hospitalario y químicamente reactivo.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El diagnóstico de infección de prótesis articulares es complejo, ya que no es posible diferenciarlo de un aflojamiento aséptico mediante los parámetros clínicos y/o analíticos. Las técnicas de imagen anatómicas tampoco muestran un nivel de exactitud suficiente para establecer un correcto diagnóstico diferencial entre ambas entidades.

Las exploraciones de Medicina Nuclear se han mostrado útiles en la detección y seguimiento de procesos inflamatorio-infecciosos que no son aparentes en la exploración física (104). Frente a otras técnicas de imagen con elevada resolución anatómica, destacando la Tomografía Computerizada y la Resonancia Magnética, las técnicas de Medicina Nuclear tienen la ventaja de permitir rastrear todo el cuerpo en la misma sesión y de ofrecer información funcional. Sin embargo, las pruebas gammagráficas actuales todavía no son suficientemente específicas en el diagnóstico de la infección para poder distinguir la inflamación de causa infecciosa de otras etiologías de carácter inflamatorio. La técnica más empleada se basa en el marcaje de leucocitos que son secuestrados por igual en el foco inflamatorio que en infeccioso con independencia de su etiología. Esta distinción es fundamental en el caso de la infección sobre material protésico osteoarticular. Una potencial solución a esta elevada inespecificidad consiste en combinarlo con una gammagrafía medular, pero supone una importante demora diagnóstica y un mayor número de pruebas.

Con el objeto de hallar un marcador más específico de la infección protésica, se ha diseñado un estudio encaminado a valorar la sensibilidad y especificidad de la gammagrafía con ciprofloxacino marcado con ^{99m}Tc , fruto de la optimización de la técnica de marcaje, control de calidad y evaluación de la acumulación *in vitro*. Esta técnica, descrita por Britton *et al* (60,61,105). Se fundamenta en la capacidad del

ciprofloxacino de ser incorporado por bacterias vivas donde actúa inhibiendo la DNA girasa. Esto implica una mayor especificidad teórica en la detección de la infección, que corrobora en sus trabajos, situándola entorno al 95%. Esta técnica, a diferencia de la gammagrafía con leucocitos marcados, no requiere la manipulación de sangre del paciente, por lo que comporta menos riesgos biológicos. Otras ventajas son su posible utilidad en pacientes neutropénicos y la ausencia de captación de la médula ósea (muy útil en los casos de infección osteoarticular). Como era de esperar, no se han descrito efectos secundarios, ya que ambos productos han sido ampliamente utilizados desde hace años.

Aspectos éticos

La parte clínica del proyecto ha sido evaluada por el Comité Ético del Hospital Clínic y aprobada por la Agencia Española del Medicamento (AGEMED, protocolo 03-0090) y a todos los pacientes reclutados se les informó y solicitó el consentimiento informado.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El ciprofloxacino es incorporado en las bacterias vivas donde actúa inhibiendo la DNA girasa. La hipótesis de este trabajo de investigación es que el ciprofloxacino se puede marcar con ^{99m}Tc obteniéndose un radiofármaco libre de impurezas el cual también se incorpora en las bacterias vivas y permite su aplicación clínica para el diagnóstico de infección en prótesis osteoarticulares.

4. OBJETIVOS

1. Optimizar el método de marcaje del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino para obtener una alta pureza radioquímica.
2. Establecer un método de control de calidad que identifique todas las impurezas.
3. Estudiar la acumulación intracelular *in vitro* en *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
4. Valorar si la acumulación se ve afectada en cepas con mecanismos de resistencia a quinolonas.
5. Determinar clínicamente la sensibilidad, especificidad y valores predictivos en el diagnóstico de infección de prótesis articulares.
6. Comparar la técnica gammagráfica con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino en el diagnóstico de la infección de prótesis osteoarticulares con las técnicas convencionales de Medicina Nuclear.

5. INVESTIGACIÓN Y RESULTADOS

5.1. Preparación y control de calidad del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino

Trabajo: “Un nuevo método de preparación y control de calidad del [^{99m}Tc]-Ciprofloxacino” (*A new method of [^{99m}Tc]-Ciprofloxacin preparation and quality control. J Label Compd Radiopharm 2006; 49:1171-1176*)

Factor de impacto: 1,096

Cuarto cuartil

Research Article

A new method of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin preparation and quality control

Daniel Rodríguez-Puig¹, Carlos Piera^{1,2}, David Fuster¹, Alex Soriano³, José María Sierra⁴, Sebastià Rubí¹ and Joan Suades^{5,*}

¹ *Radiopharmacy Unit. Nuclear Medicine Service (CDIC). Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

² *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

³ *Infectious Diseases Department, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

⁴ *Microbiology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

⁵ *Chemistry Department, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

Summary

[^{99m}Tc]-ciprofloxacin is a useful radiopharmaceutical for the detection of osteoarticular prosthesis infection. We report a new preparation method based on the use of tartrate anion as an exchange ligand and tartaric acid as a source of tartrate. An improved quality control procedure is also reported that allows measuring the level of [^{99m}Tc]-tartrate present in the radiopharmaceutical preparation. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 27 July 2006; Revised 28 August 2006; Accepted 29 August 2006

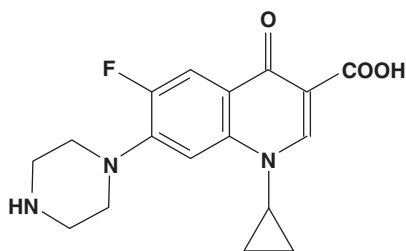
Key Words: Technetium-99m; ciprofloxacin; prosthesis infection; quality control

Introduction

Ciprofloxacin is a 4-fluoroquinolone antibiotic (Scheme 1) and [^{99m}Tc]-ciprofloxacin is a radiopharmaceutical developed to diagnose infection, being particularly attractive for the detection of osteoarticular prosthesis infection.¹ This radiopharmaceutical has been tested in clinical studies and it has been

*Correspondence to: Joan Suades, Chemistry Department, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. E-mail: joan.suades@uab.es

Contract/grant sponsor: Dirección General de Investigación Científica y Técnica

**Scheme 1.**

claimed that it can distinguish between bacterial infection and sterile inflammation.²⁻⁴ Nevertheless, the preparation method of this labelled compound is a critical point because a significant amount of colloid ($^{99m}\text{TcO}_2$) is frequently formed and it can accumulate in inflammation sites yielding false positives.⁵ Hence, a wide range of reducing agents has been studied to improve the preparation of this radiopharmaceutical such as tin(II) chloride,⁶ formamidine sulphinic acid,^{2,3,6} tin(II) tartrate⁷ and a polymer with iminodiacetic acid.⁸ Among all these reported methods, the synthesis with tin(II) tartrate should be highlighted because it leads to a radiopharmaceutical with small amounts of colloid. However, the reported quality control procedure cannot determine the level of the possible [^{99m}Tc]-tartrate formed in the reaction with tin(II) tartrate. Since tartrate is a common exchange ligand in the preparation of technetium radiopharmaceuticals,⁹ we decided to investigate the influence of tartrate anion in [^{99m}Tc]-ciprofloxacin synthesis. It should be borne in mind that although the structure of the [^{99m}Tc]-ciprofloxacin complex is unknown, ciprofloxacin acts as an O-donor ligand in reported metal complexes,¹⁰ so the difference between the stability of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin and [^{99m}Tc]-tartrate (complex with exchange ligand) could not be so significant as in other radiopharmaceuticals.

This study reports: (1) an alternative labelling procedure based on tin(II) chloride and L-tartaric acid instead of tin(II) tartrate; (2) an improvement in quality control by means of thin-layer chromatography (TLC) that allows quantification of [^{99m}Tc]-tartrate.

Results and discussion

L-tartaric acid was chosen as a source of tartrate anion because it can supply a small tartrate concentration to the reaction medium, sufficient enough to act as an exchange ligand. The use of tartaric acid and tin(II) chloride instead of tin(II) tartrate allows working at low exchange ligand concentration without dependence on tin(II) concentration. In addition, L-tartaric acid is a compound included in the European Pharmacopeia, which can facilitate its use in clinical trials. Hence, [^{99m}Tc]-ciprofloxacin was prepared by simple

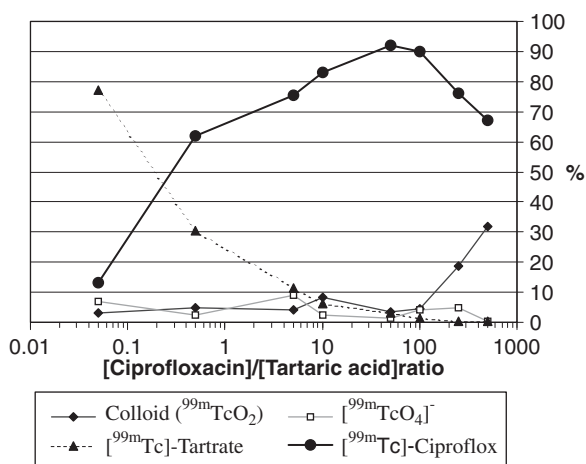


Figure 1. Influence of [ciprofloxacin]/[tartaric acid] ratio in the labelling reaction

reaction at room temperature between ciprofloxacin hydrochloride, L-tartaric acid and tin(II) chloride. Quality control was performed by TLC by means of ITLC-SG plates, developed with acetone in order to determine the pertechnetate content, and ethanol:water:ammonium hydroxide (2:5:1) as the mobile phase to determine the colloid content of the preparations.⁷ The amount of [^{99m}Tc]-tartrate formed in the preparation method was monitored using RP-18 plates and saline solution:methanol:acetic acid (55:45:1) as mobile phase. In this system, pertechnetate and [^{99m}Tc]-tartrate move with the solvent front ($R_f = 0.9$) and [^{99m}Tc]-ciprofloxacin remains at the origin ($R_f = 0$). Consequently, the concurrent use of the three TLC systems supplies enough information to determine the percentages of the four species involved in the preparation: [^{99m}Tc]-ciprofloxacin, [^{99m}Tc]-tartrate, [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ and colloid ($^{99m}\text{TcO}_2$). Making use of this methodology, we studied the influence of the ratio [ciprofloxacin]/[tartaric acid] in the labelling reaction and the result is displayed in Figure 1.

This graph shows that when the ratio [ciprofloxacin]/[tartaric acid] is very low, [^{99m}Tc]-tartrate is a major by-product of the labelling reaction. This result agrees with the idea that tartrate concentration in the reaction medium should be low because the thermodynamic stability of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin probably is not much higher than [^{99m}Tc]-tartrate. On the other hand, when the ratio [ciprofloxacin]/[tartaric acid] is very high, the amount of colloid becomes considerable. This result is consistent with the role of tartrate as an exchange ligand, because when the concentration of tartrate is very low, the reduced technetium is not stabilized and forms colloid. It should be emphasized that Figure 1 shows clearly a maximum in the representation of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin percentage versus [ciprofloxacin]/[tartaric acid] ratio in

the range 50–100. Therefore, this is the optimal range for the [ciprofloxacin]/[tartaric acid] ratio to obtain the most favourable labelling yield of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin using the preparation method reported in this work.

Experimental

Materials and methods

Tin(II) chloride dihydrate and L-tartaric acid were purchased from Merck and ciprofloxacin hydrochloride from Bayer. TLC was performed on 200 mm PALL ITLC-SG plates and Merck TLC-RP-18 plates. The plates were analysed in a BIOSCAN System 200 Imaging Scanner. Pertechnetate was obtained from the commercial $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generators DRYTEC (Amersham).

Labelling procedure

A solution of tin(II) chloride dihydrate (0.1 mg in 0.1 ml of hydrochloric acid 0.01 N) was added to a solution of ciprofloxacin hydrochloride (2 mg) in 1 ml of saline. Next, 0.1 ml of an aqueous solution of L-tartaric acid was added to the resulting solution and it was vigorously stirred. In order to study the influence of tartaric acid concentration, the labelling procedure was analysed using tartaric acid solutions with the following concentrations: 1 M, 100 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.2 mM and 0.1 mM. These values correspond to the molar ratios [ciprofloxacin]/[tartaric acid] of 0.05, 0.5, 5, 10, 50, 100, 250 and 500, respectively. Finally, freshly eluted pertechnetate (0.2–1.1 GBq) was added, the resulting solution was vigorously stirred and kept at room temperature for 15 min. Data were obtained by means of three or five experiments (N) as it is shown in Table 1.

Table 1. Labelling results

R	Colloid ($^{99m}\text{TcO}_2$)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	[^{99m}Tc]-tartrate	[^{99m}Tc]-Ciproflox.	N
0.05	3 ± 2	7 ± 3	77 ± 5	13 ± 4	3
0.5	5 ± 1	3 ± 2	31 ± 6	62 ± 6	3
5	4 ± 1	9 ± 5	12 ± 6	76 ± 3	3
10	8 ± 4	2 ± 1	6 ± 3	83 ± 5	5
50	3 ± 1	1 ± 1	3 ± 2	92 ± 2	5
100	5 ± 1	4 ± 2	1 ± 1	90 ± 2	5
250	19 ± 5	5 ± 2	1 ± 1	76 ± 4	3
500	32 ± 3	1 ± 1	1 ± 1	67 ± 4	3

Data are in percentage ± SD.

R=[ciprofloxacin]/[L-tartaric acid] ratio, N= number of experiments.

TLC procedure

- (a) Perchnetate analysis: A 10 μ L sample of the preparation was spotted on a silica-gel strip. It was developed using acetone as mobile phase and free perchnetate migrates to the solvent front ($R_f = 1$).⁷
- (b) Technetium colloid analysis: A silica-gel strip was prepared as before and developed using *ethanol:water:ammonium solution* (25%) {2:5:1}. The colloid is found at the origin of the strip ($R_f = 0$).⁷
- (c) Technetium tartrate analysis: A 10 μ L sample of the preparation was spotted on a RP-C18 plate. It was developed using *saline solution:methanol:acetic acid* (55:45:1). [^{99m}Tc]-tartrate and free perchnetate migrate with the solvent front ($R_f = 0.8 - 0.9$) and [^{99m}Tc]-ciprofloxacin is found at the origin ($R_f = 0$). To estimate the [^{99m}Tc]-tartrate content, the value of free perchnetate found in (a) was subtracted from the percentage obtained with this procedure.

Conclusions

The observed relationship between [ciprofloxacin]/[tartaric acid] and [^{99m}Tc]-ciprofloxacin labelling is consistent with the exchange ligand role for tartrate anion. Furthermore, tartaric acid and tin(II) chloride can be a useful alternative to tin(II) tartrate because the labelling reaction can be performed at low tartrate concentration. The highest radiochemical purity in [^{99m}Tc]-ciprofloxacin labelling was achieved when a [ciprofloxacin]/[tartaric acid] molar ratio in the range 50–100 was used. Finally, the study has shown that it is necessary to control the [^{99m}Tc]-tartrate formed in the reaction and TLC-RP-C18 is a convenient method to achieve this.

Acknowledgements

This research was supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica.

References

1. Larikka MJ, Ahonen AK, Niemela O, Junila JA, Hamalainen MM, Britton K, Syrjala H. *Nucl Med Commun* 2002; **23**(7): 655–661.
2. Britton KE, Vinjamuri S, Hall AV, Solanki K, Siraj QH, Bomanji J, Das S. *Eur J Nucl Med* 1997; **24**(5): 553–556.
3. Vinjamuri S, Hall AV, Solanki KK, Bomanji J, Siraj Q, O'Shaughnessy E, Das S, Britton KE. *Lancet* 1996; **347**(8996): 233–235.
4. Britton KE, Wareham DW, Dass SS, Solanki KK, Amaral H, Bhatnagar A, Katamihardja AHS, Malamitsi J, Moustafa HM, Soroa VE, Sundram FX, Padhy AK. *J Clin Path* 2002; **55**(11): 817–823.

5. Sarda L, Crémieux A, Lebellec Y, Meulemans A, Lebtahi R, Hayem G, Génin R, Delahaye N, Hutten D, Le Guludec D. *J Nucl Med* 2003; **44**(6): 920–926.
6. Oh SJ, Ryu J, Shin JW, Yoon EJ, Ha H, Cheon JH, Lee HK. *Appl Rad Isot* 2002; **57**: 193–200.
7. Siaens RH, Rennen JH, Boerman OC, Dierckx R, Slegers G. *J Nucl Med* 2004; **45**(12): 2088–2094.
8. Kleisner I, Komarek P, Komarkova I, Konopkova M. *Nuklearmedizin* 2002; **41**: 224–229.
9. Saha GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy* (5th edn). Springer: Berlin, 101.
10. López-Gresa MP, Ortiz R, Perelló L, Latorre J, Liu-González M, García-Granda S, Pérez-Priede M, Cantón E. *J Inorg Biochem* 2002; **92**: 65–74.

Resumen:Marcaje:

Partiendo de una solución de ciprofloxacino clorhidrato con 2 mg disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica, se añaden 0,1 mg de Cloruro de estaño(II) disueltos en 0,1 ml de ácido clorhídrico. Después, 0,1 ml de una solución acuosa de ácido L-tartárico se incorporó a la anterior solución resultante y se agitó para homogeneizar. Finalmente se añadió tecnecio libre ($[^{99m}\text{TcO}_4]^-$) recién eluido con una actividad que oscilaba entre 0,2 y 1,1 GBq. Una vez realizada esta acción, se dejó 15 minutos a temperatura ambiente agitando mientras la reacción de marcaje tiene lugar.

Con el fin de estudiar la influencia de la concentración de ácido tartárico, el procedimiento de marcaje también se efectuó con las siguientes concentraciones: 1 M, 100 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM y 0,1 mM. Estos valores corresponden a relaciones molares ciprofloxacino / ácido tartárico de 0,05; 0,5; 5; 10; 50; 100; 250 y 500 respectivamente.

Se realizaron 30 experimentos englobando las diferentes relaciones molares. Los resultados se expresan en porcentaje medio con la desviación estándar de cada posible compuesto formado en la reacción de marcaje: coloide marcado, tecnecio libre, tartrato marcado y antibiótico marcado.

Control de calidad:

Consiste en la combinación de 3 cromatografías en capa fina, 2 de ellas en fase normal y la otra en fase reversa para poder identificar la proporción (%) de impurezas presentes en la muestra:

- a) Para detectar el $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$, una gota de la preparación final se sembró en una tira de sílica-gel. Se desarrolló con acetona como fase móvil y el Tecnecio libre migra con el frente de disolvente ($R_f = 1$)

- b) Para evaluar la cantidad de coloide marcado se usa también una tira de sílica-gel pero con Etanol/Agua/Hidróxido amónico 25% en unas proporciones de 2:5:1. El coloide se encuentra en el punto de aplicación ($R_f = 0$)
- c) Para la detección de Tartrato de ^{99m}Tc se utiliza una placa C18 (fase reversa) como fase móvil y NaCl 0,9%/Metanol/Ác.Acético (55:45:1). Tanto el tecnecio libre ($[^{99m}\text{TcO}_4^-]$) como el ^{99m}Tc -tartrato migran con el frente de disolvente ($R_f = 0,8 - 0,9$) y el ^{99m}Tc -ciprofloxacino se queda en el origen ($R_f = 0$). Para calcular la cantidad de ^{99m}Tc -tartrato, la proporción de Tecnecio libre encontrado en el apartado a) se restó a la encontrada en este punto.

Los resultados de marcaje son los siguientes:

La cantidad de especies coloidales aumentan a medida que disminuye la cantidad de ácido tartárico añadido al medio. Si se eleva la proporción de ácido tartárico disminuyen, pero llega un punto que encontramos un exceso de tartrato de tecnecio. La máxima pureza correspondiente al antibiótico marcado se obtiene con una relación molar [ciprofloxacino] / [ácido tartárico] de 50 – 100.

5.2. Acumulación in vitro en bacterias

Trabajo: "Acumulación del [^{99m}Tc]-Ciprofloxacino en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*" (Accumulation of [^{99m}Tc]-Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2691-2692)

Factor de impacto: 4,672

Primer cuartil

Accumulation of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*[∇]

J. M. Sierra,^{1*} D. Rodriguez-Puig,² A. Soriano,¹ J. Mensa,¹ C. Piera,² and J. Vila³

Department of Infectious Diseases,¹ CDB, Department of Nuclear Medicine,² and Department of Microbiology,³ Hospital Clinic, IDIBAPS, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 15 February 2008/Returned for modification 17 March 2008/Accepted 5 May 2008

The use of radiopharmaceuticals for the diagnosis of infection is increasing due to their ability to distinguish between septic and aseptic inflammation. The aim of this study was to analyze the intracellular accumulation of technetium-99m-ciprofloxacin in strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* harboring an overexpression of NorA and MexAB-OprM, respectively.

The use of radiolabeled antibiotics is an emergent technique for the diagnosis of infection due to the agents' abilities to differentiate between septic and aseptic inflammation (3, 11). The usefulness of technetium-99m (^{99m}Tc)-ciprofloxacin to diagnose infections with orthopedic devices or to identify the source of an infectious fever of unknown origin has been described previously. However, the influence that the susceptibility of the bacterium to the radiolabeled antibiotic has on the efficacy of this tracer for the diagnosis of infection is not well established (8).

Ciprofloxacin is a broad-spectrum fluoroquinolone that inhibits DNA gyrase and/or topoisomerase IV of bacteria (7). Resistance to ciprofloxacin is mediated by the alteration of these targets and/or the overexpression of efflux pumps (1, 7, 9, 10). The second mechanism of resistance decreases intracellular concentration of ciprofloxacin. Therefore, the expression of efflux pumps could reduce the ability of ^{99m}Tc -ciprofloxacin to detect the presence of resistant microorganisms. The aim of this study was to analyze the intracellular accumulation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains with and without the presence of an efflux pump as the mechanism of resistance.

The accumulation of free ciprofloxacin, ^{99m}Tc -ciprofloxacin, and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetate) was evaluated with two strains of *S. aureus*, 1199B and 1199 (with and without the overexpression of the NorA efflux system) (2), and two strains of *P. aeruginosa*, PAOLC1-6 and KG2239 (with and without the overexpression of the MexAB-OprM efflux system) (1). Evaluation of the accumulation of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was performed to ensure that all of the radioactivity signal was due to the ^{99m}Tc -ciprofloxacin. Also, the accumulation of nonlabeled ciprofloxacin was done to ensure that *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains were able to pump out this antibiotic.

The labeling of ciprofloxacin with ^{99m}Tc was performed by following a previously described method (6). Briefly, a solution of tin(II) chloride dihydrate (0.1 mg in 0.1 ml of hydrochloric

acid, 0.01 N) was added to a solution of ciprofloxacin hydrochloride (2 mg) in 1 ml of saline. Next, 0.1 ml of an aqueous solution of L-tartaric acid was added to the resulting solution, which was vigorously stirred. Finally, freshly eluted pertechnetate (0.2 to 1.1 GBq) was added, and the resulting solution was vigorously stirred and kept at room temperature for 15 min.

Accumulation was performed as described previously and measured at two different end points, 5 and 30 min (4, 5, 9). Briefly, strains were cultured in Luria-Bertani broth overnight at 37°C. Cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline to an optical density at 600 nm of 1.5. After that, 490 μl was taken, and 10 μl of ciprofloxacin was added to obtain an extracellular concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (^{99m}Tc -ciprofloxacin presented an activity of about 555 kBq/sample, and free $^{99m}\text{TcO}_4^-$ presented an activity of about 555 kBq/sample), and samples were incubated at 37°C for 5 or 30 min. Finally, samples were washed three times with phosphate-buffered saline. The accumulation of ciprofloxacin (unlabeled) was measured by fluorimetry, the wavelength for excitation/emission used was 278/447 nm, respectively (previously, samples were lysed with glycine-HCl buffer), and accumulations of ^{99m}Tc -ciprofloxacin and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ were measured by a gamma counter. The percentage of each accumulation of ^{99m}Tc -ciprofloxacin and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was calculated as the ratio of the radioactivity in the pellet (cells) and that of the total radioactivity used per sample. All the samples were processed in duplicate, and three independent experiments were performed.

Results of the accumulation of free ciprofloxacin, ^{99m}Tc -ciprofloxacin, and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ are summarized in Table 1. The accumulation of unlabeled ciprofloxacin in the *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains showing overexpression of an efflux pump was lower than that for strains without an efflux pump overexpressed. ^{99m}Tc -ciprofloxacin accumulated equally intracellularly in all the strains tested, disregarding the presence or absence of an efflux system, while $^{99m}\text{TcO}_4^-$ did not show accumulation in any of the strains. The absence of intracellular $^{99m}\text{TcO}_4^-$ demonstrated that the entire radioactivity detected in the ^{99m}Tc -ciprofloxacin assay was due to the accumulation of the radiopharmaceutical compound and not due to free $^{99m}\text{TcO}_4^-$. The reason why ^{99m}Tc -ciprofloxacin was not pumped out remains unknown, but two different explanations are possible: first, this complex may not be recognized by the

* Corresponding author. Mailing address: Dept. of Infectious Diseases, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel 170, Esc 11-5 planta, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 34 93 2275708. Fax: 34 93 4514438. E-mail: jmsierra@clinic.ub.es.

[∇] Published ahead of print on 12 May 2008.

TABLE 1. Accumulation of free ciprofloxacin, ^{99m}Tc -ciprofloxacin, and $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in *S. aureus* and *P. aeruginosa*

Strain	Accumulated unlabeled ciprofloxacin at 30 min (ng ciprofloxacin/mg [dry wt] \pm SD)	Accumulated radioactivity (% \pm SD) ^a			
		Tc ^{99m} -ciprofloxacin at 5 min	Tc ^{99m} -ciprofloxacin at 30 min	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ at 5 min	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ at 30 min
<i>S. aureus</i> wild type 1199	47.72 \pm 5.37	6.5 \pm 1.5	22 \pm 3.2	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.005
<i>S. aureus</i> efflux 1199B	27.24 \pm 2.89	7.1 \pm 2.1	23 \pm 2.9	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
<i>P. aeruginosa</i> wild type KG2239	68.74 \pm 4.93	8.7 \pm 2.3	16.3 \pm 1.7	0.01 \pm 0.005	0.01 \pm 0.01
<i>P. aeruginosa</i> efflux PaoLC1-6	21.65 \pm 6.04	9.7 \pm 1.5	18.7 \pm 2.0	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.005

^a Percentages of radioactivity were derived by comparing radioactivity inside the bacterial cells with the total radioactivity used in the assay. All the results are the means \pm standard deviations (SD) of at least three independent experiments.

efflux systems, or second, the ^{99m}Tc -ciprofloxacin complex inside the cell could be disassociated, and free pertechnetate did not cross the membrane, as the result of the accumulation of free pertechnetate showed.

Finally, our results suggest that (i) radiolabeled ciprofloxacin accumulates in the bacteria and (ii) this compound is not recognized by the efflux pumps, resulting in a high intracellular concentration even in the case of overexpression of efflux pumps. In the future, it will be necessary to confirm these results in a clinical setting.

REFERENCES

1. Conejo, M. C., L. Martinez-Martinez, I. Garcia, L. Picabea, and A. Pascual. 2003. Effect of siliconized latex urinary catheters on the activity of carbapenems against *P. aeruginosa* strains with defined mutations in *ampC*, *oprD*, and genes coding for efflux systems. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:122–127.
2. Kaatz, G. W., and S. M. Seo. 1997. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2733–2737.
3. Malamitsi, J., H. Giamarellou, K. Kanellakopoulou, E. Dounis, V. Grecka, J. Christakopoulos, G. Koratzanis, A. Antoniadou, G. Panoutsopoulos, C. Batsakis, and C. Proukakis. 2003. Infection: a ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical for the detection of bone infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:101–109.
4. Martinez-Martinez, L., I. Garcia, M. C. Conejo, P. Joyanes, and A. Pascual. 2000. Accumulation of b-lactams and quinolones into bacteria cells, p. 63–72. *In* V. J. Benedi, R. Canton, M. A. Dominguez, L. Martinez, and J. Vila (ed.), *Antimicrobial resistance: a laboratory approach*. Biomerieux, Madrid, Spain.
5. Piddock, L. V. J. 1997. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**:399–403.
6. Rodriguez-Puig, D., C. Piera, D. Fuster, A. Soriano, J. M. Sierra, S. Rubi, and J. Suades. 2006. A new method of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin preparation and quality control. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **49**:1171–1176.
7. Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1109–1117.
8. Sarda, L., A. C. Cremieux, Y. Lebellec, A. Meulemans, R. Lebtahi, G. Hayem, R. Genin, N. Delahaye, D. Hutten, and D. Le Guldec. 2003. Inability of ^{99m}Tc -ciprofloxacin scintigraphy to discriminate between septic and sterile osteoarticular diseases. *J. Nucl. Med.* **44**:920–926.
9. Sierra, J. M., J. G. Cabeza, M. Ruiz Chaler, T. Montero, J. Hernandez, J. Mensa, M. Llagostera, and J. Vila. 2005. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:750–758.
10. Sierra, J. M., F. Marco, J. Ruiz, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila. 2002. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:781–790.
11. Welling, M. M., A. Paulusma-Annema, H. S. Balter, E. K. Pauwels, and P. H. Nibbering. 2000. Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. *Eur. J. Nucl. Med.* **27**:292–301.

Resumen:

La acumulación del antibiótico ciprofloxacino sin marcar, el marcado (^{99m}Tc -Ciprofloxacino) y tecnecio libre ($[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$) se evaluó en 2 cepas de *S. aureus*, 1199B y 1199 (con y sin la sobreexpresión del sistema de flujo NorA como mecanismo de resistencia) (106), y 2 cepas de *P. aeruginosa*, PAOLC1-6 y KG2239 (con y sin la sobreexpresión del sistema de flujo MexAB-OprM) (107). La evaluación de la acumulación de Tecnecio libre se realizó para demostrar si toda la señal radiactiva intracelular era debida al antibiótico marcado. Además, fue necesario valorar también la acumulación de ciprofloxacino sin marcar para obtener la certeza de que los sistemas de flujo (resistencia bacteriana a quinolonas) podían bombear el antibiótico hacia fuera de la célula bacteriana.

La acumulación se midió en 2 puntos diferentes, a los 5 y 30 minutos según otros autores (108,109). Las cepas bacterianas se cultivaron de noche en caldo Luria-Bertani a 37°C. Las células fueron lavadas y resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,5. Después se añadió ciprofloxacino hasta obtener una concentración extracelular de 10 µg/ml. El ^{99m}Tc -Ciprofloxacino y el Tecnecio libre presentaron una actividad de 555 kBq/muestra. La acumulación de ciprofloxacino libre se midió mediante fluorimetría. La longitud de onda para excitación/emisión usada fue de 278/447 nm respectivamente (previamente las células se lisaron con tampón glicina-HCl). La acumulación de los compuestos radiactivos (^{99m}Tc -Ciprofloxacino y tecnecio libre) se midió por contador gamma y sus porcentajes se calcularon como el cociente de radiactividad del botón celular respecto la radiactividad total por muestra. Los resultados son la media \pm la desviación estándar. Todas las muestras se procesaron por duplicado en 3 experimentos independientes.

Los resultados mostraron que el antibiótico sin marcar se acumulaba menos en las cepas resistentes. En cambio, el antibiótico marcado se acumulaba aproximadamente en igual grado tanto en las cepas resistentes como en las que no, tanto a los 5 como a los 30 minutos. El tecnecio libre no se acumuló en ningún caso.

5.3. Aplicación clínica en prótesis osteoarticulares

Trabajo: “Utilidad de la gammagrafía con [^{99m}Tc]-Ciprofloxacino en el diagnóstico de infecciones de prótesis articulares” (*Usefulness of [^{99m}Tc]-Ciprofloxacin scintigraphy in the diagnosis of prosthetic joint infections. Nucl Med Commun 2010; 32:44-51*)

Factor de impacto: 1,367

Tercer cuartil

Usefulness of ^{99m}Tc -ciprofloxacin scintigraphy in the diagnosis of prosthetic joint infections

David Fuster^a, Alex Soriano^b, Sebastian Garcia^c, Carlos Piera^a, Joan Suades^d, Dani Rodríguez^a, Juan C. Martinez^c, Josep Mensa^b, Francisco Campos^a and Francesca Pons^a

Objective To evaluate the usefulness of ^{99m}Tc -ciprofloxacin scintigraphy (CFS) in patients with hip or knee arthroplasty and suspected infection.

Methods Forty patients (26 women, 14 men) with a mean age of 66 ± 10 years and local pain in the hip (21), knee (16), or shoulder (three) prosthesis were recruited. CFS was performed at 1, 4, and 24 h after intravenous injection of 370 MBq. Anterior and posterior views centered on the affected joint were performed in all patients. A routine bone scan, ^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamine oxime leukocyte scan, and ^{99m}Tc -colloid scan [leukocyte scintigraphy–bone marrow scintigraphy (LS–MS)] were performed. Final diagnosis of infection was confirmed by positive microbiological analysis or macroscopic evidence of purulent material.

Results Diagnosis of arthroplasty infection was established in 16 out of 40 cases: coagulase-negative staphylococci (nine), *Staphylococcus aureus* (three), *Enterococcus* (one), and macroscopic infection in the remaining three cases. CFS imaging showed the 24-h image to be the best acquisition time-point. The sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value for LS–MS were 75, 92, 86,

and 85%, whereas for CFS at 24 h these figures were 88, 71, 67, and 89%. The sensitivity and specificity for LS–MS and for CFS at 24 h for hip were (74, 90, and 88, 85%) and for knee (83, 90 and 100, 50%).

Conclusion CFS can be useful in the diagnosis of arthroplasty infection of the hip as a substitute for LS–MS. It is recommended that CFS images be obtained 24 h after injection. The lack of specificity of CFS makes this technique inadequate for knee prostheses in this series. *Nucl Med Commun* 32:44–51 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Nuclear Medicine Communications 2011, 32:44–51

Keywords: bone marrow scintigraphy, joint prosthesis, ^{99m}Tc -ciprofloxacin, ^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamine oxime-leukocyte, osteoarticular infection

Departments of ^aNuclear Medicine, ^bInfectious Diseases, ^cOrthopedic Surgery and Traumatology, Hospital Clinic and ^dDepartment of Chemistry, UAB, Barcelona, Spain

Correspondence to Dr David Fuster, MD, Department of Nuclear Medicine, Hospital Clinic, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain
Tel: + 932275400 x2252; fax: + 934518137;
e-mail: dfuster@clinic.ub.es

Received 11 August 2010 Revised 15 September 2010
Accepted 25 September 2010

Introduction

The diagnosis of prosthetic joint infections is often difficult as the clinical symptoms and radiological signs are frequently indistinguishable from those of aseptic loosening. In these cases, it is necessary to perform complementary investigations to obtain a definitive diagnosis [1] that is essential to decide the best surgical approach (one or two-stage revision arthroplasty). However, there is no test that shows 100% sensitivity and specificity. Prosthetic surgery implies classical inflammatory signs that can mimic the presence of an active infection. The need to establish a correct diagnosis of infection relies on the immediate administration of specific treatment for success and to avoid a prosthesis replacement [2]. Infection may appear months or even years after prosthetic implant and is very difficult to differentiate from aseptic loosening. Both processes show pain, inflammatory signs, and radiological signs of prosthetic loosening.

Nuclear procedures are useful in the diagnosis and localization of infectious processes that are not evident

by physical examination [3]. Anatomic imaging, such as computed tomography or magnetic resonance, is not useful in the clinical routine to evaluate inflammatory activity. However, scintigraphic techniques are not specific enough to distinguish between sterile inflammation and infection. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) are acute-phase reactants that increase during infectious processes; however, their specificity is low [4,5]. Guided biopsy by computed tomography is highly specific (approximately 95%) and allows identification of the etiologic infectious agent. Nonetheless, sensitivity is widely variable (50–90%) [6–8].

Usually ^{99m}Tc -hexamethylpropyleneamine oxime-leukocyte scintigraphy (LS) not only shows high sensitivity (10) but also highly variable specificity that can range from 60 to 91% [9,10]. Labeled white cells migrate to the inflammatory focus independently of the etiologic process and this is fundamental to the characterization of infected joint prostheses. It has been reported that ^{99m}Tc -colloid bone marrow scintigraphy (MS) may be

useful for distinguishing between activated bone marrow and leukocyte deposits because of active infection [11–14].

^{99m}Tc-Ciprofloxacin scintigraphy (CFS) has been used with contradictory results in the diagnosis of different infectious processes, but most studies showed a heterogeneity of the recruited patients making it difficult to interpret the results that have been obtained [15,16]. Ciprofloxacin is incorporated by bacteria and binds to the DNA gyrase; therefore, it is reasonable to believe that using CFS could imply a better specificity than leukocyte labeling for the diagnosis of infection. When Britton *et al.* performed this technique, they obtained specificity values of up to 95% [17–19]. However, the method of the preparation of this labeled compound is critical because a significant amount of colloid is frequently formed, which, in turn, accumulates in the inflammation sites yielding false-positive results. A new labeling method for ciprofloxacin tartaric acid and tin(II) chloride, instead of tin(II), has minimized colloid formation [20].

The aim of our study was to evaluate the sensitivity of CFS in the diagnosis of prosthetic joint infections.

Materials and methods

Patients

The study was a single-center, phase II, prospective clinical trial of a diagnostic test to evaluate the usefulness of CFS in the diagnosis of prosthetic joint infection (Agencia Española del Medicamento, protocol 03-0090). Forty patients with total hip ($n = 21$), knee ($n = 16$), or shoulder ($n = 3$) prostheses (26 women, 14 men), with a mean age of 66 ± 10 years, and localized prosthetic pain were prospectively recruited. The median follow-up time after primary operation was 1.5 years. Values of ESR (millimeter/hour) and CRP (milligram/deciliter) were determined in all patients. To be included in the study, patients should not have received any type of antibiotic therapy in the 3 months before inclusion.

Diagnosis and follow-up

The final diagnosis of prosthetic joint infection was established when in two or more than two cultures out of six from the periprosthetic tissue were positive for the same microorganism or macroscopic evidence of purulent material. Standard prospective follow-up included outpatient visits at 0.5, 1, 3, 6, and 12 months with clinical, analytical, and radiological evaluation (plain radiograph). The exclusion of infection was established when (i) six intraoperative cultures and histopathology obtained during arthroplasty revision were negative (ii) in the absence of evidence of infection after 12 months of follow-up in those patients not candidates for surgery. The study

project was approved by the local hospital ethics committee and written informed consent was obtained from each patient.

Imaging acquisition

All patients underwent a conventional bone scan and combined LS and MS scan, as is routinely performed in our center. CFS was performed at 1, 4, and 24 h after intravenous injection of 370 MBq of activity. All images were acquired in a double-headed γ -camera (ECAM, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a low-energy, all-purpose collimator. A matrix of 256×256 (zoom 1) was used. Time acquisition was 600 s for 1 and 4 h images and 900 s for 24-h sets. Anterior and posterior views centered on the affected joint were performed in all patients. Lateral views of the involved joint were examined only when required for the interpretation of the findings. All images were interpreted by three blinded nuclear medicine physicians.

Ciprofloxacin labeling

The labeling of ciprofloxacin with ^{99m}Tc was done by following a method described earlier [20]. Briefly, a solution of tin(II) chloride dihydrate (0.1 mg in 0.1 ml of hydrochloric acid, 0.01 N) was added to a solution of ciprofloxacin hydrochloride (2 mg) in 1 ml of saline. Next, 0.1 ml of an aqueous solution of L-tartaric acid was added to the solution, which was then stirred vigorously. Finally, freshly eluted pertechnetate (0.2–1.1 GBq) was added, and the resulting solution was vigorously stirred and kept at room temperature for 15 min. A whole-body scan was taken for radiotracer distribution as a quality control of the labeling.

Statistical analysis

The variables ESR and CRP were analyzed using the Mann–Whitney test. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and bar graphics were calculated for combined LS–MS, and CFS at 1, 4, and 24-h imaging. The concordance between combined LS–MS with CFS at 24 h, calculated using κ , was evaluated.

Results

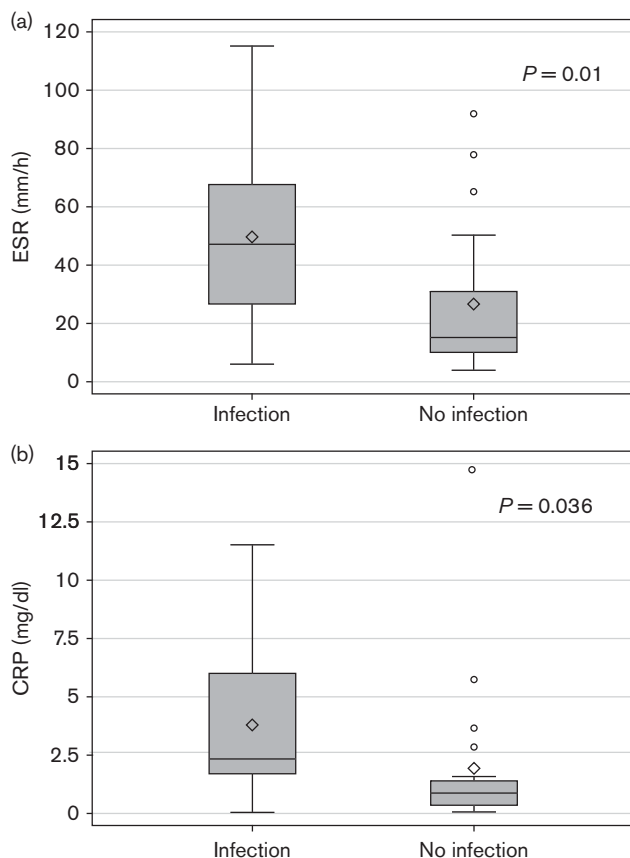
From the 40 patients included in the study, infection was documented in 16 out of 40 cases, that is, eight hips, six knees, and two shoulder prostheses cases. The etiologic microorganisms were coagulase-negative staphylococci in nine, *Staphylococcus aureus* in three, *Enterococcus* spp in one, and cultures were negative in three cases but purulent material was drained and they were classified as infections. Nine of the isolated microorganisms were resistant to ciprofloxacin. In the other 24 out of the 40 patients, the diagnosis of infection was excluded. Seventeen cases underwent revision arthroplasty and all intraoperative cultures were negative (six samples per

patient) and the remaining seven patients did not show evidence of development of infection in the follow-up. The ESR (normal range: 1–15 mm/h) and CRP (normal range: 0.0–0.8 mg/dl) were significantly higher in infected than in noninfected patients (49.6 ± 29.2 compared with 26.4 ± 23.4 ; $P = 0.01$ for ESR and 3.8 ± 3.2 compared with 1.9 ± 3.2 ; $P = 0.0036$ for CRP) (Fig. 1). However, among noninfected patients, 11 (46%) and 12 (50%) cases had ESR and CRP levels higher than normal values, respectively.

Global imaging analysis

The bone scan showed some type of increased uptake in 100% of the patients studied, with a periprosthetic diffuse appearance (31 out of 40 patients) or with areas of increased uptake in the acetabulum and tip of the stem (nine out of 40 patients). No significant differences were observed in the uptake patterns between infected patients or those without infection. The blood pool phase of the bone scan was positive in only four out of the 16 infected patients (25%). The sensitivity and specificity of combined LS–MS was 75 and 92% with a PPV of

Fig. 1



The distribution of erythrocyte sedimentation rate (ESR) (a) and C-reactive protein (CRP) (b) in the group of patients with infection was significantly higher than in the group of noninfected patients.

Table 1 Results obtained by using combined LS–MS in the global analysis

Diagnosis	LS–MS		Total
	Negative	Positive	
Noninfected	22	2	24
Infection	4	12	16
Total	26	14	40

LS–MS	95% CI	
	Lower limit	Upper limit
Sensitivity	0.75	0.91
Specificity	0.92	0.99
PPV	0.86	0.97
NPV	0.85	0.94

CI, confidence interval; LS–MS, leukocyte scintigraphy–bone marrow scintigraphy; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

86% and NPV of 85% (Table 1). CFS imaging was independently analyzed at 1- 4- and 24-h time-points, and in all potential combinations (Fig. 2) showing 24-h imaging as the best acquisition time-point with sensitivity, specificity, PPV, and NPV of 88, 71, 67, and 89%, respectively (Table 2). In all the five infected patients with a ciprofloxacin-resistant strain, CFS was positive for infection (Fig. 3). The concordance between combined LS–MS with CFS at 24 h was low [$\kappa = 0.36$; 95% confidence interval (CI): 0.09–0.63].

Hip arthroplasty imaging analysis

The sensitivity, specificity, PPV, and NPV for combined LS–MS were 74, 90, 86, and 86% and for CFS at 24 h were 88 and 85%, 78 and 92%. We found only two false negatives (two out of eight cases) and one false positive (one out of 13 cases) showing a faint uptake in the proximal component of the prosthesis. The concordance between combined LS–MS with CFS at 24 h was moderate ($\kappa = 0.40$; 95% CI: 0.01–0.79).

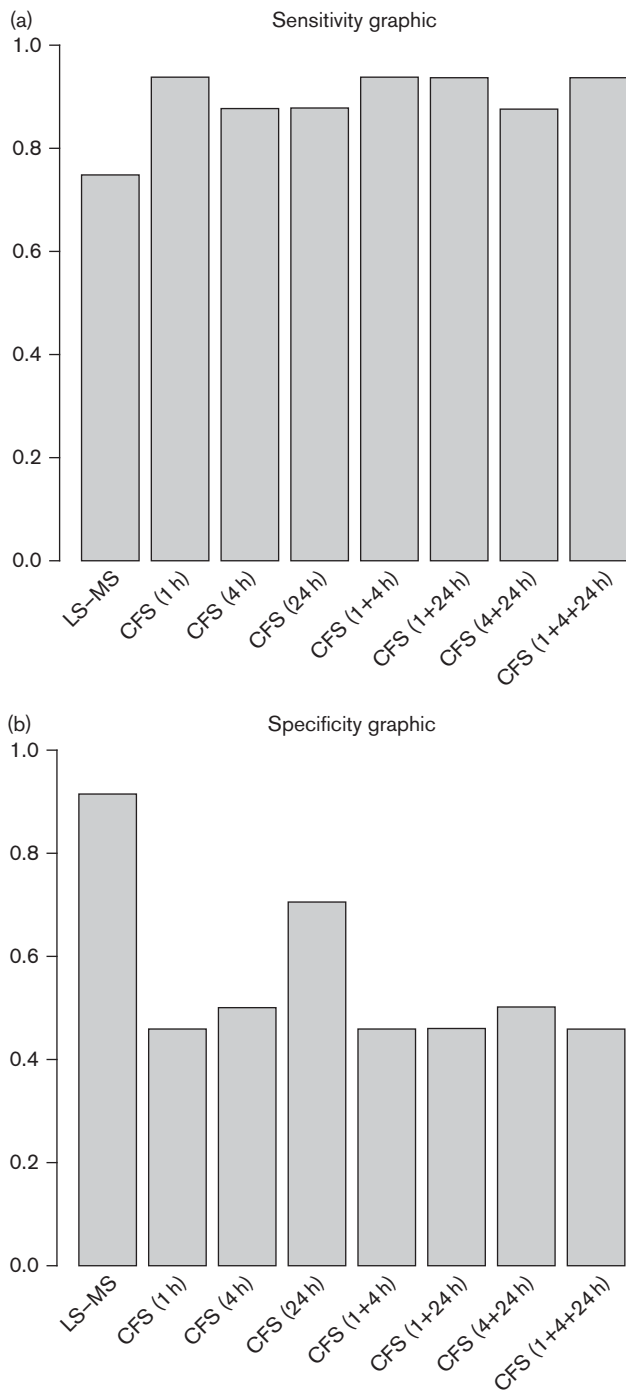
Knee arthroplasty imaging analysis

The sensitivity, specificity, PPV, and NPV for combined LS–MS were 83, 90, 83, and 90%, and for CFS at 24 h were 100, 50, 55, and 100%. The results show a low specificity for CFS in knee arthroplasty. There were no false-negative cases in the analysis of infection of the knee prosthesis (0 out of six cases); however, we found five false-positive cases from a total number of 10 noninfected knee prostheses. In all cases a diffuse uptake surrounding the prosthesis was seen (Fig. 4). The concordance between combined LS–MS with CFS at 24 h was low ($\kappa = 0.20$; 95% CI: 0.18–0.58).

Shoulder arthroplasty imaging analysis

We included only three cases with suspected shoulder prostheses infection, two of which were subsequently confirmed as infections. Both combined LS–MS and CFS at 24 h were only able to detect one of the two infected patients. However, in the patient without infection both procedures were negative.

Fig. 2



Sensitivity (a) and specificity (b) of combined leukocyte scintigraphy-bone marrow scintigraphy (LS-MS) and ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy (CFS) imaging independently analyzed at 1, 4, and 24 h time-points and in all potential combinations in the global analysis.

Discussion

The diagnosis of prosthetic joint infection using the current standard procedures is still problematic for orthopedic surgeons; therefore, new techniques that help

Table 2 Results obtained by using CFS at 1, 4, and 24 h imaging time-point in the global analysis

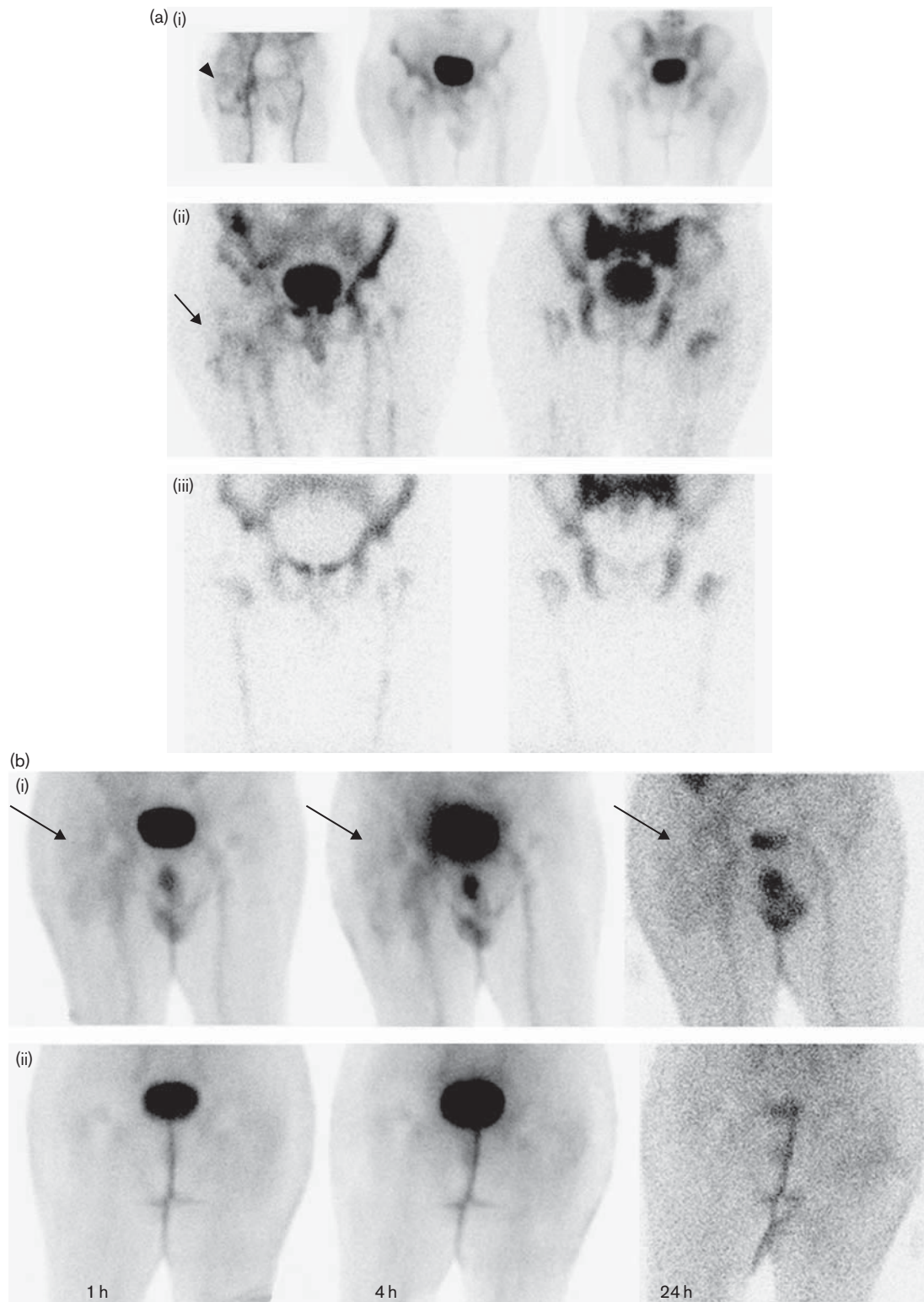
		CFS (1 h)		
Diagnosis	Negative	Positive	Total	
Noninfected	11	13	24	
Infection	1	15	16	
Total	12	28	40	
		95% CI		
CFS (1 h)		Lower limit	Upper limit	
Sensitivity	0.94	0.75	1.00	
Specificity	0.46	0.28	0.65	
PPV	0.54	0.36	0.71	
NPV	0.92	0.68	1.00	
		CFS (4 h)		
Diagnosis	Negative	Positive	Total	
Noninfected	12	12	24	
Infection	2	14	16	
Total	14	26	40	
		95% CI		
CFS (4 h)		Lower limit	Upper limit	
Sensitivity	0.88	0.67	0.98	
Specificity	0.50	0.31	0.69	
PPV	0.54	0.36	0.72	
NPV	0.86	0.63	0.97	
		CFS (24 h)		
Diagnosis	Negative	Positive	Total	
Noninfected	17	7	24	
Infection	2	14	16	
Total	19	21	40	
		95% CI		
CFS (24 h)		Lower limit	Upper limit	
Sensitivity	0.88	0.67	0.98	
Specificity	0.71	0.52	0.86	
PPV	0.67	0.46	0.84	
NPV	0.89	0.71	0.98	

CFS, ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy; CI, confidence interval; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

surgeons to rule out or confirm infection are of interest. Clinical symptoms are often vague and analytical parameters, such as ESR and CRP, are often inconclusive [4,5]. In our cohort the ESR and CRP of those patients with infection were significantly higher than in non-infected patients (49.6 ± 29.2 compared with 26.4 ± 23.4 ; $P = 0.01$ for ESR and 3.8 ± 3.2 compared with 1.9 ± 3.2 ; $P = 0.0036$ for CRP). However, ESR and CRP showed higher-than-normal levels in 11 (46%) and in 12 (50%) out of 24 noninfected patients, respectively. This indicates that these parameters have a high sensitivity but low specificity and could be useful for initial screening.

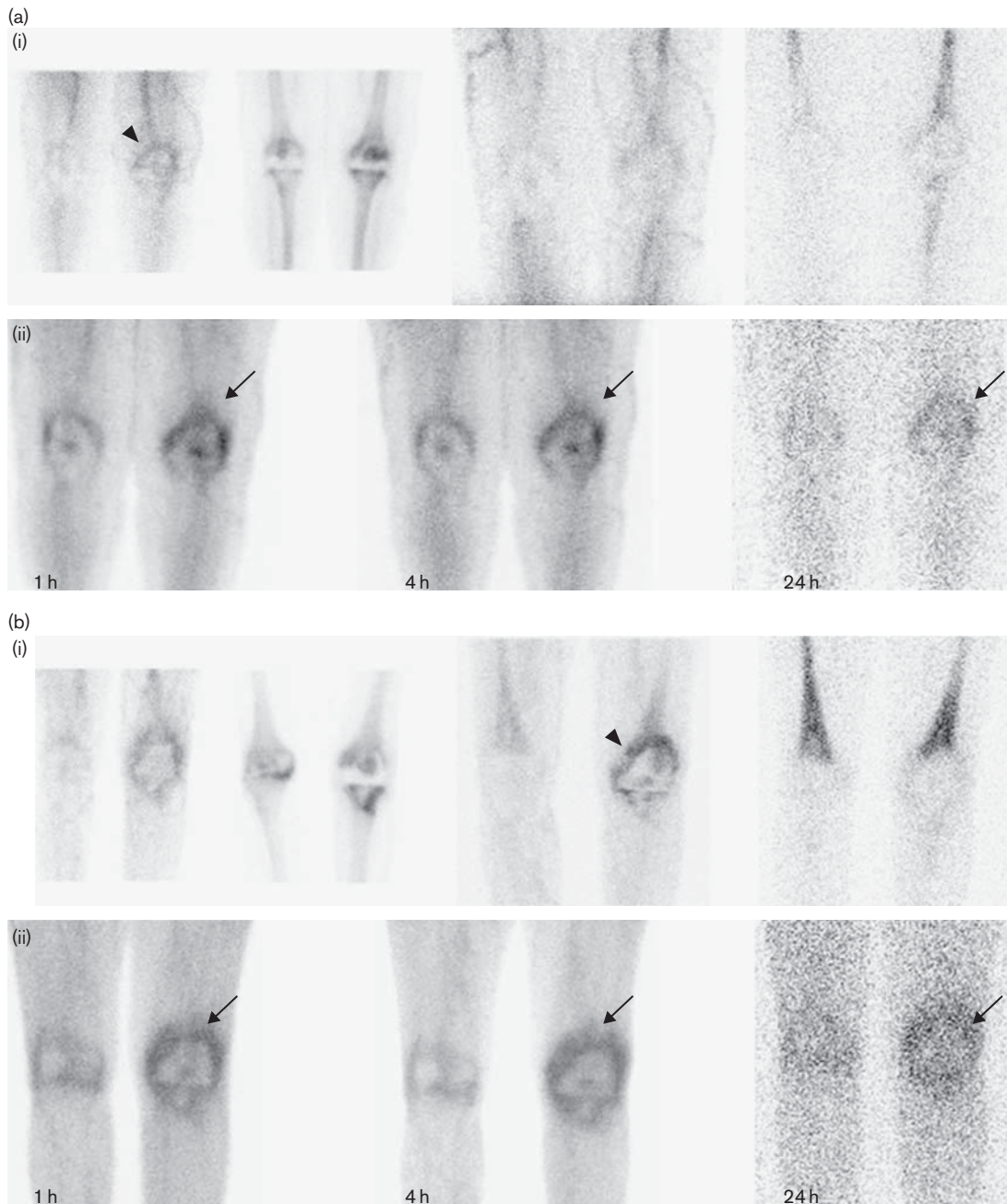
A wide variety of nuclear medicine procedures can be used and, in general, it is accepted that a normal study is a strong indicator against prosthetic joint infection, however, their specificity for differentiating aseptic loosening from infection is low [21–23]. At present, LS is still the most widely accepted imaging tool in the diagnosis of most infectious processes. However, published series using LS in the diagnosis of prosthetic joint infection show inaccuracies because of the specific characteristics of such locations. Several studies have shown higher specificity of MS combined with LS (LS-MS) compared with LS alone [14]. In these series, the global imaging analysis showed that the sensitivity and

Fig. 3



(a) Patient with infection of the right total hip prosthesis showing hyperemia in the blood pool phase (arrowhead) and increased uptake in the acetabulum in the bone phase of the bone scintigraphy (i). In the leukocyte scintigraphy, focal deposits compatible with infection in the right coxofemoral joint with fistulous trajectory toward the outer side of the thigh can be seen (arrows) (ii). The bone marrow scintigraphy is inconsistent with the leukocyte scintigraphy, suggesting active infection (iii). (b) ^{99m}Tc -ciprofloxacin scintigraphy at 1, 4, and 24 h image acquisitions show a pathological uptake that is more evident in the anterior views (arrows) (i) at all time-points and considered as true positive (ii). The patient presented a confirmed resistant strain.

Fig. 4



(a) Patient with aseptic loosening of the left knee prosthesis showing a diffuse uptake pattern in the vascular (arrowhead) and bone phase of the bone scintigraphy. In the leukocyte scintigraphy in anterior projection, a faint uptake in the femoral component consistent with the MS can be seen, discarding an active infectious process (i). ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy at 1 and 4 h acquisitions show an intense diffuse uptake surrounding the prosthesis, which is less evident, but still positive in the 24 h scan (arrows) and considered as a false positive (ii). (b) Patient with confirmed infection of the left knee prosthesis showing a diffuse uptake pattern in the leukocyte scintigraphy (arrowhead) with a negative bone marrow scintigraphy (i). ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy at 1, 4, and 24 h image acquisitions show a pathological uptake at all time-points (arrows) and is considered as true positive (ii).

specificity of combined LS-MS were 75 and 92%, respectively, noting that the use of MS probably explains such high specificity. Bone scan has recently been proposed as an accurate technique for discarding infection using

triple-phase acquisition [24]. However, in our series, the blood pool phase was positive in only four out of our 16 infected patients (25%). Furthermore, we found some kind of increased periprosthetic uptake in 100% of the patients

studied in the late phase, with no significant differences in uptake patterns between infected patients and those without infection.

CFS may have potential as an LS substitute for several reasons: (i) there is no need for blood extraction, manipulation, and posterior autotransfusion of the patient's blood, thereby eliminating biological risk not only for the patient but also for the technicians in charge; (ii) CFS is easier to carry out than LS, which requires a longer time and qualified personnel; (iii) the effective dose is lower with CFS resulting in less irradiation of the patient; (iv) it is cheaper and can be used in neutropenic patients; and (v) there is an absence of bone marrow uptake using CFS compared with LS. Concordance between combined LS-MS and CF at 24 h was low ($\kappa = 0.36$; 95% CI: 0.09–0.63), probably indicating that the information from each radiopharmaceutical about the inflammatory or infectious process is not comparable.

We found a CFS image at 24 h in the study of hip arthroplasty infections showing high sensitivity of up to 88%, with a specificity of 85%. These values were comparable with those obtained using combined LS-MS, which reached 74 and 90%, respectively. The results obtained for hip prostheses infection by Larikka *et al.* [25] agree with our findings, suggesting that diagnostic accuracy of CFS can improve from 57 to 97% when the imaging time is extended to 24 h postinjection of the tracer. In contrast, our results with the CFS image at 24 h in knee prostheses showed low specificity of only 50% compared with Larikka *et al.* [26] who reported a figure of 76%. They considered patients as noninfected when a declining pattern of uptake between 1, 4, and 24 h after radiotracer injection was observed. In our series patients were considered as noninfected cases only when no significant uptake was seen in CFS images. This could explain the low specificity of our results in the analysis of the knee prostheses. However, the declining pattern criteria are difficult to identify because of the high background at 24-h imaging. Actually, we found no visual differences in the pattern of uptake at 24 h, with strong similarities in cases with or without infection, as can be seen in Fig. 4. Another explanation of the low specificity of CFS in knee prostheses could be because the posterior synovial membrane is usually preserved and it can give false-positive results in sterile inflamed joints [27]. Shoulder prostheses are relatively infrequent and consequently large series are needed to study their clinical complications. There were only three suspected infected shoulder arthroplasties out of the 40 cases included in this study. Combined LS-MS and CFS at 24 h were only able to detect one out of the two infected patients. Only in the noninfected case both the procedures were negative.

Interestingly, the five infected patients because of a ciprofloxacin resistant strain were positive for infection by CFS images. Resistance to ciprofloxacin is mediated by

the over-expression of efflux pumps and/or the alteration of their target. The over-expression of efflux pumps could decrease the intracellular accumulation of radiotracer reducing its ability to detect infection by resistant microorganisms; however, Sierra *et al.* [28] evaluated *in vitro* the impact of efflux pumps expression on the accumulation of radiolabeled ciprofloxacin in two *S. aureus* and two *Pseudomonas aeruginosa* strains (with and without efflux pumps) and they did not find any differences. These data suggest that the radiolabeled compound is not recognized by the efflux pumps and the intracellular concentration is maintained. Although the precise resistant mechanism of the isolated microorganisms in our clinical study was not investigated, this finding is in agreement with the clinical results described in this article.

In conclusion, CFS can be useful in the evaluation of suspected infection of hip prostheses, giving similar results when compared with LS-MS. CFS should at least include images taken 24 h after injection. The lack of specificity that CFS showed in our series would indicate that this technique is inadequate for the study of infection of knee prostheses. Further studies need to be carried out to establish the potential role of CFS in other joints.

Acknowledgement

Clinical trial was approved by the Agencia Española del Medicamento (AGEMED, Agency for Spanish drugs and health products), protocol number 03-0090.

References

- 1 Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg* 1999; **81**:672–683.
- 2 Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, Ilstrup DM, *et al.* *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. *Clin Infect Dis* 1997; **24**:914–919.
- 3 Peters AM. Localising the cause of undiagnosed fever. *Eur J Nucl Med* 1996; **23**:239–242.
- 4 White J, Kelly M, Dunsmuir M. C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. *J Bone Joint Surg* 1998; **80**:909–911.
- 5 Aalto K, Österman K, Peltola H, Räsänen J. Changes on erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein after total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1984; **184**:118–120.
- 6 Barrack RL, Harris WH. The value of aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 1993; **75**:66–67.
- 7 Roberts P, Walters AJ, McMinn DJ. Diagnosing infection in hip replacements. *J Bone Joint Surg* 1992; **74**:265–269.
- 8 Lachiewicz P, Rogers G, Thomason C. Aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. Clinical and laboratory factors influencing attainment of a positive culture. *J Bone Joint Surg* 1996; **78**:749–754.
- 9 Moragas M, Lomeña F, Herranz R, García A, Píera C, Muxi A, *et al.* ^{99m}Tc -HMPAO leucocyte scintigraphy in the diagnosis of bone infection. *Nucl Med Commun* 1991; **12**:417–427.
- 10 Rütther W, Hotze A, Möller F, Bockisch A, Heitzmann P, Biersack HK. Diagnosis of bone and joint infection by leucocyte scintigraphy: a comparative study with ^{99m}Tc -HMPAO-labelled leucocytes, ^{99}Tc -labelled antigranulocyte antibodies and ^{99m}Tc -labelled nanocolloid. *Arch Orthop Trauma Surg* 1990; **110**:26–32.
- 11 King AD, Peters AM, Stuttle AW, Lavender JP. Imaging of bone infection with labelled white blood cells: role of contemporaneous bone marrow imaging. *Eur J Nucl Med* 1990; **17**:148–151.

- 12 Muñoz A, Ricart Y, Hernández Hermoso J, Roca M, Fernández A, García V, *et al.* Radionuclide scan with Tc-99m-tin colloid in the evaluation of orthopedic implant infections. *Rev Esp Med Nucl* 1998; **17**:152–157.
- 13 Palestro CJ, Love C, Tronco GG, Tomas MB, Rini JN. Combined labeled leukocyte and technetium 99m sulfur colloid bone marrow imaging for diagnosing musculoskeletal infection. *Radiographics* 2006; **26**:859–870.
- 14 Fuster D, Duch J, Soriano A, García S, Bori G, Rubí S, *et al.* Potential use of bone marrow scintigraphy in suspected prosthetic hip infection evaluated with ^{99m}Tc-HMPAO-leukocytes. *Rev Esp Med Nucl* 2008; **27**:430–435.
- 15 Sarda L, Crémieux AC, Lebellec Y, Meulemans A, Lebtahi R, Hayem G, *et al.* Inability of ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy to discriminate between septic and sterile osteoarticular diseases. *J Nucl Med* 2003; **44**:920–926.
- 16 Sonmezoglu K, Sonmezoglu M, Halac M, Akgün I, Türkmen C, Onsel C, *et al.* Usefulness of ^{99m}Tc-ciprofloxacin (infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: comparative study with ^{99m}Tc-HMPAO leukocyte scintigraphy. *J Nucl Med* 2001; **42**:567–574.
- 17 Hall AV, Solanki KK, Vinjamuri S, Britton KE, Das SS. Evaluation of the efficacy of ^{99m}Tc-Infecton, a novel agent for detecting sites of infection. *J Clin Pathol* 1998; **51**:215–219.
- 18 Vinjamuri S, Hall A, Solanki KK, Bomanji J, Siraj Q, O'Shaughnessy E, *et al.* Comparison of ⁹⁹Tc infecton imaging with radiolabelled white cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet* 1996; **347**:233–235.
- 19 Britton K, Vinjamuri S, Hall A, Solanki K, Siraj QH, Bomanji J, *et al.* Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the localisation of bacterial infection. *Eur J Nucl Med* 1997; **24**:553–556.
- 20 Rodríguez-Puig D, Píera C, Fuster D, Soriano A, Sierra JM, Rubí S, *et al.* A new method of [^{99m}Tc]-ciprofloxacin preparation and quality control. *J Label Comp Radiopharm* 2006; **49**:1171–1176.
- 21 Chryssikos T, Parvizi J, Ghanem E, Newberg A, Zhuang H, Alavi A. FDG-PET imaging can diagnose periprosthetic infection of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 2008; **466**:1338–1342.
- 22 Rubello D, Rampin L, Banti E, Grassetto G, Massaro A, Cittadin S, *et al.* Diagnosis of infected total knee arthroplasty with antigranulocyte scintigraphy: the importance of a dual-time acquisition protocol. *Nucl Med Commun* 2008; **29**:331–335.
- 23 Gnanasegaran G, Croasdale J, Buscombe JR. Nuclear medicine imaging of infection and inflammation. *World J Nuc Med* 2005; **4**:127–137.
- 24 Nagoya S, Kaya M, Sasaki M, Tateda K, Yamashita T. Diagnosis of peri-prosthetic infection at the hip using triple-phase bone scintigraphy. *J Bone Joint Surg Br* 2008; **90**:140–144.
- 25 Larikka MJ, Ahonen AK, Niemelä O, Junila JA, Hämäläinen MM, Britton K, *et al.* Comparison of ^{99m}Tc ciprofloxacin, ^{99m}Tc white blood cell and three-phase bone imaging in the diagnosis of hip prosthesis infections: improved diagnostic accuracy with extended imaging time. *Nucl Med Commun* 2002; **23**:655–661.
- 26 Larikka MJ, Ahonen AK, Niemelä O, Puronto O, Junila JA, Hämäläinen MM, *et al.* ^{99m}Tc ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. *Nucl Med Commun* 2002; **23**:167–170.
- 27 Appelboom T, Emery P, Tant L, Dumarey N, Schoutens A. Evaluation of technetium-99m-ciprofloxacin (Infecton) for detecting sites of inflammation in arthritis. *Rheumatology* 2003; **42**:1179–1182.
- 28 Sierra JM, Rodríguez-Puig D, Soriano A, Mensa J, Píera C, Vila J. Accumulation of ^{99m}Tc-ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:2691–2692.

Resumen de la metodología:

Se trata de un ensayo clínico prospectivo, unicéntrico y en fase II para evaluar la utilidad del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino en el diagnóstico de infección de prótesis osteoarticulares (Agencia Española del Medicamento, protocolo 03-0090)

Se reclutaron 40 pacientes con dolor localizado en la prótesis (cadera, rodilla y hombro). El diagnóstico final de infección de prótesis osteoarticular se estableció cuando en 2 cultivos de tejido periprotésico de 6 sean positivos para el mismo microorganismo o haya evidencia macroscópica de material purulento. La adquisición de imágenes consistió en una gammagrafía ósea convencional y en la combinación de una gammagrafía con leucocitos marcados con ^{99m}Tc -HMPAO y una gammagrafía medular. La prueba con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino se realizó a las 1, 4 y 24 horas post inyección intravenosa de 370 MBq.

El radiofármaco objeto de estudio (^{99m}Tc -Ciprofloxacino) se preparó según el procedimiento citado anteriormente manteniendo las condiciones asépticas ambientales y de producto. De los 40 pacientes incluidos en el estudio se documentó infección en 16 correspondientes a las prótesis en 8 caderas, 6 rodillas y 2 hombros. De los microorganismos aislados, 9 fueron resistentes a ciprofloxacino. En los 24 casos restantes se excluyó el diagnóstico de infección.

Análisis global de la imagen:

La gammagrafía ósea mostró algún tipo de hipercaptación en el 100% de los pacientes estudiados ya sea con apariencia difusa en la zona periprotésica (31 de 40 pacientes; 77,5%) o bien con áreas con hipercaptación en el acetábulo y en la punta del vástago de la prótesis (9 de 40 pacientes; 22,5%). No se observaron diferencias significativas en los patrones de captación entre pacientes con infección o aflojamiento aséptico. La

sensibilidad y especificidad de la gammagrafía combinada de leucocitos marcados con medular (LS-MS) fue del 75% y 92% respectivamente con un valor predictivo positivo (VPP) del 86% y un valor predictivo negativo del 85%. Las imágenes con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino (CFS) se analizaron independientemente a la hora, 4 horas y 24 horas post inyección y en diferentes combinaciones; siendo el punto de las 24 horas el de mejor sensibilidad (88%), especificidad (71%), VPP (67%) y VPN (89%). Todos los 5 pacientes infectados por cepas resistentes al ciprofloxacino captaron el radiofármaco. La concordancia entre LS-MS y ^{99m}Tc -Ciprofloxacino a las 24 horas resultó baja ($\kappa = 0,36$; 95% intervalo de confianza: 0,09 – 0,63)

Análisis de la cadera:

En la gammagrafía LS-MS se obtuvo una sensibilidad del 74%, especificidad del 90%, VPP del 86% y VPN del 86%. Para el ^{99m}Tc -Ciprofloxacino a las 24 horas una sensibilidad del 88%, especificidad del 85%, VPP del 78% y VPN del 92%. Sólo se encontraron 2 falsos negativos de 8 casos y 1 falso positivo en 13 casos que mostró una débil captación en el componente proximal de la prótesis. La concordancia fue moderada ($\kappa = 0,40$; 95% intervalo de confianza: 0,01 – 0,79)

Análisis de la rodilla:

En la gammagrafía LS-MS se obtuvo una sensibilidad del 83%, especificidad del 90%, VPP del 83% y VPN del 90%. Para el ^{99m}Tc -Ciprofloxacino a las 24 horas una sensibilidad del 100%, especificidad del 50%, VPP del 55% y VPN del 100%. Los resultados muestran poca especificidad. No hubo falsos negativos (0 de 6 casos). Sin embargo, hubo 5 falsos positivos de 10 casos que corresponden en una captación difusa alrededor de la prótesis. La concordancia fue baja ($\kappa = 0,20$; 95% intervalo de confianza: 0,18 – 0,58).

6. DISCUSIÓN

El diagnóstico de las infecciones de prótesis articulares es a menudo difícil, ya que los síntomas clínicos y los parámetros radiológicos frecuentemente son indistinguibles de los que se observan en un aflojamiento aséptico de la prótesis. En estos casos, es necesario realizar exploraciones complementarias para poder efectuar un diagnóstico definitivo (3), esencial a la hora de decidir el mejor abordaje quirúrgico. Sin embargo, no existe ningún test que tenga un 100% de sensibilidad y especificidad. La cirugía implica inflamación que se asemeja a una infección activa.

La gammagrafía con ^{99m}Tc -ciprofloxacino se ha utilizado por otros grupos de trabajo con resultados contradictorios en el diagnóstico de varios procesos infecciosos y la mayoría de los estudios mostraban una población de pacientes heterogénea, lo que hace difícil interpretar los resultados obtenidos (64,110). El ciprofloxacino se incorpora en la bacteria y se une a la DNA girasa o topoisomerasa IV, por tanto, es razonable pensar que usar este antibiótico marcado implicaría una mejor especificidad que los leucocitos marcados en el diagnóstico de la infección. Cuando Britton *et al.* propusieron esta técnica sus resultados fueron buenos (60,61,62). Sin embargo, el método de marcaje del radiofármaco es crítico, ya que si se forman coloides, éstos se acumulan en los focos inflamatorios dando resultados falsos positivos.

Los diferentes marcajes que están descritos en la literatura científica difieren generalmente en un punto: el agente reductor del $[^{99m}\text{TcO}_4^-]$. Se han usado el estaño en forma de diferentes sales, el ácido formamidín sulfínico (FSA) (60,62,111) y existe un trabajo que utilizó un polímero redox (112). Los más estudiados son las sales de estaño cuyas formas utilizadas comúnmente son el cloruro de estaño (111, 113,114) y el tartrato de estaño (59,115).

En nuestro estudio de marcaje, el ácido L-tartárico se escogió como una fuente de aniones tartrato, puesto que es capaz de abastecer una pequeña concentración de tartrato al medio de reacción, suficiente para que actúa como ligando de intercambio. El uso de ácido tartárico y el cloruro de estaño(II) (SnCl_2) por separado en lugar de tartrato de estaño(II) permite trabajar a bajas concentraciones de ligando de intercambio, independientemente de la concentración de estaño como agente reductor. Además, el ácido L-tartárico es un compuesto incluido en Farmacopea, hecho que facilita su uso en ensayos clínicos. Por tanto, el [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-Ciprofloxacino se preparó de forma sencilla mediante una reacción a temperatura ambiente entre el ciprofloxacino hidrocloreto (es la sal soluble en agua; la base libre no lo es), ácido L-tartárico y cloruro de estaño(II). El control de calidad se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Si bien existen otros métodos cromatográficos de control de calidad (p. ej. HPLC), la TLC son los más eficientes para usar en una unidad de radiofarmacia de hospital en la determinación de impurezas en los radiofármacos tecneciados, porque normalmente no se dispone de equipos sofisticados y ya son útiles como lo demuestra la rutina diaria asistencia en los demás radiofármacos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La idea de este trabajo fue precisamente poder realizar un marcaje sencillo con un control de calidad que usase los métodos habituales en una unidad de radiofarmacia hospitalaria convencional, como es la del Hospital Clínic de Barcelona. Así pues, se usaron una combinación de 3 tiras de cromatografía en capa fina para poder determinar todas las impurezas radiactivas presentes en la preparación (tecnecio libre, coloide y tartrato). Se usaron del tipo ITLC-SG (fase normal) desarrolladas con acetona para evaluar el contenido de tecnecio libre en forma de [$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$]; otra ITLC-SG con etanol/agua/hidróxido amónico (2:5:1) como fase móvil para evaluar el contenido de coloides (69). El contenido de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tartrato se evaluó mediante placas de cromatografía pero en este caso fueron de fase reversa, RP-18, con una fase móvil que consistía en solución salina/metanol/ácido acético

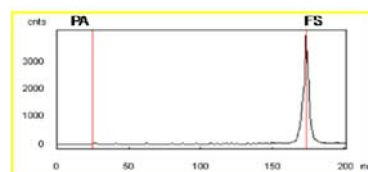
(55:45:1). En este sistema, el ^{99m}Tc -ciprofloxacino permanece en el punto de aplicación.

Por tanto, la combinación de estas 3 cromatografías en capa fina nos aporta la suficiente información para determinar los porcentajes de las 4 especies implicadas en la preparación: ^{99m}Tc -ciprofloxacino, ^{99m}Tc -tartrato, $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$ y ^{99m}Tc -coloide.

Para verificar la idoneidad de las cromatografías y asegurar que cada una de ellas sirve para identificar las impurezas formadas, se efectuaron los test correspondientes. A continuación se muestra la verificación de la idoneidad de las cromatografías que corroboran que dichos controles de calidad sirven para la identificación de las impurezas:

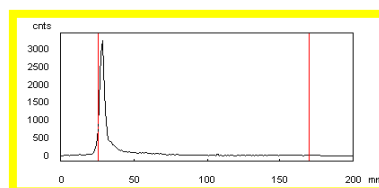
Patrón de $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$ en fase normal (sílica-gel)

Un eluido directo del generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc (Drytec®) se sembró en una tira de sílica-gel y acetona como fase móvil. Se observa que obtenemos un pico puro del producto en el frente del disolvente ($R_f = 1$). Esta cromatografía es adecuada para la detección del tecnecio libre.



Patrón de coloide

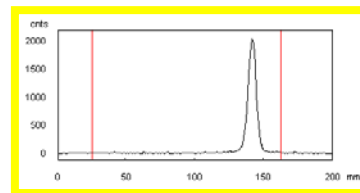
En este cromatograma podemos ver cómo una muestra de coloide permanece en el punto de aplicación ($R_f = 0$) utilizando una tira de sílica-gel y una fase móvil consistente en etanol/agua/hidróxido amónico 25% (2:5:1). Esta nos servirá para detectar el antibiótico marcado que migrará con el frente de disolvente.



Patrón de [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] en fase reversa

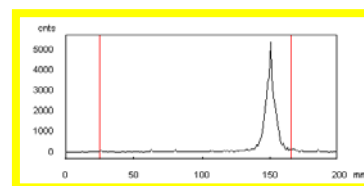
Un eluido directo del generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc (Drytec®) se sembró en una placa RP-18 y solución salina/metanol/ácido acético (55:45:1) como fase móvil.

Migra casi con el frente, a un R_f de 0,8-0,9.



Patrón de ^{99m}Tc -tartrato

Tomando como referencia un radiofármaco que contiene tartrato (MAG_3) se consiguió esta impureza radiactiva y al aplicarla en una placa RP-18 y solución salina/metanol/ácido acético (55:45:1) como fase móvil migra con el frente.

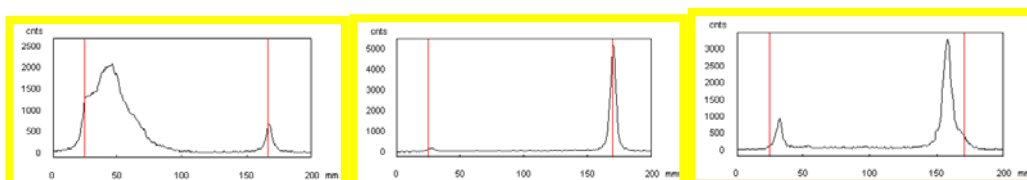


Además, siguiendo la metodología de marcaje ya descrita, se estudió la influencia del ácido tartárico mediante la adición en la reacción diferentes concentraciones que equivalían a diferentes relaciones molares de ciprofloxacino/ácido tartárico. Cuando la relación molar ciprofloxacino/ácido tartárico es muy baja, el ^{99m}Tc -tartrato es el subproducto predominante debido al gran exceso de iones tartrato en el medio. Este resultado está de acuerdo con la idea de que la concentración de tartrato en el medio de reacción debe ser baja, porque la estabilidad termodinámica del ^{99m}Tc -ciprofloxacino probablemente no es mucho mayor que la del ^{99m}Tc -tartrato. Por otro lado, cuando la relación molar ciprofloxacino/ácido tartárico es muy alta, el contenido de coloide se vuelve considerable. Este fenómeno es consistente con el papel del ion tartrato como ligando de intercambio, puesto que cuando la concentración de tartrato es muy baja, el tecnecio reducido no se estabiliza a tiempo y se forma coloide rápidamente. Se ha de hacer hincapié en que existe un punto donde se consigue una pureza radioquímica de más del 90% con cantidades despreciables de impurezas y corresponde a la relación molar ciprofloxacino/ácido tartárico de 50-100. Por consiguiente, este es el rango óptimo de trabajo para conseguir el rendimiento de

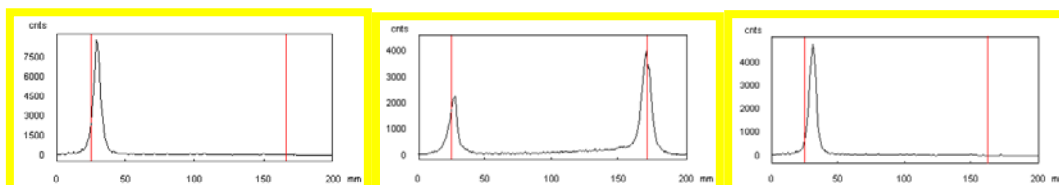
marcaje del ^{99m}Tc -ciprofloxacino más favorable según el método descrito en este trabajo.

A continuación, mirando el control de calidad en capa fina, se puede ver el perfil cromatográfico usando una relación molar [ciprofloxacino] / [ácido tartárico] muy baja (0,05), muy alta (500) y la óptima (50).

Una relación molar de 0,05 significa que hay exceso de ácido tartárico, en concreto 20 veces más. Es lógico que se observen los picos principales correspondientes a ^{99m}Tc -tartrato en los 3 cromatogramas.

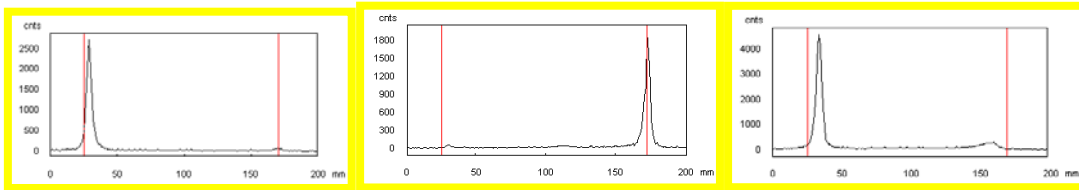


Una relación molar de 500 significa que hay un exceso considerable de ciprofloxacino respecto ácido tartárico. A efectos de marcaje, es como si este último fuera despreciable. Por consiguiente, en el segundo cromatograma se aprecia un pico de media altura en el origen, que corresponde a las especies coloidales debido a que no hay suficiente ligando de intercambio (tartrato), y en el tercer cromatograma, no aparece el tartrato de ^{99m}Tc en el frente.



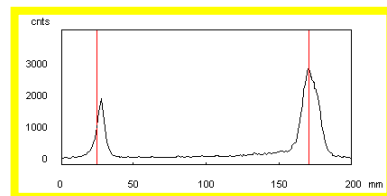
Si nos movemos en una relación molar de 50, los perfiles cromatográficos son excelentes, ya que en la primera cromatografía no encontramos ninguna impureza en

el frente de disolvente, en la segunda cromatografía no hay coloides y en la tercera el tartrato de tecnecio es mínimo.



Para contrastar resultados, en nuestro laboratorio se realizaron pruebas de marcajes utilizando solamente cloruro de estaño(II) como agente reductor y sin tartrato en el medio, como indicaron algunos grupos de trabajo citados anteriormente (111,113,114).

En este caso, la cantidad de especies coloidales no fueron nada despreciables (pico al inicio), demasiadas para aceptarlas dentro de los estándares de calidad del radiofármaco.



El ciprofloxacino, igual que tantos otros antibióticos de la familia de las quinolonas como de otros grupos, puede tener resistencias bacterianas. La resistencia a las quinolonas puede estar mediada por alteraciones en sus dianas de acción y/o sobreexpresión de bombas de eflujo (107,109,116,117)

Este último mecanismo disminuye la concentración intracelular del antibiótico. Por tanto, la presencia de este tipo de resistencia podría reducir notablemente la capacidad de que el radiofármaco ^{99m}Tc -ciprofloxacino pudiera llegar a detectar de una forma adecuada la presencia o ausencia de microorganismos resistentes.

Se escogió para el estudio dos cepas de dos especies bacterianas diferentes, una cepa con resistencia y la otra sin ella. De esta forma se ha podido demostrar que el antibiótico libre, sin marcar, se expulsa del medio intracelular como estaba previsto en las cepas con bomba de eflujo. El antibiótico marcado, por el contrario, se acumula

aproximadamente en la misma proporción tanto en las cepas resistentes como en las sensibles tanto a los cinco minutos de incubación como a los treinta. El [$^{99m}\text{TcO}_4$] no se acumula en ninguna cepa, lo cual es absolutamente positivo ya que si se llega a formar esta especie *in vivo* o un pequeño porcentaje durante la reacción de marcaje aceptable en las preparaciones radiofarmacéuticas, ya sabemos de antemano que no va acumularse en las bacterias. Se escogieron dos especies bacterianas diferentes como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, un coco grampositivo y un bacilo gramnegativo respectivamente. De este modo, se ha podido estudiar la acumulación del radiofármaco en dos microorganismos bastante diferentes pero ambos capaces de infectar prótesis osteoarticulares (13,118,119,120,121,122,123).

La razón por la cual el ^{99m}Tc -ciprofloxacino no es expulsado hacia el exterior no está clara. Posibles explicaciones pueden ir en la línea de que el complejo del antibiótico marcado no es reconocido por el sistema de bombeo hacia el exterior, ya que posee un átomo adicional diferente como es el tecnecio, o bien pensar que el complejo se disocia en el interior acumulándose el isótopo radiactivo formando otra especie, o bien que reoxidado a [$^{99m}\text{TcO}_4$] que no atraviesa la membrana como se ha demostrado.

El diagnóstico de la infección de prótesis osteoarticular mediante los actuales procedimientos estandarizados sigue todavía siendo un punto problemático para los cirujanos ortopédicos. Por lo tanto, cualquier avance o nueva técnica que pueda ayudar a confirmar o descartar una infección de este estilo es un paso adelante en medicina. Los síntomas clínicos a menudo son imprecisos y los parámetros analíticos, como la velocidad de sedimentación globular (VSG) o la proteína C reactiva (PCR), inconcluyentes (124,125). En nuestro grupo de pacientes, tanto la VSG como la PCR fueron significativamente mayor en los pacientes con infección ($49,6 \pm 29,2$ frente a $26,4 \pm 23,4$; $p = 0,01$ para la VSG y $3,8 \pm 3,2$ frente a $1,9 \pm 3,2$ $p = 0,0036$ para la proteína C reactiva). Sin embargo, entre los pacientes no infectados, 11 de ellos (46%) tuvieron valores elevados de VSG y otros 12 (50%) valores elevados de proteína C

reactiva. Este hecho indica que dichos parámetros analíticos poseen una alta sensibilidad pero baja especificidad y pueden ser útiles en una criba inicial.

Se conocen una gran variedad de procedimientos en Medicina Nuclear pero su especificidad para diferenciar aflojamiento aséptico de la prótesis de infección es baja (126,127,128). En la actualidad, la gammagrafía con leucocitos marcados sigue siendo la técnica de imagen más aceptada en el diagnóstico de muchos procesos infecciosos. No obstante, su uso en el diagnóstico de infecciones de prótesis osteoarticulares muestra inexactitudes debido a sus captaciones inespecíficas. Varios estudios demostraron mayor especificidad si se combinaba la gammagrafía con leucocitos marcados y la gammagrafía medular (129). En estos casos, se obtenía una sensibilidad del 75% y una especificidad del 92%. Este aumento de la especificidad se explica por la combinación de la gammagrafía medular y la de leucocitos marcados.

La gammagrafía ósea ha sido propuesta recientemente como una técnica precisa para descartar infección usando una adquisición en triple fase (130). Sin embargo, en nuestra serie, la fase vascular sólo fue positiva en 4 de 16 pacientes (25%). Además, se encontró algún tipo de hipercaptación en fase tardía en el 100% de los pacientes, sin diferencias en los patrones de captación entre los pacientes infectados y los que no.

La gammagrafía con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino podría tener un papel potencial como sustituto a la gammagrafía con leucocitos marcados por varias razones:

1. No se necesita extracción de sangre, manipulación ni posterior reinyección al paciente. Por tanto, se reduce enormemente el riesgo biológico para el paciente y el personal sanitario.
2. Es más fácil, menos laboriosa y requiere menos tiempo para la preparación del radiofármaco.

3. La dosis efectiva es menor. Menos irradiación al paciente.
4. Puede usarse en pacientes neutropénicos.
5. No se observa captación fisiológica en médula ósea que pueda enmascarar la infección.

La concordancia entre gammagrafía con leucocitos combinada con la medular y la gammagrafía con ^{99m}Tc-Ciprofloxacino a las 24 horas fue baja ($\kappa = 0,36$; 95% intervalo de confianza: 0,09 – 0,63). Probablemente, este hecho indica que la información extraída de cada radiofármaco acerca del proceso inflamatorio o infeccioso no es comparable.

En el estudio de las imágenes de cadera con ^{99m}Tc-Ciprofloxacino a las 24 horas se encontró una alta sensibilidad, del 88%, con especificidad del 85%. Estos valores fueron totalmente comparables con los obtenidos mediante la combinación de gammagrafía con leucocitos marcados más la gammagrafía medular (sensibilidad del 74% y especificidad del 90%). Los resultados obtenidos por Larikka *et al.* (131) están de acuerdo con los nuestros y sugiere que la exactitud diagnóstica se puede aumentar considerablemente cuando la adquisición de imágenes se alarga hasta la correspondiente a las 24 horas.

Por el contrario, nuestros resultados con ^{99m}Tc-Ciprofloxacino a las 24 horas en prótesis de rodilla mostraron una baja especificidad (sólo del 50%) comparada con la obtenida por Larikka *et al.* (132) correspondiente a un 76%. Ellos consideraron pacientes no infectados cuando existía un patrón de disminución de la captación entre las 1, 4 y 24 horas post inyección del radiofármaco. En cambio en nuestra serie de pacientes, descartamos infección sólo cuando no observábamos captación significativa en las imágenes. Ello podría explicar la baja especificidad de nuestros resultados en el análisis de las prótesis de rodilla. Sin embargo, cabe decir que el patrón de disminución de captación para descartar infección es difícil de realizar ya

que existe un fondo alto en las imágenes correspondientes a las 24 horas. Otra posible explicación para la baja especificidad sería que la membrana sinovial posterior queda preservada después de la cirugía y puede llegar a dar falsos positivos en articulaciones meramente inflamadas pero no infectadas (133).

Un hecho interesante fue que 5 pacientes infectados por una cepa resistente a ciprofloxacino fueron positivos en la gammagrafía con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino. La resistencia al ciprofloxacino (quinolona) está mediada por sobreexpresión de bombas de eflujo, mutaciones de los genes que codifican para la DNA girasa (diana del antibiótico) o bien alteraciones en la permeabilidad en la membrana. Inicialmente, se puede pensar que la sobreexpresión de bombas de eflujo puede disminuir la acumulación del radiofármaco intracelularmente, llevando a una disminución en la capacidad para detectar infecciones en estos casos. Sin embargo, nuestros estudios realizados *in vitro* con cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que expresaban dichas bombas como mecanismo de resistencia y con cepas que no las expresaban, no mostraron ninguna diferencia en cuanto a la acumulación intracelular del radiofármaco. Aunque no se investigó el mecanismo de resistencia concreto de los microorganismos aislados en el estudio clínico, este hecho está de acuerdo y satisface los hallazgos de nuestros estudios de acumulación *in vitro*.

7. CONCLUSIONES

1. El mejor método de marcaje del ^{99m}Tc -ciprofloxacino para obtener una alta pureza radioquímica es utilizando una relación molar [ciprofloxacino/ácido tartárico] en el rango de 50-100.
2. Para identificar todas las impurezas, el método de control de calidad combina 3 cromatografías en capa fina para, dos con sílica-gel como fase estacionaria y una en fase reversa.
3. El ^{99m}Tc -ciprofloxacino se acumula intracelularmente en *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La ausencia de [$^{99m}\text{TcO}_4$] intracelular demuestra que toda la radiactividad detectada es debida al antibiótico marcado.
4. La presencia de resistencias no afecta a la acumulación del ^{99m}Tc -Ciprofloxacino en *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
5. Los mejores resultados de la gammagrafía con ^{99m}Tc -ciprofloxacino en pacientes se obtienen en las imágenes a las 24 horas, con una sensibilidad del 88%, una especificidad del 71%, un valor predictivo positivo del 67% y un valor predictivo negativo del 89%.
6. La gammagrafía con ^{99m}Tc -Ciprofloxacino puede ser una alternativa útil a la gammagrafía con leucocitos marcados en la evaluación de la sospecha de infección de prótesis de cadera. La especificidad encontrada no es adecuada para recomendarla en el diagnóstico de infección en prótesis de rodilla.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ostlere S, Soin S. Imaging of prosthetic joints. *Imaging* 2003; 5:270-285.
- (2) Bauer TW, Schils J: The pathology of total joint arthroplasty. II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol* 1999; 28:483-497.
- (3) Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX & Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81: 672–683.
- (4) Wooley PH, Nasser S, Fitzgerald RH Jr. The immune response to implant materials in humans. *Clin Orthop* 1996; 326:63-70.
- (5) Toumbis CA, Kronick JL, Wooley PH et al. Total joint arthroplasty and the immune response. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 27:44-47.
- (6) Spector M, Shortkroff S, Hsu HP, Lane N, Sledge CB, Thornhill TS. Tissue changes around loose prostheses. A canine model to investigate the effects of anti-inflammatory agent. *Clin Orthop* 1990; 261:140-152.
- (7) Itasaka T, Kawai A, Sato T, Mitani S & Inoue H. Diagnosis of infection after total hip arthroplasty. *J Orthop Sci* 2001; 6:320–326.
- (8) Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D & Ramage G. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80:568–572.
- (9) Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (Suppl 2):94–106.
- (10) Tormanen J, Tervonen O, Koivula A, Junila J, Suramo I. Image technique optimization in MR imaging of a titanium alloy joint prosthesis. *J Magn Reson Imaging* 1996; 6:805–811.

-
- (11) Coventry MB. Treatment of infections occurring in total hip surgery. *Orthop Clin North Am* 1975; 6:991–1003.
- (12) Fitzgerald RH, Jr., Nolan DR, Ilstrup DM, Van Scoy RE, Washington JA & Coventry MB. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59:847–855.
- (13) Spangehl MJ, Younger AS, Masri BA & Duncan CP. Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. *Instr Course Lect* 1998; 47:285–295.
- (14) Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318–1322.
- (15) Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 2):94–106.
- (16) Ranklin JA. Biologic mediators of acute inflammation. *Clin Issues* 2004; 15:3-17.
- (17) Garcia Cimbreló E, López Barea F, Codoceo Alquinta R. Interfase hueso-prótesis: Estudio histológico y bioquímico en prótesis totales de cadera recambiadas. *Rev Ortop Traum* 1991; 35 IB:313-320.
- (18) Kwong LM, Jasty M, Mulroy RD, Maloney WJ, Bradgdon C, Harris WH. The histology of the radiolucent line. *J Bone Joint Surg* 1992; 74B: 67-73.
- (19) Lonner JH, Desai P, Dicesare PE, Steiner G, Zuckerman JD.: The reliability of analysis of intraoperative frozen sections for identifying active infection during revision hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 1996; 78A:1553-1558.
- (20) Weiner R. The role of transferrin and other receptors in the mechanism of ⁶⁷Ga localization. *Int J Rad Appl Instrum B* 1990; 17:141-149
- (21) Palestro CJ. The current role of gallium imaging in infection. *Sem Nucl Med* 1994; 24:128-141.

-
- (22) Perkins PJ. Early gallium-67 abdominal imaging: pitfalls due to bowel activity. *AJR Am J Roentgenol* 1981; 136:106-107.
- (23) Bekerman C, Hoffer PB, Bitran JB. The role of gallium-67 in the clinical evaluation of cancer. *Semin Nucl Med* 1984; 14:294-323.
- (24) Knockaert DC, Mortelmans LA, De Roo MC, Bobbaers HJ. Clinical value of gallium-67 scintigraphy in evaluation of fever of unknown origin. *Clin Infect Dis* 1994; 18:601-605.
- (25) Thakur ML, McAfee JG. The significance of chromosomal aberrations in indium-111-labeled lymphocytes. *J Nucl Med* 1984; 25:922-927.
- (26) McAfee JG, Thakur ML. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I soluble agents. II Particles. *J Nucl Med* 1976; 17:480-492.
- (27) Peters AM, Danpure HJ, Osman S et al. Clinical experience with ^{99m}Tc-hexamethylpropylene-amineoxime for labeling leukocytes and imaging inflammation. *Lancet* 1986; 2:946-949.
- (28) Peters AM. The utility of [^{99m}Tc]HMPAO-leukocytes for imaging infection. *Semin Nucl Med* 1994; 24:110-127.
- (29) Fleury HJ, Pinson P, Faure M, Masquelier B, Dupon M. HIV-1 transmission during scintigraphy. *Lancet* 2003; 362:210.
- (30) Liberatore M, Iurilli AP, Ponzo F, Prosperi D, Santini C, Baiocchi P et al. Clinical usefulness of technetium-99m-HMPAO-labeled leukocyte scan in prosthetic vascular graft infection. *J Nucl Med* 1998; 39:857-859.
- (31) Larikka MJ, Ahonen AK, Junila JA et al. Extended combined ^{99m}Tc-white blood cells and bone imaging improves the diagnostic accuracy in the detection of hip replacement infections. *Eur J Nucl Med* 2001; 28:288-293.
- (32) Datz FL, Thorne DA. Effect of chronicity of infection on the sensitivity of the In-111-labeled leukocyte scan. *AJR Am J Roentgenol* 1986; 147:809-812.

-
- (33) Becker W, Goldenberg DM, Wolf F. The use of monoclonal antibodies of antibody fragments in the imaging of infectious lesions. *Sem Nucl Med* 1994; 24:142-153.
- (34) Skehan SJ, White JF, Evans JW, Parry-Jones DR, Solanki CK, Ballinger JR et al. Mechanism of accumulation of ^{99m}Tc-sulesomab in inflammation. *J Nucl Med* 2003; 44:11-18.
- (35) Lipp RW, Wirnsberger GH, Ratschek M, Stepan V, Holzer H, Leb G. The influence of vascular diathesis on the localisation of inflammatory foci in renal allografts with a specific antigranulocyte antibody. *Eur J Nucl Med* 1996; 23:395-400.
- (36) Heiman DF, Gardner JP, Apfeldorf WJ, Malech HL. Effects of tunicamycin on the expression and function of formyl peptide chemotactic receptors of differentiated HL-60 cells. *J Immunol* 1986; 136:4623-4630.
- (37) Fischman AJ, Pike MC, Kroon D, Fucello AJ, Rexinger D, Ten Cate C et al. Imaging focal sites of bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptid analogs. *J Nucl Med* 1991; 32:483-491.
- (38) Fischman AJ, Rauh D, Solomon H, Babich JW, Tompkins RG, Kroon D et al. In vivo bioactivity and biodistribution of chemotactic peptide analogs in nonhuman primates. *J Nucl Med* 1993; 34:2130-2134.
- (39) Pollak A, Goodbody AE, Ballinger JR, Duncan GS, Tran LL, Dunn-Dufault R et al. Imaging inflammation with Tc-99m labelled chemotactic peptides: analogues with reduced neutropenia. *Nucl Med Commun* 1996; 17:132-139.
- (40) Babich JW, Dong Q, Graham W, Bardana M, Ferril K, Pike M et al. A novel high affinity chemitactic peptide antagonist for infection imaging. *J Nucl Med* 1997; 38:268.

-
- (41) Van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJG, van der Ven MTP, Claessens RAMJ, van der Meer JWM et al. Specific targeting of infectious foci with radioiodinated human recombinant interleukin-1 in an experimental model. *Eur J Nucl Med* 1995; 22:1249-1255.
- (42) Van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJG, van der Ven MTP, van der Meer JWM, Corstens FHM. Imaging of infection in rabbits with radioiodinated interleukin-1 (α and β), its receptor antagonist and a chemotactic peptide: a comparative study. *Eur J Nucl Med* 1998; 25:347-352.
- (43) Barrera P, van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM. Localization of ^{123}I -IL-1ra in affected joints in patients with rheumatic arthritis. *Rheumatology* 2000; 39:870-874.
- (44) Patel L, Charlton SJ, Chambers JK, Macphee CH. Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine* 2001; 14:27-36.
- (45) Hay RV, Skinner RS, Newman OC, Kunkel SL, Lyle LR, Shapiro B et al. Scintigraphy of acute inflammatory lesions in rats with radiolabelled recombinant human interleukin-8. *Nucl Med Commun* 1997; 18:367-378.
- (46) Gross MD, Shapiro B, Fig LM, Steventon R, Skinner RW, Hay RV. Imaging of human infection with ^{131}I -labeled recombinant human interleukin-8. *J Nucl Med* 2001; 42:1656-1659.
- (47) Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJG, Van der Laken CJ, Corstens FHM. Specific and rapid scintigraphy detection of infection with Tc-99m-labeled interleukin-8. *J Nucl Med* 2001; 42:117-123.

-
- (48) Rennen HJ, Van Eerd JE, Oyen WJ, Corstens FH, Edwards DS, Boerman OC. Effects of coligand variation on the in vivo characteristics of Tc-99m-Tc-labeled interleukin-8 in detection of infection. *Bioconjug Chem* 2002; 13:370-377.
- (49) Palestro CJ, Tomas MB, Bhargava KK, Afriyie MO, Nicodemus CF, Lister-James J et al. Tc-99m P483H for imaging infection: phase 2 multicenter trial results. *J Nucl Med* 1999; 40:15p.
- (50) Brouwers AH, Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Barrett JA, Harris TD et al. A ^{99m}Tc-labelled leukotriene B4 receptor antagonist for scintigraphic detection of infection in rabbits. *Nucl Med Commun* 2000; 21:1043-1050.
- (51) Riou LM, Ruiz M, Sullivan GW, Linden J, Leong-Poi H, Lindner JR et al. Assessment of myocardial inflammation produced by experimental coronary occlusion and reperfusion with ^{99m}Tc-RP517, a new leukotriene B4 receptor antagonist that preferentially labels neutrophils in vivo. *Circulation* 2002; 106:592-598.
- (52) Van Eerd JE, Oyen WJ, Harris TD, Rennen HJ, Edwards DS, Liu S, Ellars CE, Corstens FH, Boerman OC. A bivalent leukotriene B4 antagonist for scintigraphic imaging of infectious foci. *J Nucl Med* 2003; 44:1087-1091.
- (53) Signore A, Chianelli M, Parisella MG, Capriotti G, Giacalone P, Di Leve G et al. In vivo imaging of insulinitis in autoimmune diabetes. *J Endocrinol Invest* 1999; 22:151-158.
- (54) Signore A, Picarelli A, Chianelli M, Biancone L, Annovazzi A, Tiberti C et al. I-interleukin-2 scintigraphy: a new approach to assess disease activity in autoimmunity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9 Suppl 1:139-44.

-
- (55) Signore A, Picerelli A, Annovazzi A, Britton KE, Grossman AB, Bonanno E et al. ^{123}I -Interleukin-2: biochemical characterization and in vivo use for imaging autoimmune diseases. *Nucl Med Commun* 2003; 24:305-316.
- (56) Signore A, Chianelli M, Annovazzi A et al. ^{123}I -interleukin-2 scintigraphy for in vivo assessment of intestinal mononuclear cell infiltration in Crohn's disease. *J Nucl Med* 2000; 41:242-249.
- (57) Signore A, Chianelli M, Annovazzi A, Rossi M, Maiuri L, Graco M et al. Imaging active lymphocytic infiltration in coeliac disease with iodine-123-interleukin-2 and the response to diet. *Eur J Nucl Med* 2000; 27:18-24.
- (58) Procaccini E, Chianelli M, Pantano P, Signore A. Imaging of autoimmune diseases. *Q J Nucl Med* 1999; 43:100-112.
- (59) Britton KE, Wareham DW, Das SS, Solanki KK, Amaral H, Bhatnagar A et al. Imaging bacterial infection with $(99\text{m})\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton). *J Clin Pathol* 2002; 55:817-823.
- (60) Vinjamuri S, Hall AV, Solanki KK, Bomanji J, Siraj Q, O'Shaughnessy E et al. Comparison of 99mTc infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet* 1996; 347:233-235.
- (61) Britton KE, Vinjamuri S, Hall AV, Solanki K, Siraj QH, Bomanji J, et al. Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the localisation of bacterial infection. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 553-556.
- (62) Hall AV, Solanki KK, Vinjamuri S, Britton KE, Das SS. Evaluation of the efficacy of 99mTc -Infecton, a novel agent for detecting sites of infection. *J Clin Pathol* 1998; 51:215-219.

- (63) Amaral H, Morales B, Pruzzo R, Britton KE. Cold-hot mismatch between Tc-99m HMPAO labeled leukocytes and Tc-99m ciprofloxacin in axial skeleton infections: a report of three cases. *Clin Nucl Med* 1999; 24:855–858.
- (64) Sonmezoglu K, Sonmezoglu M, Halac M, Akgun I, Turkmen C, Onsel C et al. Usefulness of 99mTc-ciprofloxacin (infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: comparative study with 99mTc-HMPAO leukocyte scintigraphy. *J Nucl Med* 2001; 42:567–574.
- (65) Yapar Z, Kibar M, Yapar AF, Togrul E, Kayaselcuk U, Sarpel Y. The efficacy of technetium-99m ciprofloxacin (Infecton) imaging in suspected orthopaedic infection: a comparison with sequential bone/gallium imaging. *Eur J Nucl Med* 2001; 28:822–830.
- (66) Dumarey N, Blocklet D, Appelboom T, Tant L, Schoutens A. Infecton is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology. *Eur J Nucl Med* 2002; 29:530–535.
- (67) Britton KE, Wareham DW, Das SS, Solanki KK, Amaral H, Bhatnagar A et al. Imaging bacterial infection with (99m)Tc-ciprofloxacin (Infecton). *J Clin Pathol* 2002; 55:817–823.
- (68) De Winter F, Van de WC, Dumont F, Van Durme J, Solanki K, Britton K et al. Biodistribution and dosimetry of 99mTc-ciprofloxacin, a promising agent for the diagnosis of bacterial infection. *Eur J Nucl Med* 2001; 28:570–574.
- (69) Siaens RH, Rennen JH, Boermann OC, Dierckx R, Slegers G. Synthesis and Comparison of ^{99m}Tc-Enrofloxacin and ^{99m}Tc-Ciprofloxacin. *J Nucl Med* 2004; 45: 2088-2094.

- (70) El-Ghany EA, El-Kolaly T, Amine AM, El-Sayed AS, Abdel-Gelil F. Synthesis of ^{99m}Tc -pefloxacin: a new targeting agent for infectious foci. *J Radioanal Nucl Chem.* 2005; 266:131-139.
- (71) Gomes Barreto V, Iglesias F, Roca M, Tubau F, Martín-Comín J. Biodistribution of ^{99m}Tc -ceftizoxime in animal model infection and inflammation. *Eur J Nucl Med* 2000; 27:970.
- (72) Roohi S, Mushtaq A, Malik SA. Synthesis and biodistribution of [^{99m}Tc]vancomycin in a model of bacterial infection. *Radiochim Acta* 2005; 93:415-418.
- (73) Roohi S, Mushtaq A, Jehangir M, Malik SA. Synthesis, quality control and biodistribution of ^{99m}Tc -kanamycin. *J Radioanal Nucl Chem* 2006; 267:561-566.
- (74) Tsopeles C, Penglis S, Ruszkiewicz A, Bartholomeusz FDL. ^{99m}Tc -alafosfalin: an antibiotic peptide infection imaging agent. *Nucl Med Biol* 2003; 30:169-175.
- (75) Motaleb MA. Preparation of ^{99m}Tc -cefoperazone complex, a novel agent for detecting sites of infection. *J Radioanal Nucl Chem* 2007; 272:167-171.
- (76) Yurt Lambrecht F, Durkan K, Unak P. Preparation, quality control and stability of ^{99m}Tc -cefuroxime axetil. *J Radioanal Nucl Chem* 2008; 275:161-164.
- (77) Yurt Lambrecht F, Yilmaz O, Unak P, Seyitoglu B, Durkan K, Baskin H. Evaluation of ^{99m}Tc -cefuroxime axetil for imaging of inflammation. *J Radioanal Nucl Chem* 2008; 277:491-494.
- (78) Lambrecht. Evaluation of ^{99m}Tc -labeled antibiotics for infection detection. *Ann Nucl Med* 2011; 25:1-6.

- (79) Zhuang H, Duarte S, Pourdehnad, Maes A, Van Acker F, Shnier Garino JP et al. The promising role of ^{18}F -FDG PET in detecting infected lower limb prosthesis implants. *J Nucl Med* 2001; 42:44-48.
- (80) Manthey N, Reinhard P, Moog F, Knesewistch P, Kahn K, Tast K. The use of ^{18}F fluorodeoxyglucose positron emission tomography to differentiate between synovitis, loosening and infection of hip and knee prostheses. *Nucl Med Commun* 2002; 23:645-653.
- (81) Cremerius U, Mumme T, Reinartz P, Wirtz D, Niethard FU, Bull U. Analysis of ^{18}F -FDG uptake in Pet for diagnosis septic and aseptic loosening after total arthroplasty. *Nuklearmedizin* 2003; 42:234-239.
- (82) Love C, Pugliese PV, Afriyie MO, Tomas MB, Maewin SE, Palestro CJ. Utility of ^{18}F -FDG imaging for diagnosis the infected joint replacement. *Clin Positron Imaging* 2003; 42:234-239.
- (83) García-Barrecheguren E, Rodríguez Fraile M, Toledo Santana G, Valentí Nín JR, Richter Echevarria JA. ^{18}F FDG-PET: a new diagnostic approach in hip prosthesis infection. *Rev Esp Med Nucl* 2007; 26:208-220.
- (84) Kwee TC, Kwee RM, Alavi A. FDG-PET for diagnosing prosthetic joint infection: systematic review and metaanalysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008; 35:2122-2132.
- (85) Nakamura S. Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother* 1997; 3:128-138.
- (86) Wolfson JS, Hooper DC, Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2:378-424.
- (87) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1990; 34:1271-1272.

- (88) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1991; 35:1647-1650.
- (89) Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1996; 40:879-855.
- (90) Nikaido H, Preventing drug access to targets: Cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Sem Cell Dev Biol* 2001; 12:215-223.
- (91) Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JF, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistance (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: Decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition of *OmpF* reduction. *Antimicrob Agents Chemoter* 1989; 33:1318-1325.
- (92) Cohen SP, McMurry LM, Levy SB. *Mar A* locus causes decreased expression of *OmpF* porin in multiple-antibiotic resistant (*Mar*) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1988; 170:5416-5422.
- (93) Hancock REW, Role of porin in outer membrane permeability. *J Bacteriol* 1987; 169:929-934.
- (94) Chapman JS, Georgopapadaku NH, Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1988; 32:438-442.
- (95) Cohen SP, Hooper DC, Wolfson JS, Souza KS, McCurry LM, Levy SB. Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1988; 32:1187-1191.
- (96) Ubukata K, Itoh-Yamashita N, Konno M. Cloning and expression of the *norA* gene for fluorquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1989; 33:1535-1539.

-
- (97) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confer resistance to quinolones. J Bacteriol 1990; 172: 6942-6949.
- (98) Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. J Bacteriol 1993; 175:7363-7372.
- (99) Perrier AC, Segrè E. Some chemical properties of element 43. J Chem Physiol 1937; 5:712.
- (100) Charles B. Sampson. Textbook of Radiopharmacy. Theory and practice. 3rd edition. Chapter 4.
- (101) Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. 2nd edition.
- (102) Rodríguez-Puig D, Piera C, Suades J. Improved preparation method and structural studies of [99mTc]-ciprofloxacin. Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine (7). Edited by Ulderico Mazzi. SGEEditoriali. Padova. 2006. P 135-136.
- (103) Gopal B. Saha. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 4th edition. Chapter 6.
- (104) Peters AM. Localising the cause of undiagnosed fever. Eur J Nucl Med 1996; 23: 239-242.
- (105) Solanki KK, Bomanji J, Siraj Q, Small M, Britton KE. 99mTc-Infecton: a new class of radiopharmaceutical for imaging infection. J Nucl Med 1993; 34:119P.
- (106) Kaatz GW, S.M. Seo. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2733-2737.
- (107) Conejo MC, Martinez-Martinez L, García I, Picabea L, Pascual A. Effect of siliconized latex urinary catheters on the activity of carbapenems against *P.*

- Aeruginosa* strains with defined mutations in ampC, oprD, and genes coding efflux systems. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:122-127.
- (108) Piddock LVJ, Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. *J Antimicrob Chemother* 1997; 27:399-403.
- (109) Sierra JM, Cabeza JG, Ruiz Chaler M, Montero T, Hernandez J, Mensa J et al. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluorquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 8:750-758.
- (110) Sarda L, Crémieux AC, Lebellec Y, Meulemans A, Lebtahi R, Hayem G et al. Inability of ^{99m}Tc-ciprofloxacin scintigraphy to discriminate between septic and sterile osteoarticular diseases. *J Nucl Med* 2003; 44:920-926.
- (111) Oh SJ, Ryu J, Shin JW, Yoon EJ, Ha H, Cheon JH et al. Synthesis of ^{99m}Tc-Ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. *Appl Rad Isot* 2002; 57:193-200.
- (112) Kleisner I, Komarek P, Komarkova I, Konopkova M. A new technique of ^{99m}Tc-ciprofloxacin kit preparation. *Nuklearmedizin* 2002; 41:224-229.
- (113) Enrique G Yelin, Juan M Marino, Lucio Páez, Federico A Servera Velazco. *Rev Arget Radiol* 2005; 69:173-178.
- (114) Gómez M, Ferrando R, Hitateguy R, Vilar J, Moreira E, Escalona P et al. Protocolo combinado de ^{99m}Tc-ciprofloxacina y ^{99m}Tc-MDP en el diagnóstico de osteomielitis y prótesis articular infectada. *Alasbimn Journal* 2010; 48.
- (115) Singh B, Prasad V, Bhattacharya A, Singh AK, Bhatnagar A, Mittal BR et al. Diagnosis of Mandibular Osteomyelitis in Probable Coexisting Tumor Recurrence: Role of Tc-99m Ciprofloxacin imaging. *Clin Nucl Med* 2008; 33:525-527.
- (116) Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DN gyrase protection. *J Antimicrob Chemoter* 2003; 51:1109-1117.

-
- (117) Sierra JM, Marco F, Ruiz J, Jimenez de Anta T, Vila J. Correlation between the activity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2002; 8:781-790.
- (118) Davis N, Curry A, Gambhir AK, Panigrahi H, Walker CR, Wilkins EG, Worsley MA & Kay PR. Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement. J Bone Joint Surg Br 1999; 81:886–889.
- (119) Evans RP, Nelson CL, Bowen WR, Kleve MG & Hickmon SG. Visualization of bacterial glycocalyx with a scanning electron microscope. Clin Orthop 1998; 243–249.
- (120) Gaine WJ, Ramamohan NA, Hussein NA, Hullin MG, McCreath SW. Wound infection in hip and knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Br 2000; 82:561–565.
- (121) Peersman G, Laskin R, Davis J & Peterson M. Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. Clin Orthop 2001;15–23.
- (122) Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. J Bone Joint Surg Am 1999; 81:1434–1445.
- (123) Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1999; 37:3281–3290.
- (124) White J, Kelly M, Dunsmuir M. C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. J Bone Joint Surg 1998; 80:909-911.
- (125) Aalto K, Österman K, Peltola H, Räsänen J. Changes on erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein after total hip arthroplasty. Clin Orthop 1984; 184:118-120.

- (126) Chryssikos T, Parvici J, Ghanem E, Newberg A, Zhuang H, Alavi A. FDG-PET imaging can diagnose periprosthetic infection of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:1338-1342.
- (127) Rubello D, Rampin L, Banti E, Grassetto G, Massaro A, Cittadin S et al. Diagnosis of infected total knee arthroplasty with antigranulocyte scintigraphy: the importance of a dual-time acquisition protocol. *Nucl Med Commun* 2008; 29:331-335.
- (128) Gnanasegaran G, Croasdale J, Buscombe JR, Nuclear medicine imaging of infection and inflammation. *World J Nuc Med* 2005; 4:127:127.
- (129) Fuster D, Duch J, Soriano A, García S, Setoain X, Bori G et al. Potential use of bone marrow scintigraphy in suspected prosthetic hip infection evaluated with ^{99m}Tc -HMPAO-leukocytes. *Rev Esp Med Nucl* 2008; 27:430-435.
- (130) Nagoya S, Kaya M, Sasaki M, Tateda K, Yamashita T. Diagnosis of peri-prosthetic infection at the hip using triple-phase bone scintigraphy. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90:140-144.
- (131) Larikka MJ, Ahonen AK, Niemelä O, Junila JA, Hämäläinen MM, Britton K et al. Comparison of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin, ^{99m}Tc White blood cell and three-phase bone imaging in the diagnosis of hip prosthesis infections: improved diagnostic accuracy with extended imaging time. *Nucl Med Commun* 2002; 23:655-661.
- (132) Larikka MJ, Ahonen AK, Niemelä O, Puronto O, Junila JA, Hämäläinen MM et al. ^{99m}Tc -Ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. *Nucl Med Commun* 2002; 23:167-170.
- (133) Appelboom T, Emery P, Tant L, Dumarey N, Schoutens A. Evaluation of technetium-99m-ciprofloxacin (Infecton) for detecting sites of inflammation in arthritis. *Rheumatology* 2003; 42:1179-1182.

