

University of Groningen

New approaches for imaging bacteria and neutrophils for detection of occult infections

Auletta, Sveva

DOI:
[10.33612/diss.131946200](https://doi.org/10.33612/diss.131946200)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Auletta, S. (2020). *New approaches for imaging bacteria and neutrophils for detection of occult infections*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.131946200>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 8

Summary/Samenvatting

Inflammatory and infectious diseases represented, still nowadays, a serious and significant cause of morbidity and mortality worldwide since when chronic degenerative diseases and cancer dominated the scenario in developed countries. For these diseases, a rapid and accurate diagnosis plays a pivotal role for early therapeutic interventions and to discriminate the infection from an inflammatory condition. Indeed, the identification of bacterial cells in infections would be of great help for both therapeutic and diagnostic approaches, especially with the development of novel and tailored therapies.

In this scenario, there is a need of a non-invasive strategies to specifically localize bacterial or immune cells involved in infectious and inflammatory diseases before planning the best treatment option for patients. This strategy would allow to save time, reduce costs as well as side-effects due to non-appropriate therapy. Nuclear molecular imaging offers a plethora of radiopharmaceuticals for imaging bacteria and immune cells at preclinical level with possible translation to clinics. In this thesis, we present new and updated approaches to image infections as alternatives to currently available radiopharmaceuticals or to be implemented.

For bacterial infections, many compounds like antibiotics, peptides, sugars were radiolabelled with several isotopes for SPECT and PET imaging, but very few have been translated to humans with no promising results such as ^{99m}Tc -ciprofloxacin. This issue has been intensively described in the chapters 2 and 3. Indeed, these two systematic reviews give an extensive overview regarding the available radiopharmaceuticals for bacterial imaging and related concerns that limit their use in humans (e.g. the lack of specific mechanisms of binding of these compounds, the lack of standardized animal model, the lack of structured guidelines).

In order to overcome these limits, our first approach, described in the chapter 4, consists in targeting *E. coli* and *S. aureus* using an innovative infection mouse model and a new radiopharmaceutical compared to three well-known and performing in vitro and in vivo studies. The mouse model is a Teflon cage implanted subcutaneously that allows to have a reproducible, localized and persistent infection. A ciprofloxacin derivative, ciprofloxacin dithiocarbamate (CiproCS₂), was radiolabelled with ^{99m}Tc using a specific kit containing the antibiotic, succinic acid dihydrazide (SDH), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), SnCl_2 , phosphate buffer and γ -cyclodextrin. In vitro studies showed a rapid but poor bacterial binding for all tested radiopharmaceuticals, whereas in vivo studies displayed higher infected cage/sterile cage ratio for ^{99m}Tc -UBI and ^{99m}Tc -CiproCS₂ at 24 h for both *E. coli* and *S. aureus*. However, none of tested radiopharmaceuticals seemed to be promising for discrimination of infected sites, whose accumulation still remains to be clarified.

The same strategy was applied in the chapter 5 where we described the radiolabelling of an antibiotic that specifically binds to lipid A of lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria, acting as an antimicrobial peptide. The antibiotic is polymyxin B (PMB) that is conjugated with HYNIC and radiolabelled with ^{99m}Tc , obtaining an excellent labelling efficiency and specific activity. In vitro studies were performed using several bacterial strains, both Gram-negative and Gram-positive as control, showing higher binding of ^{99m}Tc -HYNIC-PMB for Gram-negative bacteria than control. In animal model, infection was induced by the injection of three different amounts of bacteria plus Matrigel in the right thigh in comparison to only Matrigel in the contralateral and imaging was performed at 1, 3 and 6 h post injection of ^{99m}Tc -HYNIC-PMB, measuring target-to-background (T/B) ratio. Results showed higher T/B ratios for Gram-negative bacteria than Gram-positive controls in slightly time and bacterial amount-dependant manner, suggesting ^{99m}Tc -HYNIC-PMB as potential agent for selective diagnosis of Gram-negative infections.

In clinical practice, radiolabelled autologous WBCs are the nuclear medicine gold standard for the diagnosis of infections and inflammatory disorders. They can be labelled with ^{111}In -oxine or $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO that are able to enter into cells' cytoplasm and radiolabel cells. In the chapter 6, we tested a new chelating agent, $(\text{S}_3\text{CPh})_2$ (S_2CPh)-complex (SSS-complex), with the aim to improve the radiochemical purity, the binding selectivity for leukocytes and its binding kinetics. The radiolabelling procedure of SSS-complex involved the use of a technetium-99m reducing kit, showing high labelling efficiency (>95%) and stable in both human serum and saline up to 24 h. Despite of high labelling efficiency to cells, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-complex showed no specific selectivity for any particular cell subset as well as a faster washout from cells than $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO. From our data, it appears that $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -SSS-complex cannot be considered a valid alternative to $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO for in vivo imaging agent.

The procedure to label WBCs is highly time expensive and high risk of cell contamination. Indeed, the Leukokit[®] has been developed with the goal to make easier the process. It is a commercial and disposable sterile kit, containing poly(O-2-hydroxyethyl)starch (HAES-steril 10%, HES) as a sedimentation agent to remove erythrocytes (RBCs) from WBCs. Currently, HES is no more commercially available and Gelofusine has been proposed as substitute sedimentation agent. Hence, in the chapter 7, we compared the labelling efficacy and the diagnostic accuracy of WBCs labelled with Leukokit[®] containing HES and Leukokit[®] containing Gelofusine. In particular, we evaluated the number and type of recovered WBCs, red blood cells (RBCs) contamination, platelets (PLTs) contamination, vitality of neutrophils, and chemotactic properties of neutrophils. Secondly, we performed a clinical comparison in terms of radiolabelling efficiency, final recovery yield and diagnostic outcome in patients affected by prosthetic joint infections, peripheral bone osteomyelitis, or vascular graft infection. Results showed a lower RBCs and PLTs contamination for HES rather than Gelofusine, but higher WBCs recovery for Gelofusine and same chemotactic properties independently from the used sedimentation agent. Then, clinical analysis reported not significantly different sensitivity, specificity and accuracy for WBCs labelled with both agents, suggesting Gelofusine as suitable substitute of HES for WBCs separation and labelling.

Ontstekingsziekten en besmettelijke ziekten vertegenwoordigden vandaag de dag nog steeds een ernstige en significante oorzaak van morbiditeit en mortaliteit sindsdien toen chronische degeneratieve ziekten en kanker het scenario domineerden in ontwikkelde landen. Voor deze ziekten speelt een snelle en nauwkeurige diagnose een cruciale rol voor vroege therapeutische interventies en om de infectie te onderscheiden van een ontstekingsaandoening. De identificatie van bacteriële cellen bij infecties zou inderdaad van groot nut zijn voor zowel therapeutische als diagnostische benaderingen, vooral bij de ontwikkeling van nieuwe en op maat gemaakte therapieën. In dit scenario is er behoefte aan niet-invasieve strategieën om specifiek bacteriële of immuuncellen die betrokken zijn bij infectie- en ontstekingsziekten te lokaliseren voordat de beste behandelingsoptie voor patiënten wordt gepland. Deze strategie zou het mogelijk maken om tijd te besparen, kosten te verminderen en bijwerkingen als gevolg van niet-geschikte therapie. Nucleaire moleculaire beeldvorming biedt een overvloed aan radiofarmaca voor beeldvorming van bacteriën en immuuncellen op preklinisch niveau met mogelijke vertaling naar klinieken. In dit proefschrift presenteren we nieuwe en bijgewerkte benaderingen van beeldinfecties als alternatieven voor de momenteel beschikbare radiofarmaca of om te implementeren. Voor bacteriële infecties werden veel verbindingen, zoals antibiotica, peptiden, suikers radioactief gelabeld met verschillende isotopen voor SPECT- en PET-beeldvorming, maar zeer weinig zijn vertaald naar mensen zonder veelbelovende resultaten zoals ^{99m}Tc -ciprofloxacin. Deze kwestie is intensief beschreven in de hoofdstukken 2 en 3. Deze twee systematische beoordelingen geven inderdaad een uitgebreid overzicht van de beschikbare radiofarmaca voor bacteriële beeldvorming en aanverwante problemen die het gebruik ervan bij mensen beperken (bijv. Het ontbreken van specifieke mechanismen voor binding van deze verbindingen, het ontbreken van gestandaardiseerd diermodel, het ontbreken van gestructureerde richtlijnen). Om deze limieten te overwinnen, bestaat onze eerste aanpak, beschreven in hoofdstuk 4, uit het richten van *E. coli* en *S. aureus* met behulp van een innovatief infectiemuismodel en een nieuw radiofarmaceutisch middel in vergelijking met drie bekende en performante in vitro en in vivo studies. Het muismodel is een Teflon-kooi die subcutaan is geïmplantéerd en die een reproduceerbare, gelokaliseerde en aanhoudende infectie mogelijk maakt. Een ciprofloxacinederivaat, ciprofloxacin dithiocarbamaat (CiproCS₂), werd radioactief gelabeld met ^{99m}Tc met behulp van een specifieke kit met het antibioticum, barnsteenzuur dihydrazide (SDH), ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), SnCl₂, fosfaatbuffer en cyc-cyclodextrine. In vitro studies toonden een snelle maar slechte bacteriële binding voor alle geteste radiofarmaca, terwijl in vivo studies een hogere geïnfecteerde kooi / steriele kooiverhouding vertoonden voor ^{99m}Tc -UBI en ^{99m}Tc -CiproCS₂ na 24 uur voor zowel *E. coli* als *S. aureus*. Geen van de geteste radiofarmaca leek echter veelbelovend voor discriminatie van geïnfecteerde sites, waarvan de accumulatie nog moet worden opgehelderd. Dezelfde strategie werd toegepast in hoofdstuk 5, waar we de radiolabeling beschreven van een antibioticum dat zich specifiek bindt aan lipide A van lypopolisaccharide (LPS) van gramnegatieve bacteriën, die als een antimicrobieel peptide werken. Het antibioticum is polymyxine B (PMB) dat is geconjugeerd met HYNIC en radioactief is gelabeld met ^{99m}Tc , waardoor een uitstekende labelingefficiëntie en specifieke activiteit wordt verkregen. In vitro-onderzoeken werden uitgevoerd met behulp van verschillende bacteriestammen, zowel gram-negatieve als gram-positieve als controle, die een hogere binding van ^{99m}Tc -HYNIC-PMB voor Gram-negatieve bacteriën vertoonden dan controle. In diermodel werd infectie geïnduceerd door de injectie van drie verschillende hoeveelheden bacteriën plus Matrigel in de rechter dij in

vergelijking met alleen Matrigel in de contralaterale en beeldvorming werd uitgevoerd op 1, 3 en 6 uur na injectie van ^{99m}Tc -HYNIC-PMB, het meten van de doel/achtergrond-verhouding (T/B). De resultaten toonden hogere T/B-verhoudingen voor gramnegatieve bacteriën dan grampositieve controles op een enigszins tijds- en bacteriehoeveelheidsafhankelijke manier, hetgeen ^{99m}Tc -HYNIC-PMB suggereert als potentieel middel voor selectieve diagnose van Gram-negatieve infecties.

In de klinische praktijk zijn radioactief gemerkte autologe WBC's de gouden standaard voor nucleaire geneeskunde voor de diagnose van infecties en ontstekingsstoornissen. Ze kunnen worden gelabeld met ^{111}In -oxine of ^{99m}Tc -HMPAO die in het cytoplasma en het radiolabel van cellen kunnen binnendringen. In hoofdstuk 6 hebben we een nieuw chelaatvormend middel (S_3CPh) $_2$ (S_2CPh)-complex (SSS-complex) getest, met als doel de radiochemische zuiverheid, de bindingsselectiviteit voor leukocyten en de bindingskinetiek te verbeteren. De radiolabelingsprocedure van het SSS-complex omvatte het gebruik van een technetium-99m-reductiekit, met een hoge etiketteringsefficiëntie (> 95%) en tot 24 uur stabiel in zowel menselijk serum als zoutoplossing. Ondanks de hoge labelingsefficiëntie voor cellen, vertoonde het ^{99m}Tc -SSS-complex geen specifieke selectiviteit voor een bepaalde celsubset, evenals een snellere uitspoeling van cellen dan ^{99m}Tc -HMPAO. Uit onze gegevens blijkt dat het ^{99m}Tc -SSS-complex niet kan worden beschouwd als een geldig alternatief voor ^{99m}Tc -HMPAO voor een in vivo beeldvormend middel.

De procedure om WBC's te labelen is zeer tijdrovend en een groot risico op celbesmetting. De Leukokit[®] is inderdaad ontwikkeld met het doel om het proces eenvoudiger te maken. Het is een commercieel en wegwerpbaar steriel pakket dat poly (O-2-hydroxyethyl) zetmeel (HAES-steril 10%, HES) als sedimentatiemiddel bevat om erythrocyten (RBC's) uit WBC's te verwijderen. Momenteel is HES niet meer in de handel verkrijgbaar en is Gelofusine voorgesteld als vervangend sedimentatiemiddel. Daarom hebben we in hoofdstuk 7 de werkzaamheid van de labeling en de diagnostische nauwkeurigheid vergeleken van WBC's gelabeld met Leukokit[®] met HES en Leukokit[®] met Gelofusine. In het bijzonder hebben we het aantal en het type teruggewonnen WBC's, rode bloedcellen (RBC's) besmetting, bloedplaatjes (PLT's) besmetting, vitaliteit van neutrofielen en chemotactische eigenschappen van neutrofielen geëvalueerd. Ten tweede hebben we een klinische vergelijking uitgevoerd in termen van efficiëntie van radioactief labelen, uiteindelijke opbrengst van herstel en diagnostische uitkomst bij patiënten met prothetische gewrichtsinfecties, perifere bot osteomyelitis of vasculaire transplantaatinfectie. Resultaten toonden een lagere RBC's en PLT's contaminatie voor HES in plaats van Gelofusine, maar hogere WBC's herstel voor Gelofusine en dezelfde chemotactische eigenschappen onafhankelijk van het gebruikte sedimentatiemiddel. Vervolgens rapporteerde klinische analyse niet significant verschillende gevoeligheid, specificiteit en nauwkeurigheid voor WBC's die met beide middelen waren gelabeld, hetgeen suggereert dat Gelofusine een geschikt alternatief is voor HES voor WBC's-scheiding en labeling.