

Impiego di 2-fluoro-2-deossi-D-glucosio marcato nell'imaging nucleare: effetti su una possibile contaminazione batterica

Rita Mangiapane¹, Angelina Cistaro², Alessandro Sperandeo¹, Antonino D'Agata³, Nicola Paligoric¹, Francesco Cocheo¹, Domenico Lo Gerfo¹, Raffaella Recenti³, Umberto Ficola¹

¹Unità di Medicina Nucleare, Ospedale Oncologico ad Alta Specialità, III° Livello "La Maddalena", Palermo

²Centro di Tomografia ad Emissioni di Positroni, IRMET S.p.A., Torino

³Unità di Medicina Nucleare, Dipartimento Universitario, Ospedale Careggi, Firenze

ABSTRACT

Use of 2-fluoro-2-deossi-D-glucose in nuclear medicine imaging: effects on possible bacterial contamination.

The 2-[¹⁸F]fluoro-2-deossi-D-glucose [(¹⁸F)-FDG] is the most frequently used radionuclide for positron emission tomography (PET). The reason for its oncologic use lays in the high glucidil activity that characterize neoplastic cells. To allow its use in the clinical setting, it is necessary that (¹⁸F)-FDG preparation fulfills the following requirements: chemical and radiochemical purity, sterility, and apirogenicity. In our study, we observed what it would happens if the (¹⁸F)-FDG, handled without observing all sterility procedures, suffered a contamination from bacteria, typical of hospital environment, such as *Staphylococcus Aureus*. 300 µL of the solution containing an original stock of *Staphylococcus Aureus* ATCC6538 was injected into (¹⁸F)-FDG samples, with increasing radioactivity (from 185 MBq to 1850 MBq) produced by synthesis modules (GE Tracerlab and IBA modules). The bacterial growth and the antibiotic assay, both of colonies from the original stock and of those created in radioactivity, were evaluated. The sensitivity to amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, gentamicin, and ceftazidime was estimated. We observed a decrease in the growth of bacterial colonies under radioactivity. Moreover, a reduction of sensitivity to tested antibiotics was observed. Our study shows that the ionising radiations may reduce the *Staphylococcus Aureus* growth and cause a reduction in the sensitivity to antibiotics. This decrease seems to be proportional to the radioactivity level. This study emphasize the importance of the right use of sterility procedures in production, preparation of doses and supplying of (¹⁸F)-FDG.

INTRODUZIONE

La tomografia ad emissione di positroni (PET) è un esame diagnostico non invasivo di medicina nucleare che permette di valutare parametri qualitativo-quantitativi di perfusione, vitalità cellulare, attività proliferativa e/o metabolica di un tessuto, utilizzando sostanze di interesse biologico (zuccheri, amminoacidi, precursori metabolici, ormoni, ecc.) marcate con radioisotopi emittenti positroni, al fine di studiare possibili alterazioni in corso di varie patologie. Tale indagine, inizialmente impiegata per lo studio di patologie neurologiche e cardiologiche, negli ultimi anni ha mostrato un aumentato impiego soprattutto in campo oncologico, in quanto permette la stadiazione di alcuni tumori, la ristadiatione, la valutazione dell'efficacia della terapia e l'ottenimento di altri parametri, la cui valutazione può aiutare a comprendere le caratteristiche biologiche del tumore e scegliere un appropriato approccio terapeutico.

In campo oncologico, il radiocomposto maggiormente impiegato è il 2-[¹⁸F]fluoro-2-deossi-D-glucosio [(¹⁸F)-FDG], un analogo del glucosio che entra nelle cellule, seguendo le stesse vie metaboliche (1). Il rationale del suo utilizzo, come indicatore oncologico, risiede nella incrementata attività glicolitica che caratterizza alcuni tipi di tumori. L'isotopo del fluoro ¹⁸F viene prodotto grazie ad un acceleratore di particelle, il ciclotrone, per bombardamento

protonico di acqua arricchita con ¹⁸O contenuta in un "target". Il ¹⁸F viene quindi trasferito a moduli di sintesi automatici per la produzione di [¹⁸F]-FDG. Le fasi di preparazione sono: separazione del ¹⁸F tramite resina a scambio anionico, anidificazione del ¹⁸F, marcatura del precursore protetto mannosio-triflato con ¹⁸F (sostituzione nucleofila), idrolisi del mannosio, rimozione delle impurezze ed infine sterilizzazione mediante il passaggio su filtro da 0,22 µm. Una volta sintetizzato, il radioglucide viene iniettato alla dose di 185-370 MBq per paziente.

Per poter essere utilizzato, il radiocomposto deve possedere tutti i requisiti dettati dalla vigente legislazione in materia, descritti nella monografia dell'European Pharmacopeia (EF) (2). Fra questi, si enumerano il controllo della pirogenicità, che prevede la determinazione della concentrazione di endotossine (<175 UI/V) tramite *Lymulus Amebocida* lisato (LAL test) e gli esami di controllo microbiologico, attraverso l'utilizzo di brodi di coltura, come tioglicolato e caseina idrolizzata di soia. I suddetti esami vengono eseguiti a farmaco privo di radioattività.

La EF indica le procedure da adottare durante la preparazione del radiocomposto, al fine di evitare eventuali contaminazioni. La contaminazione batterica del radiofarmaco potrebbe infatti comportare un possibile rischio di infezioni nel ricevente, potenzialmente responsabili di

casi di batteriemia e complicanze anche gravi per il paziente.

Lo *Staphylococcus Aureus* è un agente patogeno, frequente causa di morbilità e mortalità in caso di infezioni, soprattutto nosocomiali. La sua capacità di colonizzare e causare patologie nei mammiferi che lo ospitano dipende da un'ampia varietà di tossine ed enzimi da esso prodotte, fra cui le quattro emolisine (α , β , γ e δ) e la leucocidina, gli enzimi coagulasi, ialuronidasi e lipasi, e diverse enterotossine (3). Queste ultime possono provocare una importante tossinfezione alimentare che si manifesta con quadri clinici caratterizzati da vomito e diarrea, fino, nei pazienti defedati, a grave ipotensione e arresto cardiaco.

Alcuni ceppi di *Staphylococcus Aureus* possono manifestare resistenze ad alcuni antibiotici (4). Un esempio è lo stipte resistente alla meticillina (MRSA) (5). I primi ceppi isolati di MRSA sono stati descritti nel 1960 e le prime infezioni batteriche, nei diversi centri ospedalieri, si sono verificati tra il 1980 e il 1990. Oggi circa il 20% degli stipti isolati in ambiente ospedaliero, soprattutto in reparti di terapia intensiva, presenta questa caratteristica. La resistenza alla meticillina dipende da mutazioni del gene *mec-A*, che determina la presenza di bersagli alterati, nello specifico varianti delle "penicilline-binding proteins" (PBP-2a), e comporta una resistenza estesa a tutti i β -lattamici (6, 7).

Nel 1997 sono stati isolati stipti resistenti anche alla vancomicina (5, 8). La resistenza dello *Staphylococcus Aureus* a quest'ultimo antibiotico è ancora fortunatamente poco diffusa, con la conseguenza che i meccanismi con cui essa si realizza non sono ancora del tutto chiariti. Essa si basa essenzialmente sulla produzione di un bersaglio alternativo. Negli Enterococchi, oggetto di maggiore studio, la resistenza dipende da un complesso di geni inseriti all'interno di elementi cromosomici mobili e in quanto tali, altamente trasferibili tra microrganismi diversi (9).

I geni che caratterizzano sia la virulenza che la resistenza agli antibiotici risiedono per la maggior parte in una particolare regione del genoma batterico: la zona "auxiliary". Questa è una porzione del genoma, che può essere trasferita orizzontalmente da uno stipte ad un altro, grazie alla presenza di elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni, batteriofagi, cassette cromosomiche, ecc. (5, 10). In particolare, i geni che codificano per le enterotossine e leucocidine vengono trasferiti per traduzione generalizzata, attraverso batteriofagi (5); il gene *van A* viene trasferito per coniugazione tramite plasmidi (5, 9); il gene *mec-A* viene trasferito tramite cassette cromosomiche. La via più utilizzata in quest'ultimo caso è quella orizzontale tramite batteriofagi (5, 11).

La scelta di questo batterio per il nostro studio è motivata dal suo frequente riscontro in ambito ospedaliero e dalla sua elevata capacità di trasferire virulenza e resistenza ad antibiotici di largo consumo in ambito medico e chirurgico. D'altro canto la EF dispone in materia di norme di buona preparazione dei radiocomposti per uso diagnostico e terapeutico, senza il riscontro in letteratura dell'effetto di tali sorgenti aperte su agenti patogeni. Il

nostro studio si è proposto di valutare il comportamento biologico dello *Staphylococcus aureus*, sia in termini di crescita che di sensibilità ad alcuni antibiotici, nel caso in cui esso sia sottoposto all'effetto della radioattività emessa dal [^{18}F]-FDG, radioglucide ampiamente utilizzato nella pratica diagnostica medico-nucleare oncologica.

MATERIALE E METODI

Amplificazione del ceppo batterico originale

Per la semina è stato utilizzato un ceppo originale di *Staphylococcus Aureus* (ATCC6538) (Oxoid), impiegando anse batteriologiche pronte all'uso (Culti Loops, Oxoid) e terreni di coltura selettivi in agar, tipo Baird Parker (Oxoid) (semina in provetta). Le piastre seminate sono state incubate in un termostato a temperatura controllata di 36 ± 1 °C per 24 ore. Avvenuta la crescita delle colonie, 2-3 unità formanti colonie (CFU) di *Staphylococcus Aureus* sono state prelevate e diluite in 2 mL di brodo (Tryptone Soy Broth USP, Oxoid) in modo da ottenere una torbidità pari a 0,5 Mac Farland (equivalenti ad una concentrazione batterica pari a $1,5\times 10^8$ /mL).

Caratteristiche della produzione del radiofarmaco

Sono stati utilizzati campioni di radiofarmaco [^{18}F]-FDG prodotto da due moduli di sintesi diversi: TracerlabFXFDG (General Electric) e FDG-Module (IBA, Ion Application Beam). La resa di sintesi percentuale per i due moduli è rispettivamente del 40% e 42% e il volume di radiofarmaco prodotto è rispettivamente di 15 mL per il TracerlabFXFDG e 6 mL per FDG-Module. Ogni dose di radiocomposto è stata allestita utilizzando un dispensatore di dosi automatico (RP-300 Maspress). Tale strumentazione permette il prelevamento automatico di determinate aliquote di radiocomposto, portate al volume finale desiderato. La radioattività finale di ogni dose è stata controllata mediante calibratore di dose (Capintec CR-ISPET). Nonostante i due moduli di sintesi producano due volumi diversi, i residui chimici finali, etanolo, acetonitrile e acetone, sono in ogni caso inferiori ai limiti descritti in EF. Il rilevamento di tali residui viene eseguito mediante analisi cromatografica in fase gassosa. Tutti i campioni di radiofarmaco sono stati sottoposti agli stessi controlli di qualità chimica, radiochimica, radionuclidica, pH, sterilità e apirogenicità.

Allestimento dei punti sperimentali

Sono stati prelevati 500 μL di soluzione di *Staphylococcus Aureus* con torbidità di 0,5 Mac Farland ed aggiunti a diverse dosi appena prodotte di [^{18}F]-FDG, in un volume di 5 mL, con radioattività crescente (185 MBq, 370 Mq, 740 MBq e 1850 MBq) e ad un campione di [^{18}F]-FDG decaduto (dopo 13 dimezzamenti, con radioattività pertanto non misurabile). Ogni punto sperimentale è stato ripetuto 20 volte. Dopo 20 ore le soluzioni sono state saggate sia per disseminazione di superficie su piastre Baird Parker (Oxoid), che per conta batterica con la tecnica diretta per la misura quantitativa di

una popolazione microbica.

Le piastre utilizzate per la tecnica di disseminazione di superficie sono state incubate a 36 ± 1 °C per 24 ore, dopodiché sono state prelevate 1-2 colonie utilizzate successivamente per l'antibiogramma, (metodica "disk diffusion", Kirby-Bauer). L'antibiogramma veniva effettuato sia sulle colonie del ceppo originale che sulle colonie sviluppate in presenza di radiocomposto decaduto. In particolare, sono state testate le sensibilità per amoxicillina-acido clavulanico 20 μ g+10 μ g, ampicillina 10 μ g, gentamicina 10 μ g, ceftazidime 30 μ g e norfloxacina 10 μ g (12).

La tecnica diretta per la misura quantitativa di una popolazione microbica è stata effettuata diluendo in base 100 i campioni; quindi, volumi pari a 1 mL di ciascuna diluizione sono stati depositati su piastra e inclusi con Baird Parker Agar (Oxoid). Dopo incubazione a 36 ± 1 °C per 48-72 ore si valutava la crescita delle colonie, il cui numero totale è stato moltiplicato per il fattore di diluizione, allo scopo di determinare la quantità di batteri vivi presenti nelle soluzioni.

Analisi statistica

Ogni campione cresciuto in presenza del radiofarmaco, sia decaduto che a radioattività crescente, è stato confrontato con il campione di controllo. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test t di Student e un valore di P significativo <0,05.

RISULTATI

Si è osservata una diminuzione della crescita batterica all'aumentare della radioattività, come mostrato nella Figura 1. Confrontando i valori della crescita batterica dei ceppi selvatici con quelli cresciuti in ambiente radioattivo, si è osservato che la riduzione della crescita batterica in [18 F]-FDG decaduto, a 185 MBq e a 370 MBq è risultata non statisticamente significativa se paragonata alla crescita del ceppo selvatico, mentre la riduzione della crescita batterica a 740 MBq e a 1850 MBq è risultata statisticamente significativa (P <0,05) se paragonata sia alla crescita del ceppo selvatico che a quella in ambiente privo di radioattività.

I diametri medi degli aloni di inibizione (ALI) per gli antibiotici testati del ceppo originale confrontati con quello cresciuto in radiocomposto freddo e quelli cresciuti in radiocomposto con attività crescenti, sono illustrati nella Tabella 1. Confrontando gli ALI del ceppo originale con quello cresciuto a farmaco decaduto, si riscontra una significativa variazione del diametro dell'alone per gli antibiotici amoxicillina-acido clavulanico e ampicillina, mentre non si apprezzano significative variazioni per i tre rimanenti antibiotici. Paragonando gli ALI del ceppo cresciuto a 185 MBq rispetto al selvatico si è osservata una riduzione statisticamente significativa del diametro per tre dei cinque antibiotici testati, amoxicillina-acido clavulanico, ampicillina e norfloxacina, mentre paragonando gli ALI del ceppo cresciuto in [18 F]-FDG a 370 MBq rispetto a quelli del ceppo selvatico, si è osservata una

riduzione statisticamente significativa del diametro per l'amoxicillina-acido clavulanico, ampicillina, gentamicina e norfloxacina, mentre tale diminuzione non è statisticamente significativa per il ceftazidime. Infine, confrontando gli ALI del ceppo cresciuto nel radiocomposto con attività di 740 MBq con quelli del ceppo selvatico, si osservava una diminuzione statisticamente significativa del diametro nei confronti di tutti e cinque gli antibiotici. Lo stesso si è verificato per il ceppo cresciuto in attività di 1850 MBq.

Nella Figura 2 è illustrata la variazione del diametro degli ALI sviluppata dai vari ceppi per ogni antibiotico ad ogni livello di radioattività.

DISCUSSIONE

Lo *Staphylococcus Aureus* è la più comune causa di infezioni nosocomiali e provoca manifestazioni cliniche nel 2% di tutti i pazienti ricoverati (5). Le metodologie proprie della medicina nucleare si basano sull'uso di sostanze contenenti atomi radioattivi (radionuclidi), indicati dalla EF con il termine generale di radiofarmaci. I radiofarmaci sono stati quindi classificati come medicinali e devono pertanto rispondere a requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia. Fra i vari requisiti, uno dei più importanti è la sterilità (2). Pertanto, considerando la patogenicità dello *Staphylococcus Aureus*, la sua capacità di trasferire orizzontalmente porzioni del proprio genoma e la sua frequente presenza in ambiente ospedaliero, abbiamo ritenuto opportuno osservarne il comportamento nel caso di una contaminazione di [18 F]-FDG, radiocomposto sintetizzato e utilizzato in centri di medicina nucleare, prevalentemente in ambito diagnostico oncologico.

Dal nostro studio emerge che l'azione delle radiazioni ionizzanti sullo *Staphylococcus Aureus* comporta una riduzione della crescita batterica e una modificazione della sensibilità verso alcuni antibiotici di largo utilizzo. La riduzione della crescita batterica a causa delle radiazioni γ è ampiamente descritta in letteratura (13). Già nel 1972 tali radiazioni vennero utilizzate per la sterilizzazione di equipaggiamenti ospedalieri. In letteratura sono stati studiati i comportamenti di molte specie di microrganismi, inclusi la *Pasteurella Tularensis* (14), il *Bacillus Pumilus* (13), l'*Escherichia Coli* (15), la *Salmonella Typhimurium* (15) fino ad arrivare alle spore (16, 17). In ognuno di questi casi si è osservata una riduzione della crescita batterica causata dalle radiazioni γ o la scomparsa del ceppo batterico preso in esame se irradiato con valori elevati di radioattività.

Anche da questo studio, come in letteratura, si evince che solo l'1,1% dei batteri inoculati sopravvive a 1850 MBq rispetto al totale del ceppo inoculato (selvatico).

Se rappresentiamo i dati di sopravvivenza batterica a radioattività crescente secondo un grafico a dispersione XY, otteniamo una curva di sopravvivenza dello *Staphylococcus Aureus* ATCC6538 in accordo con il modello matematico a "bersagli multipli e colpo unico", secondo il quale nella cellula batterica sono presenti più bersagli, ciascuno dei quali dovrà essere colpito dalla radiazione per ottenere la morte del batterio (18). Per la

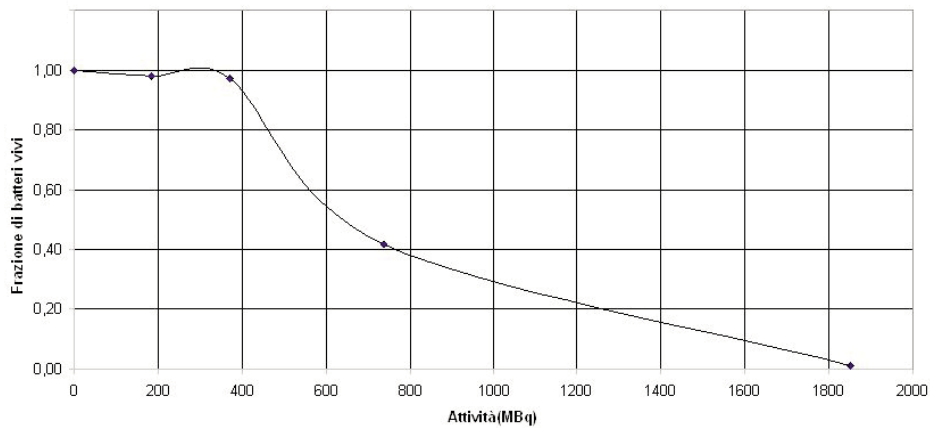


Figura 1
Frazione di batteri vivi in funzione della radioattività.

Tabella 1

Diametri medi (±DS) degli aloni di inibizione espressi in mm. Confronto tra il ceppo selvatico e i ceppi cresciuti in radiocomposto decaduto e a radioattività crescente

Antibiotico	Ceppo selvatico	Stock cresciuto a freddo	Stock cresciuto a 185 MBq	Stock cresciuto a 370 MBq	Stock cresciuto a 740 MBq	Stock cresciuto a 1850 MBq
Amoxicillina + acido clavulanico	48,2±1,4	44,7±1,9*	42,0±3,8*	38,4±1,4*	37,3±1,4*	35,1±2,6*
Ampicillina	43,3±1,8	38,3±2,6*	34,7±3,5*	32,7±2,8*	32,1±1,9*	30,3±2,6*
Gentamicina	23,0±1,0	22,3±0,5	19,8±3,0	19,1±2,8*	17,3±2,0*	16,0±1,7*
Norfloxacina	25,3±1,9	25,0±2,2	22,2±1,8*	20,8±1,2*	19,1±1,9*	16,8±1,3*
Ceftazidime	16,3±1,8	16,0±2,1	16,4±2,0	15,8±2,0	13,7±1,4*	12,2±1,8*

*Significativamente diverso dall'alone di inibizione del ceppo selvatico per $P < 0,05$.

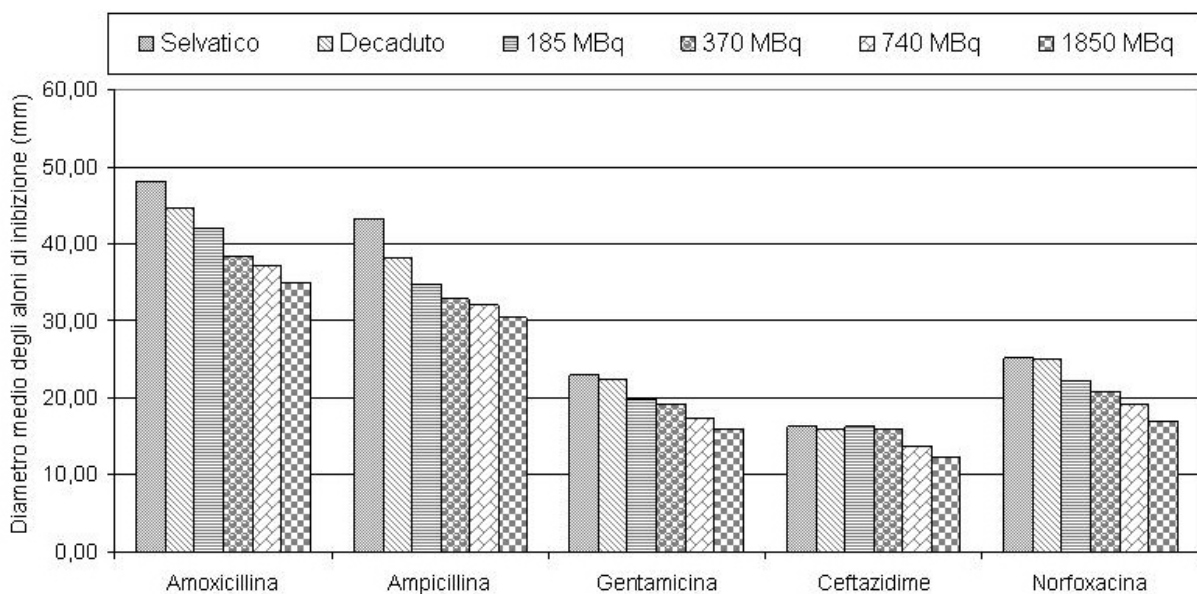


Figura 2
Aloni medi di inibizione per i vari antibiotici del ceppo di *Staphylococcus Aureus* selvatico, di quello cresciuto in assenza di radioattività e dei ceppi cresciuti in ambiente a radioattività crescente.

radiazione γ il modello maggiormente accreditato è il modello lineare-quadratico.

C'è comunque una differenza tra la curva di sopravvivenza ottenuta nel nostro studio e quelle disponibili in letteratura. Infatti, queste ultime sono in relazione alla dose somministrata, che rappresenta l'energia impartita per unità di massa, e si misura in Gray (1Gy = 1 Joule/kg). Nel nostro caso, invece, la curva di sopravvivenza è ottenuta rispetto all'attività somministrata in Bq, cioè il numero di decadimenti del ^{18}F per sec. Questo potrebbe non adattarsi bene con il modello matematico, perché ci sono due variabili: il rateo di dose, che varia con il tempo in modo esponenziale seguendo la decrescita dell'attività, e la dose cumulata che dipende invece dall'attività iniziale e dal tempo successivo alla somministrazione (tende ad una curva di saturazione).

La nostra curva mostra una curvatura nella zona corrispondente alle dosi più basse, denominata spalla, che indica una minore efficienza di effetti letali a basse dosi e rappresenta l'accumulo del danno sub-letale riparabile in funzione della dose somministrata. La successiva linea retta (in scala semilogaritmica) o "pendenza esponenziale" indica che progressivi aumenti dei livelli di radioattività, e quindi di dose assorbita, inducono da un lato un maggior danno cellulare, perché aumenta la probabilità che un batterio sia "colpito" in modo letale, e dall'altro una progressiva riduzione della capacità riparativa della cellula batterica, fino a causare la morte del batterio stesso.

La modificazione della sensibilità dello *Staphylococcus Aureus* verso alcuni antibiotici di largo utilizzo, causata dall'esposizione alle radiazioni, è l'altro interessante risultato che emerge dal nostro studio. Tale modificazione si concretizza in una diminuzione del diametro degli ALI verso alcuni antibiotici. La riduzione dell'alone non è significativa per gentamicina e ceftazidime a radioattività pari a 185 MBq e per il ceftazidime a radioattività di 370 MBq, ma lo diventa per tutte e cinque gli antibiotici testati alle radioattività superiori.

Nel nostro studio si sono testati 5 antibiotici di ampio utilizzo in ambito ospedaliero, con diverso meccanismo di azione e diverse capacità battericida nei confronti dello *Staphylococcus Aureus* ATCC6538. L'assenza della vancomicina, altro antibiotico utilizzato in ambito medico, è da ritenersi un limite di questo studio e, in considerazione dei risultati ottenuti, potrebbe essere interessante vagliarla in studi futuri. In particolare, in quanto probabilmente "trasferibile", la vancomicina-resistenza aggrava l'eventuale contaminazione da *Staphylococcus Aureus* delle preparazioni di radiocomposto e questo avvalora

maggiormente l'utilità di futuri sviluppi dell'indagine, che comprendano questo antibiotico nello spettro di molecole da testare.

Rimane da spiegare la diminuzione dell'ALI del ceppo batterico cresciuto in [^{18}F]-FDG decaduto rispetto allo stock selvatico verso i primi due antibiotici testati (amoxicillina-acido clavulanico e ampicillina). Si potrebbe ipotizzare che tale differenza potrebbe dipendere dalla diversa composizione chimico-fisica dei terreni di coltura o dalla presenza del glucide, che in qualche modo conferisce maggiore capacità di sopravvivenza a tali ceppi. Di fatto, mentre il selvatico cresce in ambiente favorevole (brodi di coltura), il ceppo cresciuto in ambiente di [^{18}F]-FDG decaduto può usufruire del glucide e di basse concentrazioni di composti chimici come etanolo, acetone, acetonitrile, ecc., che possono in qualche modo provocare una diminuzione della sensibilità ai due antibiotici. A tal proposito, Dombek e Ingram hanno evidenziato come l'etanolo modifichi la fluidità della membrana plasmatica, rendendola più rigida di alcune specie batteriche gram-negative, come l'*Escherichia Coli*, cresciute in mezzi di coltura contenente etanolo (19). Anche altri studi hanno messo in rilievo come lo *Staphylococcus Aureus* può modificare crescita, metabolismo, morfologia e vitalità se cresciuto in mezzi di coltura contenenti basse concentrazioni di etanolo (20). I ricercatori dimostrano come l'aggiunta di quest'ultimo elemento chimico nel mezzo di coltura inibisca l'utilizzo da parte dello *Staphylococcus Aureus* di amminoacidi come il glutammato, la prolina e l'ornitina (20). Questo potrebbe far pensare che, anche nel nostro caso, l'etanolo o altri composti chimici influenzino il comportamento di tale specie nei confronti dei derivati delle penicilline. Si potrebbe formulare l'ipotesi che tale molecola provochi un'alterazione della permeabilità della parete batterica dei gram-positivi verso i due derivati delle penicilline. La conseguente diminuzione della loro concentrazione in ambiente intracellulare potrebbe essere responsabile della ridotta interazione con le PBP rispetto al ceppo selvatico (21, 22).

Il "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) definisce i diametri di riferimento degli ALI per i diversi antibiotici, in base ai quali si considera un ceppo batterico sensibile, intermedio o resistente (Tabella 2). Paragonando i diametri medi degli ALI dei nostri ceppi batterici cresciuti alle differenti radioattività con i diametri di riferimento del CLSI, si osserva che, nonostante si sia avuta una riduzione dell'ALI sia per amoxicillina-acido clavulanico che per ampicillina e gentamicina, questi ceppi vengono considerati comunque come sensibili ai

Tabella 2

Interpretazione degli aloni di inibizione su Mueller Hinton agar secondo il "Clinical Institute Laboratory Standards"

Ceppo	Amoxicillina + acido clavulanico	Ampicillina	Gentamicina	Norfloxacina	Ceftazidime
Sensibile	≥20 mm	≥29 mm	≥15 mm	≥17 mm	≥18mm
Intermedio	-	-	13 mm – 14 mm	13 mm - 16 mm	15 mm - 17mm
Resistente	≤19 mm	≤28 mm	≤12 mm	≤12 mm	≤14 mm

tre antibiotici.

Nonostante il nostro ceppo selvatico presentasse una sensibilità intermedia al ceftazidime, i ceppi dello studio cresciuti alle radioattività più alte hanno comunque mostrato una riduzione della sensibilità a questo antibiotico, determinando il passaggio alla categoria di antibiotico-resistenza. Per la norfloxacina vale un discorso simile, ma solo per i ceppi cresciuti alla radioattività più elevata. Infatti, mentre il ceppo selvatico viene classificato, secondo il CLSI, come sensibile a questo antibiotico, i ceppi cresciuti alla radioattività di 1850 MBq presentano una sensibilità intermedia. In altre parole, si è anche in questo caso determinato un cambio di categoria.

Applicando i nostri risultati alla pratica quotidiana di produzione e inoculazione del radiotracciante, si potrebbe concludere dicendo che è importante evitare la contaminazione del [¹⁸F]-FDG durante la fase di sintesi, dove si hanno radioattività pari o superiori a 1850 MBq, in quanto in queste condizioni il ceppo contaminante pare subire modificazioni significative. Se la contaminazione si verificasse nelle fasi successive (ripartizione delle dosi e iniezione al paziente, con dosi di 185-370 MBq) tutti gli antibiotici testati potrebbero essere comunque clinicamente utilizzati. È comunque nostra intenzione continuare lo studio attraverso il sequenziamento genetico dei ceppi cresciuti a 1850 MBq, in quanto presentanti la maggiore modificazione della sensibilità agli antibiotici testati, e confrontare tale sequenza con lo stipite selvatico, in modo da identificare e definire gli eventuali siti di modificazione e il tipo di mutazione responsabile della risposta modificata del batterio verso i 5 antibiotici.

CONCLUSIONI

In pratica, la probabilità che il [¹⁸F]-FDG possa essere contaminato durante le fasi di produzione e sintesi è bassa, considerando il pieno rispetto delle norme di buona preparazione del farmaco. E' comunque interessante ciò che lo studio pare dimostrare: lo *Staphylococcus Aureus* non solo sopravvive ad alte attività (1850 MBq), seppur riducendo le sue capacità di crescita, ma può modificare il suo comportamento nei confronti di alcuni antibiotici. Ciò apre diversi interrogativi, come il definire il sito della modificazione, se la resistenza acquisita è trasferibile da un batterio all'altro e in che modo ciò possa avvenire, se si verificano altre modificazioni e se ciò possa determinare una modificazione della sua virulenza.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i dottori in fisica Marco Criscuoli e Vito D'Antoni ed il tecnico di laboratorio Vito Balsamo per l'apporto alla stesura dell'articolo.

BIBLIOGRAFIA

- Mandelkern M, Raines J. Positron emission tomography in cancer research and treatment. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1:423-39.
- European Pharmacopeia 5.0. Fluodeoxiglucose (18F) injection. 01/2005:1325 pag. 822-5 e 2316-9.
- Dinges MM, Orwin PM, Schliedert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16-34.
- Kowalski RP, Karenchak LM, Romanowski EG. Infectious disease: changing antibiotic susceptibility. *Ophthalmol Clin North Am* 2003;16:1-9.
- Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 2004;12:378-85.
- Zhou Y, Antignac A, Wei Wu S, et al. Penicillin-binding proteins and cell wall composition in β -lactam-sensitive and resistant strains of *staphylococcus sciuri*. *J Bacteriol* 2008;190:508-14.
- Roisin S, Nonhoff C, Denis O, et al. Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol* 2008;46:2525-8.
- Bhateja P, Mathur T, Pandya M, et al. Detection of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: a comparative study of three different phenotypic screening method. *Indian J Med Microbiol* 2005;2:52-5.
- Showsh SA, De Boever EH, Clewell DB. Vancomycin resistant plasmid in *enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2177-8.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001;357:1225-40.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323-36.
- CLSI document M100-S19. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved Standard nineteenth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- Holta Oie S, Fystro D. Efficacy of the inactivation of bacterial spores in white petrolatum and a hydrophilic ointment by gamma irradiation. *Appl Microbiol* 1975;30:514-8.
- Landay ME, Wright GG, Pulliam JD, et al. Toxicity of *Pasteurella tularensis* killed by ionizing radiation. *J Bacteriol* 1968;96:804-10.
- Spoto MH, Gallo CR, Alcarde AR, et al. Gamma irradiation in the control of pathogenic bacteria in refrigerated ground chicken meat. *Sci Agric* 2000;57:389-94.
- Kempe LL, Graikoski JT, Gillies RA. Gamma ray sterilization of canned meat previously inoculated with anaerobic bacterial spores. *Appl Microbiol* 1954;2:330-2.
- Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, et al. Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol* 2007;189:3306-11.
- Johns HE, Cuminghan JR, eds. The physics on radiology IV ed. Springfield: Charles C Thomas Publisher, 1983:668-81.
- Dombek KM, Ingram LO. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* 1984;157:233-9.
- Chatterjee I, Somerville GA, Heilmann C, et al. Very low ethanol concentrations affect the viability and growth recovery in post-stationary-phase *Staphylococcus aureus* populations. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2627-36.
- Pucci MJ, Dougherty TJ. A method to assay penicillin-binding proteins. *Methods Mol Med* 2008;142:131-41.
- Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 2008;32:361-85.