



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Porovnání vybraných analytických
metod stanovení antibiotika
vankomycinu v biologickém materiálu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Karolína Kubíčková**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D**
Termín odevzdání práce: 2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Kubíčková
Název práce	Porovnání vybraných analytických metod stanovení antibiotika vankomycinu v biologickém materiálu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum, které se používá k léčbě těžkých bakteriálních infekcí vyvolaných gram-pozitivními bakteriemi a především pak MRSA. V posledních letech se začaly objevovat případy MRSA rezistentních vůči nízkým koncentracím vankomycinu. Dále je známo, že může mít vankomycin u některých pacientů, například s renální insuficiencí nežádoucí toxické účinky – nefrotoxicitu a ototoxicitu. Z těchto důvodů je v léčbě nutné monitorovat koncentraci vankomycinu v krvi. Cílem této práce je porovnat vybrané metody stanovení vankomycinu. Pro stanovení vankomycinu v séru byla v rámci práce vyvinuta a částečně validována metoda HPLC-MS/MS. Na reálných vzorcích pacientů léčených vankomycinem pak byly porovnány výsledky měření na analytických soupravách Emit Adria Centaur, FPIA Cobas Integra 400+, Clia Abbott, FPIA KIMS Cobas Integra 400+ a vyvinuté in-house HPLC-MS/MS metody. Bylo následně provedeno statistické hodnocení rozdílů měření mezi metodami.
Klíčová slova	Vankomycin, imunochemické metody, HPLC-MS/MS, terapeutické monitorování léčiv, harmonizace
Počet stran	98
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Karolína Kubíčková
Title of thesis	Comparison of selected analytical methods for the determination of the antibiotic vancomycin in biological material
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	Vancomycin is a glycopeptide antibiotic used to treat severe bacterial infections caused by gram-positive bacteria and especially MRSA. In recent years, cases of MRSA resistant to low vancomycin concentrations have begun to appear. It is also known that vancomycin can have adverse toxic effects in some patients, for example with renal insufficiency - nephrotoxicity and ototoxicity. For these reasons, it is necessary to monitor the concentration of vancomycin in the blood during treatment. The aim of this work is to compare selected methods for the determination of vancomycin. An HPLC-MS / MS method was developed and partially validated for the determination of vancomycin in serum. The results of measurements on analytical kits Emit Adria Centaur, FPIA Cobas Integra 400+, Clia Abbott, FPIA KIMS Cobas Integra 400+ and developed in-house HPLC-MS / MS methods were then compared on real samples of patients treated with vancomycin. A statistical evaluation of the measurement differences between the methods was then performed.
Keywords	Vancomycin, immunochemical methods, HPLC-MS / MS, therapeutic drug monitoring, harmonization
Number of pages	98
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval (a) samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Děkuji RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za vedení diplomové práce za cenné rady a vstřícnost při konzultacích. Mé poděkování patří též RNDr. Martinu Švidrnochovi, Ph.D za pomoc a spolupráci na experimentální části práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za jejich porozumění a podporu.

Obsah

Úvod.....	12
Historie.....	14
Obecná charakteristika vankomycinu	16
Fyzikálně – chemické vlastnosti	16
Farmakokinetika.....	19
Degradční produkty vankomycinu	19
Mechanismus účinku.....	21
Rezistence	23
Klinické využití.....	25
Dávkování	28
Toxicita	30
TDM vankomycinu	33
Softwarové nástroje pro TDM	36
Metody stanovení vankomycinu	39
Mikrobiologické nepřímé stanovení	39
Radioimunoanalýza.....	39
Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA).....	40
Kapilární izotachoforéza	43
Enzymové imunoanalýzy	43
ELISA	45
EMIT	45
Průtoková chemiluminiscence	46
Voltametrické stanovení.....	47
Chromatografické metody.....	48
Kapalinová chromatografie.....	48
Hmotnostní spektrometr.....	48
Trojitý kvadrupól	49
Stanovení vankomycinu pomocí kapalinové chromatografie spojené s detekcí UV nebo MS.....	53
Experimentální část.....	57
Použité chemikálie	57
Přístroje a pomůcky.....	57
Příprava standardních vzorků.....	58
Příprava vzorků pro analýzu	60
Statistické metody	61
Výsledky	62
Optimalizace metody	62
Validace.....	64
Statistické porovnání metod.....	67
Diskuze.....	78
Závěr	83
Citace.....	84

Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Podoba vankomycinu v různých stádiích vývoje. Vlevo „Mississipské bahno“, původní vzhled sloučeniny, uprostřed vzhled po přečištění kyselinou pikrovou. Vpravo současná podoba jako vankomycin hydrochlorid. Převzato z Griffitha, 1981.	15
Obr. 2: Chemická struktura glykopeptidů – 1. ristocetin A, 2. avoparcin, 3. teikoplanin. Převzato z: Wikipedia	16
Obr. 3: Chemická struktura vankomycinu. Převzato z: Wikipedia.....	18
Obr. 4: Chemická struktura semisyntetických glykopeptidů – 1. dalbavancin, 2. telavancin, 3. oritavancin. Převzato z: Wikipedia.....	18
Obr. 5: Struktura degradačních produktů vankomycinu. Převzato z: Abdollahpour, Heydari and Shamsipur, 2017	21
Obr. 6: Zobrazení vazby vankomycinu na lipid II. Interagující skupiny jsou zvýrazněny modře. Převzato a upraveno dle Nitanaí et al., 2009.	22
Obr. 7: Model pro terapeutické monitorování léčiv.....	36
Obr. 8: Schéma metody FPIA a KIMS. FPIA – 1. protilátka, 2. fluorescenčně značený analyt, 3. stanovovaný analyt. KIMS – 1. mikročástice vázaná s analogem analytu, 2. stanovovaný analyt, 3. protilátka. Převzato z: Sanavio and Silke, 2015.....	42
Obr. 9: Analyzátor COBAS INTEGRA® 400 plus (roche.com).....	42
Obr. 10: Zobrazení rozdílů kalibračních závislostí mezi kompetitivními a nekompetitivními metodami. Převzato od Beňovská.....	43
Obr. 11: Uspořádání ELISA metody: Shora přímá kompetitivní ELISA, nepřímá kompetitivní ELISA a nekompetitivní ELISA. Převzato z: Imunochemické metody.	44
Obr. 12: Schéma Emit analýzy – 1. protilátka, 2. enzym vázaný na analog analytu, 3. stanovovaný analyt. Převzato a upraveno z: Sanavio and Silke, 2015	46
Obr. 13: Schématické zobrazení jednotlivých částí hmotnostního spektrometru. Převzato z: Watson and Sparkman, 2007.....	49
Obr. 14: Schéma kvadrupólového hmotnostního spektrometru. Převzato z: Honour, 2017.....	50
Obr. 15: Schématické zobrazení pracovních módů trojitého kvadrupólu. Převzato z: Begley, 2007.	52
Obr. 16: Ultrafiltrační zkumavky Centrifree®.....	59
Tab. 1: Nastavení parametru metody HPLC-MS/MS	62
Obr. 17: Kalibrační křivka s kyselinou trichloroctovou.....	63
Obr. 18: Kalibrační křivka precipitace s kyselinou trichloroctovou, hydroxidem amonným a acetonitrilem.....	63
Obr. 19: Křivka kalibrační řady s methanolem po ultrafiltraci.....	63
Obr. 20: Křivka kalibrační řady s methanolem a teikoplaninem	63
Obr. 21: Kalibrační křivka s kyselinou trichloroctovou a hydroxidem amonným	63
Tab. 2: Souhrn naměřených hodnot koncentrací analytu v biologickém materiálu za podmínek opakovatelnosti	64
Tab. 3: Souhrn naměřených hodnot koncentrací analytu v biologickém materiálu za podmínek mezilehlé preciznosti.....	65
Tab. 4: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu za podmínek opakovatelnosti. V tabulce je také vypočítána celková analytická chyba měření.	65
Tab. 5: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu za podmínek mezilehlé preciznosti. V tabulce je také vypočítána celková analytická chyba měření.	65
Tab. 6: Souhrn naměřených hodnot koncentrací pracovního rozsahu v biologickém materiálu.....	66

NS- negativní sérum, K2- kontrola ClinCheck Reciepe Level I	
Tab. 7: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu v rozsahu lineární oblasti.....	66
Obr. 22: Pracovní rozsah měření (linearita) v biologickém materiálu. Graf závislosti průměru nalezených hodnot a cílových koncentrací. Linearita je ověřena pro daný koncentrační rozsah.....	66
Tab. 8: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami LAG1 a CLO	69
Tab. 9: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami LAG2 a SMN.....	69
Tab. 10: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami VAN3 a HPLC-MS.....	69
Tab. 11: Souhrnné statistiky metod LAG1, CLO, LAG2 a SMN pro měření vankomycinu (mg/l).....	73
Tab. 12: Souhrnné statistiky metod VAN3 a HPLC-MS pro měření vankomycinu (mg/l).....	73
Tab. 13: Ověření shody srovnávaných metod - souhrnné statistiky, odhady mediánu a výsledky Passingovy-Bablokovy regrese.....	73
Obr. 23: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (mg/l) (Blandův - Altmanův graf).....	74
Obr. 24: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (mg/l) (Passingova-Bablokova regrese).....	75
Obr. 25: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (párové krabicové grafy).....	76
Obr. 26: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (krabicové grafy pozorovaných rozdílů a histogramy).....	76
Obr. 27: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (angl. Mountain plot).....	77

Seznam symbolů

^3H – radioaktivní vodík, tritium

AUC – plocha pod křivkou (Area Under the Curve)

CDP – krystalický degradační produkt

CID – kolizně indukovaná disociace

CO – oxid uhelnatý

CO₂ – oxid uhličitý

COOH – karboxylová skupina

DNA – dvouřetězcová nukleová kyselina

ELISA - enzymově značená imunoanalýza

EMIT – homogenní enzymová imunoanalýza

FPIA – fluorescenční polarizační imunoanalýza

H₂O - voda

HFBA – heptafluorobutyrová kyselina

HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

hVISA - heterogenní kmen *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu

IgE – imunoglobulin typu E

JIP – jednotka intenzivní péče

KIMS – kinetická interakce mikročastic v roztoku

MALDI – matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MIPs – molekulárně imprintované polymery

DAD – detektor diodového pole

MRM – monitorování multiplexních reakcí (multiple reaction monitoring)

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

NAD/NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)

Na⁺ - sodný ion

NH₂ - aminová skupina

p.o. – perorální dávkování

pH – záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku

PK/PD – farmakokinetický/farmakodynamický parametr

RIA - radioimunoanalýza

SA – *Staphylococcus aureus*

SIM – selektivní záznam iontu

SPC – souhrn údajů o léčivém přípravku

SRM – monitorování vybraných reakcí

TDM – terapeutické monitorování léčiv

UPLC – ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky

VRSA - vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Úvod

Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum používané k léčbě gram pozitivních bakteriálních infekcí. Je lékem, který se volí u pacientů s vážnými infekcemi, často nozokomiálními nákazami z nemocničního prostředí. Ukázalo se, že dokáže úspěšně léčit infekce vyvolané bakterií *Staphylococcus aureus*, která se stala necitlivou na methicilin. Vývoj nových antibiotik je složitý, ale velmi potřebný úkol. Bakterie jsou totiž evolučně úspěšné a rychle se u nich vyvíjí rezistence na antibiotika. Proto je třeba důkladně zhodnotit nutnost použití antibiotika v léčbě. Dnes je už hlášen výskyt kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních na vankomycin.

U každého léku lze najít nějaké nežádoucí účinky. Vankomycin je rizikový díky prokázaným nefrotoickým a ototoickým účinkům. Toto antibiotikum má velmi úzké terapeutické okno, a proto je doporučováno během léčby jeho rutinní terapeutické monitorování. Základem je zajištění účinné a bezpečné léčby pacienta, která ve výsledku zkrátí dobu hospitalizace a sníží riziko vzniku rezistence a selhání antibiotika. Kromě dodržování doporučených hladin koncentrací vankomycinu je důležité počítat s individualitou pacienta a jeho zdravotním stavem. Dávkování je nutné přizpůsobit zejména u obézních pacientů, vážně nemocných a seniorů. V dnešní době je monitorování vankomycinu stále častěji založeno na softwarech, které pracují s databázemi populačních studií.

Nicméně v běžné praxi se koncentrace vankomycinu u pacientů stanovuje různými imunochemickými a separačními metodami. Rozdílnost stanovení a citlivosti těchto metod je problematická z hlediska jejich harmonizace a standardizace. Tyto problémy by mohly být řešeny vyvinutím rychlé a spolehlivé metody kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. Metody založené na kapalinové chromatografii by mohly snížit náklady potřebné k analýze na rozdíl od imunochemických metod.

Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout a validovat vlastní metodu HPLC-MS/MS stanovení vankomycinu v séru. Následovalo porovnání výsledků měření vankomycinu vyvinutou metodou s komerčními imunochemickými metodami běžně využívanými v rutinní praxi. Posledním cílem bylo zhodnotit potřebnost standardizace a harmonizace analytických metod stanovení vankomycinu.

Historie

Před více než 50 lety byla objevena sloučenina dnes známá jako vankomycin. K objevu přispěl zvýšený výskyt případů vážných stafylokokových infekcí, které nereagovaly na léčbu. Problémem byla rezistence bakterií na používaná antibiotika, která začala být nebezpečně častá. Vědci se proto snažili nahradit stávající antibiotika jinými. Nahrazením penicilinu erytromycinem sice docílili poklesu rezistence stafylokoka na penicilin, ale zároveň vznikla rezistence bakteriálních kmenů na erytromycin. Proto bylo třeba co nejrychleji objevit nové antimikrobiální látky, které by byly účinné proti stafylokokům (Griffith, 1981).

Tímto směrem se vydala také společnost Eli Lilly, která se zabývala nalezením vysoce specifických antibiotik působících proti stafylokokům. Sbírali vzorky půdy z oblastí po celém světě a následně je podrobovali screeningu. Průlom přišel v roce 1952, kdy misionář na Borneu poslal vzorek půdy z džungle svému příteli, Dr. Kornfeldovi, organickému chemikovi společnosti Eli Lilly. V tomto vzorku byla nalezena sloučenina označená číslem 05865. Produkoval ji mikroorganismus *Streptomyces orientalis*. Nalezená sloučenina vykazovala vysoký stupeň baktericidní aktivity proti velkému množství gram-pozitivních mikroorganismů, včetně penicilin-rezistentních stafylokoků. Po tomto objevu se sloučenina 05865 začala intenzivně testovat. Velmi důležité bylo zjistit, zda si kmeny bakterií na novou sloučeninu nevytvoří rezistenci, jak se tomu stalo u předchozích antibiotik. Nicméně se ukázalo, že rezistence vůči objevené sloučenině 05865 je výrazně nižší, než tomu bylo u penicilinu (Griffith, 1981; McGuire, Wolfe and Ziegler, 1955).

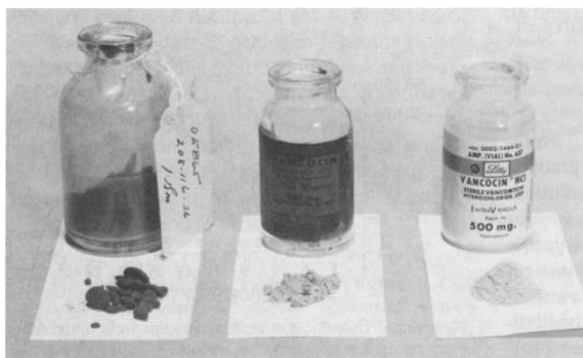
Po příznivých výsledcích experimentů byla sloučenina 05865 navržena pro klinické testování. Předtím musela být zajištěna její purifikace. Do té doby se sloučenině přezdívalo Mississipské bahno kvůli typické hnědé barvě a přítomnosti nečistot. První purifikace sloučeniny byla provedena precipitací kyselinou pikrovou a tímto postupem se získala sloučenina, jejíž baktericidní aktivita byla 780 µg/ml. Později byl vyvinut výhodnější postup purifikace na ionexové pryskyřici. Tímto přístupem se získala mnohem čistší sloučenina a

dostala také nový název vankomycin odvozený od slova vanquish, což v překladu znamená porazit (Griffith, 1981).

Některé studie na zvířatech naznačovaly, že vankomycin by mohl být pro lidi nebezpečným. Přesto se experimentálně podal dobrovolníkům a dosáhnutím terapeutické koncentrace úspěšně vyléčil těžké stafylokokové infekce u 8 z 9 pacientů. Jedním z vyléčených byl i pacient s endokarditidou (Geraci et al, 1956). Další podobné studie podpořily úspěšnost vankomycinu a tak byl v roce 1958 schválen společností US Food and Drug Administration. Společnost Eli Lilly tak poprvé uvedla na trh vankomycin pod názvem Vancocin (Moellering,2006).

Naneštěstí ve stejném roce jako vankomycin byl pro léčbu schválen antibiotikum methicilin. Ten se stal lékem první volby v léčbě stafylokokových infekcí. Vzhledem k tomu, že testy na vankomycin provedené v 50. letech odhalily jeho toxické působení – ototoxicitu a nefrotoxicitu, odsunul se na vedlejší kolej. Během 50. – 70. let minulého století byl používán pouze jako lék poslední záchrany. Podával se zejména pacientům alergickým na β -laktamová antibiotika, penicilin nebo při velmi vážných bakteriálních infekcích (Moellering,2006; Griffith, 1981).

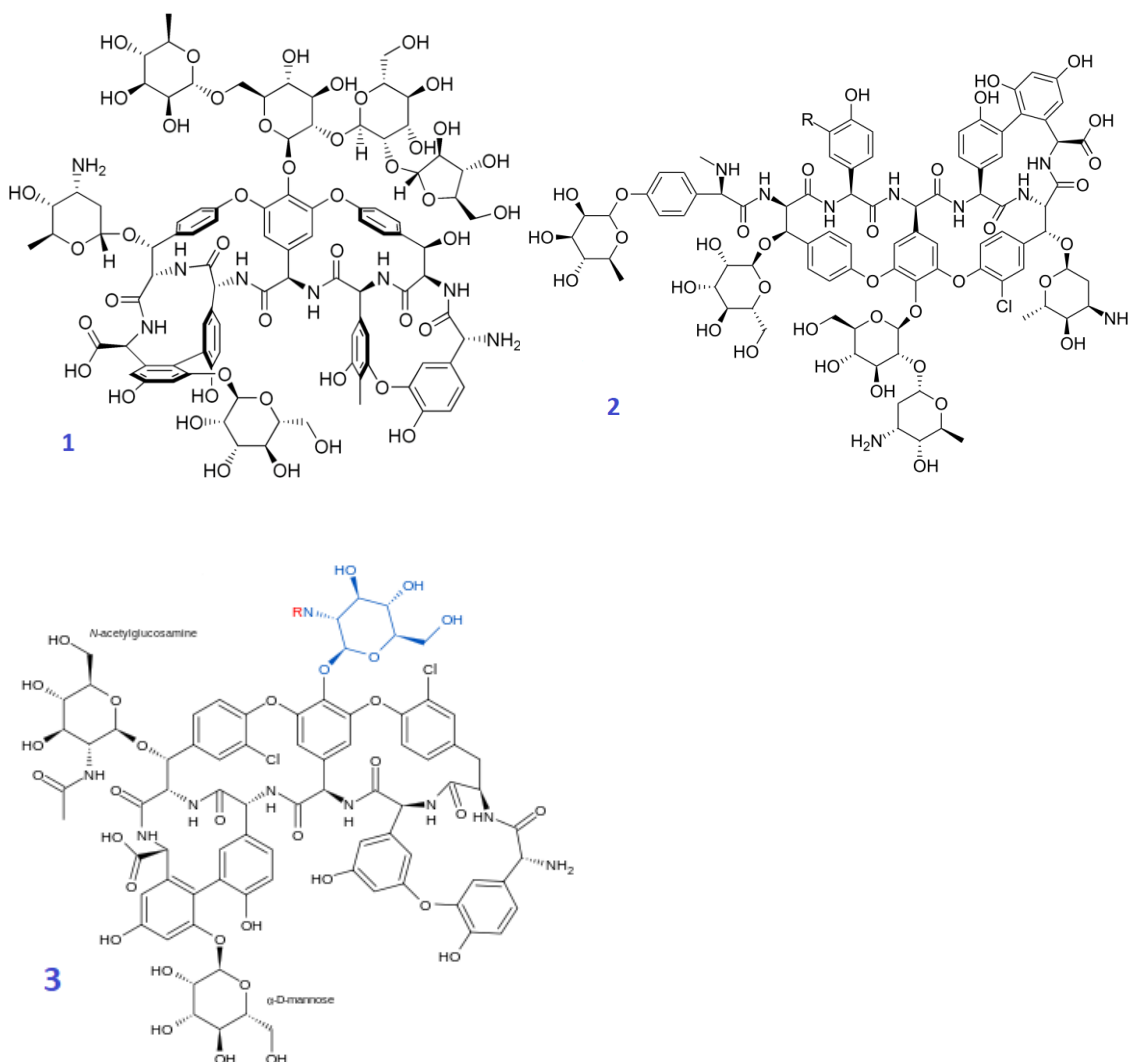
V 70. letech se začaly objevovat kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin. Tato situace opět oživila zájem o vankomycin a začal se intenzivněji používat. Vědci pomalu začali přehodnocovat názor na vankomycin a začali jej brát jako potenciálně užitečné antibiotikum (Moellering,2006; Griffith, 1981).



Obr. 1: Podoba vankomycinu v různých stádiích vývoje. Vlevo „Mississipské bahno“, původní vzhled sloučeniny, uprostřed vzhled po přečištění kyselinou pikrovou. Vpravo současná podoba jako vankomycin hydrochlorid. Převzato z Griffitha, 1981.

Obecná charakteristika vankomycinu

Vankomycin se řadí mezi tricyklická glykoproteinová antibiotika. Mezi další zástupce glykopeptidů patří ristocetin A, avoparcin a teikoplanin (Obr. 2). Vankomycin má antibakteriální účinek na grampozitivní bakterie, včetně MRSA.



Obr. 2: Chemická struktura glykopeptidů – 1. ristocetin A, 2. avoparcin, 3. teikoplanin. Převzato z: Wikipedia

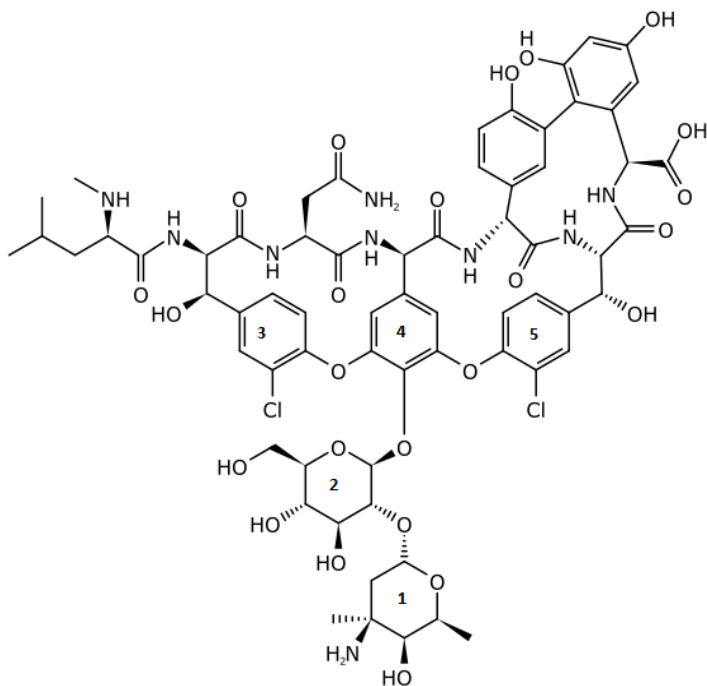
Fyzikálně – chemické vlastnosti

Jako chemická sloučenina je poměrně stabilní a dobře rozpustný ve vodě. Jeho molekulová hmotnost 1449,3 g/mol je výrazně vyšší než u ostatních používaných antibiotik. Pro srovnání molekulová hmotnost methicilinu je pouze 380,42 g/mol (Levine, 2006).

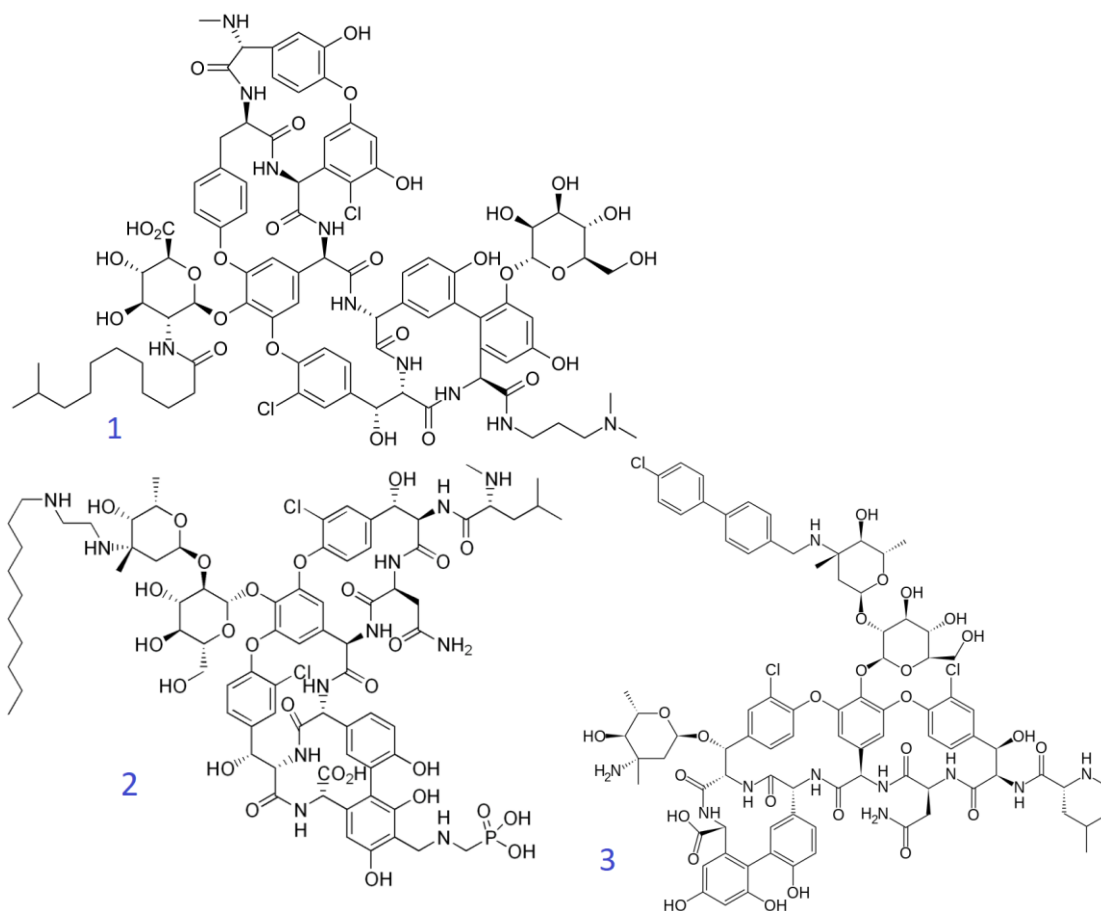
Glykopeptidy absorbují záření v UV oblasti s maximem při 260 nm. Co se týče pH je rozsah použití vankomycinu 4–7. Při pH nižším nebo vyšším, než je toto rozmezí nejsou glykopeptidy stabilní v roztoku. Mimo toto rozmezí podléhají rychleji degradaci. Jejich rozklad je provázen žloutnutím a tvorbou sraženin. Izoelektrického bodu dosahuje sloučenina při pH 7,2 (Gasper et al., 1996; Ward and Oswald, 1997; Armstrong and Nair, 1997)

Chemickou strukturou je vankomycin lineární heptapeptid obsahující aminokyselinovou a sacharidovou část. Jeho strukturní vzorec je zobrazený na Obr. 3. Vankomycin obsahuje pět aromatických kruhů, čímž se odlišuje od ostatních členů glykopeptidických antibiotik vankomycinové skupiny, které mají aromatických kruhů sedm. Dalším strukturním rysem je substituce kyslíku na aromatických kruzích 4, 5, 6 a 7. Substituenty na kruzích 2 a 6 jsou chlortyrosiny. Vankomycin ve své molekule obsahuje také aminokyselinovou substituci v podobě asparaginu (Harris and Harris, 1982). Sacharidovou část ve struktuře tvoří D-glukóza a L-vankosamin. U jednotlivých zástupců glykopeptidů se sacharidový zbytek liší.

Ukázalo se, že připojením jednoho či dvou lipofilních postranních řetězců do struktury glykopeptidu se mohou výrazně změnit farmakokinetické parametry antibiotika a jeho účinnost. Přirozeně má tuto vlastnost teikoplanin s postranním uhlovodíkovým řetězcem. Modifikací vankomycinu a dalších přirozených glykopeptidů byla vyvinuta tři nová semisyntetická antibiotika – dalbavancin, telavancin a oritavancin (Obr. 4). Tato antibiotika jsou antibakteriálně účinnější než vankomycin a výrobci je označují jako lipoglykopeptidy (Beneš, 2018).



Obr. 3: Chemická struktura vankomycinu. Převzato z: Wikipedia



Obr. 4: Chemická struktura semisyntetických glykopeptidů – 1. dalbavancin, 2. telavancin, 3. oritavancin. Převzato z: Wikipedia

Farmakokinetika

Pokud je vankomycin podáván intravenózně v množství 1 g, jeho maximální koncentrace v plazmě se pohybuje v rozmezí 20–50 mg/l. Vankomycin se z části váže v lidském těle na bílkoviny plazmy a dobře proniká do tkání včetně plic, kostí a kloubů. Jakmile dojde k dosažení rovnovážného stavu, je jeho distribuční objem větší, než odpovídá extracelulární tekutině (Rybak et al., 2009).

Do mozkomíšního moku bez přítomného zánětu proniká 0-4 mg/l vankomycinu, pokud je přítomný zánět (meningitida) pak je průnik 6-11 mg/l. Do vlastní mozkové tkáně proniká vankomycin lépe, jeho koncentrace se pohybuje mezi 1-7 mg/l (Grayson et al., 2010).

V kůži, která je bez přítomnosti zánětu, je hladina vankomycinu 0,1-0,3 mg/l extracelulární tekutiny. V tekutině zvlhčující sliznice je bez zánětu jeho koncentrace také velmi nízká (Rybak et al., 2009).

Při perorálním podání se vankomycin minimálně vstřebává z gastrointestiálního traktu. V séru byly při dávkování 4×500 mg p. o. zjištěny koncentrace okolo 0,5 mg/l. U anurických pacientů dosáhly koncentrace v séru po 16 dnech hodnot 10-20 mg/l (SPC).

Distribuční objem je asi 60 l – 1,73 m² tělesného povrchu. Ultrafiltrací bylo změřeno, že při sérových koncentracích od 10 mg/L do 100 mg/L je vazba na vankomycinu na plazmatické bílkoviny 30-35 % (SPC).

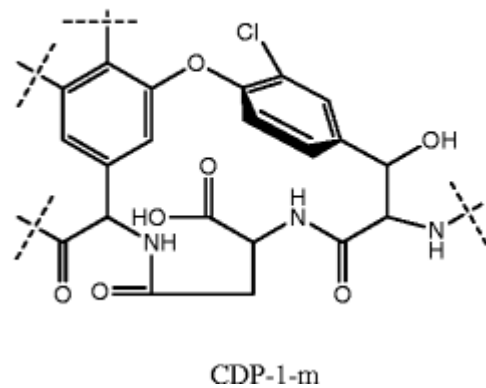
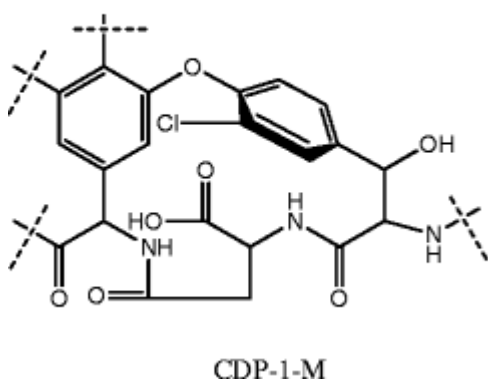
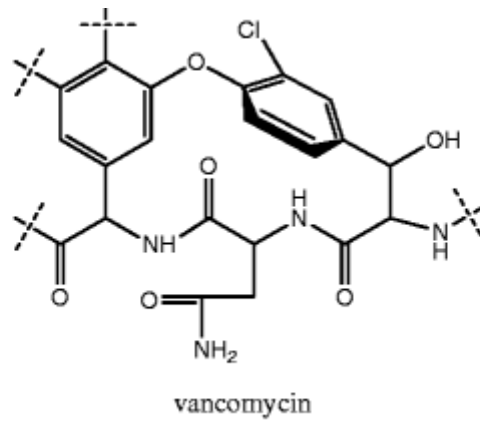
Vankomycin se vylučuje ledvinami bez přechodí biotransformace a jeho biologický poločas eliminace $T_{1/2}$ je 6 hodin (Martínková et al., 2018). Plazmatická clearance je přibližně 0,058 l · kg⁻¹ · h⁻¹ a renální clearance 0,048 l · kg⁻¹ · h⁻¹. Během prvních 24 hodin je asi 80% dávky vankomycinu vyloučeno močí glomerulární filtrací. Při poruše funkce ledvin se vylučování opoždí a zvyšuje riziko toxicity vankomycinu (SPC).

Degradační produkty vankomycinu

CDP je označení pro krystalický degradační produkt vankomycinu. Vzniká z vankomycinu hydrolytickou ztrátou amoniaku. CDP-1 byl identifikován v roce 1978 pomocí metody rentgenové difrakce (Harris, Kopecka and Harris,

1983). Tento produkt poskytuje dva izomery – CDP-1m (menší) a CDP-1M (větší). Liší se mezi sebou v poloze kruhu obsahujícího chlór, který je otočený o 180°. Struktury izomerů jsou uvedeny na Obr. 5. Transformace CDP-1M na CDP-1m spočívá v přesmyku týkajícího se amidového dusíku asparaginu ve struktuře vankomycinu. Hydrolytickým štěpením na α -uhlíku dojde poté ke vzniku izomeru CDP-1m. Oba tyto produkty postrádají antimikrobiální aktivitu vankomycinu. Důvodem je izomerace kyseliny asparagové na kyselinu isoasparagovou v polypeptidovém řetězci. Přeměna vankomycinu na degradační produkty je závislá na čase a teplotě. Při teplotě 20-25 °C je in vitro přeměněno 50% počáteční hmotnosti vankomycinu na CDP-1 za 16 hodin. Za 40 hodin je přeměněno 90 %. Tvorbu CDP-1 navíc podporuje přítomnost kyselého pH (Marshall, 1965; Harris, Kopecka and Harris, 1983).

Jejich vznik je problémem zejména u pacientů s renální insuficí, kdy dochází k jejich hromadění kvůli pomalé eliminaci z těla. Důsledkem hromadění může být selhání léčby nebo vznik rezistence. Imunochemické metody používající polyklonální ovčí protilátku falešně nadhodnocují výsledky vankomycinu. Nicméně po zavedení monoklonálních protilátek se křížová reaktivita snížila a v současnosti se nadhodnocení nepovažuje za klinicky relevantní a není potřeba úpravy metody, dokonce ani u pacientů s dialýzou a nefropatií. (Somerville et al., 1999; Chen et al., 2020).



Obr. 5: Struktura degradačních produktů vankomycinu. Převzato z: Abdollahpour, Heydari and Shamsipur, 2017

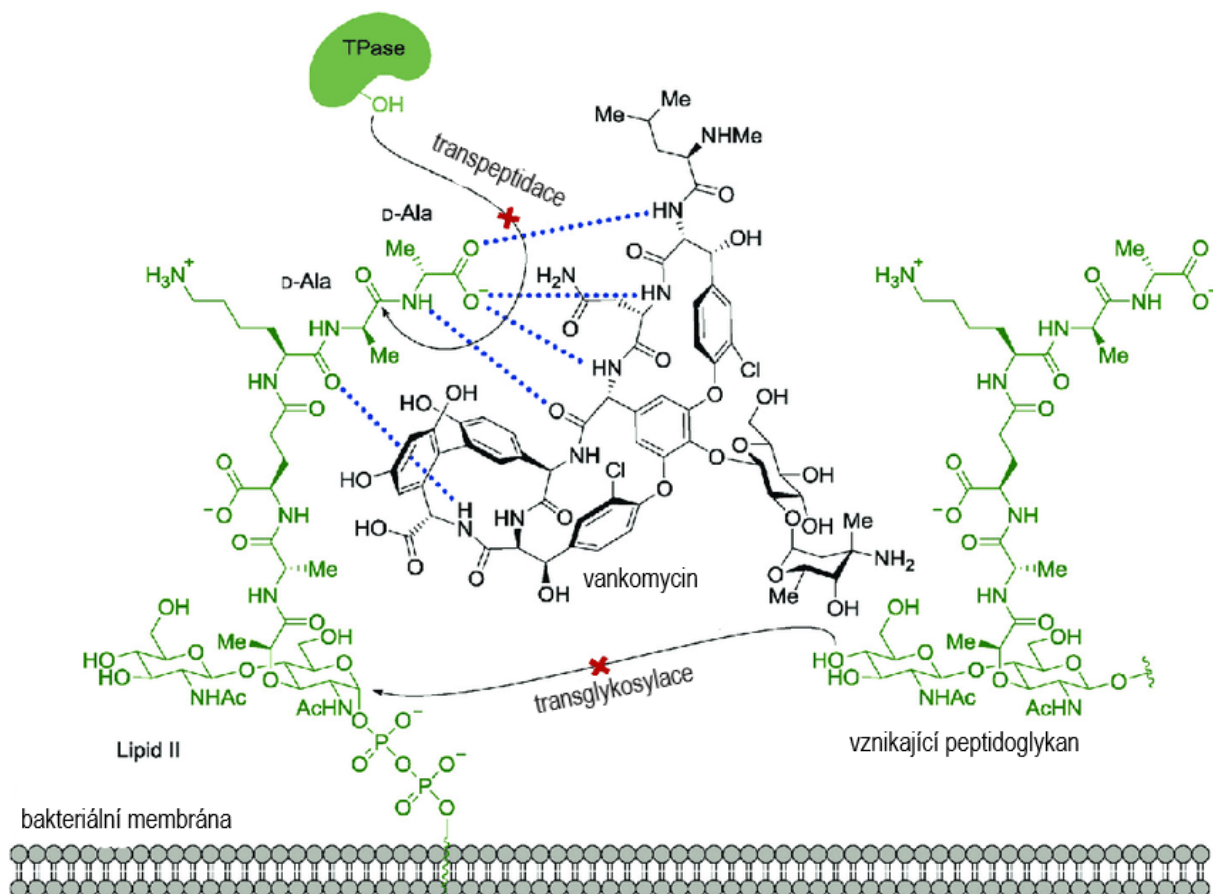
Mechanismus účinku

Obecně všechna glykopeptidová antibiotika, k nimž patří vankomycin, teikoplanin, oritavancin, dalbavancin a další mají baktericidní účinek, který spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny bakterií. Léčivo je baktericidní pro dělící se mikroorganismy. Pro pochopení antibakteriálního působení vankomycinu bylo klíčové objevení a popsání jeho chemické struktury. Předtím se jeho vlastnosti zkoumaly v biochemických studiích a až později na molekulární úrovni. Antibiotika třídy penicilinů také inhibují syntézu buněčné stěny, ale jiným způsobem. Díky tomu vankomycin účinkuje při bakteriálních onemocněních rezistentních na penicilin. (Barna and Williams, 1984).

Důvodem, proč vankomycin účinkuje na grampozitivní bakterie, a nikoliv na gramnegativní, je rozdíl ve stavbě buněčné stěny. U gramnegativních bakterií je tenká vrstva peptidoglykanu chráněna před působením vankomycinu vnější membránou tvořenou lipopolysacharidovo-fosfolipidovou proteinovou

strukturou. Naopak grampozitivní bakterie mají mnohem tlustší vrstvu peptidoglykanu, ale chybí jim vnější membrána (Barna and Williams, 1984).

Vankomycin se pevně naváže na polypeptidové meziproducty s charakteristickým volným karboxylovým koncem -D-Ala-D-Ala- (D-alanyl-D-alanin) a inhibuje tak biosyntézu peptidoglykanu. Klíčovým meziproduktem, na který se váže vankomycin, je lipid II. U bakterií je lipid II začleněn s pomocí transpeptidasy a transglykosylasy do peptidoglykanové buněčné stěny. Vankomycinem se zablokuje aktivita transglykosylasy, která by normálně lipid II přenesla na polyglykanový řetězec (Loll and Axelsen, 2000; Chellat, Raguž and Riedl, 2016). Vankomycin tak vytvoří stérickou překážku bránící v dokončení syntézy peptidoglykanu. Neschopnost syntézy buněčné stěny vede ke smrti bakterie. Schéma tohoto procesu zobrazuje Obr.6.



Obr. 6: Zobrazení vazby vankomycinu na lipid II. Interagující skupiny jsou zvýrazněny modře. Převzato a upraveno dle Nitanaí et al., 2009.

Rezistence

Vankomycin se začal používat jako náhrada methicilinu k léčbě MRSA infekcí. Nicméně s jeho narůstajícím používáním se začala stejně jako u methicilinu rozvíjet rezistence. V dnešní době je výskyt rezistentních kmenů vysoký a představuje vážný problém. Spojitost lze nalézt v nadměrném používání antibiotik ve zdravotnictví a zemědělství (Ashwin and Muralidharan, 2015; Chang et al., 2015). Nadměrným užíváním antibiotik se zvyšuje selekční tlak působící na bakterie. Jejich snahou je přežít, a proto se snaží vyvinout mechanismy, které jim umožní se vyhnout nebo neutralizovat dopad antimikrobiálních látek. Tyto bakteriální změny jsou pak zakódovány v DNA a následně mohou být přenášeny z jednoho druhu na jiný (Hastings, Rosenberg and Slack, 2004; Holmes et al., 2016).

Existují dva popsané typy rezistence na vankomycin u bakterií. Prvním je výměna D-alaninu za D-laktát nebo D-serin. D-alanin tvoří koncovou část peptidoglykanového prekurzoru. Pokud dojde k záměně tak je prekurzor pozměněný a antibiotikum se na něj není schopno navázat. Je popsáno 9 různých typů tohoto typu rezistence na vankomycin VanA – VanN (Jorgensen et al., 2015).

Tato rezistence se vyskytuje zpravidla u enterokoků, které se označují jako VRE (vancomycin resistant enterococci). Například VanA je nejčastějším typem rezistence a vyskytuje se hlavně u *Enterococcus faecium*. Důvodem rozšíření tohoto typu rezistence je fakt, že gen, který se podílí na syntéze D-alaninu je umístěn na plasmidu. Zároveň jsou na plasmidu umístěny i regulátorové geny řídící aktivitu tohoto genu. Bakteriální buňka tak pracuje ekonomicky a syntetizuje D-alanin pouze v přítomnosti antibiotika.

VanA typ je rezistentní nejen na vankomycin, ale také na teikoplanin. Rezistence VanA typu se pravděpodobně přenesla z enterokoků na *Staphylococcus aureus* a dala vzniknout fenotypu VRSA. Rezistence VanB je méně častá, protože bývá kódována chromozomálními geny a ne plasmidem. Z toho důvodu se méně šíří. Navíc u VanB zůstává zachována citlivost na teikoplanin. Rezistence VanC spočívá ve výměně D-alaninu za D-serin a geny způsobující tuto výměnu se nachází v bakteriálním chromozomu. Tento typ

nízké rezistence na vankomycin lze nalézt u kmenů *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* a *E. flavescens*. (Beneš, 2018). Dalším typem je rezistence VanD, která byla pozorována u *E. faecium* a ukázala se jako podobná s typy VanA a VanB. Nicméně je pravděpodobně VanD umístěn na chromozomu, a proto není přenosný na jiné enterokoky. Zajímavým příkladem jsou vankomycin-dependentní enterokoky, které jsou nejen rezistentní vůči působení vankomycinu, ale navíc jej potřebují k vlastnímu růstu (Cetinkaya, Falk and Mayhall, 2000).

Druhým typem rezistence je zvětšení tloušťky vrstvy peptidoglykanového obalu. Tato změna souvisí i se snížením hustoty příčných vazeb mezi peptidoglykanovými vlákny. Zůstává mnohem více volných konců se skupinou D-alanin-D-alanin. Antibiotikum tak hůř proniká tlustou vrstvou peptidoglykanu a bakterie také mají více cílových skupin D-alanin-D-alanin, na které se váže. Rezistence nevzniká skokově, ale účastní se jí řada genů. Výsledkem je snížená citlivost na vankomycin a ne absolutní rezistence. První příklad tohoto typu rezistence byl popsán u *Staphylococcus aureus* (Beneš, 2018).

Kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní označované VRSA se dělí do tří skupin na základě citlivosti k vankomycinu. Prvním je VSSA označující kmeny citlivé na vankomycin s MIC <2µg/ml. Druhým typem je VISA pro středně citlivé kmeny s MIC 4-8 µg/ml a poslední je pak rezistentní typ VRSA s MIC > 16 µg/ml. Pro určení typu kmene *S. aureus* je třeba využít molekulární metody a prokázat přítomnost VanA nebo jiných rezistentních determinant (Werner, Strommenger and Witte, 2008).

VISA kmeny jsou charakteristické intermediární rezistencí, která se často týká jen některých klonů v bakteriální populaci. Celkově taková populace je heterorezistentní a pro kmen je pak označení hVISA. Tento hVISA kmen se během testování jeví jako citlivý, ale obsahuje subpopulace semirezistentních buněk, které se špatně prokazují. Působením selekčního tlaku se tyto semirezistentní buňky rozrostou na úkor původní citlivé populace (Beneš, 2018).

Zvyšující se výskyt rezistence na vankomycin se podílí na konci dominance tohoto antibiotika v léčbě infekcí vyvolaných grampozitivními

bakteriemi. Nicméně dokud bude rezistence pod kontrolou a nedojde k objevu nového účinného antibiotika, zůstane lékem první volby. Pro kontrolu rezistence je třeba dbát na správné používání antibiotika a dodržovat pokyny pro zamezení šíření infekce ve zdravotnických zařízeních (Cong, Yang and Rao, 2020).

Klinické využití

Tradičně se vankomycin používá k léčbě vážných bakteriálních infekcí způsobených methicilin rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) a gram pozitivními bakteriemi rezistentními na β -laktamová antibiotika (Moellering, 2006). Jedná se zejména o nozokomiální infekce vyvolané rezistentními patogeny. Ty se vyskytují hlavně v nemocnicích na jednotkách intenzivní péče, novorozeneckých odděleních a odděleních imunosuprimovaných pacientů. Zdrojem nákaz je ošetřující personál, prostředí (oděvy, prach) a dlouhodobě hospitalizovaní pacienti. Léčba vankomycinem se volí také v případě infekční endokarditidy. Častějším používáním vankomycinu bylo zjištěno, že není zcela rovnocenný v porovnání s β -laktamovými antibiotiky. Příkladem je léčba pacientů se septickou tromboflebitidou, kdy se podávala kombinace heparinu a vankomycinu. U některých nemocných se prokázala subterapeutická koncentrace vankomycinu. Příčinou bylo podání obou léčiv stejnou hadičkou, kdy došlo vlivem heparinu ke tvorbě sraženin vankomycinu. Následkem toho klesla antibiotická účinnost vankomycinu. (Barg, Supena and Fekety, 1986).

Léčba vankomycinem musí být volena i z hlediska možné interakce s dalšími látkami a léčivými přípravky. Roztok vankomycin hydrochloridu má nízké pH, což může způsobit chemickou nebo fyzikální nestabilitu po smísení s jinými látkami. Je třeba kontrolovat vizuálně zbarvení a přítomnost sraženin. Také je nezbytné vyhnout se mísení s alkalickými roztoky.

Při anestezii může dojít vlivem vankomycinu k zesílení deprese myokardu, a proto je nutné monitorovat srdce a pomalou infuzí podávat správně naředěnou dávku. Při jejich současném podávání byly popsány vedlejší reakce jako vznik erytrému, zčervenání a anafylaktoidní reakce. Zamezit těmto stavům lze podáním vankomycinu 60 minut před anestezí.

Podobný účinek jako s anestetiky má vankomycin při interakci s myorelaxancii, například sukcinylcholinem. Pokud se podává během chirurgického zákroku nebo v krátkém čase po něm vede k zesílení jejich účinků nervosvalové blokády.

Podávání vankomycinu v kombinaci jiné nefrotoxické, neurotoxické nebo ototoxické látky může vést ke zvýšení jeho toxického působení. Mezi tyto látky patří gentamicin, streptomycin, tobramycin, kolistin, amikacin, amfotericin B a další. Pro synergický účinek vankomycinu a jiné látky (např. gentamicinu) je potřeba snížit maximální dávku vankomycinu na 500 mg každých 8 hodin (SPC).

Kombinace vankomycinu a cefalosporinů 3. generace se osvědčilo jako efektivní řešení v léčbě pneumokokové meningitidy (Ahmed, 1997).

Využití našel vankomycin také při podání perorálně v léčbě pseudomembrázní enterokolitidy vyvolané *Clostridium difficile*. V malé míře je toto akutní střevní onemocnění způsobené také již zmíněným *Staphylococcus aureus*, který je citlivý na léčbu vankomycinem. K tomuto stavu dochází při léčbě širokospektrálními antibiotiky, ke kterým je *Staphylococcus aureus* rezistentní a dojde k potlačení střevní mikroflóry. Následně dojde k masivnímu poškození střevní sliznice. Ke zvolení vankomycinu jako léku na pseudomembrázní enterokolitidu přispělo také to, že se špatně absorbuje ze střeva. Nicméně jeho používání proti patogenním enterokokům částečně vedlo k rozvoji rezistence označované VRE (vankomycin rezistentní enterokoky) (Gerding, 1997; Bednář et al., 1996).

Staphylococcus aureus (SA)

Jedná se o grampozitivní, nesporulující, nepohyblivou bakterii. SA patří mezi koaguláza negativní stafylokoky. Morfologicky se jedná o sférické koky, které se mohou vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích nebo tvořit nepravidelné shluky (hlavně v klinickém materiálu) a hrozny (kultury a kultivační půdy). SA patří do podskupiny koaguláza – pozitivních stafylokoků a řadí se mezi biochemicky nejaktivnější bakteriální druhy. Produkuje řadu toxinů, exoenzymů a komplexních látek buněčné stěny, které se podílejí na virulenci. SA je patogenní pro člověka a obecně všechny teplokrevné živočichy. Člověk je

obvykle vůči stafylokokové infekci odolný, ale určité predispozice (chirurgický zákrok, úraz, diabetes, malignity, zavedený katetr) a oslabení imunity mohou vést k rozvoji onemocnění. Infekce jsou rizikovější také u starších lidí.

Stafylokokové infekce často vedou k recidivám nebo chronickému průběhu. Po průniku infekce do organismu může po překonání obranných mechanismů dojít k pomnožení stafylokoků a následně infekce může pronikat do dalších tkání.

Folikulitida je označení pro zánět vlasových váčků. V místě infekce dochází k hromadění leukocyty a vzniká nekróza epitelu, která se vizuálně projevuje jako červené vředy v okolí ochlupení. Tento stav může vést k tvorbě intersticiálního zánětu označovaného jako furunkl (Klaban, 2005).

Osteomyelitida neboli zánět kostí je onemocnění nejčastěji vyvolané SA. Může vzniknout z primární infekce nebo sekundárně cestou hematogenního rozsevu ze zánětlivého ložiska v organismu. Při napadení kosterního systému dojde k rozsevu infekce do metafýz dlouhých kostí. Následkem je prudká bolestivost, vysoká teplota a otok měkkých tkání. Hnis obsahující stafylokoky se často dostává do dřeňových vén a vede ke vzniku tromboflebitidy. Takto postižená tkáň nekrotizuje a zánět směřuje dál směrem k povrchu. Léčba probíhá chirurgickým zákrokem nebo podáním antibiotika.

Pneumonie (zápal plic) vzniká většinou jako sekundární infekce, která postihuje již poškozený dýchací systém. Často po infekci vyvolané virem chřipky. Spouštěčem může být také dlouhodobá intubace, aspirace zvratků nebo hematogenního původu při infekci žil a endokardu. Primárně vzniká pneumonie u starších lidí, osob s oslabenou imunitou nebo imunodeficiencí. Onemocnění má náhlý začátek s příznaky jako vysoká horečka, třesavka, schvácenost, poruchy vědomí, tachypnoí, tachykardií, hypotenzí a vznikem abscesů v postižené plicní tkáni. Bez lékařského zásahu se rychle rozvíjí septický syndrom a šok (Bednář et al., 1996).

Clostridium difficile

Jedná se o grampozitivní bakterii se štíhlým tyčinkovitým tvarem. Tvoří spóry a to zejména ve střevě. Je vysoce citlivá na vankomycin, ale oproti ostatním klostridiím je rezistentní na cefoxitin.

Pseudomembránová enterokolitida vzniká z endogenního zdroje *C. difficile* působením jeho toxinů. Někdy vzniká po podání antibiotik, jak bylo uvedeno výše. Dochází k tvorbě lézí v terminálním ileu a v kolon s charakteristikou nekrotického ložiska v mukóze a submukóze. Prvními příznaky jsou silné bolesti břicha a vodnaté průjmy, které neobsahují příměs krve. Základní terapií je podávání metronidazolu perorálně. Ke specifické léčbě slouží vankomycin podávaný perorálně. U nezávažné infekce je doporučená dávka 125 mg každých 6 hodin po dobu 10 dní. V případě závažného průběhu lze dávku navýšit až na 500 mg každých 6 hodin. (Bednář et al., 1996; Klaban, 2005; SPC).

Enterokoky

Do rodu *Enterococcus* patří 12 druhů, nejdůležitější jsou pro člověka *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* a *E. durans*. Jedná se o grampozitivní, kataláza-negativní koky tvořící dvojice nebo krátké řetězky. Tvoří důležitou součást normální mikroflóry tlustého střeva, ale nalézt je můžeme také v tenkém střevě, genitálním traktu a výjimečně v horních dýchacích cestách. Jsou původci závažných infekcí močových a žlučových cest. Způsobují také gynekologické záněty a infekční komplikace v břišní chirurgii (Bednář et al., 1996; Klaban, 2005).

Dávkování

Kvůli špatné absorpci vankomycinu z gastrointestinálního traktu se pacientům podává výhradně intravenózně. Doba infuze by měla být 1-2 hodiny. Při kratší době hrozí rozvoj tzv. „red man“ syndromu. Během něj dochází ke vzniku červené svědivé vyrážky v horní části těla, poklesu krevního tlaku a hrozí riziko srdeční zástavy. Příčinou tohoto syndromu je nadměrná stimulace imunitního systému vankomycinem. Dochází k degranulaci žírných buněk a bazofilů a následkem toho k uvolnění histaminu z těchto buněk nezávisle na komplementu nebo preformovaných protilátkách IgE (Davis, Smith and Koup, 1986). Výjimečně se může podávat perorálně k léčbě střevních infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*. Perorální podání v tomto případě umožňuje vankomycinu působit pouze ve střevech, kde se nachází patogen. (Rubinstein

and Keynan, 2014). Intramuskulární podání vankomycinu se nedoporučuje kvůli bolestivosti.

Doporučená koncentrace vankomycinu v séru u dospělých pacientů by se měla pohybovat v rozmezí 15-20 mg/L, což je údolní koncentrace měřená před podáním infuze vankomycinu. U závažných infekcí je rozmezí koncentrace dokonce až do 25 mg/L. Vrcholové koncentrace po infuzi by se měly pohybovat v rozmezí 20-40 mg/L. V případě vážných infekcí se dnes akceptuje koncentrace až 50 mg/l. Počáteční dávka u dospělých by měla být vypočítána podle tělesné hmotnosti. Následně by se mělo dávkování upravovat na základě skutečných sérových koncentrací tak, aby se dosáhlo cílové terapeutické koncentrace. Jakmile se dosáhne cílového terapeutického rozmezí, účinek antibiotika se dalším zvyšováním již nezlepšuje, pouze se prodlužuje doba působení. Léčba a její účinnost může být taky ovlivněna typem režimu infuze. Pacienti mají buď kontinuální infuzi, nebo přerušovanou. Pravděpodobně lepšího výsledku dosáhne pacient, který má kontinuální infuzi (Rybak et al., 2009). Dávkování vankomycinu je třeba upravovat a monitorovat, protože špatně zvolená koncentrace může vést k rozvoji rezistence patogena nebo k projevu toxickým vlastnostem vankomycinu.

Účinnost vankomycinu je závislá na čase. Měřítkem účinnosti tedy není absolutní koncentrace dosažená po podání (C_{max}), ale poměr velikosti plochy pod křivkou koncentrace v závislosti na čase (AUC) k minimální inhibiční koncentraci patogena (MIC). Cílem je dosáhnout hodnoty farmakokineticko-farmakodynamického parametru účinnosti dle Vancomycin Therapeutic Guidelines:

$$AUC_{0-24}/MIC \geq 400$$

Tento parametr byl určen na základě in vitro, zvířecích a lidských studiích týkajících se dávkování vankomycinu dle doporučení od Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists z roku 2009. K dosažení této hodnoty jsou nutné vyšší dávky vankomycinu a vysoká minimální koncentrace v séru. Přesto, že vyšší dávky mohou vyvolat řadu nežádoucích účinků, jejich zvýšením se dosáhne příznivějšího výsledku léčby. Podávání nižších dávek snižuje efektivitu léčby a zvyšuje riziko mortality pacientů (Rybak et al., 2009).

Nicméně v roce 2019 došlo k aktualizaci doporučení týkající se horní hranice terapeutického rozmezí. Je doporučeno, že denní hodnota AUC_{24} za předpokladu, že bude hodnota $MIC=1$ bude udržována v rozmezí 400–600 mg/L•h (Rybak et al., 2020).

Monitorování koncentrace vankomycinu u pacientů je velmi důležité kvůli úzkému terapeutickému rozmezí. V léčbě se musí navíc zohledňovat i další zdravotní obtíže pacienta.

Toxicita

Jako každý lék má i vankomycin vedlejší účinky. Nejčastějším je „red man“ syndrom, dále pak neutropenie, horečka, slzení, trombocytopenie, flebitida žíly a další. U pacientů alergických na teikoplanin dochází ke zkřížené hypersenzitivitě a může dojít až k rozvoji anafylaktického šoku. Dalším popsaným vedlejším účinkem je bulózní reakce označovaná jako Stevens-Johnsonův syndrom charakteristický kožní vyrážkou s puchýři nebo poškozením sliznice. V tomto případě je nutné ukončit léčbu vankomycinem a provést dermatologické vyšetření. Při léčbě pacientů byla také zaznamenána nefrotoxicita a ototoxicita vankomycinu (Gupta, Biyani and Khaira, 2011; SPC).

Podezření na nefrotoxicitu vankomycin provázejí již od jeho schválení v roce 1958. Prvotní přípravky vankomycinu obsahovaly řadu nečistot, které byly považovány za hlavní důvody nefrotoxicity (Jeffres et al., 2007). Nefrotoxicita vyvolaná vankomycinem je obvykle reverzibilní a má mírnou až středně závažnou formu. Nicméně byly popsány rizikové faktory, které zvyšují riziko nefrotoxicity vankomycinu. Jedná se o vyšší věk pacienta, obezitu, delší dobu léčby, kombinovanou léčbu s nefrotoxickými látkami a již existující poškození ledvin (Filippone, Kraft and Farber, 2017). Zvýšení nefrotoxicity vankomycinu bylo pozorováno při jeho kombinovaném použití s aminoglykosidovými antibiotiky (Rybak et al., 1990).

Vankomycin je z těla vylučován převážně ledvinami. Hlavní část jeho eliminace probíhá prostřednictvím glomerulární filtrace a zbytek pak aktivní tubulární sekrecí. Zvířecí studie naznačily, že mechanismem nefrotoxicity vankomycinu je nekróza buněk proximálního tubulu. Nefrotoxicitu způsobuje hromadění vankomycinu v buňkách ledviny a také alterace ve funkci

mitochondrií. Poškození ledvin vankomycinem zahrnuje energeticky závislý transport mezi krví a tubulárními buňkami skrz bazolaterální membránu. Transport je zprostředkovaný systémem organických kyselin a receptorem megalinem, který se nachází na apikálním povrchu. Vlastní poranění proximálního tubulu je vyvolané oxidativním stresem, aktivací zánětlivých drah a komplementu. Superoxidy depolarizují membránový potenciál mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c a následné aktivaci kaspáz 3 a 9, jejichž funkce souvisí s buněčnou apoptózou. Dalším potencionálním mechanismem poškození je obstrukce tubulů sraženinami tvořenými vankomycinem (Prybylski, 2015; Pazhayattil and Shirali, 2014; Nakamura et al., 1996; Dieterich et al., 2009).

Vzhledem k tomu, že nefrotoxicitu může vyvolat oxidativní stres, vědci se zaměřili na jeho snížení použitím antioxidantů. Některé se ukázaly v experimentech jako účinné ve snaze ochránit buňky a patří mezi ně modifikovaná superoxid dismutáza, extrakt z Ginkgo biloby, α -lipoová kyselina, melatonin a další (Nishino et al., 2009; Celik et al., 2005). Na dalších zvířecích experimentech se zjistilo, že látky zvyšující vylučování ledvin jsou schopny snižovat nefrotoxicitu vyvolanou vankomycinem. Takovým příkladem je látka cilastatin testovaná na myších, která může blokovat megalinem zprostředkovaný transport vankomycinu v proximálním tubulu a snižovat tak nefrotoxicitu. Původním cílem cilostatinu je inhibice renální dehydropeptidázy-1 nacházející se na membráně proximálního tubulu, ale ukázalo se, že je v její blízkosti lokalizován také megalin. Vzhledem k tomu, že se megalin nachází také ve vnitřním uchu, uvažuje se o možném využití cilastatinu nejen ke snížení nefrotoxicity, ale také ototoxicity vankomycinu (Elyasi et al., 2013; Hori et al., 2017).

Dalším vedlejším účinkem vankomycinu je tedy ototoxicita, která se vyskytuje vzácně, může být přechodná nebo trvalá. U pacientů byl pozorován tinitus a ztráta sluchu. Ototoxicita se stejně jako nefrotoxicita připisuje zejména dřívějším nečistotám vankomycinu. Zvýšený výskyt ototoxicity byl pozorován u starších pacientů. Dále byla hlášena u pacientů, kteří již měli předcházející hluchotu a dostávali během léčby vysoké intravenózní dávky vankomycinu nebo byli léčeni ještě jinými ototoxickými přípravky. Poškození sluchu se během

terapie vankomycinem zjišťuje pomocí audiometru. Její riziko se zvyšuje při kombinovaném užití s aminoglykosidy a dalšími léky. Aby se snížilo riziko ototoxického působení vankomycinu doporučuje se pravidelně hodnotit krevní hladiny a sluchové funkce pacientů, zejména těch starších během léčby a po ní. (Forouzesh, Moise and Sakoulas, 2008; Lanvers-Kaminsky et al., 2017; Gupta, Biyani and Kaira, 2011; SPC).

TDM vankomycinu

Jedná se o stanovení koncentrace látky (xenobiotika) v séru, plazmě, krvi a následně se interpretuje výsledek v kontextu laboratorních a klinických dat. Nakonec se zhodnotí dávkovací režim léčiva a případně se upraví dle potřeb pacienta. Monitorování hladin léčiv má význam zejména u dětí, starších osob, obézních a pacientů s chorobnými stavy ovlivňujícími eliminaci léčiva z organismu.

Terapeutické monitorování antibiotik slouží k optimalizaci dávkování tak, aby se maximalizovala účinnost léčby a zároveň minimalizovalo riziko vedlejších účinků. Jeho dalším cílem je snížit náklady spojené s léčebnou péčí o pacienta. Terapeutické monitorování antibiotik se navíc snaží předcházet vzniku rezistence bakterií (Kacířová and Grundmann, 2015).

Většina doporučených dávkovacích režimů je navržena na průměrného pacienta, který nemá poruchu eliminačních funkcí nebo není léčený pro vážnou infekci způsobenou rezistentními kmeny bakterií. Proto často dochází v rámci těchto skupin pacientů k chybnému nebo nedostatečnému dávkování vankomycinu na základě odchylek PK/PD parametrů. Variability, které ovlivňují TDM, mohou být rozděleny do 3 částí: the bug, the drug and the patient (brouk, léčivo a pacient). Dohromady tvoří celek, který je základem pro správnou léčbu, kdy prvním krokem je určení původce onemocnění, zda je vhodné použít antibiotikum k léčbě a následně zohlednění variability MIC bakterií a správnému určení hodnoty AUC/MIC u vankomycinu. V posledním kroku je třeba zhodnotit stav a odchylky u pacienta. Výsledkem by měla být úspěšná léčba pacienta, zamezení rozvoji nežádoucích účinků, zkrácení doby hospitalizace a zamezení opětovnému vzniku infekce. Proces TDM je schématicky zobrazený na Obr. 7 (Cusumano et al., 2020).

U kriticky nemocných pacientů je často pozorován zvýšený srdeční výdej, který vede ke zvýšení clearance vankomycinu, dysfunkci endotelu a zvýšenou propustnost kapilár způsobující přebytek extravaskulární tekutiny. Transkapilární únik albuminu vede navíc u 40-50 % vážně nemocných pacientů k hypoalbuminémii. Tyto změny vyústí ve zvýšení distribučního objemu hydrofilních antibiotik, mezi které patří vankomycin. Kriticky nemocní pacienti

mají většinou také zvýšenou renální clearance, jejíž příčinou je pravděpodobně SIRS nebo vážný zánět v organismu, který dokáže zvýšit průtok krve ledvinami. U takových pacientů hrozí zvýšené riziko akutního selhání ledvin (Roberts et al., 2014; Ulldemolins et al., 2011; Alobaid et al., 2016)

Zvláštní skupinu tvoří také obézní pacienti, u kterých dochází kvůli většímu množství tukové a svalové tkáně ke změnám v distribučním objemu a clearance u hydrofilních antibiotik. Distribuční objem je kvůli špatné prostupnosti antibiotika skrz tukovou tkáň nadhodnocen, jak ukázala studie na pacientech léčených vankomycinem rozdělených na obézní a normální. U obézních pacientů byla hodnota V_d průměrně 74,4 L, tedy podstatně vyšší oproti 50,4 L u normálních. Zvýšená renální clearance může být způsobena zvýšením orgánové hmoty u pacientů vedoucí k vyššímu průtoku krve ledvinami. Vliv na dávkování má také bypass žaludku, který často obézní pacienti podstupují a výsledkem je snížení absorpční schopnosti (Alobaid et al., 2016; Meng et al., 2017; Richardson, Scheetz and O'Donnell, 2015; Miller and Smith, 2006).

Vankomycin je dávkován na základě tělesné hmotnosti, což může vést k chybným výsledkům u obézních pacientů, protože hmotnost zcela neodpovídá tělesné kompozici, která ovlivňuje jeho distribuci a clearance. Vyšší tělesná váha vede k výpočtu vyšší dávky vankomycinu, což zvyšuje riziko akutního selhání ledvin u pacientů s váhou ≥ 101 kg. Pomocť by mohlo použití počítačové tomografie spolu s morfologickými parametry jako je tělesná hloubka, objem trupu a celková plocha těla, které jak se ukázalo na studii 300 pacientů, korespondují s tělesným objemem a farmakokinetickými parametry vankomycinu (Pai et al., 2017; Lodise et al., 2009).

Problém se správným dávkováním je také u starších pacientů. Fyziologicky se s věkem snižuje průtok krve ledvinami, játry a zpomaluje se tak rychlost renální clearance. Snižuje se koncentrace proteinů v séru následkem je pak zvýšená koncentrace volného léčiva v krvi (Faulkner, Cox and Williamson, 2005).

U výše uvedených rizikových skupin pacientů je zvýšené riziko nefrotoxického působení vankomycinu a proto vyžadováno jeho TDM.

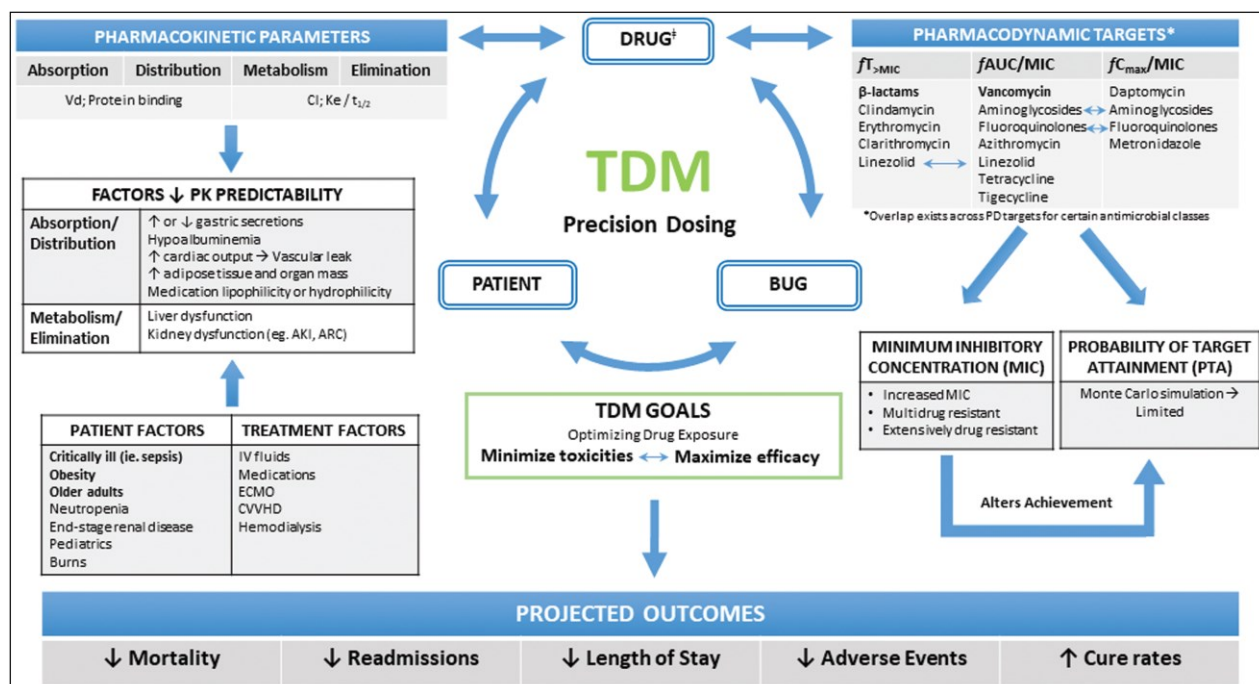
Vankomycin má složitý farmakokinetický profil a je nejčastěji popisován dvoukompartmentovým modelem, který se využívá k analýze dat. Občas je možné se setkat s jeho popisem s využitím tříkompartmentového nebo jednodukompartmentového modelu. V případě dvoukompartmentového modelu využívá systém centrálního a periferního systému, kdy mezi nimi dochází k výměně látek za účelem udržení rovnováhy. Kompartmenty jsou využívány pro simulaci pohybu látky v těle pacienta a pracují s nimi software pomůcky sloužící k TDM (Rybak, 2006; Zamoner et al., 2019).

V klinické praxi je často obtížné udržet koncentraci vankomycinu u pacienta v terapeutickém rozmezí 15-20 mg/L. Často se pak stává, že pacienti dosahují subterapeutických hodnot vankomycinu. Uvádí se hned několik příčin, které zvyšují šanci na nedostačující nebo špatně zvolenou léčbu vankomycinem. Těmito příčinami se zabývala studie zaměřená na pacienty na oddělení jednotky intenzivní péče (JIP). Tito pacienti jsou často vážně nemocní a prodělávají vážně infekce, které ovlivňují vylučování a metabolismus antibiotik. U pacientů se zvýšenou renální clearance to vede k nízkému poměru AUC_{0-24}/MIC , který nedosahuje doporučené hodnoty 400. Dále se ukázalo, že často je léčba vankomycinem špatně zvolená a po provedení mikrobiologického stanovení se zjistilo, že u 55 pacientů z 83 nebyl detekován patogen citlivý na vankomycin nebo se jednalo o kolonizátora. Navíc u pacientů infekce souvisí se špatnou údržbou zavedeného katetru (Helset et al., 2020). Zvýšená renální clearance představuje patologický stav, kdy ledviny vykazují nadměrnou filtrační aktivitu, snižují tím hladinu antibiotika a tím znemožňují dosáhnouti terapeutické koncentrace. K odhalení tohoto stavu slouží monitorování clearance kreatininu. Doporučením je dávkování nejvyšších bezpečných dávek, prodloužení doby infuze nebo v krajním případě zvážit změnu léčivého přípravku (Chen and Nikolau, 2020).

Zvláštní skupinou jsou pacienti, kteří po selhání ledvin podstupují hemodialýzu. Často jsou tito pacienti ohroženi infekcemi a volí se u nich k léčbě vankomycin.

Clearance vankomycinu ovlivňuje při hemodialýze řada faktorů jako membrána, její povrch, permeability a adherence léčiva. Ovlivnit clearance může také průtok krve a samotný průtok dialyzátu. Doporučuje se dávkovat

vankomycin během poslední hodiny až dvou dialýzy, aby se zabránilo ztrátě skrz dialyzér a zároveň se dosáhlo terapeutického cíle (Allawati et al., 2020; Mason et al., 2003).



Obr. 7: Model pro terapeutické monitorování léčiv.

Softwarové nástroje pro TDM

V dnešní době dochází ke změně v přístupu dávkování vankomycinu. V roce 2019 došlo k aktualizaci doporučení pro dávkování vankomycinu podporující využití Bayesiánského přístupu ke spolehlivému odhadnutí hodnot AUC. Postupně se tedy přechází z dávkování na základě měření údolní koncentrace k metodě založené na použití softwarových programů využívajících Bayesiánské analýzy a populačních modelů (Rybak et al., 2020; Vali et al., 2021).

Zlepšení v personalizovaném dávkování by mohlo přinést použití softwarového nástroje DoseMeRx. Využívá pro výpočet informace o farmakokineticko-farmakodynamický model vankomycinu. Jedná se o jednodokompartmentový model vytvořený na základě dat získaných z dospělých pacientů s maligním hematologickým onemocněním. Vložené informace jsou věk, váha pacienta, koncentrace vankomycinu a laboratorní data (hodnota kreatininu v séru). Studie využívající tento nástroj byla provedena u pacientů na

oddělení cévní chirurgie. Výhodou je také to, že DoseMeRx nevyžaduje odebrání vzorku pacienta v nějaký konkrétní čas a je možné provést odběr v době rutinních odběrů krve. Ukázalo se, že software dokáže úspěšně navrhnout vhodnou dávku těmto pacientům. Jediná nevýhoda spočívá v tom, že nemůže být použit u pacientů, kteří dostávají kontinuální infuzi vankomycinu (Vali et al., 2021; Buelga et al., 2005).

Dalším softwarovým nástrojem použitým pro dávkování vancomycinu je SmartDose (Gao et al., 2018). V čínské studii pak porovnávali úspěšnost v dávkování mezi skupinou, která byla léčena na základě TDM s využitím SmartDose a skupinou bez TDM. SmartDose využívá také metodologii založenou na Bayesiánské analýze. Kombinuje data získaná od pacientů s těmi získanými z populace, v uvedené studii se jednalo o čínskou populaci. U pacientů byl použitý opět jednokompartmentový model vankomycinu, protože dvoukompartmentový nebyl vhodný vzhledem k tomu, že většina vzorků bylo měřeno jako údolní koncentrace. Software umožňuje využití 4 farmakokinetických modelů pro dospělé a starší pacienty, neurochirurgické pacienty, novorozence a děti. SmartDose se ukázal jako nástroj s vysokou predikční schopností pro dosažení vhodného dávkování vankomycinu a snížení nefrotoxicity u pacientů s renální insuficiencí v kombinaci s TDM (Zhang et al., 2020).

Dále se používá v praxi farmakokinetický software MW/Pharm, který je uživatelsky přívětivý, interaktivní, a tak vhodný pro klinickou praxi. Jeho obsahem je databáze obsahující farmakokinetické parametry 180 používaných léků, databázi historie používání léků a postupy výpočtů pro jejich správné dávkování. Pro upravení dávkování bere v potaz historii medikace, hmotnost pacienta, jeho ledvinné funkce a aktuální zdravotní stav. Volitelný je přístup založený na Bayesiánské analýze. Dnešní moderní varianta softwaru MW/Pharm ++ obsahuje stále se rozšiřující databázi skoro 300 léčivých látek. Pro některé látky navíc obsahuje i modifikace farmakokinetických parametrů v závislosti na genotypu nebo fenotypu pacienta (Proost and Meijer, 1992; Mediware a.s).

Dávkování s využitím TDM se používá stále častěji. Nicméně není zdaleka jednoduché TDM provádět v běžné praxi, protože s ním souvisí řadu

překážek včetně ceny, dostupnosti testu a informovanosti specializovaného personálu. Do budoucna je proto určitě nutné dále studovat propojení mezi TDM a výsledků pacienta (Cusumano et al., 2020).

Při terapii vankomycinem je doporučováno jeho rutinní monitorování, zvláště u pacientů s renální insuficiencí. Podmínkou je, aby bylo možné stanovit koncentraci léčiva v organismu rychlou, přesnou, levnou a spolehlivou metodou. Dříve se používala zejména imunochemická metoda stanovení, ale dnes je nahrazována chromatografickými technikami, zejména vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), která k detekci využívá hmotnostní spektrometrii (Beneš, 2018).

Metody stanovení vankomycinu

Nejčastěji se provádí stanovení vankomycinu v séru nebo plazmě. Stanovení se provádí imunoanalytickými nebo chromatografickými metodami. Odběr vzorku se provádí 2 hodiny po podání vankomycinu a poté znovu před další dávkou. Následně musí být zpracován do 4 hodin od odběru (FONS, 2007).

Dále jsou představeny metody, které slouží ke stanovení vankomycinu v biologickém materiálu. Jsou zde uvedeny metody používané v běžné praxi a také metody raritní.

Mikrobiologické nepřímé stanovení

Tato metoda vyžaduje výběr vhodného bakteriálního kmenu jako například *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Staphylococcus aureus*. Důležitý je také výběr živného média a doby inkubace. Principem testu je lineární závislost inhibice růstu bakterií na koncentraci vankomycinu. Výsledek se tedy odečítá na základě průměru zón růstu bakterií na médiu. Metoda je poměrně snadno proveditelná, ale má velmi omezený pracovní rozsah. Navíc stanovení zabere hodně času a není tak prakticky použitelné pro rutinní a statimová měření (Stroy, 1969; Walker and Kopp, 1978).

Radioimunoanalýza

Jedná se o první použitou imunoanalytickou metodou stanovení vankomycinu. Radioimunoanalýza je citlivá, rychlá a poměrně jednoduchá metoda pro kvantitativní stanovení. Vankomycin je značen izotopem ^3H pro intravenózní podání nebo ^{125}I pro podání orální cestou. Následně značený vankomycin kompetuje s neznačeným ve vzorku o vazbu na protilátku. Množství vankomycinu se odečte na základě vzniku radioaktivních komplexů. Metoda je vhodná pro stanovení koncentrace vankomycinu ze vzorku séra a moči pacientů. Nevýhodou metody je nákladnost zařízení a zdravotní riziko plynoucí z ozáření. (Fong et al., 1981).

Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)

Tato metoda stanovení spojuje výhody specifity imunoanalýz s rychlostí a pohodlností homogenní metody. Výsledkem je spolehlivá a přesná metoda vhodná pro stanovení hladin vankomycinu. Princip spočívá v kompetici mezi vankomycinem značeným fluoresceinem a neznačeným vankomycinem o vazbu na králičí protilátku. Míra polarizace značeného vankomycinu je určena pomocí speciálně navrženého fluorometru Abbott TDx, který se komerčně vyrábí jako diagnostická souprava. Měřená fluorescence je nepřímo úměrná koncentraci vankomycinu ve vzorku. FPIA metoda je prostá matricového efektu a interferencí v lipemickém, ikterickém nebo hemolytickém séru (Schwenzer et al., 1983; Joos, Lüthy and Blaser, 1989).

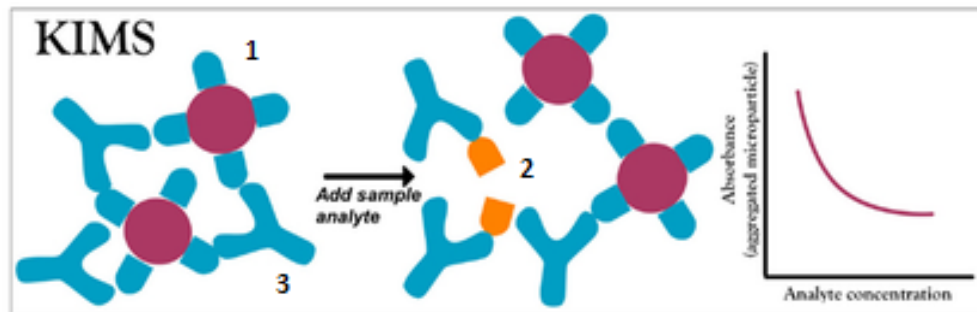
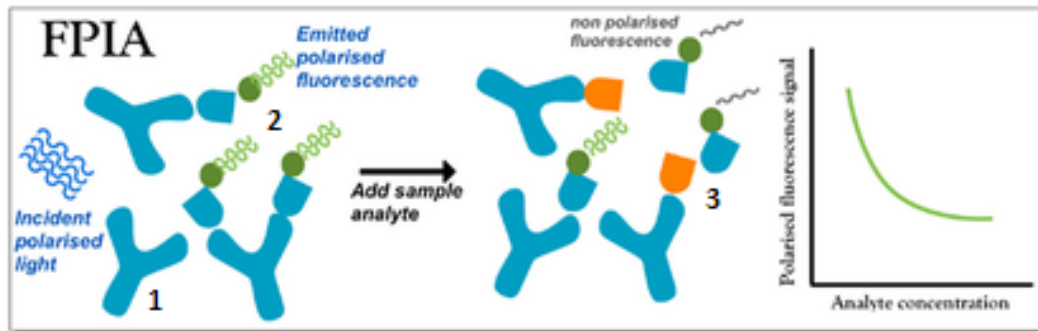
Nicméně se ukázalo, že při porovnání získaných hodnot vankomycinu v séru je oproti HPLC metodě výrazně nadhodnocuje (až o 50-70 %). Důvodem je křížová reaktivita degradačních produktů vankomycinu se systémem TDx u pacientů s renální insuficiencí. Problém se vyřešil přechodem z používání polyklonálních (ovčích, králičích) protilátek na monoklonální (myší) (Smith et al., 1998).

Další variantou stanovení s využitím metody fluorescenční polarizace je kvantitativní stanovení vankomycinu v séru nebo plazmě systémem COBAS INTEGRA 400. Jedná se o in vitro diagnostický test běžně používaný v laboratořích pro terapeutické monitorování léčiv. Fluoresceinem značený protein je osvětlen světlem excitační vlnové délky 485 nm. Následně dojde k absorpci části světla a po krátkém čase v rozmezí nanosekund k emisi absorbovaného světla s delší vlnovou délkou 515 nm. Schopnost polarizace emitovaného světla pak závisí na velikosti molekuly ve vzorku. Malé molekuly rotují vzorkem rychleji před emisí, a tak je výsledné světlo depolarizované. Naopak velké molekuly, kterými mohou být i fluoresceinem značené proteiny rotují pomalu a dávají vznik polarizovanému světlu (Dandliker and Feigen, 1961).

Fluorescenční polarizace vzorku je pak využita ke stanovení kvantitativní koncentrace vankomycinu. Analyzátor stanoví koncentraci ve vzorku s pomocí dodávaných kalibračních roztoků Preciset TDM 1 Calibrators, ke kterým

vypočítá křivku nelineární regrese metodou nejmenších čtverců. Podle kalibrační křivky je schopný dopočítat konkrétní koncentraci v neznámém vzorku. Pro ověření kontroly kvality je součástí TDM Control Set I-III. Kontroly vymezují intervaly, ve kterých by se měly pohybovat naměřené hodnoty v laboratoři. Vzorky by se měly po odběru zpracovat do 2 hodin, pokud jsou uchovány při teplotě 15–25 °C (Hammett-Stabler and Johns, 1998). V případě pozdějšího testování je lze uzavřené uchovat po dobu 48 hodin při teplotě 2–8 °C nebo po dobu 4 týdnů při teplotě -20°C. Pro vzorky není vhodné, aby byly opakovaně zmrazeny a rozmrazeny.

Novější používanou variantou diagnostického testu 3. generace pro stanovení vankomycinu je prováděno na systému COBAS INTEGRA 400 plus. Principem testu je kinetická interakce mikročastic v roztoku (KIMS). Na latexové mikročastice je kovalentně navázána myší monoklonální protilátka proti vankomycinu a derivát léčiva je navázán na makromolekulu. Kinetická interakce mikročastic roztoku je vyvolaná vazbou konjugátu léčiva na protilátku na mikročastici a je inhibována přítomností vankomycinu ve vzorku. Mezi konjugátem léčiva a vankomycinem ve vzorku séra probíhá kompetitivní reakce o vazebná místa protilátky proti vankomycinu navázané na mikročastice. Výsledná kinetická interakce je pak nepřímo úměrná množství vankomycinu ve vzorku. Výsledná hodnota se zjišťuje měřením absorbance (Sorrell, et al., 1982, Liu, et. al., 2011, Rybak, et. al., 2009, Hammet-Stabler and Johns, 1998).



Obr. 8: Schéma metody FPIA a KIMS. FPIA – 1. protilátka, 2. fluorescenčně značený analyt, 3. stanovovaný analyt. KIMS – 1. mikročástice vázaná s analogem analytu, 2. stanovovaný analyt, 3. protilátka. Převzato z: Sanavio and Silke, 2015



Obr. 9: [Analyzátor COBAS INTEGRA® 400 plus \(roche.com\)](http://roche.com)

Kapilární izotachoforéza

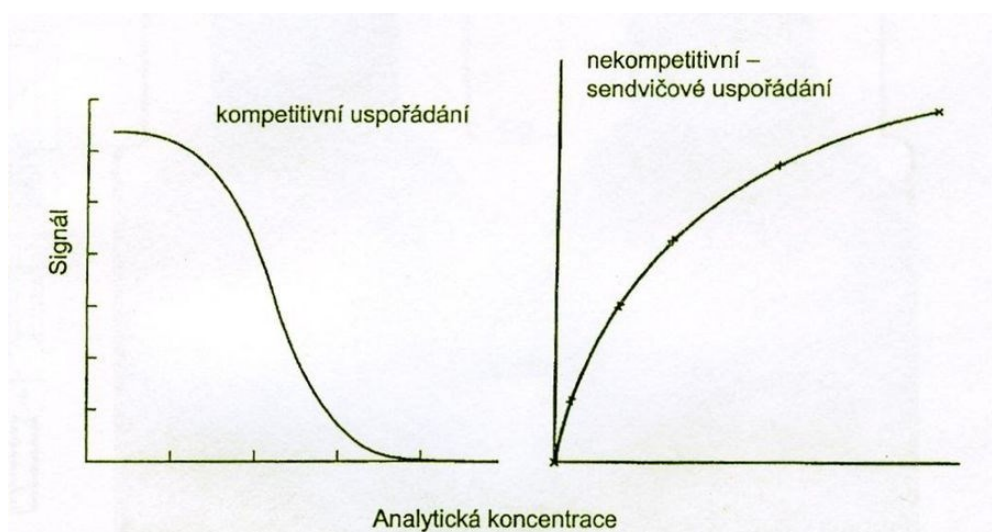
Vankomycin se touto metodou stanovuje ve dvou elektrolytech na základě migrace vytvořeného vícenásobně nabitého kationtu. Vedoucí elektrolyt obsahuje Na^+ jako hlavní iont, jako protiont kyselinu morfolinoethanosulfonovou a methylhydroxyethylcelulózu jako přísadu. Koncovým elektrolytem je kyselina morfolinoethanosulfonová. Metoda byla použita na vzorcích séra pacientů a naměřené hodnoty jsou srovnatelné s FPIA. Oproti FPIA je ale metoda méně citlivá a pomalejší (Sádecká, Polonský and Netriová, 1995).

Enzymové imunoanalýzy

Obecně se jedná o imunochemické metody využívající ke značení enzymy. Do této skupiny patří dvě hlavní metody ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique). Tyto metody využívají reakci mezi protilátkou a antigenem. Můžeme je rozdělit na metody kompetitivní a nekompetitivní.

Kompetitivní metoda je charakteristická tím, že specifická protilátka není v reakční směsi v nadbytku a o vazbu na ní soutěží značený a neznačený antigen.

Nekompetitivní metoda má naopak v reakci protilátku v nadbytku a reaguje s ní antigen, který je právě určovanou látkou. Kvantifikace je zajištěna označenou specifickou protilátkou.



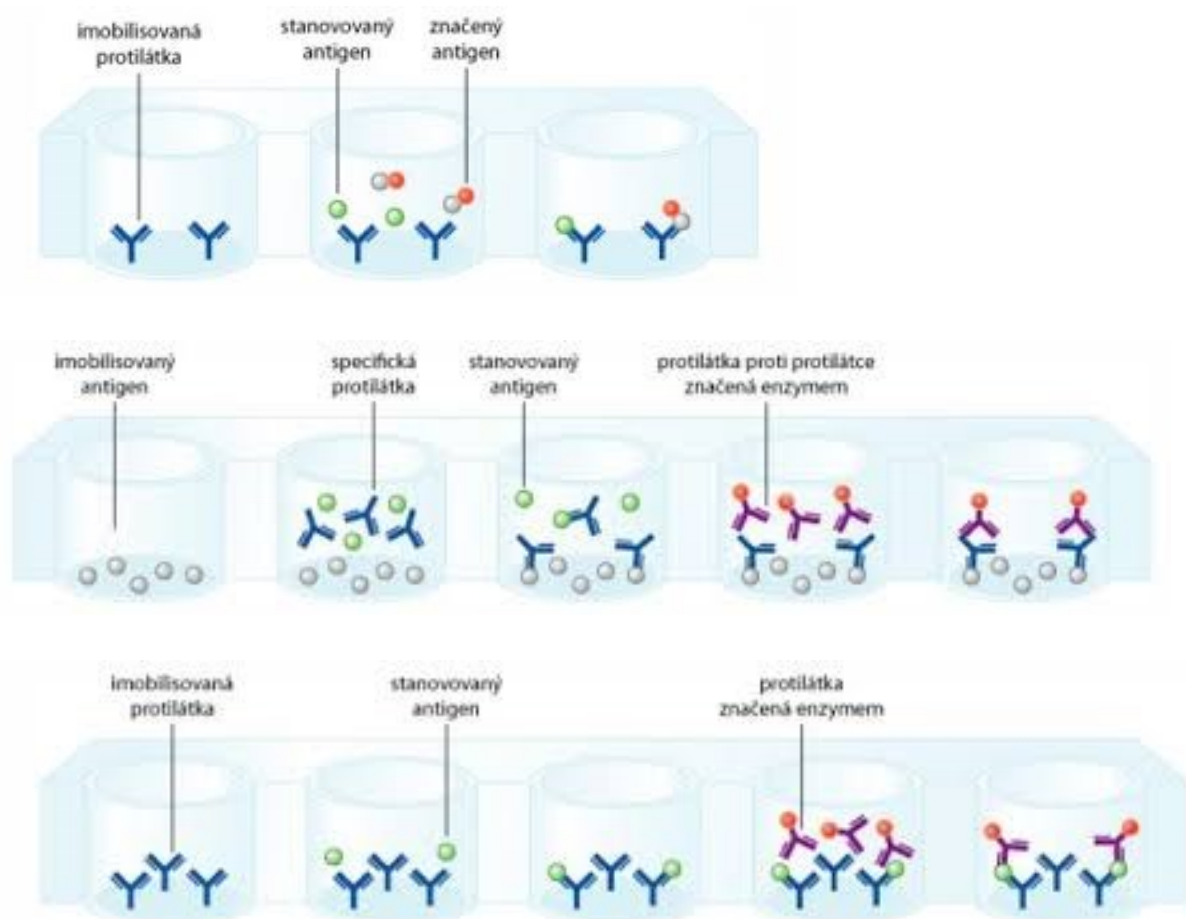
Obr. 10: Zobrazení rozdílů kalibračních závislostí mezi kompetitivními a nekompetitivními metodami. Převzato od Beňovská

Dále je možné dělit enzymové imunoanalytické metody podle potřeby separace volné a vázané frakce indikátoru na homogenní a heterogenní.

Homogenní imunoanalýzou rozumíme metody nevyžadující separaci a řadí se zde EMIT. Enzym spojený s antigenem po inkubaci s protilátkou vykazuje změnu aktivity. Změnu lze inhibovat přidáním volného antigenu.

Heterogenní imunoanalýza je založena na separaci vytvořeného komplexu antigen-protilátka od volných antigenů a protilátek. Následně se stanoví aktivita jedné nebo obou frakcí. Heterogenní imunoanalýzou je ELISA zahrnující enzymovou imunosorbentní zkoušku (Engvall, 1980; Karlíková and Topolčan eds., 2012).

ELISA se může provádět v mnoha uspořádáních. Může být kompetitivní nebo nekompetitivní, u obou variant přímá i nepřímá podle stanovení analytu.



Obr. 11: Uspořádání ELISA metody: Shora přímá kompetitivní ELISA, nepřímá kompetitivní ELISA a nekompetitivní ELISA. Převzato z: *Imunochemické metody*.

ELISA

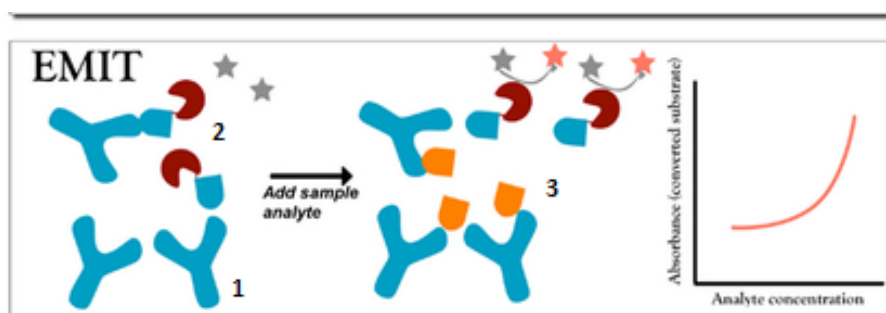
Metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení vankomycinu. Princip spočívá v kompetici volného analytu (vankomycinu) s enzymově značeným konjugátem ve vazbě na imobilizovanou protilátku. Množství vankomycinu je pak nepřímo úměrné množství navázaných enzymově značených konjugátů na protilátku. Jako enzym se využívá křenová peroxidáza. ELISA je rychlou a citlivou metodou, ale má i své nevýhody. Mezi ně patří stabilita reagensů, nutnost přepravy, skladování v chladu a vysoká cena protilátek (Chianella et al., 2013).

Řešením posledního problému je nahrazení protilátek za molekulárně imprintované polymerní nanočástice (MIPs) syntetizované na pevné fázi. Výhodou těchto částic je jejich snadná příprava, nízké náklady a stabilita. Lze tak připravit částice se specifickým tvarem pro vazbu vankomycinu. Takto upravená metoda má přesnost stanovení průměrně 98 % a má velmi nízkou křížovou reaktivitu s dalšími antibiotiky (Chianella et al., 2013).

EMIT

Emit® 2000 test je homogenní enzymová imunoanalýza pro kvantitativní analýzu vankomycinu z plazmy a séra. Dodává se komerčně ve formě kitu. Nejdříve se smíchá vzorek s reagenčním činidlem obsahujícím vankomycin značený enzymem glukóza-6-fosfát dehydrogenázou. V dalším kroku se přidá činidlo obsahující myší monoklonální protilátky proti vankomycinu a koenzym NAD. Následně vzorek obsahující vankomycin a enzymem značený vankomycin soutěží o vazebná místa na protilátce. Po navázání na protilátku klesá aktivita enzymu. Koncentrace vankomycinu se dá zjistit z hlediska aktivity enzymu. Enzym v aktivním stavu mění oxidovaný NAD na NADH, což vede ke změně absorbance. Tato změna je následně měřena spektrofotometricky při 340 nm. Test měří celkovou koncentraci vankomycinu (vázanou na bílkoviny a volnou frakci). Navíc nedochází k interferenci s endogenní glukóza-6-fosfát dehydrogenázou, protože koenzym je funkční pouze s bakteriálním enzymem organismu *Leuconostoc mesenteroides*, který je v testu použitý (Beckman Coulter, 2010).

Přesnost metody je srovnatelná s metodami RIA, FPIA a HPLC. Nicméně byly pozorovány dva potencionální problémy, které mohou mít negativní klinické důsledky. Prvním je přesnost měření u vzorků, jejichž koncentrace přesahuje 30 mg/L. Proto se laboratořím doporučuje kontrolovat přesnost u vyšších hladin léčiva s využitím kontrol a následného vyhodnocení standardní křivky. Druhým problémem je proporcionální chyba v naměřených hodnotách u stejných pacientů mezi metodami EMIT a FPIA. Větší odchylka pak byla pozorována u pacientů s renální insuficiencí. Pravděpodobně je důvodem použití odlišné protilátky u FPIA, která křížově reaguje s látkou hromadící se v těle u pacientů s renální insuficiencí. Metoda EMIT je často využívána v klinické praxi k terapeutickému monitorování dávek vankomycinu (Yeo, Traverse and Horowitz, 1989).



Obr. 12: Schéma Emit analýzy – 1. protilátka, 2. enzym vázaný na analog analytu, 3. stanovovaný analyt. Převzato a upraveno z: Sanavio and Silke, 2015

Průtoková chemiluminiscence

Tento přístup spočívá v emisi elektromagnetického záření tvořícího se během reakce luminolu- H_2O_2 - CuO. Vankomycin je schopen inhibovat toto záření, tedy chemiluminiscenci. Hodnota, o jakou se sníží chemiluminiscenční záření je pak úměrná množství vankomycinu ve vzorku. Metoda je rychlá, jednoduchá a nevyžaduje budící excitační záření. Citlivost a přesnost průtokové chemiluminiscence spočívá v její schopnosti smísení roztoků a detekci emitovaného záření. Vankomycin byl tímto způsobem detekován ve vzorcích vody získané z životního prostředí, v séru pacientů a ve farmaceutických přípravcích. Nicméně tato metoda se v praxi zatím nepoužívá (Khataee et al., 2014).

Test založený na chemiluminiscenci se navíc ukázal jako vhodným pro detekci kmenů VISA a hVISA a jejich odlišení od kmenů citlivých na vankomycin. Chemiluminiscenci vyvolává přítomnost kyslíkových radikálů generovaných během glykolýzy u živých organismů, včetně bakterií. Ty následně reagují s chemiluminiscenční sondou – lucigeninem nebo luminolem. Provedení trvá asi 8 hodin a citlivost dosahuje téměř 100 %. Touto metodou tak lze spolehlivě nalézt v klinických vzorcích kmeny rezistentní na léčbu vankomycinem (Tajima et al., 2007; Campbell, Hallet and Weeks, 1985).

Voltametrické stanovení

Tato metoda není v praxi používána a dala by se spíše zařadit mezi raritní a experimentální. Metoda elektroanalytického voltametrického stanovení je použitelná pro analýzu ze vzorků plazmy. Principem je měření závislosti proudu na potenciálu pracovní elektrody při elektrolýze analytu. Pro stanovení vankomycinu v plazmě se použila detekce voltametrií čtvercových vln. Nejdůležitějším faktorem u voltametrického stanovení je výběr vhodné elektrody, konkrétně jejího materiálu. Pro stanovení vankomycinu se po zhodnocení vybrala grafenem modifikovaná skleněná uhlíková elektroda. Na elektrochemický děj má velký vliv také chemická struktura analyzované látky. Konkrétně funkční skupiny obsahující kyslík. V případě vankomycinu, který obsahuje různé funkční polární skupiny jako například OH, NH₂, CO, COOH to vede k akumulaci těchto molekul skrz různé vazebné interakce na povrch elektrody. Nicméně přesto metoda dokáže pokrýt koncentrační rozmezí určené pro terapii vankomycinem s limitem detekce 0,2 μM. Množství vankomycinu se zjistí výpočtem kalibrační rovnice ze získaných voltamogramů. Toto stanovení vankomycinu je citlivé, rychlé a jednoduché (Hadi and Mollaei, 2018).

Chromatografické metody

Chromatografie je metoda založená na separaci složek obsažených ve vzorku. Řadí se mezi metody kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.

Samotné rozdělení vzorku probíhá mezi dvěmi nemísitelnými fázemi. Označují se jako mobilní – pohyblivá fáze a stacionární – nepohyblivá fáze. Vzorek se umísťuje na začátek stacionární fáze. Následně dochází k pohybu mobilní fáze přes stacionární a vzorek je touto silou unášen. Jednotlivé složky ve vzorku mohou být také zachycovány na stacionární fázi a opožďují se tak za jinými, které volně putují spolu s mobilní fází. Čím silněji jsou složky vzorku zachycovány stacionární fází, tím více se opozdí. Tímto způsobem dochází k separaci složek analytu (Klouda, 2003).

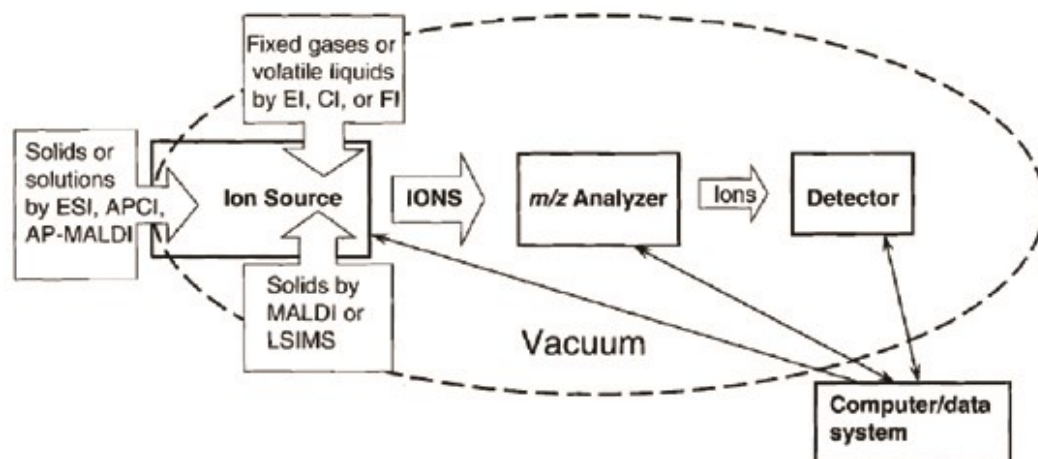
Kapalinová chromatografie

Jedná se o variantu chromatografie, kdy mobilní fází je kapalina a separace probíhá na chromatografické koloně, kde je umístěna stacionární fáze. Používány jsou v praxi 3 varianty kapalinové chromatografie. Nízkotlaká kapalinová chromatografie, která už skoro není využívána a slouží k preparativním účelům, kdy se pomocí ní čistí směsi látek. Dále se využívá planární chromatografie, která je nenáročná a jednoduchá, a tak vhodná pro analytické a mikropreparativní účely. Nicméně největší rozmach a využití představuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). (Opekar et al., 2002).

Hmotnostní spektrometr

Jedná se o iontově-optické zařízení. Obvykle se hmotnostní spektrometr skládá z následujících vzájemně propojených součástí: vstupní systém pro zavedení vzorku, vakuový systém, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor s počítačem. Vzorek může být v pevném, plynném nebo kapalném stavu a podle toho se volí metoda zavedení do spektrometru. Vakuový systém je tvořený turbomolekulárními čerpadly a olejovou difúzí, což zajišťuje vakuum na hodnotě obvykle 10⁻⁶ Torrů. Dále existuje řada ionizačních zdrojů, které jsou schopny převést molekuly vzorku do plynné ionizované fáze, například chemická ionizace, ionizace elektrosprejem nebo MALDI. Analyzátor provádí

vlastní separaci iontů na základě poměru m/s . Příklady analyzátorů jsou kvadrupólové analyzátoři, analyzátoři doby letu, iontová cyklotronová rezonance a iontová past. Detektorem je obvykle jednoduchá elektroda nebo elektronový multiplikátor, který přenáší signál do počítače (Honour, 2003).



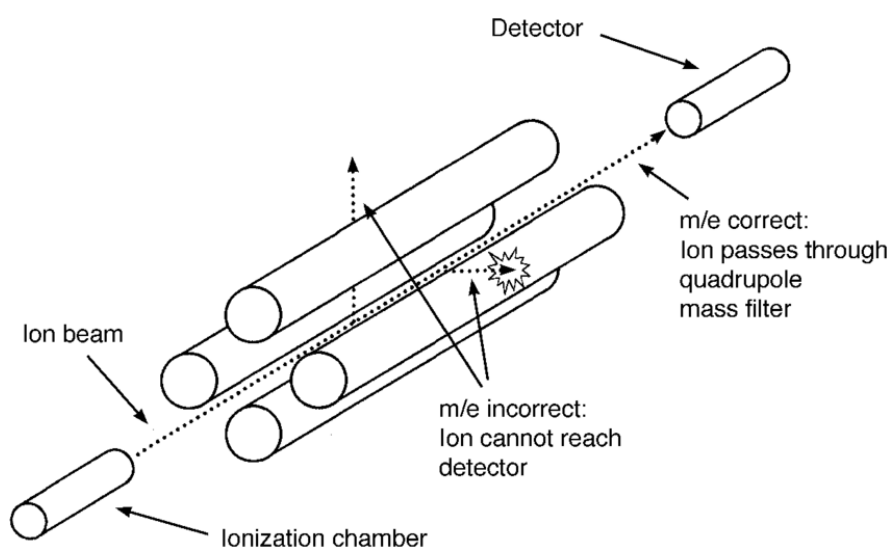
Obr. 13: Schématické zobrazení jednotlivých částí hmotnostního spektrometru. Převzato z: Watson and Sparkman, 2007.

Trojité kvadrupól

Stavbou je složený ze sady 4 kovových tyčí, které jsou paralelně uspořádány a je na ně vloženo stejnosměrné a střídavé napětí, které je fázově posunuto. Ion přivedený do kvadrupólového filtru je vlivem elektrického pole kvadrupólu oscilován a stabilní dráhy se dosáhne pouze při určité hodnotě napětí U a amplitudy V . Tyto veličiny se během skenování kvadrupólem mění, ale jejich poměr je udržován konstantní. Upravením těchto charakteristických veličin lze předurčit pohyb zvolených iontů (o dané velikosti m/z) mezi tyčemi a trajektorii jejich dráhy. Ostatní ionty s jinou velikostí m/z k detektoru neprojdou. Postupnou změnou v nastavení veličin u kvadrupólu dochází k detekci všech iontů.

Ionty mohou také podléhat fragmentaci, která je vyvolaná kolizí s inertním plynem. Toho se využívá v tandémové analýze, kdy jsou kvadrupóly spojeny a zařazeny za sebou. Nejčastěji se používá kombinace tří kvadrupólů označovaná jako trojitý kvadrupól. První kvadrupól slouží k selekci iontu, následně druhý funguje jako kolizní cela a dojde zde k fragmentaci iontu

v procesu kolizí indukované disociace (CID). Ionty analytu se srazí s inertním plynem jako je argon, helium nebo dusík a následně vzniknou fragmenty původních iontů. Tyto fragmenty vstupují do třetího a posledního kvadrupólu ve kterém na základě zvoleného pozitivního nebo negativního módu dojde ke skenu iontů podle hodnoty m/z a tím k určení struktury látky podle četnosti zastoupení jednotlivých fragmentů. Trojitý kvadrupól se často využívá ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií, kdy zajišťují funkci vysoce specifických detektorů.



Obr. 14: Schéma kvadrupólového hmotnostního spektrometru. Převzato z: Honour, 2017.

S trojitým kvadrupólem je možné pracovat v různých módech. Jednotlivé módy se mezi sebou liší typem prováděných skenů iontů a zvyšují selektivitu analýzy. Mezi tyto módy patří (Griffiths and Wang, 2009; Hoffmann and Stroobant, 2007):

- Sken celkového proudu iontů

Systém pracuje jako jednoduchý kvadrupól a propouští všechny ionty. V posledním kvadrupólu dojde ke skenu všech iontů a získání hmotnostního spektra.

- Sken vybraného iontu (SIM=selected ion monitoring)

Tento mód se používá k detekci specifických sloučenin s vysokou citlivostí. Pro každou cílovou sloučeninu se vyberou vhodné ionty

ke sledování. První dva kvadrupóly jsou propustné a třetí kvadrupól sleduje intenzitu iontu s vybraným m/z .

- Sken produktových iontů

Při tomto módu se zaostří v prvním kvadrupólu na konkrétní ion s určitým m/z a následně dojde k jeho fragmentaci v kolizní cele. Výsledné fragmenty neboli produktové ionty jsou skenovány třetím kvadrupólem. Tato často používaná varianta umožňuje identifikaci neznámé látky a také optimalizaci kolizní energie pro další módy.

- Sken iontů prekurzoru

Prvním kvadrupólem prochází ionty dle svých m/z a druhý kvadrupól funguje jako kolizní cela poskytující fragmenty iontů. Třetí kvadrupól je nastavený tak, že propouští pouze fragmentový ion o určitém zvoleném m/z . Takto je možné identifikovat pouze ionty s identickými fragmenty a lze tak získat informace o strukturně podobných látkách.

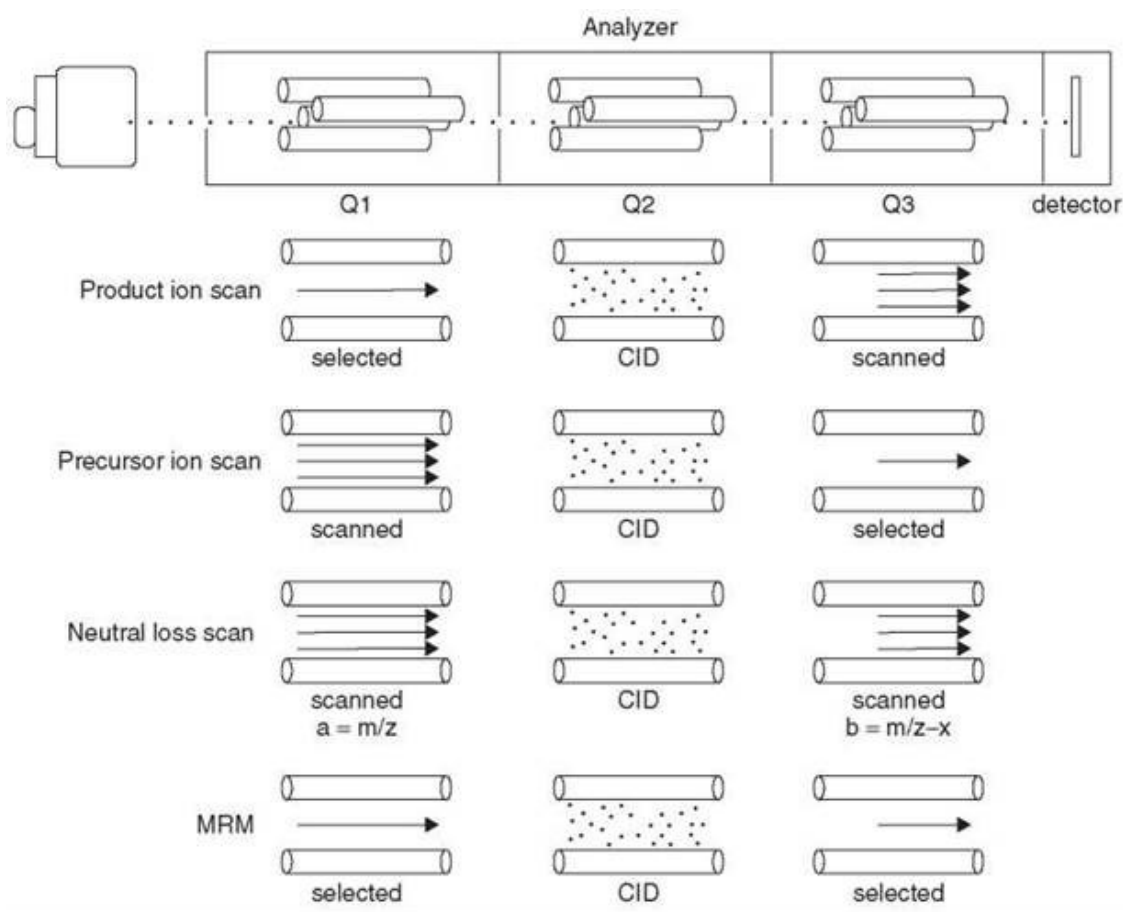
- Sken neutrálních ztrát (NLS)

V tomto módu skenují první a třetí kvadrupól současně. Používá se k detekci prekurzorových iontů, které fragmentují prostřednictvím specifické neutrální ztráty skupin H_2O , CO_2 a dalších během CID. Slouží k profilování metabolitů, kdy se hledají běžné funkční skupiny, které jsou neutrálně ztraceny. Ve směsi mohou být tyto skupiny charakteristické pro konkrétní třídu sloučenin.

- Sken iontových reakcí (SRM/MRM)

Tento mód umožňuje sledování jednoho nebo více fragmentačních přechodů. První kvadrupól zacílí na zvolený ion o určitém m/z . Následně dojde k fragmentaci v kolizní cele. Třetí kvadrupól poté selektivně vybere určitý fragment nebo více fragmentů pro kvantifikaci. Jedná se o vysoce citlivou a specifickou techniku pro kvantifikaci sloučenin uvnitř komplexních

směsí. Výhodou je také nízký chemický šum zajištěný třetím kvadrupólem, který propouští pouze určité fragmenty.



Obr. 15: Schématické zobrazení pracovních módů trojitého kvadrupólu. Převzato z: Begley, 2007.

Stanovení vankomycinu pomocí kapalinové chromatografie spojené s detekcí UV nebo MS

Vzhledem k tomu, že imunochemické metody jsou často nepřesné kvůli jejich křížové reaktivitě při stanovení vankomycinu, stále častěji se objevují varianty metody využívající kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií, případně UV detekcí. HPLC metoda se ukázala být citlivější a vhodnější pro detekci nízkých koncentrací vankomycinu. Proto je dnes zájem vědců vyvinout a validovat vhodné varianty stanovení vankomycinu pomocí kapalinové chromatografie pro biologické vzorky, které by byly vhodné pro úpravu a monitorování léčiva v praxi.

Lima et al. (2018) vyvinuli novou rychlou HPLC metodu stanovení vankomycinu ve vzorcích plazmy s využitím UV detekce. Jako detektor použili v metodě diodové pole. Tato HPLC-DAD metoda se od ostatních HPLC metod liší zejména tím, že je rychlejší, má snadnější provedení a vyžaduje mnohem menší množství vzorku plazmy. Vzorky byly před vlastní analýzou precipitovány s acetonitrilem a následně vlastní chromatografická separace byla provedena na koloně Supercosil C₁₈ s částicemi velikosti 2,7 µm. Pro metodu byl použit izokratický eluční systém. Pro zlepšení přesnosti měření se použil interní standart Zidovuline. Největším přínosem této metody je zmenšení objemu vzorku plazmy nutného pro analýzu na 50 µl. Tím se snížila i spotřeba dalších rozpouštědel a snížil se celkový čas přípravy vzorku na vlastní analýzu. Čas vlastní analýzy vzorku se zkrátil na dobu 8 minut. Metoda byla otestována pouze na 7 patientských vzorcích a také nebyl vypočítán limit detekce metody. Nicméně přes tyto nedostatky se podařilo vyvinout validovanou metodu, která je specifická, citlivá, přesná pro kvantifikaci vankomycinu v lidské plazmě a vhodná alternativa pro jeho terapeutické monitorování.

Zhang et al. (2019) se zabývali vyvinutím rychlé a jednoduché metody UPLC pro detekci vankomycinu v séru u dětských pacientů, kteří jsou léčeni přerušovanou nebo kontinuální infúzí. Metoda byla provedena na systému Waters ACQUITY H Class UPLC s UV detekcí a separace byla provedena na koloně Waters ACQUITY BEH C₈. Vzorky byly precipitovány s methanolem a následně se provedla filtrace. Objem vzorku séra pro analýzu byl 100 µl a doba

analýzy byla 5 minut, což je kratší doba, než má většina HPLC metod. Metoda pokryla potřeby rychlého extrakčního procesu, krátké doby analýzy a vhodného rozmezí detekce pro zajištění rychlého výsledku hladin vankomycinu u dětských pacientů. Na vybraných 42 dětech léčených vankomycinem následně provedli s touto metodou studii. Ta se zabývala rozdílem mezi kontinuální a přerušovanou infúzí vankomycinu. Na základě zjištěných výsledků se ukázalo, že děti s kontinuálním podáváním vankomycinu dosáhnou snadněji a trvaleji vhodného terapeutického rozmezí.

Da Silva et al. (2019) se snažili vyvinout a validovat jednoduchou UPLC-MS/MS metodu pro simultánní stanovení vankomycinu, amikacinu a kreatininu v lidské plazmě. Po vyhodnocení nároků na detekci tří zmíněných látek se rozhodli použít reverzní stacionární fázi spojenou s nízkou koncentrací iontově párovacího činidla (kyselina heptafluorobutyrová, HFBA), které nebude oproti HILIC stacionární fázi s vysokou koncentrací tak škodlivé pro chromatografickou kolonu a hmotnostní detektor. Přidání HFBA navíc zvýšilo retenci aminoglykosidového antibiotika amikacinu a jeho interního standartu kanabycinu. Množství plazmy nutné pro analýzu bylo 50 μ l. Vzorky byly precipitovány s acetonitrem a následně ředěny v roztoku 0,1 % kyselině mravenčí ve vodě. Výsledkem bylo ředění matrice, které se společně s malým množstvím finálního objemu vzorku (1 μ l) vstříknutého do analyzátoru vedlo k nízkému matricovému efektu. Analýza byla provedena na Acquity UPLC I-Class chromatografickém systému spojeném s trojitým kvadrupólem Xevo TQD, vše značky Waters Technologies. Separace proběhla na koloně Acquity HSS T3. Celkový čas analýzy byl 5,5 minut. Metoda byla použita na 71 vzorcích plazmy získaných od 18 pacientů léčených antibiotiky. Sedm pacientů bylo léčeno vankomycinem i amikacinem současně. Plazmatické koncentrace kreatininu byly měřeny z hlediska jeho výpovědní hodnoty týkající se clearance. Přesnost, spolehlivost a stability metody odpovídala bioanalytickým validačním požadavkům a je uplatnitelná pro TDM těchto antibiotik.

Javorská et. al. (2017) kvantifikovali vankomycin metodou UHPLC-MS/MS ve vzorcích lidského séra, moči, peritoneálním a pleurálním výpotku. Jejich snahou bylo unifikovat podmínky tak, aby se dalo touto metodou stanovit množství vankomycinu v uvedených biologických vzorcích. Detekce více typů

vzorků by mohla pomoci lépe pochopit vliv ukládání tekutiny do třetího prostoru na dosažení vhodné terapeutické hladiny vankomycinu u pacientů. Pro přípravu vzorků k analýze spotřebovali 50 µl biologického vzorku pacienta. Následně přidali acetonitril a interní standard teikoplanin. Teikoplanin byl zvolený kvůli podobné chemické struktuře s vankomycinem a jeho nízké ceně oproti izotopicky značenému internímu standardu. Vzorky moči pacientů byly v některých případech upravené ředěním acetonitrem kvůli vyššímu obsahu proteinů. Vlastní analýza vzorků proběhla na přístroji UHPLC Nexera set značky Shimadzu a použila se chromatografická kolona Meteoric Core C18 BIO spojená s kolonou SecurityGuard ULTRA, UHPLC C18. Detekce vankomycinu a teikoplaninu byla provedena na LCMS-8030 trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem v MRM módu. Vyvinutou metodu vyzkoušeli na vzorcích 5 pacientů podstupující terapii vankomycinem. Metoda splnila požadavky pro stanovení velké série vzorků díky jednoduchosti a úpravám šetřící čas analýzy. Výhodné se ukázalo použití 96jamkové mikrodestičky, která urychlila analýzu a snížila spotřeba rozpouštěděl. Čas nutný pro zpracování jednoho vzorku byl 1,5minuty. Metoda byla validována dle norem, nicméně vzhledem k vysokému matricovému efektu teikoplaninu ve vzorcích séra a výpočtech se nepovedlo jej normalizovat. Navíc kvůli rozdílnosti v retenčních časech bude vankomycin pravděpodobně matricovým efektem ovlivněn jinak než teikoplanin. Výsledná UHPLC-MS/MS metoda je vhodná pro monitorování vankomycinu u kriticky nemocných pacientů, kde hrozí, že hromadění tekutin v tkáních nebo renální selhání ovlivní efektivitu antibiotické léčby.

Brozmanová et al. (2017) pro běžné terapeutické monitorování vankomycinu u pacientů vyvinuli vlastní metodu LC-MS/MS. Jejich snahou bylo vytvořit a validovat dle norem metodu rychlou a jednoduchou co se týče přípravy vzorku. Dalším cílem studie bylo porovnat výsledky získané touto metodou s FPIA imunoanalýzou, která je pro monitorování vankomycinu rutinně používána. Pro přípravu vzorků k analýze spotřebovali 50 µl lidského séra. Dále zvolili jednoduchou metodu extrakce vzorků, a to precipitace s 33 % kyselinou trichloroctovou. V předběžných experimentech zjistili, že čím vyšší je pH precipitačního činidla, tím nižší je výtěžek vankomycinu. Nicméně pH vzorků připravených s 33 % kyselinou trichloroctovou bylo velmi nízké (1,1). Takto

nízká hodnota pH je škodlivá pro chromatografickou kolonu a celkově chromatografický systém. Proto dodali ke vzorkům po precipitaci, centrifugaci a separaci supernatantu pro zvýšení pH hydroxid amonný. Jako interní standart vankomycinu si vybrali z testovaných antibiotik tobramycin a vzorky pro kontrolu kvality komerčně dodávané od firmy Roche. Analýza připravených vzorků proběhla na UPLC-MS/MS systému tvořeném Waters Acquity UPLC spojeném s Quatro Micro Api trojitým kvadrupólem. Použitá chromatografická kolona byla Acquity UPLC RP BEH C18. Hmotnostní spektrometr byl pro analýzu nastaven pro práci v MRM módu. Celková doba analýzy byla 5 minut. Metoda byla úspěšně validována dle norem FDA. Vzorky séra byly získány od pacientů s vážnými infekcemi léčenými vankomycinem. Ty rozdělily podle hodnot sérového kreatininu do tří kategorií – normální hodnoty, zvýšené a dialyzované pacienty. Zajímali se o korelaci výsledků mezi těmito skupinami v rámci nové metody a FPIA. Porovnání těchto metod bylo provedeno pomocí Passing-Bablokovy regresní analýzy a Bland-Altmanovy analýzy. Výsledky pacientů s normálními a zvýšenými hodnotami kreatininu spolu u obou metod dobře korelovaly. Nicméně u dialyzovaných pacientů s renální insuficiencí se ukázalo, že metoda FPIA nadhodnocuje výsledné koncentrace vankomycinu o 14 % oproti LC-MS/MS. Důvodem může být přítomnost degradačního produktu vankomycinu CDP u těchto pacientů. Vzhledem k tomu, že tyto vážně nemocní pacienti jsou častěji monitorováni a doporučené koncentrační rozmezí vankomycinu je v tomto ohledu široké, není takové nadhodnocení výrazným klinickým problémem.

Experimentální část

Použité chemikálie

Acetonitril, SIGMA – ALDRICH

Methanol, SIGMA – ALDRICH

Trichloroctová kyselina 33 %, SIGMA – ALDRICH

Hydroxid amonný, SIGMA – ALDRICH

Teikoplanin 50 µg/ml

Vankomycin Mylan 500 mg, Francie

Vankomycin hydrochlorid, USA

Voda pro HPLC, SIGMA – ALDRICH

TDM control set, Randox Quality Control

Negativní sérum – od zdravých dárců

Vzorky krve pacientů – sérum

Přístroje a pomůcky

Automatické pipety, Eppendorf Research plus

Vysokorychlostní mikrocentrifuga SCILOGEX D3024

Vortex mixer, VELP SCIENTIFICA

Centrifuga

Zkumavky skleněné, plastové „eppendorf“

Odměrná baňka 10 ml

Vialky skleněné, inzerty plastové

Ultrafiltrační zkumavky Centrifree®, SIGMA – ALDRICH

UHPLC Shimadzu Nexera X2

Hmotnostní spektrometr Shimadzu LCMS-8060

Chromatografická kolona

Pro analýzu byla v systému HPLC použita kolona Kinetex® vyrobená společností Phenomenex. Kolona je polární s velikostí částic C18, zrněním 2,6 µm a délkou 50 x 2,1 mm.

Příprava standardních vzorků

V rámci vytvoření a optimalizace metody jsem vyzkoušela několik typů příprav kalibračních řad vankomycinu. Vyzkoušela jsem varianty různých precipitačních činidel, které uvádím níže.

Zásobní roztok A

Vankomycinu mylan 500 mg byl předem připraven do formy infuzního roztoku o koncentraci 100 mg/ml. Takto připravený roztok byl pro další přípravy jednotlivých řad uchováván zamražený.

Příprava koncentrační řady A

Ze zásobního roztoku se připravila řada roztoků o koncentracích 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 mg/l. Jako první se připravil roztok o koncentraci 100 mg/l, kdy se do odměrné baňky pipetovalo 10 µl ze zásobního roztoku vankomycinu a 9990 µl vody pro HPLC, případně negativního séra. Postupně se z této koncentrace ředily další.

Kalibrační řada s kyselinou trichloroctovou

Před vlastní precipitací se provedla ultrafiltrace připravených kalibračních roztoků a TDM kontrol. Ultrafiltrační zkumavky slouží k rychlému a účinnému oddělování volných mikrosolutů od mikrosolutů vázaných na protein v malých objemech séra, plazmy a biologického materiálu před vlastní analýzou. Zkumavky obsahují nízko adsorbující hydrofilní membránu, O-kroužku, který je napevno zabudovaný mezi zásobník vzorku a spodní část. Součástí spodní části je odnímatelná nádobka na filtrát. Protein je selektivně oddělen do frakce vzorku (koncentrátu), zatímco volný ligand s rozpouštědlem prochází volně membránou do nádobky na filtrát. Zkumavky jsou vhodné pouze pro jednorázové použití (Sigma-Aldrich).

Do ultrafiltračních zkumavek se pipetovalo 150 μl kontrol nebo roztoku vankomycinu a na 15 minut se zkumavky vložily do centrifugy na 1000 rcf. Z ultrafiltrovaných roztoků se pipetovalo 50 μl do zkumavek „eppendorf“ a provedla se precipitace přidáním 50 μl kyseliny trichloroctové. Zkumavky se vložily do centrifugy nastavené na 15000 otáček po dobu 10 minut. Pak se takto připravené roztoky k analýze pipetovaly o množství 70 μl do vialek a následně se provedla jejich analýza na HPLC-MS/MS.



Obr. 16: Ultrafiltrační zkumavky Centrifree®

Kalibrační řada s kyselinou trichloroctovou a hydroxidem amonným

Tato řada se připravovala bez ultrafiltrace. Do zkumavek se napipetovalo nejdřív 50 μl z každé připravené koncentrace vankomycinu a také z TDM kontrol. Následně se přidalo 50 μl kyseliny trichloroctové, zkumavky se promíchaly na vortexu, aby se předešlo vzniku sraženin a přidalo se 50 μl hydroxidu amonného. Takto připravená řada se vložila do centrifugy na 10 minut na 15000 rcf. Poté se jednotlivé vzorky pipetovaly do vialek a vložily do HPLC-MS/MS k analýze.

Kalibrační řada s kyselinou trichloroctovou, hydroxidem amonným a acetonitrilem

Řada byla připravena obdobným způsobem jak bylo uvedeno výše. K 50 μl všech koncentrací vankomycinu a TDM kontrol se pipetovalo 50 μl kyseliny trichloroctové. Zkumavky se promíchaly na vortexu a poté se přidalo 50 μl

hydroxidu amonného a 50 µl acetonitrilu. Řada se vložila do centrifugy na 10 minut a 15000 rcf. Pro analýzu se pipetovaly supernatanty po centrifugaci do vialek.

Kalibrační řada s methanolem

Nejdřív byla provedena ultrafiltrace koncentrací vankomycinu a TDM kontrol. Centrifugace byla nastavená na 15 minut a 1000 otáček. Z ultrafiltračních zkumavek se pipetovalo 50 µl do zkumavek „eppendorf“ a precipitovalo s 100 µl methanolu. Vzorky se centrifugovaly 10 minut při 15000 rcf. Následně se 70 µl supernatantu z každé zkumavky pipetovalo do vialek a poté vložilo do HPLC-MS/MS k analýze.

Zásobní roztok B

Navážka standardu vankomycinu hydrochloridu 1,17 mg byla rozpuštěna v objemu 1,170 µl vody pro HPLC. Výsledný roztok měl koncentraci 1,0 mg/ml.

Příprava kalibrační řady B

Ze zásobního roztoku byla připravena řada koncentrací 100, 50, 25, 10 a 5 mg/l. Nejdřív bylo pipetou odebráno ze zásobního roztoku 100 µl a do zkumavky se k tomuto množství přidalo 900 µl negativního séra. Takto vznikl koncentrační roztok 100 mg/l. Následně se z něj ředily ostatní koncentrace z řady.

Kalibrační řada s methanolem a teikoplaninem

Z kalibračních roztoků se pomocí pipety odebralo 50 µl z každé koncentrace a přidalo do zkumavek k 20 µl roztoku teikoplaninu o koncentraci 50 µg/ml. Následně se provedla precipitace přidáním 100 µl methanolu. Vzorky byly průběžně míchány na vortexu, aby nevznikaly sraženiny. Následně byly umístěny do centrifugy na 10 minut a 15000 rcf. Poté se z nich množství 80 µl pipetou odebralo do připravených vialek pro analýzu.

Příprava vzorků pro analýzu

Vycházelo se z připravené kalibrační řady s methanolem a teikoplaninem, která byla zvolena jako finální. Krev pacientů byla

centrifugovaná a pracovalo se pouze se sérem. Odebíralo se 50 μ l séra z každého vzorku krve. Postup zpracování vzorků byl následně stejný jako pro přípravu kalibrátorů s methanolem a teikoplaninem.

Statistické metody

Validace metody byla provedena v softwaru MSEXCEL. K porovnání analytických metod byla použita Passing-Bablokova regresní analýza, Blandův-Altmanův rozdílový graf a Mountain plot.

Výsledky

Optimalizace metody

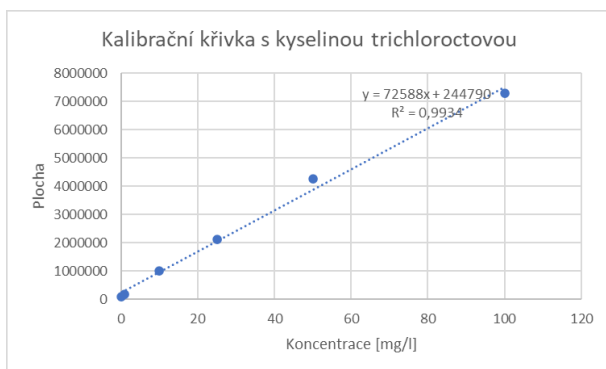
Prvotním cílem bylo nastavení vhodných podmínek pro stanovení vankomycinu metodou HPLC-MS/MS. Potřebné parametry jako složení mobilní fáze, mód stanovení, polarita a další byly zvoleny na základě měření kalibračních roztoků. Přehled nastavených parametrů vyvinuté metody je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1: Nastavení parametru metody HPLC-MS/MS

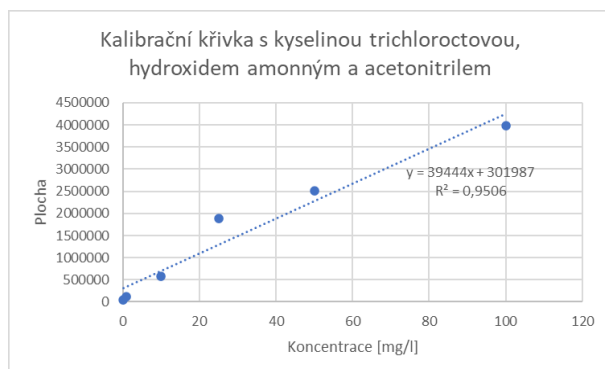
Průtok	0,2 ml/min
koncentrace mobilní fáze C	70 %
koncentrace mobilní fáze D	30 %
Mód	MRM
Polarita	pozitivní
počáteční čas	0 min.
závěrečný čas	3 min.
prekurzorový m/z	726,4
produktový m/z	144,2
doba setrvání	83 min.
kolizní energie	-15 eV
rozhraní	ESI
teplota rozhraní	300 °C
tok nebulizačního plynu	3,00 l/min
průtok zahřívacího plynu	10,00 l/min
tepelný blok	400 °C
průtok sušícího plynu	10,00 l/min

**mobilní fáze C – voda pro HPLC, mobilní fáze D – acetonitril*

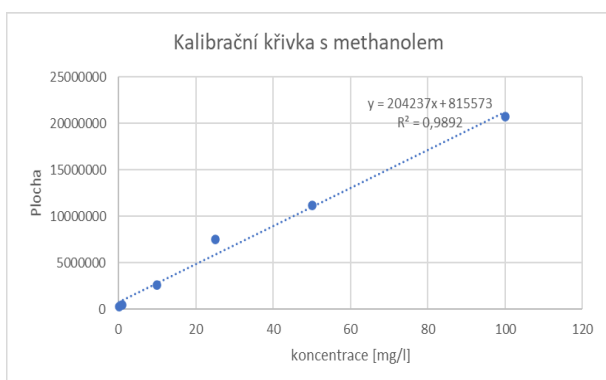
Dále byly hodnoceny zkoušené kalibrační řady připravené s rozdílnými precipitačními činidly. Na základě výsledků kalibračních křivek se vybrala příprava koncentrační řady s methanolem bez úpravy ultrafiltrací.



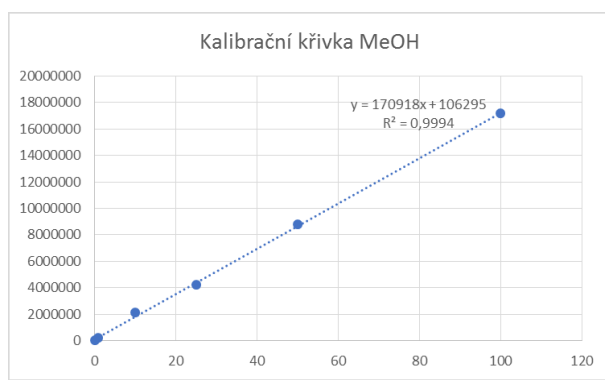
Obr. 17: Kalibrační křivka s kyselinou trichloroctovou



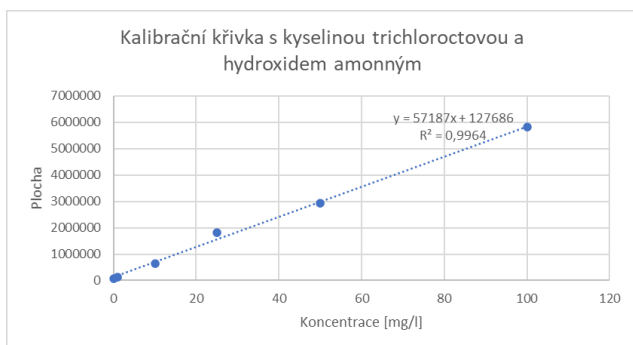
Obr. 18: Kalibrační křivka precipitace s kyselinou trichloroctovou, hydroxidem amonným a acetonitrilem.



Obr. 19: Křivka kalibrační řady s methanolem po ultrafiltraci.



Obr. 20: Křivka kalibrační řady s methanolem a teikoplaninem



Obr. 21: Kalibrační křivka s kyselinou trichloroctovou a hydroxidem amonným

Validace

V rámci vývoje nové analytické metody je třeba zajistit spolehlivost výsledků pro rutinní laboratorní vyšetření. Tento proces se označuje jako validace metody. Stanovují se parametry jako přesnost, správnost, citlivost, linearita a další. Pro vyvinutou metodu HPLC-MS/MS pro stanovení vankomycinu byla provedena částečná validace následujících parametrů pro koncentrace 5, 10 a 50 mg/l.

Preciznost a přesnost

Přesnost určuje míru shody výsledků měření jednoho identického vzorku opakovaně stejnou metodou. Přesnost v sérii se označuje jako opakovatelnost a mezi sériemi pak jako mezilehlá přesnost.

Tab. 2: Souhrn naměřených hodnot koncentrací analytu v biologickém materiálu za podmínek opakovatelnosti

	RM1	RM2	RM3
	Cílová koncentrace (mg·l⁻¹)		
	5	10	50
Opakování	Naměřená koncentrace (mg·l⁻¹)		
1	3,9	8,69	34,21
2	5,81	8,38	38,56
3	6,49	8,63	39,21
4	6,79	9,88	44,49
5	7,24	11,36	43,7
6	7	12,14	63,35
7	7,69	13,18	62,98
8	7,34	11,92	53,47
9	7,61	9,89	61,04
10	6,72	11,15	61,25
11	6,4	12,23	49,23
12	4,38		

Tab. 3: Souhrn naměřených hodnot koncentrací analytu v biologickém materiálu za podmínek mezilehlé preciznosti

	RM1	RM2	RM3
	Cílová koncentrace (mg·l⁻¹)		
	5	10	50
Opakování	Naměřená koncentrace (mg·l⁻¹)		
1	3,9	8,69	49,23
2	4,38	8,66	48,93
3	5,48	12,2	49,09
4	4,87	9,48	53,01
5	3,81	6,83	34,21
6	5,83	8,73	

Tab. 4: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu za podmínek opakovatelnosti. V tabulce je také vypočítána celková analytická chyba měření.

Cílová koncentrace (mg·l⁻¹)	<i>Průměr *</i>	<i>SD</i>	<i>CV (%)</i>	<i>BIAS (%)</i>
5	6,45	1,2057	18,70	28,95
10	10,68	1,6650	15,59	6,77
50	50,14	10,8363	21,61	0,27

*průměr měření z celkového počtu opakování

Tab. 5: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu za podmínek mezilehlé preciznosti. V tabulce je také vypočítána celková analytická chyba měření.

Cílová koncentrace (mg·l⁻¹)	<i>Průměr *</i>	<i>SD</i>	<i>CV (%)</i>	<i>BIAS (%)</i>
5	4,71	0,8304	17,62	-5,77
10	9,10	1,7553	19,29	-9,02
50	46,89	7,2924	15,55	-6,21

*průměr měření z celkového počtu opakování

Linearita

Linearita byla ověřena v pracovním rozsahu ve 2-3 opakováních (Tab. 6, Tab. 7 a Obr. 22).

Tab. 6: Souhrn naměřených hodnot koncentrací pracovního rozsahu v biologickém materiálu

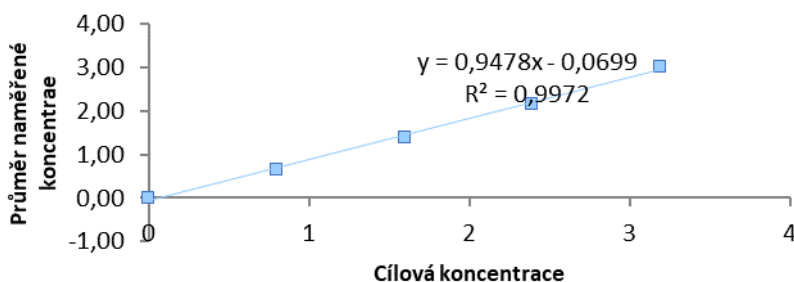
Diluční poměr	Cílová koncentrace (mg·l ⁻¹)	Naměřená koncentrace (mg·l ⁻¹)		
		Opakování 1	Opakování 2	Opakování 3
NS	0	0	0	0
1+3 1:1	0,798	0,658	0,655	0,614
NS + K2 1:1	1,595	1,377	1,322	1,463
3+5 1:1	2,393	2,163	2,169	2,147
K2	3,19	3,071	3,014	2,977

NS- negativní sérum, K2- kontrola ClinCheck Recepte Level I

Tab. 7: Preciznost a přesnost metody v biologickém materiálu v rozsahu lineární oblasti.

Cílová koncentrace (mg·l ⁻¹)	Průměr *	SD
0	1,44	1,1085
0,798	1,80	0,9247
1,595	2,19	0,7089
2,393	2,59	0,4726
3,19	3,02	0,0474

*průměr měření z celkového počtu opakování



Obr. 22: Pracovní rozsah měření (linearita) v biologickém materiálu. Graf závislosti průměru nalezených hodnot a cílových koncentrací. Linearita je ověřena pro daný koncentrační rozsah.

Statistické porovnání metod

Cílem analýzy bylo srovnat několik metod pro měření obsahu vankomycinu (mg/l) v séru pacientů. Pro analýzu bylo získáno externích 20 vzorků krve a v každém z nich byla zjišťována hladina vankomycinu metodami: Vancomycin FPIA Cobas FPIA na analyzátoru Cobas Integra 400+ na pracovišti Laboratoř farmakologie a toxikologie Laboratoře AGEL a.s. v Novém Jičíně (LAG1) a i-Vancomycin CLIA Abbott na analyzátoru Architect na pracovišti Oddělení klinické biochemie Slezské nemocnice Opava p. o. (CLO), popř. Vancomycin FPIA Cobas FPIA na analyzátoru Cobas Integra 400+ na pracovišti Laboratoř farmakologie a toxikologie Laboratoře AGEL a.s. v Novém Jičíně (LAG2) a Vancomycin EMIT na analyzátoru Adria Centaur na pracovišti Oddělení laboratorní medicíny Středomoravská nemocniční a.s. Prostějov (SMN). Na dalších 54 vzorcích pak byly zjišťovány hladiny vankomycinu metodami Vancomycin KIMS Roche na analyzátoru Cobas Integra 400+ na pracovišti Laboratoř farmakologie a toxikologie Laboratoře AGEL a.s. v Novém Jičíně (VAN3) a vyvinutou HPLC-MS/MS. Naměřené hladiny vankomycinu u pacientů těmito metodami jsou uvedeny v Tab. 8, Tab. 9 a Tab. 10. Následně jsme se zaměřili na srovnání vybraných dvojic metod.

Pro popisnou statistiku byly zvoleny základní statistické charakteristiky (rozpětí – tj. minimum – maximum a medián doplněný o interkvartilové rozpětí (IQR, tj. dolní kvartil – horní kvartil), což jsou charakteristiky vhodně popisující rozložení dat v případě, že nejde o výběr z normálního rozdělení), viz Tab. 11 a Tab. 12.

Pro ověření shody měření byla zvolena kombinace několika metod. Vzhledem k zamítnutí normality u dvou ze tří analyzovaných rozdílů, byly voleny neparametrické metody (normalita dat byla ověřována Shapirovým-Wilkovým testem, přičemž v souhrnné tabulce Tab. 13 uvádíme jeho p-hodnotu). Pro popisnou statistiku detekovaných rozdílů byly zvoleny stejné charakteristiky jako pro popis hladin vankomycinu naměřených jednotlivými metodami. Toto bylo dále doplněno popisnou statistikou detekovaných relativních odchylek (%) hladin vankomycinu zjištěných srovnávanými metodami.

Veškeré závěry na základě statistické indukce byly prováděny na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Výskyt systematické odchylky byl posuzován na základě 95% intervalového odhadu jejího mediánu a příslušného Wilcoxonova testu. Pro vizualizaci srovnání příslušných dvou metod měření byly využity párové krabicové grafy pro výsledky zjištěné srovnávanými metodami a krabicové grafy a histogramy pro odchylky zjištěné těmito metodami. Toto bylo dále doplněno Blandovými-Altmanovými grafy pro srovnání dvou metod¹ a grafy zobrazujícími příslušnou Passingovu – Bablokovu regresi. Tato byla zvolena jako neparametrická obdoba klasické lineární regrese vyžadující mimo jiné normální rozdělení analyzovaných dat. Výstupy Passingovy – Bablokovy regrese byly využity rovněž pro posouzení systematické a proporcionální odchylky. V případě shody výsledků srovnávaných metod bychom očekávali, že regresní přímka bude odpovídat identitě, tj. funkci $y = x$ ($y = 0 + 1x$). Z tohoto důvodu byla systematická odchylka posuzována rovněž na základě 95 % intervalového odhadu posunu a proporcionální odchylka byla posuzována na základě 95 % intervalového odhadu směrnice regresní přímky. Posledním grafickým výstupem, který byl pro srovnání odchylek různých dvojic metod použit je tzv. Mountain plot vyjadřující zalomenou distribuční funkci pozorovaných odchylek měření (pro hodnoty menší, než medián jde o distribuční funkci, pro hodnoty větší, než medián jde o doplněk distribuční funkce do jedničky). V ideálním případě bychom očekávali, že vrchol tohoto grafu bude mít x-ovou souřadnici rovnu nule. Čím je graf užší, tím jsou pozorované odchylky menší.

¹ Blandův-Altmanův graf je vzhledem k zamítnutí předpokladu normality pozorovaných rozdílů uváděn pouze jako ilustrativní (pás znázorňující 95% intervalový odhad střední hodnoty a limity shody nelze považovat za relevantní).

Tab. 8: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami LAG1 a CLO

ID	LAG1	CLO
1_LAG1_CLO	22,00	19,23
2_LAG1_CLO	36,40	32,42
3_LAG1_CLO	24,20	21,80
4_LAG1_CLO	9,10	7,99
5_LAG1_CLO	22,80	19,22
6_LAG1_CLO	30,10	24,03
7_LAG1_CLO	10,30	8,20
8_LAG1_CLO	16,60	14,76
9_LAG1_CLO	16,20	13,99
10_LAG1_CLO	6,90	5,40
11_LAG1_CLO	21,30	18,68
12_LAG1_CLO	41,60	34,94
13_LAG1_CLO	16,10	12,94
14_LAG1_CLO	30,10	23,96
15_LAG1_CLO	21,80	19,07
16_LAG1_CLO	34,70	31,51
17_LAG1_CLO	6,50	7,75
18_LAG1_CLO	18,60	16,54
19_LAG1_CLO	40,90	35,61
20_LAG1_CLO	8,60	7,58

Tab. 9: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami LAG2 a SMN

ID	LAG2	SMN
1_LAG2_SMN	9,33	7,90
2_LAG2_SMN	34,26	26,40
3_LAG2_SMN	26,68	24,90
4_LAG2_SMN	39,38	36,90
5_LAG2_SMN	15,45	13,90
6_LAG2_SMN	32,58	26,20
7_LAG2_SMN	40,96	34,10
8_LAG2_SMN	55,15	46,90
9_LAG2_SMN	19,36	14,40
10_LAG2_SMN	53,35	41,00
11_LAG2_SMN	11,78	9,66
12_LAG2_SMN	23,09	16,03
13_LAG2_SMN	35,43	26,10
14_LAG2_SMN	16,37	13,18
15_LAG2_SMN	10,14	8,23
16_LAG2_SMN	17,50	9,56
17_LAG2_SMN	26,87	18,19
18_LAG2_SMN	33,59	15,40
19_LAG2_SMN	14,68	9,22
20_LAG2_SMN	24,94	16,69

Tab. 10: Hodnoty vankomycinu (mg/l) zjištěné metodami VAN3 a HPLC-MS

ID	VAN3	HPLC-MS	ID	VAN3	HPLC-MS
1_VAN3_HPLC-MS	59,11	19,69	28_VAN3_HPLC-MS	14,92	7,05
2_VAN3_HPLC-MS	60,02	18,22	29_VAN3_HPLC-MS	13,35	13,15
3_VAN3_HPLC-MS	11,93	10,26	30_VAN3_HPLC-MS	4,00	4,62
4_VAN3_HPLC-MS	24,20	19,54	31_VAN3_HPLC-MS	35,48	10,08
5_VAN3_HPLC-MS	54,91	13,54	32_VAN3_HPLC-MS	25,91	18,30
6_VAN3_HPLC-MS	33,73	11,05	33_VAN3_HPLC-MS	11,60	11,56
7_VAN3_HPLC-MS	22,67	12,21	34_VAN3_HPLC-MS	5,74	3,21

8_VAN3_HPLC-MS	42,52	12,62	35_VAN3_HPLC-MS	28,25	26,43
9_VAN3_HPLC-MS	54,53	18,87	36_VAN3_HPLC-MS	16,95	17,97
10_VAN3_HPLC-MS	12,73	5,53	37_VAN3_HPLC-MS	36,84	10,68
11_VAN3_HPLC-MS	26,69	8,59	38_VAN3_HPLC-MS	17,96	11,18
12_VAN3_HPLC-MS	4,00	2,68	39_VAN3_HPLC-MS	13,65	9,85
13_VAN3_HPLC-MS	30,59	11,34	40_VAN3_HPLC-MS	35,86	30,53
14_VAN3_HPLC-MS	14,61	5,95	41_VAN3_HPLC-MS	36,17	15,26
15_VAN3_HPLC-MS	38,36	13,98	42_VAN3_HPLC-MS	48,30	24,85
16_VAN3_HPLC-MS	23,63	11,68	43_VAN3_HPLC-MS	30,40	9,96
17_VAN3_HPLC-MS	41,97	18,60	44_VAN3_HPLC-MS	8,89	3,16
18_VAN3_HPLC-MS	33,92	10,06	45_VAN3_HPLC-MS	19,59	6,95
19_VAN3_HPLC-MS	15,83	7,29	46_VAN3_HPLC-MS	65,79	15,12
20_VAN3_HPLC-MS	48,33	28,38	47_VAN3_HPLC-MS	22,51	4,50
21_VAN3_HPLC-MS	33,24	20,52	48_VAN3_HPLC-MS	42,55	12,18
22_VAN3_HPLC-MS	23,36	20,01	49_VAN3_HPLC-MS	25,87	6,28
23_VAN3_HPLC-MS	20,97	12,22	50_VAN3_HPLC-MS	5,20	1,67
24_VAN3_HPLC-MS	11,03	7,07	51_VAN3_HPLC-MS	24,65	20,55
25_VAN3_HPLC-MS	30,65	18,01	52_VAN3_HPLC-MS	10,35	7,06
26_VAN3_HPLC-MS	15,72	13,54	53_VAN3_HPLC-MS	29,34	11,96
27_VAN3_HPLC-MS	33,22	20,70	54_VAN3_HPLC-MS	13,94	7,30

Srovnání metod LAG1 a CLO

Souhrnné statistiky hladin vankomycinu (mg/l) zjištěných metodami LAG1 a CLO můžeme vidět v Tab. 11, jejich vizualizaci (včetně vazeb mezi hodnotami zjištěnými na jednom vzorku krve) pak na Obr. 23 až Obr. 25. Odchylna příslušných měření byla následně definována tak, že kladná hodnota detekuje, že výsledek zjištěný metodou LAG1 je vyšší než výsledek zjištěný metodou CLO.

V Tab. 13 jsou uvedeny souhrnné statistiky pro detekované odchylky při použití těchto metod. Lze říci, že odchylka obou metod se pohybovala v rozsahu -1,25 mg/l až 6,66 mg/l. V polovině měření byla pozorována odchylka větší než 2,68 mg/l. Všimnout si lze rovněž, že v polovině měření byla detekována odchylka metod 1,90 mg/l až 3,88 mg/l. Podíváme-li se na vyhodnocení relativních změn (viz Tab. 13), můžeme si všimnout, že nejvyšší pozorovaný rozdíl odpovídal o 28 % vyšší hladině vankomycinu zjištěné metodou LAG1 oproti hladině zjištěné metodou CLO.

Lze očekávat, že v polovině měření bychom při měření hladin vankomycinu metodami LAG1 a CLO detekovali odchylku menší než cca 2,68 mg/l. Dle 95 % intervalového odhadu tohoto mediánu (viz Tab. 13, interval nepokrývá nulovou odchylku) lze konstatovat, že se mediány výsledků zjištěných metodami LAG1 a CLO statisticky významně liší, což ukazuje na systematickou odchylku daných metod. Pozorované rozdíly lze velmi dobře vidět i na Obr. 25a, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**26 a Obr. 27. Na Obr. 23 a Obr. 124 lze pozorovat rovněž proporcionální chybu – s rostoucími hladinami vankomycinu roste rozdíl v hodnotách detekovaných srovnávanými metodami. Toto naznačuje rovněž intervalový odhad směrnice regresní přímky (viz Tab. 13), který nepokrývá očekávanou hodnotu 1.

Srovnání metod LAG2 a SMN

Souhrnné statistiky hladin vankomycinu získané při porovnání metod LAG2 a SMN jsou zobrazeny v Tab. 11 a znázorněny na Obr. 23 až Obr. 25.

Tab. 13 zobrazuje odchylky v měření obou metod. Pro metody LAG2 a SMN je odchylka 1,43 – 18,17 mg/l. V polovině měření byla odchylka větší než 6,62 mg/l. V polovině měření byla detekovaná odchylka v rozmezí 2,21 – 8,25 mg/l. Při pozorování relativních změn v Tab. 13 je nejvyšší měřený rozdíl 118% vyšší hladiny vankomycinu metodou LAG2 v porovnání s metodou SMN. V této tabulce lze s pomocí 95 % intervalového odhadu mediánu konstatovat, že jsou porovnávané metody zatížené systematickou odchylkou. Rozdíly jsou zobrazeny na Obr. 25b, Obr. 26 a Obr. 27. Dále je zobrazena proporcionální chyba měření na Obr. 23 a Obr. 24. Stejně jako u předchozí metody pozorujeme trend rostoucího rozdílu měření s narůstající koncentrací.

Srovnání metod VAN3 a HPLC-MS

Souhrnné statistika hladin vankomycinu získané srovnáním metod VAN3 a HPLC-MS jsou zobrazeny v Tab. 12 a na Obr. 23 až Obr. 25.

Souhrnné statistiky pro odchylky měřené těmito metoda jsou uvedeny v Tab. 13. Odchylka obou metod se pohybovala v rozmezí -1,02 až 50,67 mg/l. V polovině měření byla odchylka větší než 11,21 mg/l. Detekovaná odchylka v polovině měření byla v rozmezí 3,92 – 22,85 mg/l. Nejvyšší rozdíl byl 401% nadhodnocení výsledku metodou VAN3 v porovnání s metodou HPLC-MS. Dále lze v Tab. 13 na 95 % intervalového odhadu mediánu vidět, že se mediány metod statisticky významně liší a z toho lze konstatovat, že jsou metody zatížené systematickou odchylkou měření. Tyto rozdíly jsou dále vizuálně zobrazeny v Obr. 25c, Obr. 26 a Obr. 27. Na Obr. 23 a Obr. 24 je zachycena proporcionální odchylka měření, která roste spolu s narůstající koncentrací vankomycinu. Oproti předchozím metodám je proporcionální chyba měření výrazně větší ve vyšších koncentracích.

Tab. 11: Souhrnné statistiky metod LAG1, CLO, LAG2 a SMN pro měření vankomycinu (mg/l)

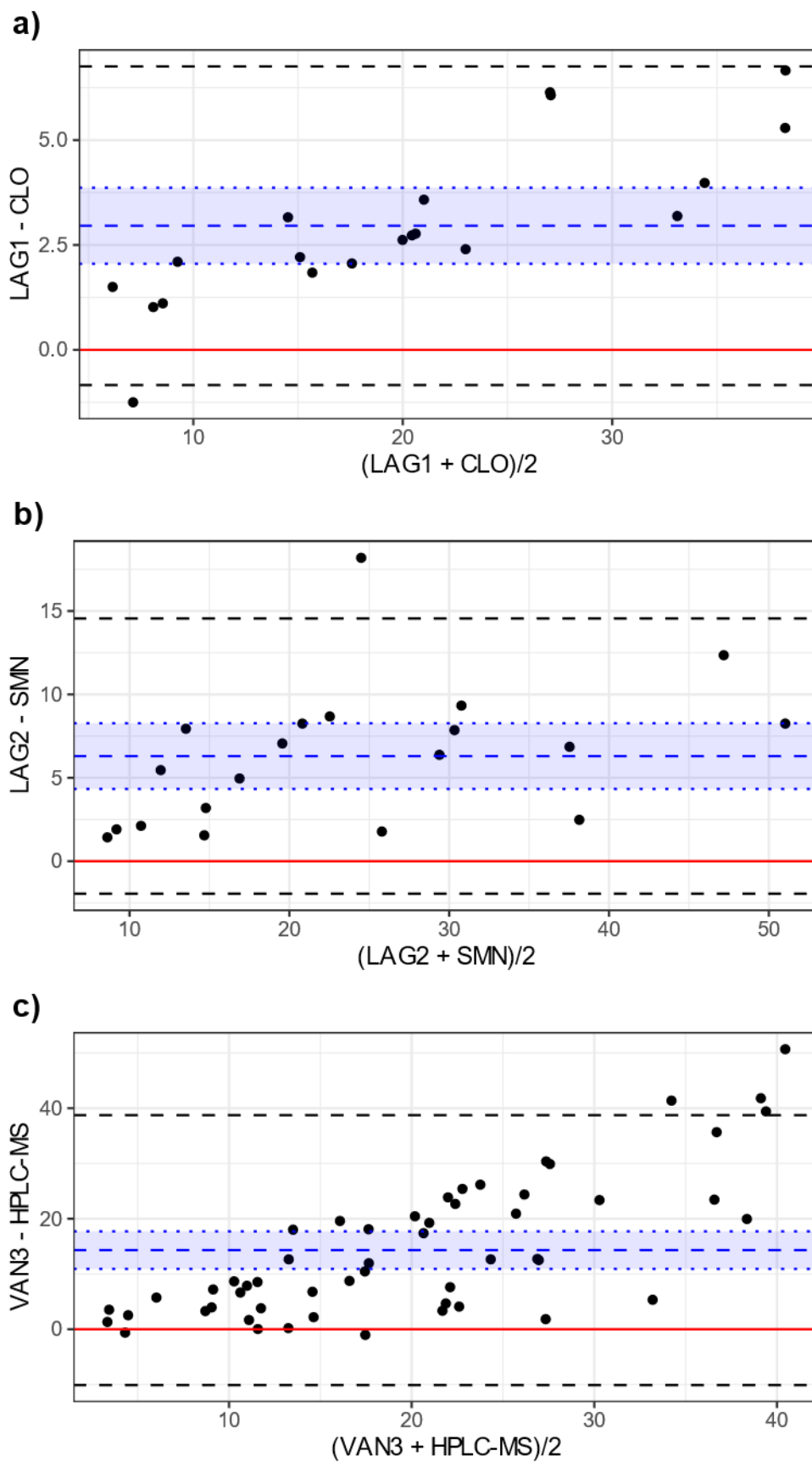
	LAG1	CLO	LAG2	SMN
rozsah výběru	20		20	
min – max	6,50 - 41,60	5,40 - 35,61	9,33 - 55,15	7,90 - 46,90
medián (IQR)	21,55 (11,75; 30,10)	18,88 (9,39; 24,01)	25,81 (15,68; 35,14)	16,36 (10,54; 26,35)

Tab. 12: Souhrnné statistiky metod VAN3 a HPLC-MS pro měření vankomycinu (mg/l)

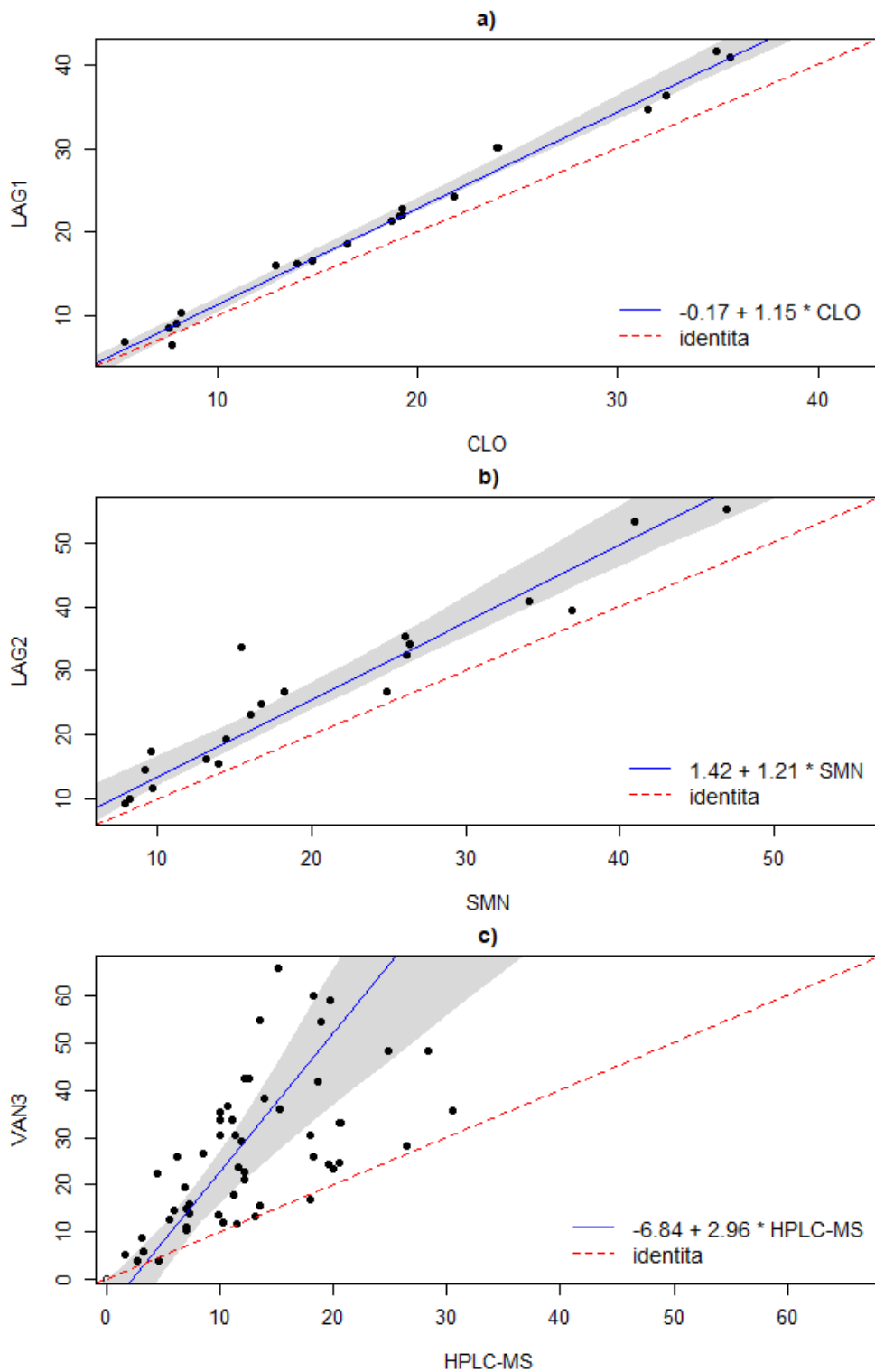
	VAN3	HPLC-MS
rozsah výběru	54	
min - max	4,00 - 65,79	1,67 - 30,53
medián (IQR)	25,26 (14,44; 35,94)	11,82 (7,24; 18,24)

Tab. 13: Ověření shody srovnávaných metod - souhrnné statistiky, odhady mediánu a výsledky Passingovy-Bablokovy regrese

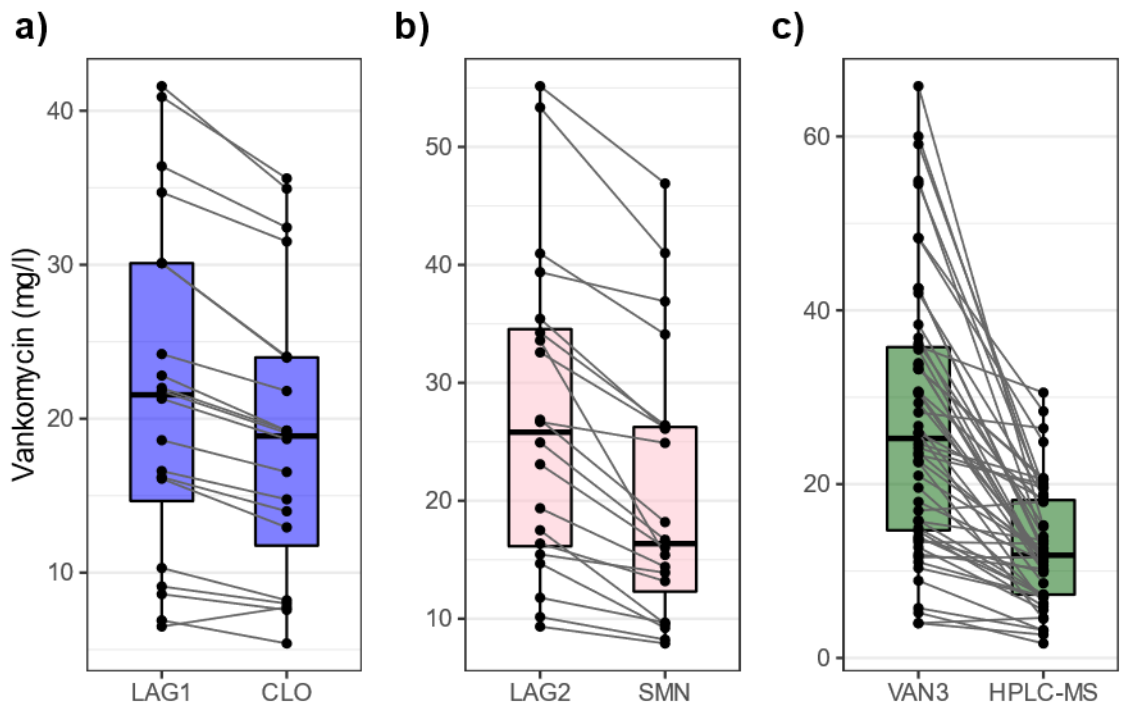
	LAG1 - CLO	LAG2 - SMN	VAN3 - HPLC-MS
rozsah výběru	20	20	54
min - max	-1,25 - 6,66	1,43 - 18,19	-1,02 - 50,67
medián (IQR)	2,68 (1,90; 3,88)	6,62 (2,21; 8,25)	11,21 (3,92; 22,85)
min (%) - max (%)	-20 - 28	6 - 118	-16 - 401
medián (%) (IQR (%))	14 (12; 24)	27 (18; 47)	107 (45; 206)
Shapirův-Wilkův test (p)	0,290	0,028	< 0,001
Ověření shody			
medián (95% IO), párový Wilcoxonův test (p)	2,68 (2,10; 3,98), p < 0,001	6,62 (4,38; 7,95), p < 0,001	11,21 (9,91; 16,58), p < 0,001
Passingova-Bablokova regrese			
konstanta	-0,17 (-1,99; 0,99)	1,42 (-1,41; 5,82)	-6,84 (-17,92; -0,54)
směrnice	1,15 (1,09; 1,26)	1,21 (1,04; 1,39)	2,96 (2,00; 4,12)



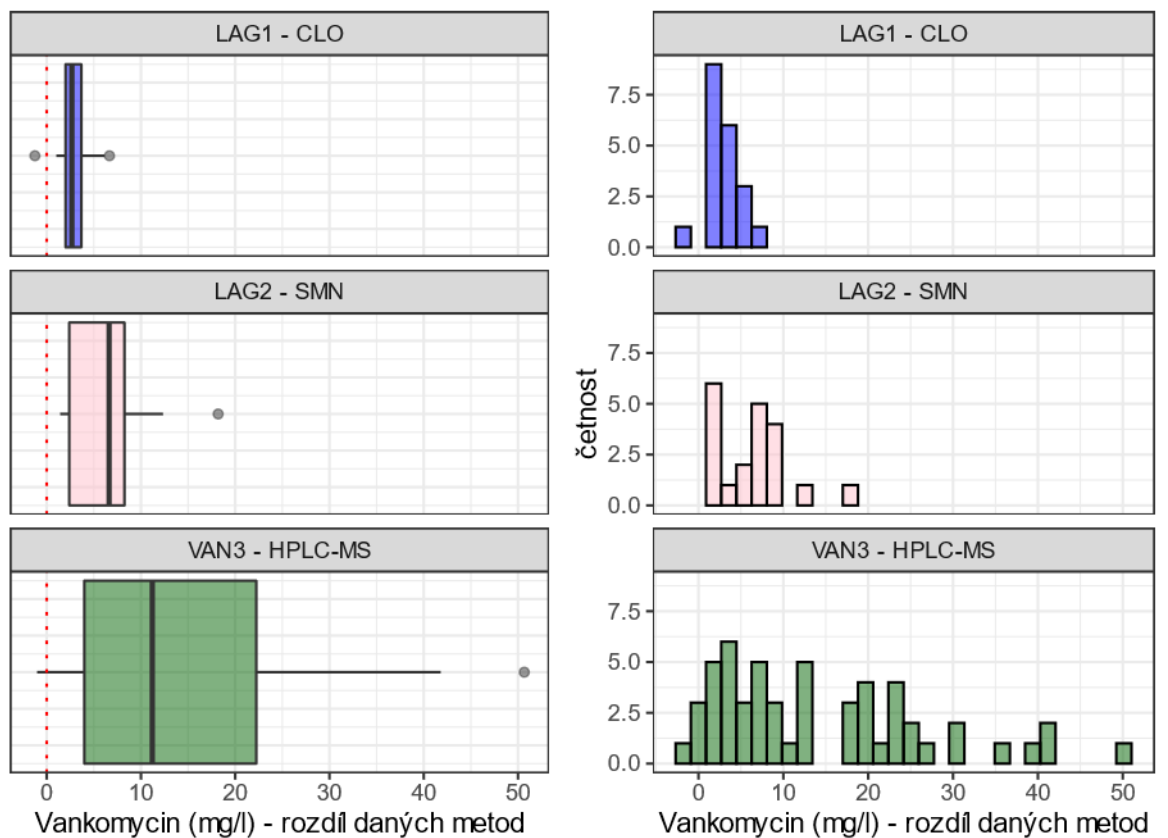
Obr. 23: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (mg/l) (Blandův - Altmanův graf)



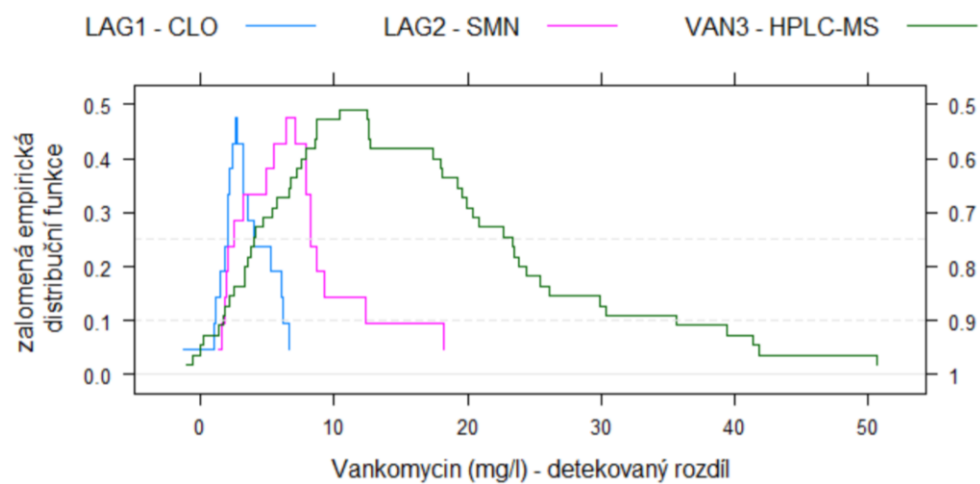
Obr. 14: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (mg/l) (Passingova-Bablokova regrese)



Obr. 25: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (párové krabicové grafy)



Obr. 26: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (krabicové grafy pozorovaných rozdílů a histogramy)



Obr. 27: Srovnání porovnávaných metod pro měření vankomycinu (angl. Mountain plot)

Diskuze

Cílem diplomové práce bylo porovnat mezi sebou analytické metody stanovení antibiotika vankomycinu v biologickém materiálu. Součástí práce bylo také vyvinutí a validace vlastní metody pro detekci vankomycinu pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru.

Pro vyvinutí metody HPLC-MS/MS bylo potřeba zajistit optimální nastavení podmínek analýzy a vytvořit vhodnou koncentrační řadu vankomycinu, která by vymezovala rozsah stanovení pro vzorky pacientů. Při volbě precipitačních roztoků jsem vycházela z již použitých a ověřených postupů stanovení vankomycinu kapalinovou chromatografií. Lima et al., Da Silva et al., Javorská et al. uvádí, že použili k přípravě vzorků precipitaci pomocí acetonitrilu. Brozmanová et al. naopak využili kyselinu trichloroctovou k precipitaci. Nicméně během přípravy kalibračních křivek se ukázaly tyto přípravy nedostatečně přesné. Zhang et al. vyzkoušel ve své metodě pro precipitaci methanol. Po vyhodnocení koncentrační řady s methanolem se ukázala tato příprava kalibrátorů nejpřesnější. Pro další zlepšení přesnosti detekce vzorků byla vyzkoušena ultrafiltrace pomocí speciálních zkumavek značky Centrifree. V takto upravených vzorcích došlo k odstranění neúčinné frakci vankomycinu vázané na bílkoviny a stanovovala se pouze volná účinná frakce. Předpoklad byl takový, že tato úprava by měla poskytnout ještě přesnější měření. Při porovnání s kalibrační řadou s methanolem bez precipitace se ale ukázalo, že ultrafiltrace nedosahuje lepších výsledků pro metodu. Navíc imunoanalytické metody, s kterými se metoda měla porovnávat, stanovovaly volnou i vázanou frakci vankomycinu, což byl další důvod pro volbu přípravy bez ultrafiltrace. Kromě poslední finální kalibrační řady, kdy byl použit standard vankomycin hydrochloridum, byla používána dostupnější varianta vankomycin ylan 500 mg. Dále byl zvolen pro analýzu interní standard teikoplanin, který je chemicky velmi podobný vankomycinu a také je levnější variantou oproti izotopicky značenému standardu. Přesné parametry nastavení metody jsou uvedeny v Tab. 1.

Vyvinutou metodou bylo proměřeno 54 reálných vzorků krve pacientů odeslaných na oddělení farmakologie a toxikologie. Jednotlivé vzorky pacientů

nebyly tříděny na základě pohlaví, věku ani zdravotního stavu. Podmínkou byla pouze indikace léčby vankomycinem, kdy se běžně provádí monitorování jeho hladin v séru. V rámci odběru krve před rutinní analýzou imunoanalytickou metodou Vancomycin KIMS Roche na analyzátoru Cobas Integra 400+ (VAN3) se následně ten samý vzorek analyzoval na vyvinuté metodě HPLC-MS/MS. K porovnání byly přidány vzorky měřené imunoanalytickými metodami získané externě z různých zdravotnických zařízení z Opavy, Nového Jičína a Prostějova. Všechny metody byly porovnány a výsledky statistické analýzy jsou uvedeny a popsány v kapitole Výsledky.

Důvodem, proč byly v rámci práce porovnávány metody stanovení vankomycinu, je ten, že dostupné analytické metody vykazují malou návaznost měření. Vzhledem k tomu, že terapeutické monitorování vankomycinu u pacientů je běžnou praxí, nutnost zajistit přesné měření je zásadním krokem v úspěšné léčbě. Metoda stanovení vankomycinu musí být dostatečně přesná a spolehlivá, aby zabránila možným toxickým účinkům antibiotika a zároveň určila, kdy je dávka nedostatečná a zvyšuje riziko neúspěšné léčby a rozvoj rezistence bakterií. Ideálně by měly všechny metody stanovení poskytovat identické kvalitní výsledky. V praxi se ale ukazuje, že metody poskytují rozdílné výsledky.

Nedostatečná harmonizace metod stanovení může mít řadu příčin. Obecně je jedním z důvodů rozdílnost mezi použitými analytickými systémy. Řada laboratoří využívá ke stanovení komerčně dodávané imunoanalytické sady, kterých je na trhu celá řada. Variabilita mezi těmito imunoanalytickými testy je způsobena rozdílným typem interakce vzorku s analytickým systémem a jeho detekce. V polské studii se zabývali rozdíly stanovení kontrolních vzorků vankomycinu mezi analytickými a zjistili, že největší rozdíl byl mezi chemiluminiscenční imunanalýzou na systému Siemens Advia Centaur a FPIA systémem Roche Integra, který dosáhl 40 % (Kowalski et al., 2019). Vzhledem k rozdílnosti mezi imunanalytickými metodami někteří autoři doporučují přesun k analýze vankomycinu pomocí pokročilých analytických metod LC-MS (Samardzic et al., 2016).

Pro porovnání imunoanalytických metod Vancomycin FPIA Cobas FPIA na analyzátoru Cobas Integra 400+ (LAG1;LAG2), i-Vancomycin CLIA Abbott

na analyzátoru Architect (CLO) a Vancomycin EMIT na analyzátoru Adria Centaur (SMN) byly vzorky získány externě z odlišných zdravotnických zařízení. Všechny porovnávané metody v rámci této práce vykazovaly systematickou konstantní odchylku i proporcionální chybu měření. Vyvinutá metoda HPLC-MS/MS byla porovnána s rutinně používanou metodou VAN3. Na základě výsledků je jednoznačné, že metoda VAN3 poskytuje významně zvýšené hodnoty vankomycinu oproti HPLC-MS/MS. Samozřejmě je nutné počítat s možnou chybou v přípravě vzorků pro analýzu HPLC-MS/MS, ale míra ovlivnění výsledků by nebyla tak výrazná. Dalším problémem metody HPLC-MS/MS je validace, kdy řada parametrů nesplňuje podmínky zavedení metody do praxe. Největší shody v měření poskytlo srovnání metody LAG1 a CLO, které byly zatíženy nejmenší chybou. Je třeba zmínit, že všechny porovnávané metody detekují vankomycin imunanalyticky a vyvíjená metoda jediná kombinuje kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometr. Jedním z výsledků porovnání je potvrzení nedostatečné harmonizace analytických metod, protože ve všech porovnáních došlo k statisticky významným odchylkám.

Důvodem významnému nadhodnocení VAN3 při porovnání s HPLC-MS/MS může být s velkou pravděpodobností přítomnost látek interferujících s imunanalýzou. Analytickou interferencí se rozumí přítomnost látky ve vzorku, která způsobí odchylku v měření od skutečné hodnoty analytu. To může vést k nesprávně zvolenému dávkování a ohrozit tak léčbu pacienta. Interference mohou být exogenní způsobené látkami, které se běžně nenachází ve vzorcích pacientů i endogenní, týkající se látek jako je bilirubin, proteiny, imunoglobuliny a dalších běžných součástí vzorků (Brencic and Nikolac, 2019). V případě vankomycinu studie uvádí přítomnost neznámé endogenní nebo exogenní substance, která se maskuje za vankomycin při stanovení enzymovou imunanalýzou. Ve studii byl uveden případ pacientky, u níž došlo ke komplikacím léčby vlivem nesprávného stanovení vankomycinu imunanalýzou. Při proměření pomocí HPLC byly výsledné hodnoty sniženy o polovinu a analýza pomocí ultrafiltračního zařízení zjistila ve vzorcích zvýšenou vazbu na proteiny. Při další hospitalizaci byla pacientce stanovena pomocí EIA na systému Emit 2000 koncentrace 2,4 mg/l vankomycinu dokonce 11 měsíců od

poslední dávky. Stejný vzorek pacientky byl změřen pomocí HPLC a výsledek byl nedetekovatelný (Singer et al., 2020). V další studii došlo k chybě a změřili koncentraci vankomycinu pacientovi před jeho podáním. Neočekávaně zjistili koncentraci 36,1 mg/l na analyzátoru Roche Modular P. Provedli další měření stejného vzorku a získali velmi odlišné výsledky. Analýzou platformou Siemens Advia detekovali 13 mg/l, Ortho Vitros 108 mg/l, Abbott Architect 4,8 mg/l. Zaměřili se proto na identifikování neznámé endogenní proteinové substance. Předpokládali možný vliv imunoglobulinů třídy G, A a M. Dále revmatoidního faktoru, antibiotik fosfomycinu a imipenemu, které pacient předtím dostával a celkového proteinu. Nicméně neprokázali žádný vliv těchto substancí na metody (Tsoi et al., 2019). Podobnou studii výše zmíněných možných endogenních substancí provedli LeGatt et al., na metodě FPIA, EMIT a dvou turbidimetrických analýzách. Výsledkem bylo, že IgA ani IgG neovlivňují měření těmito metodami. Zvýšené koncentrace byly naměřené pouze v přítomnosti revmatoidního faktoru. Naopak ke snížení o 20 % došlo vlivem IgM u dvou turbidimetrických imunoanalýz. U zbylých metod ke snížení nedošlo (LeGatt, 2012). Naopak v další studii srovnávali měření pomocí systému Abbott TDx s HPLC a nepozorovali žádné odchylky v měření (Iwamoto et al., 2005).

Podle výsledků porovnání metod stanovujících koncentrace vankomycinu u pacientů není možné doporučit pro rutinní používání metodu HPLC-MS/MS. Zjištěné rozdíly vedly k hypotéze, že existuje jedna nebo více neznámých interferujících látek, které reagují s metodami založenými na imunoanalytickém stanovení. Je třeba tuto látku identifikovat a vysvětlit možnosti její interakce s metodami. Pozorovaná interference se samozřejmě netýká všech vzorků a pacientů ale je nutné informovat o ní odborný zdravotnický personál, aby nedošlo ke špatnému nastavení léčby vankomycinem až případnému ohrožení zdraví pacienta. Přesto, že kapalinová chromatografie pro detekci vankomycinu by byla levnější a robustnější variantou oproti imunoanalýzám, vyvinutá metoda vyžaduje ještě úpravy. V budoucnu by bylo vhodné porovnat výsledky měření HPLC-MS metody s dalšími variantami imunoanalýz. V rutinní praxi by se měly prozatím používat ověřené imunoanalytické metody. U nich je ale nutné provést harmonizaci. Mezinárodní konsorcium pro harmonizaci klinických laboratorních

výsledků již umístilo vankomycin na listinu stanovovaných látek vyžadujících harmonizaci se statusem potřebný.

Závěr

Byla vyvinuta a částečně validována metoda HPLC-MS/MS stanovení vankomycinu v séru.

Touto metodou bylo proměřeno 54 reálných vzorků pacientů léčených vankomycinem. Výsledky měření byly porovnány s metodou fluorescenční polarizační imunoanalýzy. Obě metody byly statisticky porovnány a bylo zjištěno, že neposkytují shodné výsledky. Metoda fluorescenční polarizační imunoanalýzy poskytovala až o 401% vyšší naměřené hodnoty než metoda HPLC-MS/MS. Srovnání ukázalo významnou systematickou odchylku a proporcionální chybu mezi metodami.

Byly porovnány výsledky měřené různými imunoanalytickými soupravami na 20 reálných vzorcích pacientů získaných z různých zdravotnických zařízení. Výsledky měření nebyly při porovnání metod shodné a byla pozorována systematická odchylka a proporcionální chyba.

Vyvinutá metoda HPLC-MS/MS nebyla doporučena v této podobě k používání v rutinní analýze vankomycinu u pacientů.

Do budoucna by bylo vhodné harmonizovat imunoanalytické metody stanovení vankomycinu a definovat možné příčiny rozdílnosti stanovení. S těmito znalostmi by bylo možné upravit metodu HPLC-MS/MS tak, aby byla vhodná pro terapeutické monitorování vankomycinu u pacientů.

Citace

- ABDOLLAHPOUR, A., HEYDARI, R. and SHAMSIPUR, M. (2017) Two Synthetic Methods for Preparation of Chiral Stationary Phases Using Crystalline Degradation Products of Vancomycin: Column Performance for Enantioseparation of Acidic and Basic Drugs. 18. *AAPS PharmSciTech*. s. 1855-1862. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-016-0660-6
- AHMED, A. (1997) A Critical Evaluation Of Vancomycin For Treatment Of Bacterial Meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 16:895–903.
- ALLAWATI, H. et al. (2020) A Pharmacokinetic Study Comparing the Clearance of Vancomycin during Haemodialysis Using Medium Cut-Off Membrane (Theranova) and High-Flux Membranes (Revaclear). 12. *Toxins*. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12050317
- ALOBALD, A. S., et al. (2016) Effect Of Obesity On The Pharmacokinetics Of Antimicrobials In Critically Ill Patients: A Structured Review." *International journal of antimicrobial agents* 47.4 259-268.
- ARMSTRONG, D. W. and NAIR, U. B.(1997) Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. 18. *Electrophoresis*. s. 2331-2342. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.1150181224
- ASHWIN, K. S. and MURALIDHARAN, N. P. (2015) Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) vs Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). 33. *Indian Journal of Medical Microbiology*. S. 166-167. ISSN 02550857. Dostupné z: doi:10.4103/0255-0857.150976
- Avoparcin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Avoparcin>
- BARG, N. L., SUPENA, R. B. and FEKETY, R. (1986) Persistent Staphylococcal Bacteremia In An Intravenous Drug Abuser. 29. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. s. 209-211. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.29.2.209
- BARNA, J. C. and WILLIAMS, D. H. (1984) The Structure and Mode of Action of Glycopeptide Antibiotics of the Vancomycin Group. 38. *Annual Review of*

- Microbiology*. s. 339-357. ISSN 0066-4227. Dostupné z:
doi:10.1146/annurev.mi. 38.100184.002011
- BEDNÁŘ, M. (1996) *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, ISBN 80-238-0297-6.
- BEGLEY, T P. (2007) *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, [cit. 2021-03-13]. ISBN 0470048670.
- BENEŠ, J. (2018) *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0636-3.
- BEŇOVSKÁ. *Doplňky a opravy ke skriptům Klinická biochemie* [online]. (2011) [cit. 2021-5-8]. Dostupné z:
https://is.muni.cz/el/1411/podzim2011/KBSM/um/SKRIPTA_Klin.bioch_DOPLNENI_Benovska.pdf?fbclid=IwAR1gfeT8MfCckdajjoyQWtFF7eqEZluWlQCeM5NI7XkiWFy8iiJKhJscyuY
- BRENCIC, T. and NIKOLAC, N. (2019) *Gentamicin and Vancomycin Interference on Results of Clinical Chemistry Parameters on Abbott Architect c8000*. s. 738-747. ISSN 0003-9985. Dostupné z: doi:10.5858/arpa.2017-0462-OA
- BROZMANOVÁ, H. et al. (2017) New Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Routine TDM of Vancomycin in Patients with Both Normal and Impaired Renal Functions and Comparison with Results of Polarization Fluoroimmunoassay in Light of Varying Creatinine Concentrations. 469. *Clinica Chimica Acta*. s. 136-143. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca. 2017.04.003
- BUELGA, D. S. et al. (2005) Population Pharmacokinetic Analysis of Vancomycin in Patients with Hematological Malignancies. 49. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. s. 4934-4941. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.12.4934-4941.2005
- CAMPBELL, A. K., HALLETT, M. B. and WEEKS, I. (1985) Chemiluminescence as an Analytical Tool in Cell Biology and Medicine. *Methods of Biochemical Analysis*. Hoboken, NJ, USA, s. 317-416.

Methods of Biochemical Analysis. ISBN 9780471821779. Dostupné z:
doi:10.1002/9780470110522.ch7

CELIK, I. et al. (2005) Protective Effects of Different Antioxidants and Amrinone on Vancomycin-Induced Nephrotoxicity. 97. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. s. 325-332. ISSN 1742-7835. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto_153.x

Centrifree® Ultrafiltration for Clinical Samples. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/protein-sample-preparation/protein-concentration/clinical-samples.html>

CETINKAYA, Y., FALK, P. and MAYHALL, C. G. (2000) Vancomycin-Resistant Enterococci. 13. *Clinical Microbiology Reviews*. s. 686-707. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.13.4.686-707.2000

CONG, Y., YANG, S. and RAO, X. (2020) Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. 21. *Journal of Advanced Research*. s. 169-176. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare. 2019.10.005

CUSUMANO, J. et al. (2020) Towards precision medicine: Therapeutic drug monitoring – guided dosing of vancomycin and β -lactam antibiotics to maximize effectiveness and minimize toxicity. 77. *American Journal of Health-System Pharmacy*. s. 1104-1112. ISSN 1079-2082. Dostupné z:
doi:10.1093/ajhp/zxaa128

DA SILVA, A. C. C. et al. (2019) Ready for TDM: Simultaneous quantification of amikacin, vancomycin and creatinine in human plasma employing ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 70. *Clinical Biochemistry*. s. 39-45. ISSN 00099120. Dostupné z:
doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.06.011

Dalbavancin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dalbavancin>

DANDLIKER, W. B. and FEIGEN, G. A. (1961) Quantification of the Antigen-Antibody Reaction by the Polarization of Fluorescence. 5. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications. s. 299-304. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(61)90167-X

DAVIS, R. L., SMITH, A. L., KOUP, J. R. (1986) The "Red Man's Syndrome" and Slow Infusion of Vancomycin. 104. *Annals of Internal Medicine*. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-104-2-285_2

De HOFFMANN, E., and STROOBANT, V. (2007) Mass spectrometry: principles and applications. John Wiley 8.

DIETERICH, Ch. et al.(2009) Gene Expression Analysis Reveals New Possible Mechanisms of Vancomycin-Induced Nephrotoxicity and Identifies Gene Markers Candidates. 107. *Toxicological Sciences*. s. 258-269. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfn203

ELYASI, S. et al.(2013) Prevention of vancomycin induced nephrotoxicity: a review of preclinical data. 69. *European Journal of Clinical Pharmacology*. s. 747-754. ISSN 0031-6970. Dostupné z: doi:10.1007/s00228-012-1406-3

EMIT 2000 Vancomycin Assay [online]. (2010) [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=/cis/4W052/%25%25/EN_VANCOMYCIN.pdf

ENGVALL, E. (1980) [28] Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Immunochemical Techniques, Part A*. Elsevier, s. 419-439. Methods in Enzymology. ISBN 9780121819705. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(80)70067-8

FAULKNER, C. M., COX, H. L. and WILLIAMSON, J.C. (2005) Unique Aspects of Antimicrobial Use in Older Adults. 40. *Clinical Infectious Diseases*. s. 997-1004. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/428125

FILIPPONE, E. J., KRAFT, W. J. and FARBER, J. L. (2017) *The Nephrotoxicity of Vancomycin*. s. 459-469. ISSN 00099236. Dostupné z: doi:10.1002/cpt.726

FONG, K. L. et al. (1981) Sensitive Radioimmunoassay For Vancomycin. 19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. s. 139-143. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.19.1.139

FONS - Příručka laboratorních vyšetření. *Česká Společnost Klinické Biochemie* [online]. (2007) [cit. 2021-5-9]. Dostupné z:

http://stara.cskb.cz/plv/Produkty/6CACDC9A-B525-4E34-A0AA-7EE57295A141.html?fbclid=IwAR0DifOLwWaknGK_U50vHYNbXmgSQowAnkSDiFcQzQt9p8EoYiEasNZsU5Y

GAO, Y. C., JIAO, Z., HUANG, H. et al. (2018) Development Of Decision System For Individualization Of Vancomycin Dosage. *Acta Pharm Sin.* 53: 104-110. Dostupné z: doi: 10.16438/j.0513-4870.2018-0853

GASPER, M. P., BERTHOD, A., NAIR, U. B. and ARMSTRONG, D. W. (1996) Comparison and Modeling Study of Vancomycin, Ristocetin A, and Teicoplanin for CE Enantioseparations. 68. *Analytical Chemistry.* s. 2501-2514. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac960154q

Geraci, J. E., et al. (1956) Some Laboratory And Clinical Experiences With A New Antibiotic, Vancomycin. *Proceedings of the Staff Meetings. Mayo Clinic.* Vol. 31. No. 21.

GERDING, D. N. (1997) Is There a Relationship Between Vancomycin-Resistant Enterococcal Infection and Clostridium Difficile Infection? 25. *Clinical Infectious Diseases.* S206-S210. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/516247

GRAYSON, M. L. et al. (2010) *Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs.* CRC Press.

GRIFFITH, R. S. (1981) Introduction to Vancomycin, *Reviews of Infectious Diseases, Volume 3, Issue Supplement_2.* s. 200–204. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/clinids/3.Supplement_2.S200

GRIFFITHS, W. J. and WANG, Y. (2009) Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. 38. *Chemical Society Reviews.* ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b618553n

GUPTA, A., BIYANI, M. and KHAIRA, A. (2011) Vancomycin nephrotoxicity: myths and facts. *Neth J Med*, 69(9), pp. 379-383.

HADI, M. and MOLLAEI, T. (2018) Electroanalytical Determination of Vancomycin at a Graphene-modified Electrode: Comparison of Electrochemical Property between Graphene, Carbon Nanotube, and Carbon Black.

31. *Electroanalysis*. s. 1224-1228. ISSN 1040-0397. Dostupné z:
doi:10.1002/elan.201800497
- HAMMETT-STABLER, C. A. and JOHNS, T. (1998) Laboratory Guidelines For Monitoring Of Antimicrobial Drugs. *Clin Chem*. 44(5). 1129 – 1140. PMID: 9590397
- HARRIS, C. M. and HARRIS, T. M. (1982) Structure Of The Glycopeptide Antibiotic Vancomycin. Evidence For An Asparagine Residue In The Peptide. 104. *Journal of the American Chemical Society*. s. 4293-4295. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00379a062
- HARRIS, C. M., KOPECKA, H. and HARRIS, T. M. (1983) Vancomycin: structure and transformation to CDP-I. 105. *Journal of the American Chemical Society*. s. 6915-6922. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00361a029
- HASTINGS, P. J., ROSENBERG, S. M. and SLACK, A. (2004) Antibiotic-induced Lateral Transfer Of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol*. 12(9): 401–404. doi:10.1016/j.tim. 2004.07.003. PMID: 15337159.
- HELSET, E., NORDØY, I., SPORSEM, H. et al. (2020) Factors increasing the risk of inappropriate vancomycin therapy in ICU patients: A prospective observational study. 64. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. s. 1295-1304. ISSN 0001-5172. Dostupné z: doi:10.1111/aas.13658
- HOLMES, A. H., MOORE, L. S. P., et al. (2016) Understanding The Mechanisms And Drivers Of Antimicrobial Resistance. *Lancet*, 387(10014): 176–187. doi:10.1016/S0140-6736(15)00473-0. PMID: 26603922.
- HONOUR, J. W. (2003) Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. 40. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. s. 628-638. ISSN 0004-5632. Dostupné z:
doi:10.1258/000456303770367216
- HORI, Y., AOKI, N., KUWAHARA, S. et al. (2017) Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. 28. *Journal of the American Society of Nephrology*. s. 1783-1791. ISSN 1046-6673. Dostupné z:
doi:10.1681/ASN.2016060606

CHANG, Q., WANG, W., REGEV-YOCHAY, G., LIPSITCH, M., and HANAGE, W. P. (2015) Antibiotics In Agriculture And The Risk To Human Health: How Worried Should We Be? *Evol. Appl.* 8(3): 240–247. doi:10.1111/eva.12185. PMID:25861382.

CHELLAT, M. F., RAGUŽ, L. and RIEDL, R. (2016) Targeting Antibiotic Resistance. *Angewandte Chemie International Edition* 55.23. 6600-6626.

CHEN, Chao-Yang, Meng-Ya LI, Ling-Yun MA, Xing-Yu ZHAI, Dao-Huang LUO, Ying ZHOU, Zhen-Ming LIU and Yi-Min CUI. (2020) Precision and accuracy of commercial assays for vancomycin therapeutic drug monitoring: evaluation based on external quality assessment scheme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkaa150

CHEN, I. H. and NICOLAU, D. P. (2020) Augmented Renal Clearance and How to Augment Antibiotic Dosing. 9. *Antibiotics*. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9070393

CHIANELLA, I. et al. (2013) Direct Replacement of Antibodies with Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles in ELISA-Development of a Novel Assay for Vancomycin. 85. *Analytical Chemistry*. s. 8462-8468. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac402102j

Imunochemické metody. *Evropský sociální fond* [online]. [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/7OPPAst.pdf>

IWAMOTO, T., KAGAWA, Y. and KOJIMA, M. (2005) Factors influencing the overestimation of plasma vancomycin concentrations measured by the Abbott TDx technique. *Therapeutic drug monitoring* 27. 1. 58-62.

JAVORSKA, L., KUJOVSKA KRCMOVA, L., SOLICH, P. and KASKA, M. (2017) Simple and Rapid Quantification of Vancomycin in Serum, Urine and Peritoneal/Pleural Effusion via UHPLC-MS/MS Applicable to Personalized Antibiotic Dosing Research. 142. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. s. 59-65. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.04.029

JEFFRES, M. N. et al. (2007) A Retrospective Analysis Of Possible Renal Toxicity Associated With Vancomycin In Patients With Health Care-Associated

- Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Pneumonia. 29. *Clinical Therapeutics*. s. 1107-1115. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinthera.2007.06.014
- JOOS, B., LÜTHY, R. and BLASER, J. (1989) Long term accuracy of fluorescence polarization immunoassays for gentamicin, tobramycin, netilmicin and vancomycin. 24. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. s. 797-803. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/24.5.797
- JORGENSEN, J. H. and TURNIDGE, J. D. (2015) Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2015-05-26, s. 1253-1273. ISBN 9781683672807. Dostupné z: doi:10.1128/9781555817381.ch71
- KACÍŘOVÁ, I., GRUNDMANN, M. (2015) Terapeutické monitorování amikacinu a gentamicinu v rutinní klinické praxi. *Vnitřní Lékařství*. 61(1):33-41. Czech. PMID: 25693614.
- KARLÍKOVÁ, M and TOPOLČAN, O. Kolektiv autorů. Editoři: Marie Karlíková, Ondřej Topolčan. Protilátka a antigen. Zdroj: Docplayer [online]. (2012) [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/33902204-Kolektiv-atoru-editori-marie-karlikova-ondrej-topolcan-protilatka-a-antigen-zdroj.html?fbclid=IwAR0ln0flqtGzFB4mEUKbBlxedGPjn3gQg71110sEVnBrs1Vix8LoLg-zJQ>
- KHATAEE, A. R. et al. (2014) CuO nanosheets-enhanced flow-injection chemiluminescence system for determination of vancomycin in water, pharmaceutical and human serum. 122. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. s. 737-743. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2013.12.014
- KLABAN, V. (2005) *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén. ISBN 80-726-2341-9.
- KLOUDA, P. (2003) *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-863-6907-2.
- KOWALSKI, R. et al. (2019) Insufficient harmonization of antibiotics assays – Polish experience with an external quality assessment program in the years

2011–2018. 66. *Clinical Biochemistry*. s. 91-94. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.02.001

LANVERS-KAMINSKY, C. et al. (2017) *Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies*. s. 491-500. ISSN 00099236. Dostupné z: doi:10.1002/cpt.603

LeGatt, D. F. et al. (2012) The effect of paraproteins and rheumatoid factor on four commercial immunoassays for vancomycin: implications for laboratorians and other health care professionals. *Therapeutic drug monitoring* 34.3. 306-311.

LEVINE, D. P. (2006) Vancomycin: A History. 42. *Clinical Infectious Diseases*. S5-S12. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/491709

LIMA, Tácio de Mendonça et al. (2018) A Rapid and Simple HPLC Method for Therapeutic Monitoring of Vancomycin. 56. *Journal of Chromatographic Science*. s. 115-121. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmx089

LIU, C., BAYER, A., COSGROVE, S. E. et al. (2011) Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. 52. *Clinical Infectious Diseases*. e18-e55. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/ciq146

LODISE, T. P. et al. (2009) Relationship between Initial Vancomycin Concentration-Time Profile and Nephrotoxicity among Hospitalized Patients. 49. *Clinical Infectious Diseases*. s. 507-514. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/600884

LOLL, P. J. and AXELSEN, P. H. (2000) The Structural Biology of Molecular Recognition by Vancomycin. 29. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. s. 265-289. ISSN 1056-8700. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biophys.29.1.265

MARSHALL, F. J. (1965) Structure Studies On Vancomycin. *Journal of medicinal chemistry* . 18-22.

MARTÍNKOVÁ, J. (2018) *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2.*, zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4157-4.

MASON, N. A. et al. (2003) Comparison of 3 vancomycin dosage regimens during hemodialysis with cellulose triacetate dialyzers: post-dialysis versus intradialytic administration. 60. *Clinical Nephrology*. s. 96-104. ISSN 0301-0430. Dostupné z: doi:10.5414/CNP60096

MediWare a.s. *MEDIWARE* [online]. [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://mediware.cz/en/mwpharm-plus-plus/?fbclid=IwAR1SBhBERYkfAigt4WeKmFj6RpDsES1KMTmC715hri0zua9S4TIJdX7rx8E>

MENG, L., MUI, E., HOLUBAR, M. K. and DERESINSKI, S. C. (2017) Comprehensive Guidance for Antibiotic Dosing in Obese Adults. 37. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. s. 1415-1431. ISSN 02770008. Dostupné z: doi:10.1002/phar.2023

MILLER, A. D. and SMITH, K. M. (2006) Medication And Nutrient Administration Considerations After Bariatric Surgery. *American Journal of Health-System Pharmacy* 63.19 1852-1857.

MOELLERING, R. C. Jr., Vancomycin: (2006) A 50 -Year Reassessment, *Clinical Infectious Diseases, Volume 42, Issue Supplement_1*. s. 3–4, <https://doi.org/10.1086/491708>

NAKAMURA, T. et al. (1996) In-vivo Clearance Study of Vancomycin in Rats. 48. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. s. 1197-1200. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb03920.x

NISHINO, Y. et al. (2009) Targeting Superoxide Dismutase to Renal Proximal Tubule Cells Attenuates Vancomycin-induced Nephrotoxicity in Rats. 37. *Free Radical Research*. s. 373-379. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.1080/1071576031000061002

NITANAI, Y. et al. (2009) Crystal Structures Of The Complexes Between Vancomycin And Cell-Wall Precursor Analogs. 385. *Journal of Molecular*

Biology. s. 1422-1432. ISSN 00222836. Dostupné z:
doi:10.1016/j.jmb.2008.10.026

OPEKAR, F. (2002) *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

Oritavancin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oritavancin>

PAI, M. et al.(2017) Relationships of Vancomycin Pharmacokinetics to Body Size and Composition Using a Novel Pharmacomorphomic Approach Based on Medical Imaging. 61. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. e01402-17. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01402-17

PROOST, J. H. and MEIJER, Dirk K.F. (1992) MW/Pharm, an integrated software package for drug dosage regimen calculation and therapeutic drug monitoring. 22. *Computers in Biology and Medicine*. s. 155-163. ISSN 00104825. Dostupné z: doi:10.1016/0010-4825(92)90011-B

PRYBYLSKI, J. P. (2015) Vancomycin Trough Concentration as a Predictor of Clinical Outcomes in Patients with Staphylococcus aureus Bacteremia: A Meta-analysis of Observational Studies. 35. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. s. 889-898. ISSN 02770008. Dostupné z: doi:10.1002/phar.1638

RICHARDSON, J., SCHEETZ, M. and O'DONNELL, E. P. (2015) The association of elevated trough serum vancomycin concentrations with obesity. 21. *Journal of Infection and Chemotherapy*. s. 507-511. ISSN 1341321X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiac.2015.03.007

Ristocetin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ristocetin>

ROBERTS, J. A, Mohd H ABDUL-AZIZ, LIPMAN, J. et al. (2014) Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. 14. *The Lancet Infectious Diseases*. s. 498-509. ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(14)70036-2

- RUBINSTEIN, E. and KEYNAN, Y. (2014) Vancomycin Revisited - 60 Years Later. 2. *Frontiers in Public Health*. ISSN 2296-2565. Dostupné z: doi:10.3389/fpubh.2014.00217
- RYBAK, M. J, et al. (2020) Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. 77. *American Journal of Health-System Pharmacy*. s. 835-864. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.1093/ajhp/zxaa036
- RYBAK, M. J. (2006) The Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Vancomycin. 42. *Clinical Infectious Diseases*. S35-S39. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/491712
- RYBAK, M. J. et al. (1990) Nephrotoxicity of vancomycin, alone and with an aminoglycoside, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 25, Issue 4, s 679–687, <https://doi.org/10.1093/jac/25.4.679>
- RYBAK, M. J. et al. (2009) Vancomycin Therapeutic Guidelines: A Summary of Consensus Recommendations from the Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. 49. *Clinical Infectious Diseases*. s. 325-327. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/600877
- RYBAK, M. J. et al. (2009) Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. 66. *American Journal of Health-System Pharmacy*. s. 82-98. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.2146/ajhp080434
- SÁDECKÁ, J., POLONSKÝ, J. and NETRIOVÁ, J. (1995) Stúdium možnosti stanovenia vankomycínu v sére kapilárnou izotachoforézou. *Ceska Slovenska Farmacie*;44(6):322-6. Slovak. PMID: 8599730.
- SAMARDZIC, J. et al. (2016). Different vancomycin immunoassays contribute to the variability in vancomycin trough measurements in neonates. *BioMed research international 2016*

- SANAVIO, B. and KROL, S. (2015) On the Slow Diffusion of Point-of-Care Systems in Therapeutic Drug Monitoring. 3. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2015.00020
- SHIRALI, A. and PAZHAYATTIL, G. S. (2014) Drug-induced impairment of renal function. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. ISSN 1178-7058. Dostupné z: doi:10.2147/IJNRD.S39747
- SCHWENZER, K. S. et al. (1983) Automated Fluorescence Polarization Immunoassay for Monitoring Vancomycin. *Therapeutic Drug Monitoring*. vol. 5, issue 3, s. 199-209. DOI: 10.1007/978-1-4684-5466-6_11
- SINGER, B. et al. (2019). Falsely Elevated Vancomycin-Concentration Values from Enzyme Immunoassay Leading to Treatment Failure. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 77. 10.1093/ajhp/zxz258.
- SMITH, P., PETROS, F. et al. (1998) New Modified Fluorescence Polarization Immunoassay Does Not Falsely Elevate Vancomycin Concentrations in Patients With End-Stage Renal Disease, *Therapeutic Drug Monitoring: - Volume 20 - Issue 2 - s 231-235*
- SOMERVILLE, A. L., WRIGHT, D. H. and ROTSCHAFFER, J. C. (1999) Implications of Vancomycin Degradation Products on Therapeutic Drug Monitoring in Patients with End-Stage Renal Disease. 19. *Pharmacotherapy*. s. 702-707. ISSN 0277-0008. Dostupné z: doi:10.1592/phco.19.9.702.31548
- SORRELL, T. C. (1982) Vancomycin Therapy for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. 97. *Annals of Internal Medicine*. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-97-3-344
- SPC - SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU: Vancomycin Kabi. *Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv: SÚKL* [online]. (2020) [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0156258&tab=texts>
- STROY, S. A. (1969) Modified microbiological assay for rapid estimation of antibiotic concentrations in human sera. *Appl Microbiol*. Jul;18(1):31-34. PMID: 4896101; PMCID: PMC377879.
- TAJIMA, Y. et al. (2007) Rapid detection of Staphylococcus aureus strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based

drug-susceptibility test. 70. *Journal of Microbiological Methods*. s. 434-441. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2007.05.020

Teicoplanin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Teicoplanin>

Telavancin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Telavancin>

TSOI, V. et al. (2019) Falsely elevated vancomycin concentrations in a patient not receiving vancomycin. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 39.7. 778-782.

ULLDEMOLINS, M., ROBERTS, J. A., RELLO, J., PATERSON, D. L. and LIPMAN, J. (2011) The Effects of Hypoalbuminaemia on Optimizing Antibacterial Dosing in Critically Ill Patients. 50. *Clinical Pharmacokinetics*. s. 99-110. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/11539220-000000000-00000

VALI, L., JENKINS, D. R., VAJA, R. and MULLA, H. (2021) Personalised dosing of vancomycin: A prospective and retrospective comparative quasi-experimental study. 87. *British Journal of Clinical Pharmacology*. s. 506-515. ISSN 0306-5251. Dostupné z: doi:10.1111/bcp.14411

Vankomycin. En.wikipedia.org [online]. San Francisco: Wikipedia, 2021 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin>

WALKER, C. A. and KOPP, B. (1978) Sensitive Bioassay for Vancomycin. 13. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. s. 30-33. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.13. 1. 30

WARD, T. J. and OSWALD, T. M. (1997) Enantioselectivity in capillary electrophoresis using the macrocyclic antibiotics. 792. *Journal of Chromatography A*. s. 309-325. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(97)00993-X

WATSON, T. J. and SPARKMAN, O. D. (2007) *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. 4th ed. Chichester: Wiley. ISBN 978-047-0516-348.

- WERNER, G., STROMMENGER, B. and WITTE, W. (2008) Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. 3. *Future Microbiology*. s. 547-562. ISSN 1746-0913. Dostupné z: doi:10.2217/17460913.3.5.547
- YEO, K. T., TRAVERSE, W. and HOROWITZ, G. L. (1989) Clinical performance of the EMIT vancomycin assay. 35. *Clinical Chemistry*. s. 1504-1507. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/35.7.1504
- ZAMONER, W. et al. (2019) Vancomycin dosing, monitoring and toxicity: Critical review of the clinical practice. 46. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. s. 292-301. ISSN 0305-1870. Dostupné z: doi:10.1111/1440-1681.13066
- ZHANG, M. et al. (2019) A rapid and simple UPLC method for serum vancomycin determination in pediatric patients undergoing continuous infusion or intermittent infusion of vancomycin. 174. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. s. 214-219. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2019.05.056
- ZHANG, Y. et al. (2020) Therapeutic Drug Monitoring Coupled With Bayesian Forecasting Could Prevent Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Renal Insufficiency Patients: A Prospective Study and Pharmacoeconomic Analysis. 42. *Therapeutic Drug Monitoring*. s. 600-609. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000750
- ZIEGLER, D. W., WOLFE, R. N. and MCGUIRE, J. M. (1956) Vancomycin, A New Antibiotic. II. In Vitro Antibacterial Studies. *Antibiotics annual 1955-1956. Medical Encyclopedia, Inc., New York*, p. 612-618.