

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**ASPECTOS ANALÍTICOS DA MONITORIZAÇÃO DE
VANCOMICINA SÉRICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO
DE COLETA POR SANGUE CAPILAR E
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COMERCIAIS EM
PACIENTES DIALÍTICOS**

LETÍCIA VALE SCRIBEL ZIMMER

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

**ASPECTOS ANALÍTICOS DA MONITORIZAÇÃO DE
VANCOMICINA SÉRICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO
DE COLETA POR SANGUE CAPILAR E
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COMERCIAIS EM
PACIENTES DIALÍTICOS**

LETÍCIA VALE SCRIBEL ZIMMER

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre P. Zavascki

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Linden

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Scribel, Leticia Vale
ASPECTOS ANALÍTICOS DA MONITORIZAÇÃO DE VANCOMICINA
SÉRICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE COLETA POR SANGUE
CAPILAR E COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COMERCIAIS EM
PACIENTES DIALÍTICOS / Leticia Vale Scribel. -- 2022.
131 f.
Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Coorientador: Rafael Linden.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Vancomycin / Vancomicina. 2. Dried Blood Spot
Testing / Teste em Amostras de Sangue Seco. 3.
Chromatography, Liquid / Cromatografia Líquida. 4.
Tandem Mass Spectrometry / Espectrometria de Massas em
Tandem. 5. Immunoassay / Imunoensaio. I. Zavascki,
Alexandre Prehn, orient. II. Linden, Rafael,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA VALE SCRIBEL ZIMMER

ASPECTOS ANALÍTICOS DA MONITORIZAÇÃO DE VANCOMICINA SÉRICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE COLETA POR SANGUE CAPILAR E COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS COMERCIAIS EM PACIENTES DIALÍTICOS

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção de título de Doutora em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre P. Zavascki
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Linden

Porto Alegre

2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Helena Rigatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dra. Natália Brucker

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Doutor Eduardo Celia Palma

Universidade do Vale dos Sinos - UNISINOS

Agradecimentos

Quero dedicar meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Alexandre Zavascki, por me acolher pela segunda vez para mais um desafio. Obrigada pela confiança, persistência, dedicação e ensinamentos. Foi um privilégio ser orientada por alguém pelo qual tenho profunda admiração. Foram anos de muito aprendizado, trabalho e amadurecimento.

Agradeço também ao Professor Dr. Rafael Linden, que abriu as portas do Laboratório de Toxicologia da Universidade Feevale e permitiu que eu tivesse uma experiência profissional inédita. Obrigada pelas oportunidades e por compartilhar tanto conhecimento.

Aos colegas, alunos, estagiários e amigos que, junto comigo, fizeram esse trabalho acontecer: Nadine Andrigueti, Roberta Hahn, Douglas Matos, Francine Silveira, Talitha Peralta, Natalia Gonçalves Landgraf, Priscila Lamb Wink, Anne Caroline Cezimbra da Silva, Letícia Loss Lisboa, Marina Venzon Antunes, Cristina Boff Castro Araújo, Patrícia da Silva Fernandes, Aline Galiotto, Isadora de Souza Rodrigues e Frederico Arsivenco.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pelos ensinamentos de excelência. Em especial ao Professor Dr. Afonso Barth e à Professora Dra. Maria Helena Rigatto, que estiveram presentes em diferentes momentos desde o início desta caminhada.

E o agradecimento mais especial eu dedico à minha família: ao meu marido Michael Zimmer, pelo incentivo, pelo apoio incondicional, por todo amor e companheirismo. Aos meus filhos, Pedro e Gabriel, que nasceram durante essa jornada, pela compreensão e pelo amor e carinho infinitos. Aos meus pais, Jorge e Maria do Céu Scribel, e aos meus sogros, Geraldo e Regina Zimmer, pelo apoio principalmente com as crianças. Sem vocês nada seria possível.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender
Nem tão pequeno que não possa ensinar”*

Esopo

RESUMO

Base teórica: A vancomicina é um antimicrobiano amplamente utilizado como tratamento de primeira linha para infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Na ausência de novas alternativas de antimicrobianos, o Monitoramento Terapêutico (MT) é essencial para otimizar a dosagem daqueles pré-existentes. Assim, é possível aumentar a eficiência do tratamento minimizando efeitos adversos e prevenindo o surgimento de resistência microbiana. Considerando a importância da dosagem da concentração sanguínea no MT da vancomicina, dois trabalhos foram realizados. **Trabalho 1. Objetivo:** Desenvolvimento e validação analítica e clínica de um método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS) para determinação simultânea de vancomicina e creatinina em amostras de sangue seco em papel, ou *Dried Blood Spots* (DBS). **Métodos:** O método de LC-MS/MS para dosagem de vancomicina e creatinina em DBS foi validado de acordo com os parâmetros linearidade, precisão, acurácia e eficiência da extração. As concentrações de vancomicina e de creatinina foram então determinadas a partir de 54 e 35 amostras pareadas de DBS e de plasma, respectivamente, obtidas de 29 pacientes. **Resultados:** O método apresentou linearidade satisfatória com coeficientes de correlação acima de 0.99 para vancomicina e creatinina. Os resultados de precisão, acurácia e sensibilidade atenderam aos critérios de aceitação. As concentrações de vancomicina e creatinina em DBS e plasma foram significativamente correlacionadas: $r = 0.892$, $p < 0.01$, $n = 54$ e $r = 0.945$, $p < 0.01$, $n = 35$, respectivamente. Entretanto, as razões entre as concentrações de plasma e DBS para vancomicina foram altamente variáveis, em um intervalo de 1.148 a 5.022, com uma média de 2.36, enquanto que para creatinina variou entre 0.800 a 1.283, com uma média de 1.07. **Conclusão:** Um método de quantificação simultânea de vancomicina e creatinina em amostras de DBS foi desenvolvido e validado. Todos os parâmetros analíticos apresentaram critérios aceitáveis. Entretanto, os níveis plasmáticos de vancomicina não puderam ser preditos com acurácia a partir das amostras de DBS. Estudos devem ser realizados para determinar as causas da variabilidade das razões entre as concentrações de

plasma e DBS. No entanto, as concentrações de creatinina em plasma foram satisfatoriamente previstas a partir de medidas em DBS. **Trabalho 2. Objetivo:** Avaliação do desempenho de dois tipos diferentes de imunoensaio comparados à LC-MS/MS em pacientes sob terapia de substituição renal. Estudos anteriores relatam a interferência de um produto de degradação da vancomicina chamado CDP-1 (do inglês *Crystalline Degradation Product*) em imunoensaios, que são os métodos mais utilizados para dosagem da vancocinemia, quando comparados com LC-MS/MS, método de referência. O CDP-1 tende a acumular em pacientes com insuficiência renal e valores falsamente elevados ou diminuídos de vancocinemia pode resultar em toxicidade, falha terapêutica e resistência bacteriana. **Métodos:** os resultados de 65 amostras de 43 pacientes analisadas por imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) e 54 amostras de 24 pacientes analisadas por imunoensaio de interação cinética das micropartículas em solução (KIMS), foram comparados com os resultados obtidos por LC-MS/MS para as mesmas amostras. **Resultados:** As medidas de vancomicina por CMIS e KIMS foram altamente correlacionadas com LC-MS/MS e não foi observado desvio da linearidade. Os níveis séricos de vancomicina em pacientes dialíticos por LC-MS/MS foram, em média, 2.64% mais altos do que aqueles obtidos por CMIA e 8.81% mais altos do que aqueles obtidos por KIMS. **Conclusão:** A comparação entre os métodos CMIA e KIMS com LC-MS/MS para dosagem de vancocinemia em amostras de pacientes sob terapia de substituição renal apresentou correlação e concordância satisfatórias, o que permite concluir que não houve interferência do CDP-1 nos imunoensaios.

Palavras-chave: Vancomicina, Monitoramento Terapêutico, DBS, Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência, CMIA, KIMS, CDP-1

ABSTRACT

Background: Therapeutic drug monitoring (TDM) is essential in preventing the emergence of microbial resistance and optimizing the dosage of existing antibiotics. Vancomycin is an antimicrobial that has a broad application as a first-line treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Considering the importance of drug concentration measurement on vancomycin TDM, two kinds of research were carried out. **Research 1. Objective:** Analytical and clinical validation of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of vancomycin and creatinine in Dried Blood Spots (DBS). **Methods:** The LC-MS/MS method was validated according to linearity, precision, accuracy, and extraction efficiency parameters. Vancomycin and creatinine concentrations were then determined from 54 and 35 paired DBS and plasma samples, respectively, from 29 patients. **Results:** The method showed satisfactory linearity with correlation coefficients above 0.99 for vancomycin and creatinine. The precision, accuracy, and sensitivity results met the acceptance criteria. Vancomycin and creatinine concentrations in DBS and plasma were significantly correlated: $r = 0.892$, $p < 0.01$, $n = 54$ and $r = 0.945$, $p < 0.01$, $n = 35$, respectively. However, the ratios between plasma and DBS concentrations for vancomycin were highly variable, ranging from 1.148 to 5.022 (mean = 2.36), whereas the range for creatinine was 0.800 to 1.283 (mean = 1.07).

Conclusion: A vancomycin and creatinine quantification method was developed and validated in DBS samples. All analytical parameters presented acceptable criteria. However, plasma vancomycin levels could not be accurately predicted from DBS samples. Further studies should be performed to determine the causes of variability in the ratios between plasma and DBS concentrations. However, plasma creatinine concentrations were satisfactorily predicted from measurements in DBS. **Research 2. Objective:** Evaluate the performance of vancomycin measurement in two different immunoassays compared to LC-MS/MS in patients undergoing renal replacement therapy. Previous studies reported immunoassay interference of CDP-1, a vancomycin crystalline degradation product. CDP-1 tends to accumulate in patients

with renal failure resulting in falsely elevated vancomycin values that may result in toxicity, therapeutic failure, and bacterial resistance. **Method:** To assess the performance of two different immunoassays in vancomycin dosage in patients undergoing renal replacement therapy, 65 samples from 43 patients analyzed by chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA), and 54 samples from 24 patients analyzed by kinetic interaction immunoassay of microparticles in solution (KIMS) were compared with the results obtained by LC-MS/MS for the same samples. **Results:** Vancomycin measurements by CMIS and KIMS were highly correlated with LC-MS/MS and no deviation from linearity was observed. The mean difference between vancomycin concentrations measured in CMIA to LC-MS/MS was -1.19 mg/mL and between vancomycin concentrations measured in KIMS to LC-MS/MS was -2.28 mg/mL. On average, vancomycin serum levels in LC-MS/MS dialysis patients were 2.64% higher than those obtained by CMIA and 8.81% higher than those obtained by KIMS. **Conclusion:** Vancomycin serum concentrations from patients undergoing renal replacement therapy measured by CMIA and KIMS compared with LC-MS/MS showed satisfactory correlation and agreement, which allows us to conclude that there was no interference of CDP-1 in the immunoassays.

Key Words: vancomycin, Therapeutic Drug Monitoring, DBS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, CMIA, KIMS, CDP-1

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 - Relação de antimicrobianos descritos em métodos de DBS	28
Quadro 2 - Recomendações para o procedimento de coleta de sangue capilar em manchas de papel	30
Figura 1 - Fórmula estrutural da vancomicina	19
Figura 2 - Estrutura química da vancomicina e dos dois isômeros de seu produto de degradação, CDP-1-M e CDP-1-m	22
Figura 3 - Representação gráfica dos índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos da curva de concentração plasmática pelo tempo em um intervalo de dose	23
Figura 4 - Componentes básicos de um imunoenensaio	32
Figura 5 - Representação esquemática de um sistema de HPLC	33
Figura 6 - Representação esquemática de um sistema de HPLC-MS/MS	34
Figura 7 - Marco Conceitual	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia de busca de artigos para revisão da literatura	17
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da coleta de DBS comparado à coleta de sangue venoso	29
Tabela 3 - Resumo dos parâmetros de validação analítica para análise de DBS por métodos cromatográficos	36
Tabela 4 - Relação de estudos que comparam diferentes métodos de imunoenensaio com métodos de cromatografia.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBS: *Dried Blood Spots* ou mancha de sangue seco em papel

MT: Monitoramento Terapêutico

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

VRE: *Enterococcus faecalis* resistente à meticilina

VISA: *Staphylococcus aureus* com susceptibilidade reduzida a vancomicina

VRSA: *Staphylococcus aureus* verdadeiramente resistentes a vancomicina

PK: Farmacocinético

PD: Farmacodinâmico

ASC₂₄: área sob a curva de concentração x tempo no intervalo de 24 horas

CIM_{micro}: Concentração Inibitória Mínima obtida pelo método de microdiluição

Cl_{van}: Clearance da vancomicina

Cl_{cr}: clearance da creatinina

CDP-1: *Crystalline Degradation Product* ou Produto de Degradação Cristalino

CRE-D3: creatinina deuterada

HD: Hemodiálise

HDI: Hemodiálise Intermitente

TSRC: Terapia de Substituição Renal Contínua

Hct: Hematócrito

Ag: Antígeno

Ac: Anticorpo

FPIA: *Fluorescence polarization immunoassay* ou imunoensaio por fluorescência polarizada

EIA: *Enzymatic Immune Assay* ou imunoensaio enzimático

EMIT: *enzyme-multiplied immunoassay technique* ou imunoensaio enzimático de multiplicação

PETINIA: *Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay* ou Imunoensaio de inibição turbidimétrica melhorada por partículas

LC: *Liquid Chromatography* ou Cromatografia Líquida

MS: espectômetro de massas ou *Mass Spectrometry*

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry* ou Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência

HPLC-MS/MS: *High Performance Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry* ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência

UPLC-MS/MS: *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry* ou Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência

CMIA: *Chemiluminescent Microparticle Assay* ou Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência

KIMS: *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution* ou Interação cinética das micropartículas em solução

m/z: razão massa/carga

IATDMCT: *International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology* ou Associação Internacional para o Monitoramento Terapêutico e Toxicologia Clínica

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

FDA: *Food And Drug Administration*

EBF: *European Bioanalysis Forum*

EMA: *European Medicines Agency* ou Agência Européia de Medicamentos

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute* ou Instituto De Padronização Clínica e Laboratorial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	21
2.2. VANCOMICINA	23
2.2.1. Mecanismo de ação	23
2.2.2. Resistência	24
2.2.3. Efeitos Adversos	25
2.2.4. Farmacocinética	26
2.2.4.1. <i>Estimando a ASC₂₄</i>	29
2.2.5. Tratamento Inicial	30
2.3. MONITORAMENTO TERAPÊUTICO	31
2.3.1. Coleta de amostras para o Monitoramento Terapêutico da Vancomicina	34
2.3.1.1. <i>Dried Blood Spots - DBS (ou mancha de sangue seco em papel</i>	34
2.3.2. Métodos Analíticos	37
2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DBS	41
2.5. DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE DOSAGEM DA VANCOMICINA	44
3. MARCO CONCEITUAL	48
4. JUSTIFICATIVA	49
5. OBJETIVOS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
6. ARTIGO 1	61
7. ARTIGO 2	104

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	126
APÊNDICES	127

1. INTRODUÇÃO

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo amplamente utilizado no tratamento de infecções sérias por bactérias gram positivas (1–3). Foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1958 e devido ao risco aumentado de toxicidade, o uso da vancomicina tem sido reservado para pacientes com alergias graves a β -lactâmicos ou pacientes com infecções causadas por microrganismos resistentes a novos agentes (4). No início dos anos 1980, aconteceu um aumento dramático no uso de vancomicina, seguido de um aumento 100 vezes maior nas duas décadas seguintes. O primeiro evento que desencadeou o ressurgimento da vancomicina foi o tratamento de enterocolite pseudomembranosa e o segundo foi a ampla disseminação de patógenos resistentes, principalmente *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (2,4).

Com o uso acelerado da vancomicina desde os anos 1980, o surgimento de resistência foi inevitável, inicialmente com cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE) e mais recentemente com relatos de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade reduzida a vancomicina (VISA), de MRSA hétero resistentes à vancomicina (hVISA) e de *S. aureus* verdadeiramente resistentes a vancomicina, pela aquisição do gene *vanA* de enterococos (4,5). Assim, o monitoramento terapêutico (MT) através do nível sérico da vancomicina (vancocinemia) se tornou uma ferramenta útil na busca da efetividade terapêutica, evitando a toxicidade e o aumento da resistência (2,4). O MT da vancomicina é recomendável na prática clínica devido à sua janela terapêutica estreita, variações consideráveis na farmacocinética interindividual e potencial nefrotoxicidade (6–8).

Apesar de já ter ultrapassado 61 anos de início do uso clínico da vancomicina, ainda existem lacunas a respeito da melhor estratégia para otimizar a terapia e minimizar a toxicidade (9). O MT baseia-se em estudos farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) que exploram a relação triangular entre a concentração do antimicrobiano, a sensibilidade do microrganismo ao antibiótico (medida pela

Concentração Inibitória Mínima – CIM) e desfechos clínicos pré-definidos (10). A razão entre a área sob a curva de concentração em 24 horas (ASC_{24}) e a concentração inibitória mínima do antibiótico (ASC_{24}/CIM) tem sido documentada como alvo PK/PD primário para os glicopeptídeos, incluindo a vancomicina. Estudos clínicos recentes têm demonstrado uma redução significativa na exposição à vancomicina e nas taxas de nefrotoxicidade, sem comprometer os desfechos, quando a razão ASC/CIM é empregada ao invés do monitoramento tradicional pelo nível vale de concentração (9). O uso da razão ASC/CIM como preditor da atividade da vancomicina contra MRSA tem resultado, inclusive, na redução da mortalidade e da falência ao tratamento (11).

Uma vez que a dosagem da concentração sanguínea é indispensável ao MT, a disponibilidade de tecnologias laboratoriais validadas no contexto clínico se faz necessária (12). Atualmente, os métodos quantitativos para dosagem da vancocinemia mais utilizados são: imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), imunoensaio de interação cinética das micropartículas em solução (KIMS), imunoensaio enzimático (EIA) quimioluminescência, imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT), imunoensaio por fluorescência polarizada (FPIA). Entretanto, estes testes foram avaliados por Chen e col., que encontraram diferenças significativas na precisão entre KIMS e outros métodos, e na acurácia entre EMIT, FPIA e outras técnicas. Assim, os laboratórios estão mais propensos a subestimar as concentrações de vancomicina (13). Outros métodos analíticos utilizados para vancocinemia são baseados em espectrometria e cromatografia (3). O método de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em sequência (LC-MS/MS) é considerado referência na dosagem de medicamentos devido à alta especificidade e sensibilidade (14).

Há aproximadamente 20 anos, a LC-MS/MS começou a ser utilizada na dosagem de analitos a partir de sangue capilar coletado através de gota de sangue seco em papel, ou DBS - *Dried Blood Spots*. A introdução da LC-MS/MS permitiu o desenvolvimento de metodologias de dosagem usando microquantidades de sangue com excelente sensibilidade e precisão (15).

O uso de DBS para a dosagem de medicamentos pode facilitar estudos clínicos e o MT. É uma alternativa conveniente e barata para coleta e armazenamento de amostras de sangue (3). As vantagens potenciais do uso de sangue capilar são a facilidade de coleta, que eventualmente poderá ser realizada pelo próprio paciente e que poderá ser feita fora do ambiente hospitalar, ou facilitada na ausência de acesso venoso em pacientes internados. Por ser um processo menos invasivo e menos dolorido, é mais aceitável principalmente por crianças e também torna a coleta da amostra mais rápida e com menor risco de intercorrências (15,16). Outras vantagens do uso de DBS são a facilidade no transporte, o armazenamento e a maior estabilidade, permitindo a obtenção de amostras em situações onde a coleta de sangue ou plasma não está disponível (10).

O método de DBS tem sido desenvolvido para o MT de diversos medicamentos (17), entretanto o presente trabalho apresenta o primeiro estudo avaliando a vancocinemia por LC-MS/MS a partir de amostras em DBS (3).

As doenças infecciosas são a segunda causa de morte em pacientes que fazem hemodiálise (HD) de longa duração, precedidas apenas por doenças cardiovasculares. A lesão da pele pelo acesso vascular da HD é a rota principal de infecção, frequentemente levando à bacteremia. A maioria dos casos de bacteremia são causados por espécies de *Staphylococcus* (59.6%) (18), entre os quais *Staphylococcus aureus* representa mais de 47% dos casos (11). A vancomicina usualmente faz parte do tratamento empírico de bacteremias em pacientes em HD (11).

Uma vez que a incidência de patógenos multirresistentes continua a subir, atualmente é mais importante do que nunca que os antibióticos passíveis de MT atinjam seus alvos de forma consistente. Isto é particularmente desafiador em pacientes sépticos que requerem terapia de substituição renal. (19). A vancomicina possui tempo de meia-vida aumentado em pacientes com insuficiência renal. A exposição prolongada da vancomicina à temperatura corporal permite a formação de um produto de degradação cristalino, chamado CDP-1. O CDP-1 possui estrutura química similar à vancomicina, porém é biologicamente inativo (20,21). O acúmulo de CDP-1 pode interferir na detecção da vancomicina nos imunoenaios pela reação

cruzada com os anticorpos anti-vancomicina, resultando em concentrações séricas superestimadas (20–23).

Estudos têm sido publicados comparando diferentes tipos de imunoensaios com LC-MS/MS na dosagem de vancocinemia. O método mais estudado em relação à interferência do CDP-1 é o FPIA (22–29). Poucos estudos avaliaram o desempenho de outros imunoensaios como EIA, EMIT, imunoensaio de inibição turbidimétrica melhorada por partículas (PETINIA) (28,30), CMIA (20,31) e KIMS (28,30) comparados com LC-MS/MS. Estudos anteriores que avaliaram o método KIMS não incluíram pacientes dialíticos (28,32). Fan e col. em 2019 avaliaram o método CMIA, entretanto não especificaram o número de pacientes dialíticos dos quais as amostras de sangue foram obtidas, tampouco incluiu o número mínimo de amostras (n=40) recomendado para estudos de comparação entre métodos (33,34). Andriguetti e col., também em 2019, compararam o método CMIA com LC-MS/MS em amostras de pacientes randomizados de acordo com o nível sérico de creatinina, sem informar se haviam pacientes em diálise (31).

Considerando que dosar a vancocinemia em pacientes sob terapia de substituição renal é fundamental para o ajuste de dose, avaliou-se neste estudo o desempenho dos imunoensaios CMIA e KIMS para dosagem de vancocinemia em amostras de sangue de pacientes dialíticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Baseado na questão de pesquisa, esta revisão da literatura envolveu o tema monitoramento terapêutico da vancomicina e a dosagem da vancocinemia em dois momentos: na fase pré-analítica, através do método de coleta de amostras de sangue seco em papel, ou Dried Blood Spots (DBS), e na fase analítica, através da avaliação dos métodos analíticos atuais.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (PubMed), Biblioteca Cochrane© e Portal de Periódicos CAPES em fevereiro de 2022. Foram consultadas também as bases de dados Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Scientific Electronic Library Online (SciELO), que não apresentaram artigos relevantes e diferentes das bases citadas anteriormente. Para seleção dos artigos, foram utilizados os seguintes descritores: “Vancomycin AND Therapeutic Drug Monitoring”, “Therapeutic Drug Monitoring AND Dried Blood Spots AND Antibiotic”, “Vancomycin AND Dried Blood Spots”, “DBS AND Hematocrit”, “Vancomycin Concentration AND Dialysis”, “Vancomycin AND Immunoassay”, “Vancomycin AND Assay AND Interference”, “Overestimation AND Vancomycin Concentrations”, “Vancomycin AND Immunoassay AND Dialysis”, “Vancomycin AND Assay AND Degradation Product” e “Vancomycin AND High-Performance Liquid Chromatography”. Foram selecionados apenas os artigos relacionados diretamente à pergunta de pesquisa. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 1.

Também foram utilizados artigos consultados nas referências bibliográficas daqueles obtidos pela estratégia de busca descrita anteriormente.

Tabela 1. Estratégia de busca de artigos para revisão da literatura. O número total de artigos representa todos os artigos apresentados pela base de dados de acordo com as combinações de palavras-chave. O número de artigos selecionados representa a quantidade de artigos que foram consultados e o número de artigos utilizados representa aqueles artigos que fazem parte das referências bibliográficas desta tese.

Palavras-chave	Bases de Dados	Nº total de artigos	Nº de artigos consultados	Nº de artigos utilizados
Vancomycin AND Therapeutic Drug Monitoring	PubMed	1721	9	5
	Cochrane©	90	7	2
	CAPES	11040	22	8
Therapeutic Drug Monitoring AND Dried Blood Spots AND antibiotic	PubMed	48	15	12
	Cochrane©	4	0	0
	CAPES	864	13	3
Vancomycin AND dried blood spots	PubMed	1	1	1
	Cochrane©	0	0	0
	CAPES	565	0	0
DBS AND Hematocrit	PubMed	112	8	4
	Cochrane©	16	0	0
	CAPES	749	3	1
Vancomycin Concentration AND Dialysis	PubMed	305	37	11
	Cochrane©	35	1	0
	CAPES	4121	17	2
Vancomycin AND Immunoassay	PubMed	153	5	3
	Cochrane©	15	0	0
	CAPES	2959	12	6
Vancomycin AND Assay AND Interference	PubMed	106	11	3
	Cochrane©	3	0	0
	CAPES	0	0	0
Overestimation AND Vancomycin Concentrations	PubMed	33	11	8
	Cochrane©	8	0	0
	CAPES	1	0	0
Vancomycin AND Immunoassay AND Dialysis	PubMed	32	11	4
	Cochrane©	3	0	0
	CAPES	0	0	0
Vancomycin AND Assay AND Degradation Product	PubMed	673	13	4
	Cochrane©	0	0	0
	CAPES	0	0	0
Vancomycin AND High-Performance Liquid Chromatography	PubMed	504	19	0
	Cochrane©	12	0	0
	CAPES	5	0	0

2.2. VANCOMICINA

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos, descoberta em 1953 pelo isolamento de *Amycolatopsis orientalis* do solo, mas pode ser produzida por 45 diferentes microrganismos (35). Foi aprovada pelo FDA em 1958 para o combate à infecções causadas por bactérias gram positivas (4). Sua fórmula molecular é $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, representada na Figura 1. Apresenta-se como pó branco e higroscópico, facilmente solúvel em água, fracamente solúvel em etanol e insolúvel em éster e acetona. Atualmente, é indicada como principal alternativa para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram positivas incluindo MRSA, *Clostridium difficile* and *Enterococcus spp.* (35).

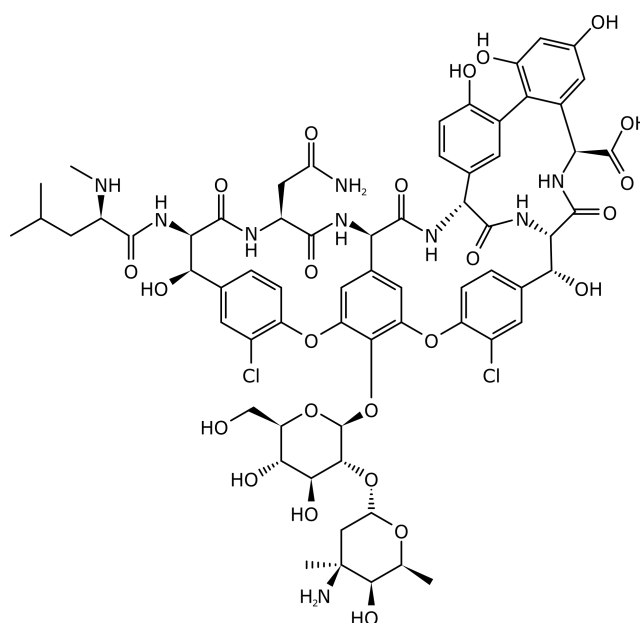


Figura 1. Fórmula estrutural da vancomicina (35).

2.2.1. Mecanismo de ação

Como todos os antibióticos glicopeptídeos, a vancomicina inibe a síntese da parede celular bacteriana através da ligação com dipeptídeos terminais D-Ala-D-Ala nos precursores de peptideoglicano. Sem a formação da parede celular, a bactéria se

torna frágil e não suporta a pressão osmótica, sofrendo lise. Considerando seu mecanismo de ação, é classificado como um antibiótico bactericida (35).

2.2.2. Resistência

As penicilinas semissintéticas análogas à meticilina foram aprovadas no mesmo período que a vancomicina, entretanto, os β -lactâmicos se tornaram os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções por gram positivos e a vancomicina foi considerada última escolha devido à sua administração menos conveniente e efeitos adversos. Entretanto, o uso constante dos β -lactâmicos levou a um aumento dramático na resistência bacteriana e um exemplo dessas cepas resistentes, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), tornou-se endêmico na maioria dos hospitais no início dos anos 1990. Em seguida, infecções por MRSA adquiridas na comunidade emergiram em pacientes sem fatores de risco estabelecidos. Este quadro levou à reemergência da vancomicina como terapia de escolha no tratamento de MRSA. No entanto, a pressão seletiva exercida por anos de uso generalizado de glicopeptídeos está evidente, com o surgimento de cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina (6). O MRSA foi reconhecido como séria ameaça em relatório sobre resistência a antibióticos divulgado em 2013 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), com mais de 80.000 infecções graves e 11.000 mortes por ano somente nos EUA (6).

As mutações mais conhecidas relacionadas a resistência a glicopeptídeos, especialmente em enterococci, acarretam na biossíntese alterada dos precursores de peptideoglicano que formam a parede celular das bactérias gram positivas, alterando o grupamento terminal D-Ala-D-Ala para os fenótipos D-Ala-D-Lac (codificadas pelos genes *vanA*, *vanB* e *vanD*) ou D-Ala-D-Ser (*vanC*, *vanE* e *vanG*). A substituição do D-Ala para o D-Lac causa uma redução de 1000 vezes na afinidade da ligação da vancomicina com a parede celular bacteriana, pela remoção de pontes de Hidrogênio, enquanto que a alteração para D-Ser provoca uma alteração na conformação menos significativa (6).

A resistência de *Enterococci* a vancomicina, mediada pelo gene vanA e vanB, é conhecida há uma década. Um grupo de 3 espécies de *Enterococcus* que possuem o gene vanC são intrinsecamente resistentes à vancomicina. O desenvolvimento de resistência em estafilococos está relacionada a níveis baixos de concentração sérica da vancomicina (< 10 mg/L) (33,35) . O surgimento de cepas de *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade reduzida a vancomicina (VISA) e de MRSA hétero resistentes à vancomicina (hVISA) indicam o aumento dos níveis de resistência, apesar da incidência de cepas de *S. aureus* verdadeiramente resistentes a vancomicina (VRSA), a partir da aquisição do gene vanA dos enterococos, ainda ser rara (6). Em 2013, o VRSA foi considerado como “ameaça relativa” em relatório sobre resistência aos antibióticos publicado pelo CDC. Apesar de ter sido excluído em 2019, casos de infecção por *Staphylococcus* ainda estão sendo monitoradas no ambiente hospitalar e na comunidade (36).

2.2.3. Efeitos Adversos

O entendimento do perfil toxidinâmico da vancomicina é fundamental para otimizar sua dosagem (37). Os pacientes que fazem uso de vancomicina podem apresentar reações de toxicidade relacionadas à infusão, como flebite, calafrios e rash cutâneo. Levine e col. relataram que esses eventos aconteciam com maior frequência com o uso de preparações mais antigas e estavam relacionados a impurezas no produto (4). A síndrome do pescoço vermelho tem sido associada à infusão rápida de vancomicina, e é caracterizada pela combinação de eritema, prurido, hipotensão e angioedema (38). A reação de ototoxicidade é infrequente, mas o risco é aumentado quando a vancomicina é associada a outras medicações ototóxicas (39). Outras reações menos frequentes incluem neutropenia e trombocitopenia (4).

A maior preocupação relacionada à toxicidade da vancomicina é a lesão renal aguda (37). A prevalência da lesão renal aguda associada à vancomicina difere entre os estudos, com relatos que variam de 5% a 43% (40) . A nefrotoxicidade é reversível, porém muitos pacientes, especialmente os mais críticos, podem não recuperar totalmente a função renal, e mesmo lesões moderadas podem diminuir

significativamente as taxas de sobrevivência, aumentar a morbidade e os custos hospitalares (37).

2.2.4. Farmacocinética

A vancomicina é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo administrada principalmente por via endovenosa. Entretanto, pode ser administrada por via oral como terapia local em doenças intestinais (41). Uma fração de 10 a 50% da vancomicina é ligada a proteínas plasmáticas (18,35) e aproximadamente 80 a 90% é eliminada por filtração glomerular na sua forma inalterada (41). Por isso, o Clearance da vancomicina (Cl_{van}) é altamente correlacionado com o clearance da creatinina (Cl_{cr}) (42). Em torno de 75% da dose administrada é eliminada na urina em 24 horas (13,41).

Os rins são a principal via de eliminação da vancomicina. Seu tempo de meia-vida pode variar entre 6 a 12 horas em pacientes com função renal preservada, mas pode ser aumentado para 200 horas em pacientes com insuficiência renal (11,41). Quando o tempo de meia vida é prolongado, a vancomicina é convertida em um produto de degradação biologicamente inativo chamado CDP-1, ou *crystalline degradation product*. O CDP-1 possui dois isômeros, cujas estruturas químicas diferem da vancomicina apenas pela conversão do resíduo de asparagina em isoaspartato (Figura 2), e por isso pode resultar na superestimativa de sua concentração sanguínea dependendo do ensaio analítico utilizado (20,25).

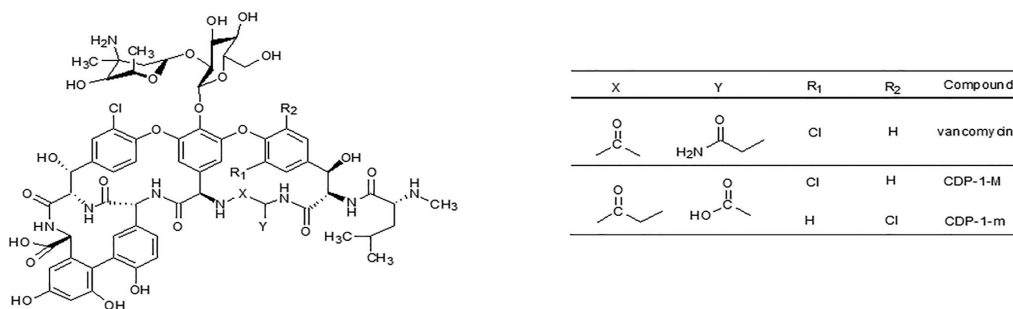


Figura 2. Estrutura química da vancomicina e dos dois isômeros de seu produto de degradação, CDP-1-M e CDP-1-m (20).

A farmacocinética dos antimicrobianos em pacientes críticos com falência renal aguda é substancialmente diferente daqueles pacientes não-críticos. Alterações na ligação às proteínas e a quantidade de água corporal total afetam os parâmetros farmacocinéticos como o volume de distribuição e o clearance renal (43). Devido ao seu peso molecular de 1485 Da e por ser parcialmente ligada a proteínas, a vancomicina é pobremente removida por hemodiálise intermitente (HDI) utilizando dializadores de baixo fluxo. Com o uso de dializadores de alto fluxo, 30 a 40% da dose administrada deve ser removida por sessão em pacientes em HDI crônica, com aumento deste percentual em terapias mais prolongadas como a terapia de substituição renal contínua (TSRC) (18,44). A variação na dose da TSRC inter- e intra-paciente pode, ainda, levar a uma variação substancial no clearance do antimicrobiano (43).

Modelos farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) são utilizados para descrever a relação entre dose, concentração, efeitos desejados e efeitos adversos dos antimicrobianos, ou seja, relaciona a exposição (concentração plasmática) com seu efeito farmacológico (capacidade de matar ou inibir o crescimento de um patógeno) (45,46). Através dos modelos PK/PD são definidos os regimes de dosagem que resultam em um perfil representado pela curva de concentração versus tempo de tratamento (Figura 3) (45). Estudos têm demonstrado que as propriedades PK/PD diferem entre as classes de antimicrobianos, e podem ser caracterizadas da seguinte forma:

- Tempo dependentes: quando o melhor parâmetro PK/PD associado à sua ação antimicrobiana é a razão entre tempo no qual a concentração plasmática se mantém acima da concentração inibitória mínima (CIM) durante um intervalo de dose ($T > CIM$). Exemplos: beta-lactâmicos, carbapenêmicos, linezolida;
- Concentração dependentes: o parâmetro PK/PD que melhor descreve sua ação é a razão entre a concentração máxima alcançada em um intervalo entre as doses (C_{max}) e a CIM (C_{max}/CIM). Exemplos: aminoglicosídeos, quinolonas, metronidazol;
- Concentração e tempo dependentes: quando o parâmetro PK/PD que melhor representa sua ação antimicrobiana é a razão entre a área da curva de

concentração plasmática durante 24 horas (ASC_{24}) e a CIM (ASC_{24}/CIM).
Exemplos: glicopeptídeos, azitromicina (46).

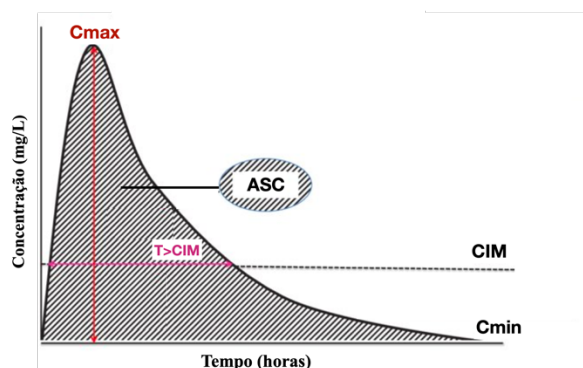


Figura 3. Representação gráfica dos índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos da curva de concentração plasmática pelo tempo em um intervalo de dose. C_{max} : concentração máxima atingida (pico), C_{min} : concentração mínima (vale), ASC: área sob a curva de concentração x tempo, CIM: concentração inibitória mínima, $T > CIM$: tempo de duração que a concentração se mantém acima da CIM. Adaptado de Abdul-Aziz e col. (46)

O efeito antimicrobiano da vancomicina é concentração- e tempo-dependente, uma vez que a razão entre a ASC_{24} e a CIM obtida pelo método de microdiluição, ASC_{24}/CIM_{micro} , tem sido relatada como o melhor indicador para desfechos clínicos favoráveis (13,18,47–52). A ASC_{24} é a medida da exposição total do paciente ao medicamento em um dado período de tempo, no caso 24 horas e é definida matematicamente pelo cálculo da área abaixo da curva de concentração. A CIM_{micro} tem como definição a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da bactéria isolada de amostra clínica do paciente, medida *in vitro* preferencialmente pelo método de microdiluição em caldo (7). O nível vale da curva de concentração tem sido utilizado como marcador substituto da ASC_{24} , entretanto, Neely e col. relataram que entre pacientes com $ASC_{24} \geq 400 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ e um microrganismo com $CIM_{micro} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$, aproximadamente 60% teria concentração no vale inferior a $15 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os autores concluíram que a dosagem guiada pelo nível vale $\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ levaria a uma exposição excessiva à vancomicina (53).

A determinação da exposição à vancomicina pela ASC_{24} permite individualizar a terapia e melhorar o manejo do risco de toxicidade com maior segurança. A última revisão das diretrizes para o MT da vancomicina, publicadas em

consenso pela Sociedade Americana de Farmacêuticos do Sistema de Saúde, juntamente com a Sociedade de Doenças Infecciosas da America, com a Sociedade de Doenças Infecciosas Pediátricas da America e com a Sociedade dos Farmacêuticos de Doenças Infecciosas, recomenda que o regime de dosagem da vancomicina seja guiado pela ASC_{24} através do uso de métodos Bayesianos (8). Tsutsuura e col (2020) conduziram uma revisão sistemática e metanálise e demonstraram que a incidência de nefrotoxicidade tende a ser menor no MT guiado pela ASC_{24} quando comparado ao MT guiado pelo nível vale. Além disso, os autores relataram que uma razão ASC_{24}/CIM com ponto de corte $400 \pm 15\%$ foi associada a uma redução significativa na taxa de falência ao tratamento, e uma ASC_{24} mais elevada (ponto de corte $600 \pm 15\%$) aumentou significativamente o risco de nefrotoxicidade (2).

2.2.4.1. Estimando a ASC_{24}

A estimativa de parâmetros farmacocinéticos permite uma abordagem poderosa na individualização de regimes de dosagem (54). Diferentes abordagens estão disponíveis para estimar a ASC_{24} a partir de medidas de concentração sanguínea: (1) métodos baseados no vale da concentração; (2) métodos que utilizam o clearance estimado da creatinina, (3) métodos que utilizam dois pontos de concentração a partir de modelo farmacocinético de um compartimento e (4) métodos Bayesianos, que utilizam uma ou múltiplas medidas de concentração (7). O método Bayesiano foi descrito primeiramente por Lewis Sheiner e col. e é extremamente valioso em situações onde a coleta de amostras para medir a concentração de medicamentos é restrita, o que o torna uma ferramenta valiosa na implementação efetiva do MT (54).

Nos métodos Bayesianos, a ASC_{24} calculada é comparada com a ASC_{24} alvo e a dose revisada de vancomicina pode ser estimada proporcionalmente. Existem vários softwares disponíveis para estimar a ASC_{24} que utilizam métodos Bayesianos. Nestes softwares são empregados modelos estatísticos que combinam informações obtidas *a priori*, os quais incluem parâmetros farmacocinéticos e suas distribuições na população, com as concentrações medidas em amostras de um indivíduo, a fim de

estimar valores prováveis de parâmetros como a ASC_{24} . Modelos farmacocinéticos populacionais têm sido validados para o uso em uma variedade de populações específicas de pacientes, incluindo pacientes internados em hospitais, pacientes críticos e obesos. Desde que sejam abastecidos por dados farmacocinéticos que sejam relevantes para o paciente, os softwares podem produzir estimativas confiáveis da ASC_{24} com apenas uma única amostra de sangue (7,54).

É esperado que o método Bayesiano seja menos sensível às variações aleatórias dos métodos analíticos da vancocinemia quando comparado ao método de duas concentrações, uma vez que minimiza os desvios aleatórios através da distribuição dos parâmetros populacionais (7,54). Além disso, mostrou-se superior ao MT baseado no vale da concentração. Entretanto, os métodos Bayesianos necessitam treinamento especializado e possuem o custo do software comercial (7).

Com suas vantagens e apesar de suas limitações, a otimização farmacoterapêutica baseada na estimativa Bayesiana é cada vez mais utilizada, tornando-se o método de referência atualmente. Essa característica é particularmente conveniente para a prática clínica de rotina devido ao número limitado de amostras exigidas do paciente e à flexibilidade que apresenta em relação aos tempos de coleta de sangue para quantificação de medicamentos. Portanto, a aplicação dos princípios bayesianos à prática da farmacocinética clínica levou à melhoria dos cuidados farmacoterapêuticos (55).

2.2.5. Tratamento Inicial

As principais diretrizes internacionais recomendam calcular a dose inicial de vancomicina de acordo com a função renal do paciente (56).

A dose recomendada para a maioria dos pacientes com função renal preservada é 15 a 20 mg/kg de peso corporal atual, administrada a cada 8 a 12 horas por infusão intermitente, assumindo que a CIM_{micro} seja igual a 1 $\mu\text{g/mL}$. Se a CIM_{micro} for $> 2 \mu\text{g/mL}$, essa dose pode não ser suficiente para atingir o alvo terapêutico quando este for baseado na razão ASC_{24}/CIM_{micro} . No caso de infusão

contínua, recomenda-se uma dose de ataque de 15 a 20 mg/kg seguido de infusão contínua diária de manutenção de 30 a 40 mg/kg (até 60 mg/kg) a fim de atingir a concentração alvo no estado de equilíbrio igual a 20 a 25 mg/L (8).

Para atingir a concentração alvo mais rapidamente em pacientes críticos com suspeita ou confirmação de infecção por MRSA, uma dose de ataque de 20 a 35 mg/kg pode ser considerada para administração intermitente da vancomicina. A dose de ataque deve ser baseada no peso corporal atual e não deve exceder 3000 mg (8).

Uma vez que quantidades significativas de vancomicina são removidas durante hemodiálise de alto fluxo, doses maiores devem ser administradas para sustentar as concentrações plasmáticas acima da CIM_{micro} (44). Em pacientes submetidos à TSRC, recomenda-se aplicar dose de ataque de 20 a 25 mg/kg de peso corporal atual e a dose de manutenção inicial deve ser de 7.5 a 10 mg/kg a cada 12 horas. A dose de manutenção e o intervalo entre as doses deve ser baseado no monitoramento da concentração sanguínea, que deve ser conduzida nas primeiras 24 horas para garantir que o alvo ASC_{24}/CIM_{micro} seja atingido (8).

2.3. MONITORAMENTO TERAPÊUTICO

O MT da vancomicina tem sido foco de serviços clínicos farmacêuticos devido à sua estreita janela terapêutica (41) e à ampla variabilidade farmacocinética interpaciente e intrapaciente, associada à nefrotoxicidade exposição-dependente (57). A sub-dosagem pode acarretar em resistência bacteriana e ineficácia terapêutica, enquanto que uma sobre-dose pode estar associada a toxicidade (nefrotoxicidade, ototoxicidade e toxicidade relacionada à infusão) (41).

Com o passar do tempo o alvo terapêutico tem evoluído. Por muito tempo foi padronizada a abordagem que utiliza como alvo terapêutico para a vancomicina a concentração no vale entre 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para o tratamento de infecções graves, com risco de morte, uma vez que não havia alvos bem definidos para o uso da razão ASC_{24}/CIM_{micro} (57). Entretanto, nos últimos anos, dados têm sido publicados a favor

da razão $ASC_{24}/CIM_{micro} \geq 400 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{L}$ como alvo terapêutico associado a melhora nos desfechos clínicos (8,57).

No consenso publicado por Ryback e col. em 2009, recomendava-se o uso do vale da concentração de vancomicina = 15 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como marcador substituto da razão $ASC_{24}/CIM_{micro} \geq 400 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{L}$ devido à facilidade no manejo terapêutico e visando simplificar os ajustes de dose e o monitoramento (58). Infelizmente, o uso do vale da concentração no MT da vancomicina tem resultado em um aumento acentuado de lesão renal causada pela vancomicina tanto em adultos como em crianças, conforme evidenciado pela literatura. Baseado em publicações mais recentes, está evidente que o MT utilizando a ASC_{24} reduz significativamente esse risco, que é um ganho notável no atendimento ao paciente (37). Por isso, a última revisão do consenso publicado por Ryback e col., publicada em 2020, reforçada por carta publicada pelos mesmos autores em 2021 (8,37), recomenda a razão ASC_{24}/CIM_{micro} entre 400 e 600 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{L}$ como alvo no tratamento de infecções invasivas por MRSA em pacientes adultos e pediátricos (8). O consenso recomenda, ainda, que o alvo deve ser atingido no início do curso da terapia (24 a 48 horas), devido à importância da terapia precoce e adequada (8).

Para verificar se a ASC_{24} alvo foi atingida, é mais fácil aguardar que o estado de equilíbrio da concentração sanguínea seja atingido (7), como recomendado anteriormente com o uso do nível vale de concentração (41). Isso ocorre após aproximadamente 4 tempos de meia-vida para a vancomicina, ou 24 horas para um tempo de meia-vida de 6 horas em pacientes com função renal normal (7). Entretanto, com o uso de métodos Bayesianos não é necessário atingir o estado de equilíbrio, então a amostra de sangue pode ser coletada após o término da primeira infusão (7,9). Assim, é possível alcançar precocemente do alvo sugerido (9).

O MT é recomendado para pacientes que recebem vancomicina devido à infecções graves por MRSA a fim de atingir a ASC_{24} -alvo, assumindo uma $CIM_{micro} = 1\mu\text{g}/\text{mL}$ se a CIM_{micro} não for conhecida. Independente do tipo de infecção por MRSA, o MT da vancomicina também é recomendado para todos os pacientes com risco de nefrotoxicidade, pacientes com função renal instável e para aqueles que

estão recebendo terapia prolongada (maior de 3 a 5 dias). A frequência do MT deve ser baseada no julgamento clínico, mas é prudente que seja realizada frequentemente ou diariamente no caso de pacientes hemodinamicamente instáveis (p.ex. com doença renal terminal) e uma vez por semana no caso de pacientes hemodinamicamente estáveis (8).

A vancomicina é o antibiótico mais comumente prescrito entre os pacientes com doença renal aguda submetidos à hemodiálise devido à alta prevalência de infecções por MRSA. Todavia, a estratégia ideal de dosagem da vancomicina para esses pacientes não está clara devido às amplas variações farmacocinéticas e da influência da diálise em si. A vancomicina é substancialmente removida pelos dializadores de alto fluxo. Se for administrada durante o procedimento de diálise, resultará na imediata remoção da fração infundida antes que seja distribuída nos tecidos. Por isso, é recomendada a infusão da vancomicina após o término da terapia de substituição renal (59).

No caso de pacientes que fazem hemodiálise intermitente, o MT deve ser baseado em concentrações sanguíneas pré-diálise e esses dados devem ser extrapolados para estimar a ASC_{24} . É necessário manter as concentrações pré-diálise entre 15 e 20 mg/L para atingir o alvo de $ASC_{24}/CIM_{micro} = 400 - 600$ mg.h/L. A frequência do MT desses pacientes deve ser de, pelo menos, uma vez por semana e deve guiar a dose subsequente (8). Em pacientes que fazem TSRC, a dosagem das medicações normalmente é empírica, baseadas em estudos de hemodiálise intermitente, ou baseadas em estudos farmacocinéticos de pacientes em hemodiálise contínua de baixo fluxo. Entretanto, têm resultado em níveis sub-terapêuticos (59,60). Assim, na TSRC a dosagem deve ser adaptada através da administração de uma dose de ataque e do ajuste da dose de manutenção (61).

Conforme as últimas recomendações de Ryback e col. são implementadas, novos estudos prospectivos controlados serão importantes a fim de permitir uma avaliação precisa do valor da ASC_{24} nas populações difíceis de tratar (37). Visando a ampla aplicação da terapia guiada pela ASC_{24} na prática clínica, UEDA e col. avaliaram a estimativa da ASC_{24} utilizando apenas uma medida do vale, e

confirmaram utilidade da ASC₂₄ entre 400 e 600 µg.h/mL como alvo para terapia com vancomicina (62).

2.3.1. Coleta de amostras para o Monitoramento Terapêutico da Vancomicina

2.3.1.1. Dried Blood Spots - DBS (ou mancha de sangue seco em papel)

A análise de medicamentos para fins de MT é normalmente realizada em amostras de soro ou plasma, obtidos por punção venosa. Entretanto, há um crescente interesse em sangue capilar obtido por punção digital por uma lanceta automática, colhido em uma matriz de papel filtro, chamado de DBS (*Dried Blood Spots* ou mancha de sangue seco em papel) (63). Nos últimos anos, muitos métodos foram publicados sobre a quantificação de medicamentos em DBS. Os antimicrobianos que já tiveram métodos de DBS descritos estão relacionados no Quadro 1.

Quadro 1. Relação de antimicrobianos descritos em métodos de DBS.

β-LACTÂMICOS	colistina A e colistina B (72)
ceftriaxona (64)	OXAZOLIDINONAS
cefotaxima (65)	linezolida (73,74)
ceftolozana (66)	QUINOLONAS
piperacilina/tazobactam (12)	ciprofloxacino (73)
ceftazidima/avibactam (67)	moxifloxacino (17)
CARBAPENÊMICOS	RIFAMICINAS
meropenem (68)	rifampicina (75)
ertapenem (69)	MACROLÍDEOS
AMINOGLICOSÍDEOS	claritromicina (75)
gentamicina (70)	NITROIMIDAZÓLICOS
POLIMIXINAS	metronidazol (76)
polimixina B (71)	

Comparada com a coleta convencional de sangue venoso, a coleta de DBS é um método simples e minimamente invasivo, tornando-o conveniente ao proporcionar melhor conforto para o paciente (3,63,77). Além disso, a matriz seca aumenta a estabilidade do medicamento e seus metabólitos (3). Na tabela 2 constam as principais vantagens e desvantagens da coleta de DBS.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da coleta de DBS comparado à coleta de sangue venoso (3,63,77–79).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - coleta fácil e minimamente invasiva: o próprio paciente pode fazer a coleta, sem necessidade de coletados profissional. Por ser mais conveniente, facilita para cálculo da área sob a curva de concentração x tempo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Predizer a concentração plasmática ou sérica utilizando DBS é desafiador, já que as medidas de concentração podem ser afetadas pela distribuição do medicamento dentro das células sanguíneas.
<ul style="list-style-type: none"> - é requerido pequeno volume de sangue: ideal para crianças, neonatos e pacientes com restrição hídrica 	<ul style="list-style-type: none"> - se não houver treinamento, a coleta pode não ser bem-sucedida.
<ul style="list-style-type: none"> - Devido à sua matriz seca, a maioria dos analitos são mais estáveis em DBS quando comparados com amostras congeladas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ainda é necessária extensa validação: avaliar o impacto da variação do hematócrito no tamanho da mancha e na homogeneidade da amostra; avaliar o tipo de papel bem como diferentes fabricantes.
<ul style="list-style-type: none"> - transporte e armazenamento convenientes: seguro em relação à contaminação de quem o manipula, pode ser enviado por sistemas postais tradicionais sem tratamentos especiais; todas as proteínas, patógenos e enzimas são inativadas no papel e o crescimento bacteriano é prevenido. 	<ul style="list-style-type: none"> - por oferecer menor volume de sangue, requer técnica analítica mais sensível.
<ul style="list-style-type: none"> - menos dolorosa: mais conveniente para neonatos e crianças, bem como pacientes com flebite. 	
<ul style="list-style-type: none"> - reduz o número de passos pré-analíticos: não requer refrigeração nem requer centrifugação logo após a coleta 	

Para garantir resultados efetivos, é essencial um controle de qualidade adequado em métodos analíticos utilizados no MT. A análise de DBS é influenciada por diversas variáveis pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas que devem ser consideradas ao desenvolver e validar novas técnicas (16).

A escolha da matriz de papel é importante pois influencia a recuperação da amostra, a interação da matriz com o sangue, a estabilidade do analito, a análise cromatográfica, a influência do hematócrito (Hct) e o volume de sangue absorvido. Os papéis se diferenciam em sua composição, espessura e resistência ao espalhamento do sangue. A matriz mais comum em análises por DBS é o papel de celulose. Existem

dois tipos de cartões de papel disponíveis comercialmente: os quimicamente tratados e os não tratados (16,63,78).

Os cartões não tratados quimicamente mais comumente utilizados são Whartman 903® e Ahlstrom 226®. Os cartões que passam por tratamento químico visam a lise celular, a inativação de patógenos e a desnaturação de enzimas e outras proteínas. Os mais utilizados são Whartman FTA®, FTA Elute®, FTA DMPK-A®, e FTA DMPK-B® (16,63,78). Encontra-se disponível uma matriz de papel cuja base não é celulose, e não é tratada quimicamente. Wilhelm e col. e Antunes e col. citam essa matriz como alternativa aos cartões de celulose pois sofre menos influência do Hct e menor interferência na análise por LC-MS/MS por não conter celulose (16,63).

A fim de obter manchas de sangue em papel filtro reprodutíveis, o Forum Europeu de Bioanálises (*European Bioanalysis Forum* - EBF) estabeleceu, em 2011, as Boas Práticas de Coleta de Mancha de Sangue, com atualização em 2013 (80,81). As orientações visam padronizar os procedimentos pré-analíticos a fim de evitar potenciais fontes de erro como sobreposição de manchas ou borrões, pouco volume de sangue, aplicação de múltiplas gotas, e contaminação resultante de anestésico tópico, desinfetantes ou manipulação do medicamento antes da coleta (16). As recomendações para o procedimento de coleta estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2. Recomendações para o procedimento de coleta de sangue capilar em manchas de papel (16,78,82).

-
1. Evitar qualquer contato com a área de coleta da matriz de papel.
 2. Se as mãos do paciente estiverem frias, massagear ou aquecer o sítio da coleta a fim de estimular o fluxo sanguíneo local.
 3. Higienizar o sítio da punção com álcool isopropílico 70%.
 4. Utilizar lanceta estéril e descartável para puncionar o centro da ponta do dedo médio ou anelar.
 5. Descartar a primeira gota de sangue pois contém maior quantidade de fluido tecidual.
 6. Posicionar cuidadosamente o papel embaixo do dedo e permitir que a gota caia por gravidade. O dedo do paciente nunca deve encostar no papel.
 7. Coletar até 5 gotas (média de 50 µL). Para estimular o fluxo sanguíneo, ordenhar gentilmente a mão a partir do punho até a base do dedo, evitando apertar o dedo. Não sobreponha as gotas para evitar concentração da amostra.
 8. Deixar a mancha de sangue secar por 3 a 4 horas em posição horizontal, permitindo que os dois lados da matriz esteja em contato com o ar. Evitar tocar a mancha de sangue e impedir que a

mesma entre em contato com superfícies enquanto ainda estiver úmida. Evitar exposição ao sol, poeira, ou insetos pois podem comprometer sua integridade.

9. Armazenar a matriz em sacos plásticos contendo dessecante, a temperatura ambiente, refrigerado ou congelado, dependendo da estabilidade do analito.
-

No laboratório, um disco de diâmetro conhecido é cortado da mancha de sangue do papel, representando um volume fixo do sangue absorvido. Depois da extração, o analito é mensurado com técnica analítica (63,79).

Entre os fatores que influenciam na difusão do sangue no papel filtro, o Hct é identificado como o parâmetro mais importante, podendo impactar na validação dos resultados gerados pelo método de DBS. A variação do Hct pode afetar a formação e o tamanho da mancha, o tempo de secagem, a homogeneidade, a recuperação do analito, a robustez e reprodutibilidade das análises. Existem algumas estratégias a fim de evitar ou minimizar a influência do hematócrito, como analisar a mancha de sangue inteira, eliminando as variações de espalhamento e homogeneidade ou medir os níveis de potássio, cujas concentrações estão relacionadas diretamente com o Hct, permitindo a consequente correção dos resultados analíticos (16,63,83).

Apesar das vantagens descritas, o uso de DBS é um desafio analítico em função da pequena quantidade de sangue (5 - 50 μL) e da complexidade que as amostras de DBS representam. Por isso, a análise de DBS requer técnicas analíticas muito sensíveis (16,79). Devido a sua alta sensibilidade e seletividade, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (HPLC-MS/MS - *High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) têm sido a ferramenta analítica predominante utilizada em análises de DBS (15,16).

2.3.2. Métodos Analíticos

Entre os métodos desenvolvidos para quantificação da vancomicina, os imunoenzimáticos e os cromatográficos são os mais relevantes (29,32,33). Os imunoenaios são amplamente utilizados para o MT por fornecer resultados rápidos e

pela sua simplicidade (29,32), mas têm como desvantagem menor sensibilidade, com limite inferior de quantificação de 2 mg/mL e relatos de reatividade cruzada com o produto de degradação CDP-1 (13,29). Além disso, é necessário maior volume de sangue, dificultando a análise no caso de pacientes com restrição hídrica ou pediátricos, por exemplo (32). Embora sejam metodologias que permitem análise rápida e fácil, os imunoenaios podem apresentar substanciais diferenças entre métodos, apresentando exatidão e precisão inconsistentes (13). Além das diferenças na padronização, componentes plasmáticos (proteínas, sais) podem variar entre os pacientes e interferir na ligação do analito com os anticorpos dos imunoenaios, especialmente quando o analito está em baixas concentrações (28).

Os sistemas de imunoenasão utilizam métodos imunquímicos para quantificar a concentração de medicamentos. São métodos baseados na relação Antígeno (Ag) - Anticorpo (Ac), nos quais um Ac específico é utilizado para detectar uma substância química (o Ag) de interesse. A Figura 4 mostra a ilustração dos componentes básicos de um imunoenasão.

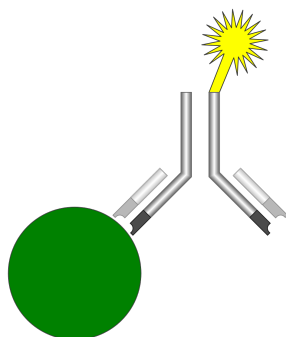


Figura 4. Componentes básicos de um imunoenasão: o antígeno (em verde), o anticorpo (em cinza) e um marcador detectável (em amarelo) (Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoassay>. Último acesso em 11/04/2022).

Existem diversos imunensaios que utilizam metodologias diferentes para detectar a ligação Ag-Ac. Entre eles os mais utilizados são: Imunoenasão de micropartículas por quimioluminescência (CMIA - *Chemiluminescent Microparticle Assay*), Imunensaios de Florescência Polarizada (FPIA - *Fluorescence polarization immunoassay*); Interação cinética das micropartículas em solução (KIMS - *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution*), Enzima Imunoenasão (EIA - *enzyme*

immunoassay), Imunoensaio Enzimático de Multiplicação (EMIT - *enzyme-multiplied immunoassay technique*), Imunoensaio de inibição turbidimétrica melhorada por partículas (PETINIA - Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay) (13).

Os imunoensaios podem utilizar anticorpos policlonais ou monoclonais. Os sistemas policlonais consistem em uma mistura heterogênea de anticorpos, onde cada uma se liga a uma região diferente da molécula do medicamento. Diferente dos sistemas monoclonais, que são mais específicos e apresentam menor risco de reatividade cruzada com metabólitos do medicamento ou outros compostos com estruturas similares (25).

Por ser altamente sensível e específica, HPLC-MS/MS é normalmente utilizada como método de referência na análise quantitativa de medicamentos em matrizes complexas devido à alta especificidade e reprodutibilidade (32).

A cromatografia é uma das mais importantes técnicas analíticas utilizadas para separação, identificação e purificação de componentes presentes em uma mistura complexa que contém componentes de diferentes tamanhos e/ou pesos moleculares. Envolve a separação física do componente de interesse presente em uma mistura, portanto os componentes e/ou substâncias a serem separadas devem estar misturados fisicamente, e não quimicamente combinados (84). A cromatografia líquida (LC) é baseada no princípio onde as moléculas presentes em amostras líquidas são aplicadas em uma coluna composta por material granular sólido (como polímeros e sílica) que compõem a fase fluida estacionária não polar, e são separadas enquanto se movem de um lado para o outro da fase estacionária, com a adição de um solvente líquido que compõe a fase móvel polar. A separação dos componentes é baseada na sua afinidade relativa com a coluna e o solvente. O componente de maior afinidade com a fase estacionária é o último a ser separado. A HPLC é um tipo de LC baseada na injeção de uma fase móvel através de uma coluna sob alta pressão, reduzindo o tempo de separação. Os compostos são determinados baseados no tempo de retenção na coluna através de um gráfico chamado cromatograma, onde o tempo de retenção representa o eixo x, e a absorbância representa o eixo y quando utilizado detector UV (84). A Figura 5 apresenta uma representação esquemática de um sistema de HPLC (85).

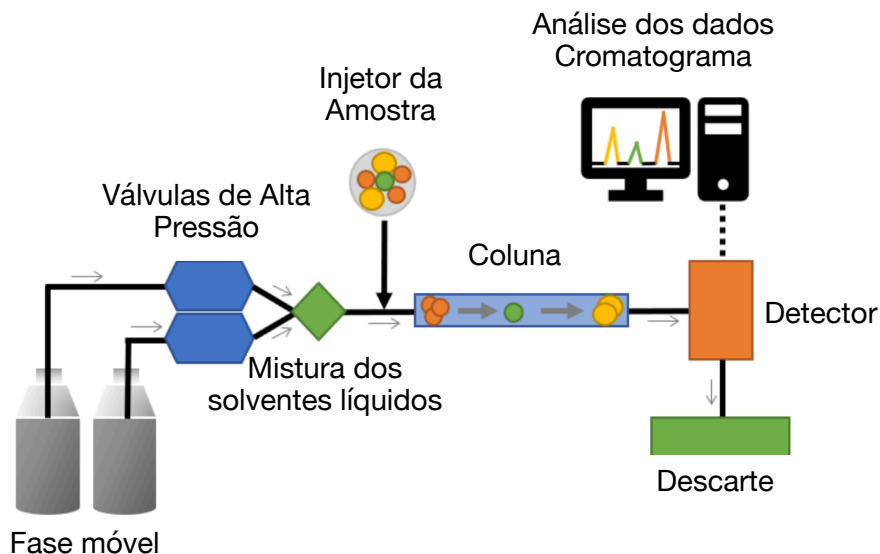


Figura 5. Representação esquemática de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (85) .

O espectrômetro de massas (MS) é um equipamento que determina o peso das moléculas através da estimativa da razão massa/carga (m/z) dos íons (84,86). Nesta técnica, as moléculas são bombardeadas com elétrons; íons positivos altamente energizados são produzidos e posteriormente quebrados para produzirem pequenos fragmentos. Estes íons são separados em campo magnético ou elétrico de acordo com sua m/z . Os íons com maior m/z são mais pesados e vive-versa. A massa molecular dos íons separados também são determinadas. O detector mede os íons separados e os resultados são apresentados em um espectro de massas, cujo gráfico é plotado entre a quantidade de íons e a m/z (84).

A MS é uma técnica muito precisa e altamente sensível para separação e detecção de compostos, mas em misturas altamente complexas, a MS não faz o processo de separação, uma vez que muitos compostos podem ter massa molar e padrões de fragmentação similares. Portanto, a combinação da MS com outro processo de separação, como a HPLC é ideal. Assim é possível reduzir erros experimentais e aumentar a exatidão. Para aumentar a especificidade, é possível utilizar, ainda, MS em sequência (MS/MS), aumentando a especificidade da análise de massas em um único estágio, pela redução da interferência de ruído químico (86). Acoplada à HPLC, a MS/MS, ou seja, a HPLC-MS/MS, é amplamente empregada na detecção de microquantidades de compostos em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na capacidade de detecção e reduz a interferência de compostos presentes na

matriz, além de fornecer maior quantidade de informação estrutural (87). A Figura 6 apresenta uma representação esquemática de um sistema de HPLC-MS/MS (85).

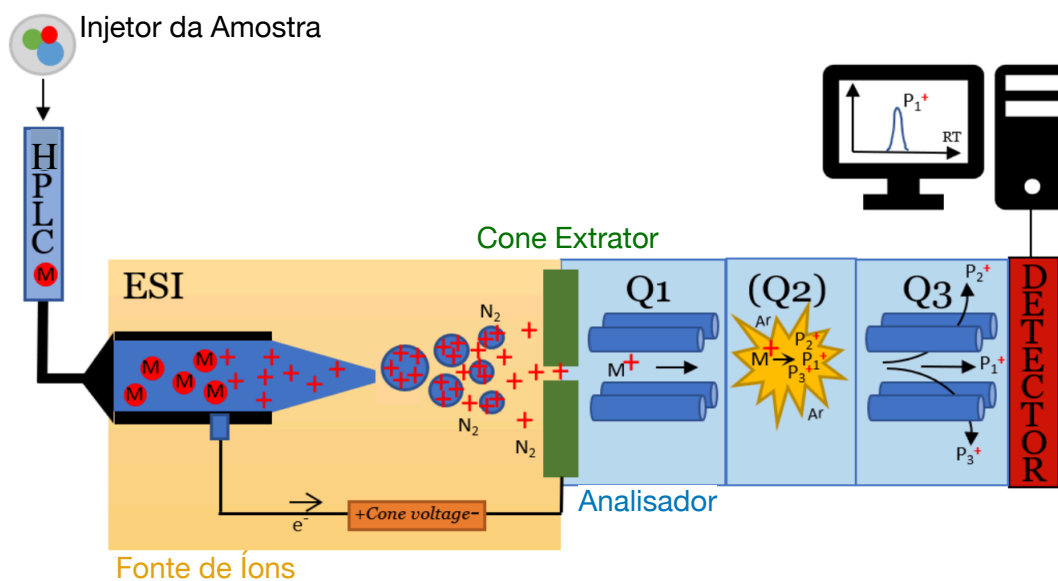


Figura 6. Representação esquemática de um sistema de HPLC-MS/MS. As amostras que contêm o analito (M, massa) são injetadas em uma coluna de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para separação (TR, tempo de retenção) e os metabólitos separados são detectados utilizando um sistema de ionização por eletrospray (ESI) positivo $[M+H]^+$ em modo positivo onde apenas analitos ionizados com H^+ extra entram no cone extrator e adiante no analisador de massas (MS/MS). O MS/MS consiste de dois filtros quadrupolo/analizadores de massas (Q1 e Q3) e uma célula de colisão (Q2) de alta pressão de gás argônio fragmentando (dependendo da energia de colisão) o íon analito precursor (M^+) em vários produtos ionizados (P^+) dos quais apenas um é permitido alcançar o detector. A detecção resulta em cromatogramas a partir dos quais a quantidade do analito pode ser determinada (85).

2.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DBS

A análise em DBS tem sido cada vez mais introduzida na prática clínica para facilitar o MT. Para garantir a qualidade dos métodos bioanalíticos, o desenho, o desenvolvimento e a validação precisam se ajustar ao uso pretendido. As exigências de validação descritas em guias para matrizes tradicionais (sangue, plasma, soro) não abrangem todos os aspectos necessários para o desenvolvimento do método de DBS e sua validação analítica e clínica. A fim de definir os parâmetros necessários para a validação de métodos de DBS, a Associação Internacional para o Monitoramento

Terapêutico e Toxicologia Clínica (IATDMCT - *International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*) publicou em 2019 um guia de recomendações com foco na análise de DBS para determinação quantitativa de medicamentos utilizando métodos cromatográficos (82).

Conforme os guias publicados pelo FDA e pelo EMA (*European Medicines Agency*), a validação analítica de qualquer método de quantificação inclui seletividade, acurácia, precisão, recuperação (eficiência da extração), calibração, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade (88,89). Entretanto, conforme recomenda o EBF, a validação do método de DBS requer a análise de parâmetros específicos como a influência do Hct, da hemólise e do uso de anticoagulante - se for o caso -, a homogeneidade da amostra, o preparo de amostras de calibração e de controle de qualidade, diluição das amostras e o efeito do tipo de matriz (papel filtro). Além disso, também devem ser consideradas as Boas Práticas de Coleta, o volume da mancha de sangue e o tamanho do ponto perfurado da mancha de sangue utilizada na análise, homogeneidade da mancha de sangue e o uso de múltiplas amostras da mesma mancha (80). O guia da IATDMCT foi desenvolvido com base nas recomendações de órgãos como FDA, EMA, EBF e também do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), bem como nos inúmeros trabalhos publicados sobre a análise de DBS (82). Os parâmetros a serem avaliados na validação analítica estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos parâmetros de validação analítica para análise de DBS por métodos cromatográficos (77,82).

<p>Considerações para a validação analítica</p>	<p>Coleta das amostras: procedimento, escolha do tipo de filtro, interferência do substrato, volume da amostra processo de secagem, armazenamento</p>	<p>Preparo das amostras: tamanho da punção, incorporação de um PI</p>	<p>Preparo das manchas de sangue para a curva de calibração e CQ: utilizar sangue venoso, ajustar o Hct à média de Hct da população alvo, adicionar o padrão do analito no sangue e deixar equilibrar a concentração entre hemácias e plasma</p>
--	---	---	--

Pré-validação	Testes exploratórios para ensaios cromatográficos: ausência de 'carryover', influência da matriz da amostra, estabilidade da solução de estoque utilizada para a curva de calibração e CQ	Testes exploratórios para DBS: estabilidade a curto prazo, eficiência da extração, homogeneidade da mancha de sangue no papel	Avaliação da eficiência da extração que deve ser dependente da concentração, do Hct e do tempo.
Validação analítica	Parâmetros clássicos a serem avaliados: <ul style="list-style-type: none"> - Seletividade - Modelo de calibração - Precisão e exatidão - Integridade da diluição - Carryover (arraste) - Recuperação - Efeito da matriz - Eficiência do processo - Estabilidade 		Parâmetros específicos para DBS: <ul style="list-style-type: none"> - Efeito do volume da mancha - Efeito do Hct - Efeito vulcão (homogeneidade da mancha)

PI: padrão interno; CQ: controle de qualidade; DBS: *Dried Blood Spots*; Hct: hematócrito

A implementação do método de DBS é geralmente aceita na rotina assistencial com o propósito do MT depois da realização de um estudo de validação clínica (82). A validação clínica refere-se à demonstração de equivalência entre os resultados obtidos por DBS e os resultados obtidos pelas matrizes tradicionais (sangue venoso total, plasma, soro) em amostras pareadas, com o propósito de demonstrar que esses resultados são intercambiáveis (79,82). Uma vez que as concentrações do medicamento na corrente sanguínea são dinâmicas, é importante que as amostras paradas sejam coletadas entre 5 a 10 minutos de diferença entre uma e outra (82). Além disso, deve-se levar em consideração parâmetros como a separação das células sanguíneas e o comportamento da ligação a proteínas (fração livre no plasma) (79).

O sangue capilar coletado por punção na ponta do dedo consiste em uma mistura de sangue venoso, arterial e fluidos intersticiais. Assim, a concentração do medicamento no sangue capilar pode ser diferente da concentração no sangue venoso, efeito presente principalmente na fase de distribuição do medicamento. Embora seja um processo rápido, a distribuição do medicamento pelo corpo pode levar algumas horas, levando a resultados errôneos quando as amostras são coletadas durante a fase de distribuição. Ao comparar os valores do sangue capilar por DBS com os valores de referência do plasma ou soro, fatores de correção (às vezes baseados no Hct) podem ser necessários e devem ser derivados de estudos clínicos de validação (82).

2.5. DESEMPENHO DOS MÉTODOS DE DOSAGEM DA VANCOMICINA

O MT da vancomicina tem como referência sua concentração sanguínea. Assim, ensaios robustos são fundamentais para evitar decisões equivocadas no ajuste de dose. Estudos de comparação entre métodos são realizados para avaliar o viés (ou no caso em que nenhum dos dois métodos é um método de referência, a diferença) entre dois métodos, medindo o mesmo analito. O objetivo é determinar se os métodos avaliados fornecem resultados semelhantes dentro do poder estatístico do estudo, identificar resultados atípicos, estimar a faixa de concentração testada e identificar possíveis erros de medição proporcionais (dependentes da concentração) ou sistemáticos (constantes) (90).

Estudos que avaliam a interferência de substâncias endógenas em métodos de dosagem da vancomicina já foram publicados, mas são raros (91,92). A interferência de substâncias endógenas ou de outras medicações em métodos comerciais podem ter efeitos deletérios, levando à toxicidade ou à falta de eficácia terapêutica (92). Tsoi e col. relataram a detecção falsamente elevada de vancomicina (36.1 mg/L) em amostra coletada inadvertidamente antes da primeira dose utilizando equipamento Roche Modular P (EIA), e permaneceu alta nas 48 horas seguintes, e 8 meses após, mesmo na ausência de tratamento. Nesse caso, a vancomicina foi detectada também por outros equipamentos como Ortho VITROS (EIA = 108 mg/L), Siemens ADVIA (CMIA = 13 mg/L) e Abbott Architect (CMIA = 4,8 mg/L) e não foi detectada por PETINIA e LC-MS/MS (91).

Fan e col. relataram o efeito da matriz sanguínea como interferente na determinação da vancomicina, afetando a acurácia e a precisão de métodos analíticos. O grupo ressaltou que a hemólise é uma preocupação para LC-MS/MS, entretanto o não foi observada interferência do efeito da matriz no método validado por eles (33). Em estudo recente, Singer e col. relataram um caso no qual concentrações de vancomicina falsamente elevadas, obtidas por EIA, levaram à falha terapêutica, mas os autores não conseguiram identificar a substância interferente (92).

A maioria dos estudos de desempenho relatam a interferência do CDP-1, produto de degradação da vancomicina, em diferentes tipos de imunoensaio, mas especialmente em FPIA (13,20,23,25,29,93). A interferência do CDP-1 é preocupante em pacientes com falência renal, uma vez que a vancomicina é metabolizada nos rins e, no caso de insuficiência renal, o CDP-1 tende a acumular na corrente sanguínea (23). A remoção dialítica da vancomicina depende do tipo de dializador, que é aumentada em hemodializadores de alta permeabilidade. Devido à similaridade estrutural com a vancomicina, é possível que a remoção do CDP-1 também dependa do tipo de dializador (23). Apesar de inúmeros relatos da possível interferência do CDP-1 em imunoensaios, ainda há carência na investigação desse produto de degradação na LC-MS/MS (33).

Independente do tipo de interferente, diferenças substanciais entre as dosagens de vancocinemia são relatadas entre os métodos (33). Na tabela 4 estão relacionados alguns estudos e os respectivos resultados de comparação entre diversos métodos de imunoensaio e cromatografia.

Tabela 4. Relação de estudos que comparam diferentes métodos de imunoensaio com métodos de cromatografia.

Autor	Ano	Método avaliado	Padrão ouro	População em estudo	Percentual de superestimativa encontrado (%)
Tanaka e col. (94)	2002	FPIA	HPLC	49 amostras de 4 pacientes em HD	40,5
				68 amostras de 14 pacientes não dialíticos	61,7
Iwamoto e col. (93)	2005	FPIA	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> - 14 amostras com Clcr < 30 mL/min - 139 amostras pré-dose com Clcr entre 5.8 e 165.3 	<ul style="list-style-type: none"> - Relação FPIA/HPLC tende a diminuir com o aumento da concentração de vancomicina no plasma, especialmente nas amostras pré-dose. - Superestimativa de 23% em amostras obtidas pré-dose e de 11% em amostras pós-dose; - não foi encontrada relação entre a razão FPIA/HPLC e o Clcr

Oyaert e col. (28)	2015	FPIA	LC-MS/MS	99 amostras de 68 pacientes, distribuídas de acordo com a faixa de concentração da vancomicina: sub-terapêutica (< 15mg/L), terapêutica (15 a 25 mg/L) e tóxica (>25 mg/mL)	12,2*
		KIMS (Cobas 8000 c702)			22,2*
		EIA (Ortho Vitros 5000)			8,1*
		PETINIA (Dimension)			6,1*
Barco e col. (32)	2016	KIMS (Cobas Roche C501)	UHPLC-MS/MS	138 amostras de 42 pacientes de 2 meses a 20 anos de idade	4,5
Usman e col. (30)	2016	PETINIA	HPLC	289 amostras, não específica a população	0,44
Brozmanová e col. (29)	2017	FPIA	UPLC-MS/MS	25 amostras pré-dose e 5 amostras pós-dose de 30 pacientes em hemodiálise com níveis altos de creatinina (234 - 720 $\mu\text{mol/L}$)	14
Fan e col. (33)	2019	CMIA	UPLC-MS/MS	748 pacientes normais	5,3
				36 amostras de pacientes em HD	15
Andrigueti e col. (31)	2019	CMIA	LC-MS/MS	47 amostras de pacientes com Crea 0.32 - 0.59 mg/dL	6.3**
				48 amostras de pacientes com Crea 0.60 - 0.90 mg/dL	1.0
				45 amostras de pacientes com Crea 0.91 - 1.94 mg/dL	8.7
				47 amostras de pacientes com Crea 1.98 - 7.13 mg/dL	15.1

*Dados apresentados como grau de discordância entre os métodos.

**Neste estudo o método de LC-MS/MS apresentou 6.5% de superestimativa em relação ao método CMIA.

FPIA = *Fluorescence polarization immunoassay*

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

LC-MS/MS = Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência (*Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry*)

UPLC-MS/MS = Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

CMIA = Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (*Chemiluminescent Microparticle Assay*)

KIMS = Interação cinética das micropartículas em solução (*Kinetic Interaction of Microparticles in Solution*)

HD = Hemodiálise

Clcr = Clearance da creatinina

Crea = Creatinina

3. MARCO CONCEITUAL

O MT da vancomicina envolve a dosagem do nível sérico para individualização da terapia. A validação analítica e clínica de um método de DBS proporciona uma valiosa alternativa menos invasiva para a coleta de sangue venoso. O MT depende de metodologias robustas de dosagem da vancocinemia, que não sofram interferências de produtos de degradação, como o CDP-1, que tende a acumular em pacientes sob terapia de substituição renal. Por isso, a comparação entre os imunoenaios CMIA e KIMS e o padrão ouro LC-MS/MS é fundamental para esse grupo de pacientes.

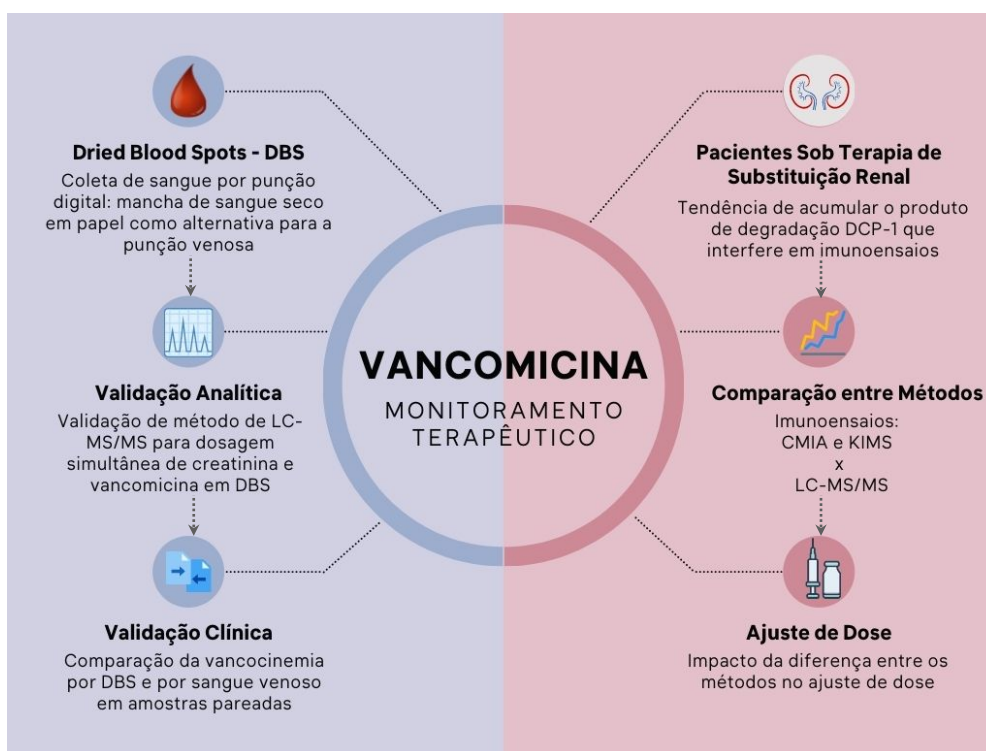


Figura 7. Marco Conceitual.

LC-MS/MS = Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Sequência; CMIA = Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência; KIMS = Interação cinética das micropartículas em solução.

4. JUSTIFICATIVA

Apesar de mais de 61 anos de uso clínico da vancomicina, lacunas de conhecimento a respeito da melhor abordagem para otimizar a terapia e minimizar a toxicidade ainda existem. Devido à sua estreita janela terapêutica, variações farmacocinéticas interindividuais e potencial nefrotoxicidade, o MT da vancomicina é recomendado (6–8).

O MT da vancomicina utiliza parâmetros PK baseados na medida de sua concentração sanguínea. O método de DBS é uma alternativa conveniente e barata para coleta e armazenamento de sangue, é simples e minimamente invasiva e fornece uma matriz seca que aumenta a estabilidade do medicamento e seus metabólitos (3). Foi avaliado para diversos antimicrobianos, entre eles β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, polimixinas, macrolídeos e carbapenêmicos (12,17,63–68,70–73,75,76). Entretanto, para vancomicina não havia relato de validação da técnica de DBS até o desenvolvimento deste estudo (3).

Considerando que resultados falsamente elevados ou diminuídos de vancocinemia podem levar a uma decisão clínica inapropriada (33) podendo resultar em falha terapêutica (92) e que a medição precisa da concentração de vancomicina é de grande importância para o ajuste individualizado da terapia (33), é de essencial a utilização de métodos robustos de dosagem da vancocinemia que não sofram interferência do CDP-1, produto de degradação que tende a acumular em pacientes sob terapia de substituição renal. Até a elaboração deste projeto, apenas dois estudos avaliaram especificamente a população de dialíticos, comparando FPIA e CMIA com UPLC-MS/MS, e apresentaram uma superestimativa da concentração de vancocinemia pelos imunoensaios de 14% e 15%, respectivamente, (29,33). Assim, é urgente a necessidade de novos estudos para avaliação da concordância entre imunoensaios modernos para dosagem da vancocinemia, como CMIA e KIMS, e o método de LC-MS/MS, considerado referência na dosagem de medicamentos em matrizes complexas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo realizar a validação analítica e clínica de uma metodologia de LC-MS/MS a partir de amostras de DBS e avaliar a concordância entre dois imunoenaios, CMIA e KIMS, e o método de LC-MS/MS para a dosagem de vancocinemia em amostras de pacientes sob terapia de substituição renal.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Validar uma metodologia de LC-MS/MS a partir de amostras de DBS para a dosagem simultânea de vancocinemia e creatinina;

5.2.2. Avaliar a estabilidade da vancomicina em amostras coletadas por DBS;

5.2.3. Avaliar a influência do hematócrito nas concentrações de vancomicina obtidas por DBS;

5.2.4. Realizar a validação clínica da metodologia de DBS através da comparação entre as concentrações de vancocinemia em amostras pareadas obtidas por venopunção e por DBS, coletadas no mesmo horário;

5.2.5. Comparar os resultados de vancocinemia obtidos com dois métodos comerciais - CMIA (do inglês *Chemiluminescent Microparticle Assay* - imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência) e KIMS (do inglês *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution* - interação cinética das micropartículas em solução) - com LC-MS/MS em amostras de pacientes sob terapia de substituição renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crew P, Heintz SJ, Heintz BH. Vancomycin dosing and monitoring for patients with end-stage renal disease receiving intermittent hemodialysis. *Am J Heal Pharm.* 2015;72(21):1856–64.
2. Tsutsuura M, Moriyama H, Kojima N, Mizukami Y, Tashiro S, Osa S, et al. The monitoring of vancomycin: a systematic review and meta-analyses of area under the concentration-time curve-guided dosing and trough-guided dosing. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1–15.
3. Al-Ghazawi M, Daoud NEH, Hadidi KA, Alzweiri M, Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2021;78(1):3–10.
4. Levine DP. Vancomycin : A History. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1):5–12.
5. Moellering RC. Vancomycin : A 50-Year Reassessment. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1):3–4.
6. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MAT, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67(9):631–44.
7. Drennan PG, Begg EJ, Gardiner SJ, Kirkpatrick CMJ, Chambers ST. The dosing and monitoring of vancomycin: what is the best way forward? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019;53(4):401–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.12.014>
8. Rybak M, J L, Lodise T, DP L, Bradley J, Liu C, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin: A revised consensus guideline and review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society and the Society of Infectious Diseases. *Am Soc Heal Pharm* [Internet]. 2020;77(11):835–64. Available from: <https://www.ashp.org/-/media/assets/policy-guidelines/docs/draft-guidelines/draft-guidelines-ASHP-IDSa-PIDS-SIDP-therapeutic-vancomycin.ashx>
9. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, Levine DP, Bradley JS, Liu C, et al. 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 pediater. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1361–4.
10. Page-Sharp M, Nunn T, Salman S, Moore BR, Batty KT, Davis TME, et al. Validation and Application of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Jan;60(1):14–23. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01740-15>
 11. Vitória MP Da, Alvarenga CGDS, Vasconcellos Filho LM, Birro JDCT, Barbosa MC, Ferreira MAM, et al. Low Serum Trough Concentrations and High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* from Hemodialysis Patients in Brazil. *Ther Drug Monit*. 2019;41(1):38–43.
 12. Barco S, Risso FM, Bruschetini M, Bandettini R, Ramenghi LA, Tripodi G, et al. A validated LC-MS/MS method for the quantification of piperacillin/tazobactam on dried blood spot. *Bioanalysis*. 2014;6(21):2795–802.
 13. Chen C, Li M, Ma L, Zhai X, Luo D, Zhou Y, et al. Precision and accuracy of commercial assays for vancomycin therapeutic drug monitoring : evaluation based on external quality assessment scheme. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(8):2110–9.
 14. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments. *Clin Biochem*. 2008;41(9):649–62.
 15. Keevil BG. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2011;44(1):110–8.
 16. Antunes MV, Charão MF, Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin Biochem* [Internet]. 2016;49(13–14):1035–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004>
 17. Vu DH, Koster RA, Alffenaar JWC, Brouwers JRBJ, Uges DRA. Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(15–16):1063–70.
 18. de Freitas FM, Zamoner W, Dos Reis PF, Balbi AL, Ponce D. Vancomycin for

- dialytic therapy in critically ill patients: Analysis of its reduction and the factors associated with subtherapeutic concentrations. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):1–12.
19. Kirwan M, Munshi R, O’Keeffe H, Judge C, Coyle M, Deasy E, et al. Exploring population pharmacokinetic models in patients treated with vancomycin during continuous venovenous haemodiafiltration (CVVHDF). *Crit Care*. 2021;25(1):1–9.
 20. Fan Y, Peng X, Wu H, Liang X, Chen Y, Guo B, et al. Simultaneous separation and determination of vancomycin and its crystalline degradation products in human serum by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring. *J Sep Sci*. 2020;43(21):3987–94.
 21. Do Nascimento PA, Kogawa AC, Nunes Salgado HR. Current status of vancomycin analytical methods. *J AOAC Int*. 2020;103(3):755–69.
 22. Fan Y, Peng X, Yu J, Liang X, Chen Y. An ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference. *Bioanalysis*. 2019;11(10):941–55.
 23. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, Levine DP, Bradley JS, Liu C, et al. Validity of 2020 vancomycin consensus recommendations and further guidance for practical application. *Am J Heal Pharm*. 2021;78(15):1364–7.
 24. Bailie GR, Morton R, Ross Y, Waldek S. VANCOMYCIN, RED NECK SYNDROME, AND FITS. *Lancet*. 1985;326(8449):279–80.
 25. Rybak LP, Ramkumar V, Mukherjea D. Ototoxicity of Non-aminoglycoside Antibiotics. *Front Neurol*. 2021;12(March):1–11.
 26. Van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):734–44.
 27. Javorska L, Krcmova LK, Solichova D, Solich P, Kaska M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-

- performance liquid chromatography - A review. *J Sep Sci.* 2016;39(1):6–20.
28. Andriguetti NB, Lisboa LL, Hahn SR, Pagnussat LR, Antunes M V, Linden R. Simultaneous determination of vancomycin and creatinine in plasma applied to volumetric absorptive microsampling devices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;165:315–24.
 29. Smith PF, Morse GD. Accuracy of Measured Vancomycin Serum Concentrations in Patients with End-Stage Renal Disease. *Ann Pharmacother.* 1999;33(12):1329–35.
 30. Choi G, Gomersall CD, Tian Q, Joynt GM, Freebairn R, Lipman J. Principles of antibacterial dosing in continuous renal replacement therapy. *Crit Care Med.* 2009;37(7):2268–82.
 31. AB P, MP P. Vancomycin dosing in high flux hemodialysis: a limited-sampling algorithm. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 2004;61(17):1812–6. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=cookie,ip,shib&db=rzh&AN=106544767&site=ehost-live>
 32. Neely MN, Youn G, Jones B, Jelliffe RW, Drusano GL, Rodvold KA, et al. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):309–16.
 33. Diekema DJ, Pfaller MA, Shortridge D, Zervos M, Jones RN. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S47–53.
 34. Brocks D, Hamdy D. Bayesian estimation of pharmacokinetic parameters: An important component to include in the teaching of clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Res Pharm Sci.* 2020;15(6):503–14.
 35. Guido PC, Pavan CH, Otamendi E, Bramuglia GF. Principles of Bayesian statistics and its relationship with applied pharmacokinetics. *Rev Chil Pediatr.* 2020;91(5):838–9.
 36. Ye Z-K, Li C, Zhai S-D. Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: A Systematic Review. Conly J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014

- Jun 16;9(6):e99044. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099044>
37. Heil EL, Claeys KC, Mynatt RP, Hopkins TL, Brade K, Watt I, et al. Making the change to area under the curve-based vancomycin dosing. *Am J Heal Pharm.* 2018;75(24):1986–95.
 38. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, et al. 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. *Clin Infect Dis [Internet].* 2009;49(3):325–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/600877>
 39. Lewis SJ, Mueller BA. Evaluation and Development of Vancomycin Dosing Schemes to Meet New AUC/MIC Targets in Intermittent Hemodialysis Using Monte Carlo Simulation Techniques. *J Clin Pharmacol.* 2021;61(2):211–23.
 40. Wilson FP, Berns JS. Vancomycin levels are frequently subtherapeutic during continuous venovenous hemodialysis (CVVHD). *Clin Nephrol.* 2012;77(4):329–31.
 41. Schetz M. Drug dosing in continuous renal replacement therapy: general rules. *Curr Opin Crit Care.* 2007;13(6):645–51.
 42. Ueda T, Takesue Y, Nakajima K, Ichiki K, Ishikawa K, Yamada K, et al. Validation of Vancomycin Area under the Concentration— Time Curve Estimation by the Bayesian Approach Using One-Point Samples for Predicting Clinical Outcomes in Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Antibiotics.* 2022;11(1).
 43. Wilhelm AJ, den Burger JCG, Swart EL. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(11):961–73.
 44. Mukap M, Sprod C, Tefuaran N, Laman M, Page-Sharp M, Salman S, et al. Validation of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay in Papua New Guinean Children with Severe Bacterial Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e00940.

45. Chaudhari BB, Sridhar P, Moorkoth S, Lewis LE, Mallayasamy S. Validation of an HPLC method for estimation of cefotaxime from dried blood spot: alternative to plasma-based PK evaluation in neonates. *Bioanal.* 2021;Sep 2.
46. Martens-Lobenhoffer J, Matthias Hinderhofer 2, Uwe Tröger 2 SMB-B. Stability of ceftolozane in human plasma and dried blood spots: Implications for transport and storage. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2020;May-Jun(103: 106692).
47. Martens-Lobenhoffer J, Angermair S, M.Bode-Böger S. Quantification of ceftazidime/avibactam in human plasma and dried blood spots: Implications on stability and sample transport. *J Chromatogr B.* 2022;1193.
48. Martens-Lobenhoffer J, Monastyrski D, Tröger U, Bode-Böger SM. Stability of meropenem in plasma versus dried blood spots (DBS). *J Pharm Biomed Anal.* 2019;170:279–84.
49. la Marca G, Giocaliere E, Villanelli F, Malvagia S, Funghini S, Ombrone D, et al. Development of an UPLC-MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2012;61:108–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.018>
50. Santos ALA Dos, Silva ACC da, Lizot L de LF, Schneider A, Meireles YF, Hahn RZ, et al. Development and validation of an assay for the measurement of gentamicin concentrations in dried blood spots using UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;208(114448).
51. Huang X, Liu X, Wang Y, Zhang J. Determination of polymyxin B in dried blood spots using LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2022;1192(123131).
52. Tsai IL, Kuo CH, Sun HY, Chuang YC, Chepyala D, Lin SW, et al. An on-spot internal standard addition approach for accurately determining colistin A and colistin B in dried blood spots using ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;145:783–93.
53. Ferrone V, Carlucci M, Cotellese R, Raimondi P, Cichella A, Marco L Di, et al. Development of a dried blood spot HPLC-PDA method for the analysis of

- linezolid and ciprofloxacin in hospital-acquired pneumonia patients. *Drug Test Anal.* 2017;9(10):1611–9.
54. la Marca G, Villanelli F, Malvagia S, Ombrone D, Funghini S, De Gaudio M, et al. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for the analysis of antibiotic linezolid on dried blood spot. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;67–68:86–91.
 55. Vu DH, Koster RA, Bolhuis MS, Greijdanus B, Altena R V, Nguyen DH, et al. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. *Talanta.* 2014;121:9–17.
 56. Kole PL, Majithia R, Singh TRR, Garland MJ, Migalska K, Donnelly RF, et al. Dried blood spot assay for estimation of metronidazole concentrations in rats and its application in single animal drug pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(19):1713–6.
 57. Jager NGL, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review. *Bioanalysis.* 2014;6(18):2481–514.
 58. Sharma A, Jaiswal S, Shukla M, Lal J. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Test Anal.* 2014;6(5):399–414.
 59. Enderle Y, Foerster K, Burhenne J. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;130:231–43.
 60. Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtke S, Brunet L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis.* 2011;3(14):1567–75.
 61. Timmerman P, White S, Cobb Z, De Vries R, Thomas E, Van Baar B. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis.* 2013;5(17):2129–36.
 62. Capiou S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based

- Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit.* 2019;41(4):409–30.
63. Den Burger JCG, Wilhelm AJ, Chahbouni AC, Vos RM, Sinjewel A, Swart EL. Haematocrit corrected analysis of creatinine in dried blood spots through potassium measurement. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(2):621–7.
64. Barco S, Castagnola E, Gennai I, Barbagallo L, Tripodi G, Cangemi G, et al. Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice. *J Chemother Chemother.* 2016;28(5):395–402.
65. Brozmanová H, Kacířová I, Uřinová R, Šišťík P, Grundmann M. 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. *Clin Chim Acta.* 2017;469:136–43.
66. Oyaert M, Peersman N, Kieffer D, Deiteren K, Smits A, Allegaert K, et al. Novel LC-MS/MS method for plasma vancomycin: Comparison with immunoassays and clinical impact. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015;441:63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.012>
67. Akash MSH, Rehman K. Essentials of pharmaceutical analysis. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd.; 2019. 1–222 p.
68. Zimdahl Kahlin A. Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* 2020.
69. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* [Internet]. 2009;30(1):19–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224008>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2643089>
70. Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na

- análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim Nova*. 2008;31(3):623–36.
71. Food and Drug Administration FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, FDA. 2013. 28 p.
 72. European Medicines Agency (EMA) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. 2012;44(July 2011):1–23. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
 73. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem*. 2019;90:215–81.
 74. Tsoi V, Bhayana V, Bombassaro AM, Tirona RG, Kittanakom S. Falsely Elevated Vancomycin Concentrations in a Patient Not Receiving Vancomycin. *Pharmacotherapy*. 2019;39(7):778–82.
 75. Singer B, Stevens RW, Westley BP, Nicolau DP. Falsely elevated vancomycin-concentration values from enzyme immunoassay leading to treatment failure. *Am J Heal Syst Pharm*. 2020;77(1):9–13.
 76. J R Kingery, Sowinski KM, Kraus MA, Klaunig JE, Mueller BA. Vancomycin assay performance in patients with end-stage renal disease receiving hemodialysis. *Pharmacotherapy*. 2000;20(6):653–6.
 77. Iwamoto T, Kagawa Y, Kojima M. Factors Influencing the Overestimation of Plasma Vancomycin Concentrations Measured by the Abbott TDx Technique. *Ther Drug Monit*. 2005;27(1):58–62.
 78. Tanaka M, Orii T, Gomi T, Kobayash H, Kanke M, Hirono S. Clinical Estimation of Vancomycin Measurement Method on Hemodialysis Patient. *Yakugaku Zasshi*. 2002;122(4):269–75.
 79. Usman M, Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *Springerplus*. 2016;5:124.
 80. Andriguetti NB, Andriguetti NB, Lisboa LL, Hahn RZ, Antunes MV, Pagnussat LR, et al. Comparison of Vancomycin Serum Concentrations Measured by

Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS / MS) in a Group of Patients with a Wide Range of Creatinine Levels. Lat Am J Pharm. 2019;38(5):891–5.

6. ARTIGO 1

Manuscrito publicado no periódico Journal of Chromatography B em 2019.

DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121897

L. Scribel, A.P. Zavascki, D. Matos, F. Silveira, T. Peralta, N. Gonçalves Landgraf, P. Lamb Wink, A. Caroline Cezimbra da Silva, N. Bordin Andriguetti, L. Loss Lisboa, M. Venzon Antunes, R. Linden, Vancomycin and creatinine determination in dried blood spots: analytical validation and clinical assessment, Journal of Chromatography B (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121897>

VANCOMYCIN AND CREATININE DETERMINATION IN DRIED BLOOD SPOTS: ANALYTICAL VALIDATION AND CLINICAL ASSESSMENT

Letícia Scribel^a, Alexandre P. Zavascki^{a,b}, Douglas Matos^c, Francine Silveira^c, Talitha Peralta^c, Natalia Gonçalves Landgraf^c, Priscila Lamb Wink^d, Anne Caroline Cezimbra da Silva^e, Nadine Bordin Andriguetti^{e,f}, Letícia Loss Lisboa^e, Marina Venzon Antunes^{e,f}, Rafael Linden^{e,f}

a. Postgraduate Program in Medical Sciences, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil

b. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

c. Research and Postgraduate Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

d. Bacterial Resistance Research Laboratory - LABRESIS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

e. Laboratory of Analytical Toxicology, Institute of Health Sciences, Universidade Feevale, Novo Hamburgo/RS, Brazil

f. Graduate Program on Toxicology and Analytical Toxicology, Universidade Feevale, Novo Hamburgo/RS, Brazil.

(*) Correponding author at: Postgraduate Program in Medical Sciences, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar. CEP: 90035003, Porto Alegre/RS, Brazil

e-mail adress: leticia.scribel@poa.ifrs.edu.br (L Scribel)

Abstract

This study aims to develop a liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for vancomycin and creatinine measurement in dried blood spots (DBS) and to evaluate its clinical application. The analytes were extracted from DBS and analyzed by LC-MS/MS. Vancomycin and creatinine DBS and plasma concentrations were compared in 54 and 35 samples, respectively, from 29 patients. Accuracy was 94.4-102.6%, intra-assay precision was 2.1-5.6%, and inter-assay precision was 3.5-7.0%. Patients' vancomycin plasma to DBS concentration ratios were highly variable (1.148 to 5.022), differently from creatinine (0.800 to 1.283). The assay has adequate analytical performance. Plasma concentrations can be satisfactorily predicted from DBS measurements for creatinine, but not for vancomycin, which limits its clinical application.

Key-words: Dried Blood Spots, liquid chromatography-mass spectrometry, vancomycin, creatinine, therapeutic drug monitoring

Abbreviations

LC-MS/MS: liquid chromatography tandem-mass spectrometry

DBS: dried blood spots

MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

PK/PD: pharmacokinetic/pharmacodynamics

CL_{VAN}: vancomycin clearance

CL_{CR}: creatinine clearance

AUC: area under the serum drug concentration-versus-time curve

MIC: minimum inhibitory concentration

CRE-D3: deuterated creatinine

QC: quality control

Hct: hematocrit

QCL: quality control at low concentration

QCM: quality control at medium concentration

QCH: quality control at high concentration

QCLOQ: quality control at the limit of quantification

LLOQ lower limit of quantification

ME: matrix effect

EY: extraction yield

IS: internal standard

EPC: estimated plasma concentration

TDM: therapeutic drug monitoring

1. Introduction

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic widely used for the treatment of serious Gram-positive infections, especially community- and health-care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Even though it has been used for over 60 years, data on vancomycin's optimal dosing regimen and pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamics (PD) properties remain controversial (95,96).

Vancomycin is a hydrophilic drug excreted mainly through the kidneys. Although the association with the development of acute kidney injury may still be unclear, nephrotoxicity was reported in 5 to 43% of the patients (29). High vancomycin plasma concentrations can contribute to nephrotoxicity, especially in combination with other nephrotoxic agents. Thus, maintaining appropriate vancomycin exposure is crucial to ensure optimal treatment outcomes with minimal toxicity (96).

Once vancomycin is primarily eliminated by glomerular filtration, vancomycin clearance (CL_{VAN}) is highly correlated with creatinine clearance (CL_{CR}) (97). According to Colin et. al., initial dosing regimens for vancomycin should depend on CL_{CR} and body weight in adults, and CL_{CR} , body weight, and age in children (98). As creatinine is an essential parameter for vancomycin PK/PD studies(42), the simultaneous measurement of vancomycin and creatinine in the same biological specimen is clinically useful.

The current vancomycin dosing and monitoring guidelines (8) advocate the ratio of the area under the serum drug concentration-versus-time curve over the minimum inhibitory concentration (AUC/MIC ratio) as the best parameter to predict the effectiveness of vancomycin (8,96), with an AUC/MIC ratio ≥ 400 as the target that best correlates with antibacterial activity (96). However, obtaining multiple serum vancomycin concentrations to determine AUC and subsequently calculate the AUC/MIC can be difficult in the clinical setting. Thus, trough serum vancomycin concentrations of 15-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are commonly used as a surrogate marker for AUC and are often used for therapeutic monitoring (8,96,99).

Dried Blood Spot (DBS) assays for antibiotics can facilitate PK/PD studies in situations where venous blood sampling is logistically challenging, as it is a convenient and inexpensive alternative to sampling and storage of whole blood for subsequent assays (81,100). DBS allows simple and cost-effective logistics, is minimally invasive, and usually allows stabilization of drugs and metabolites in the dried matrix (81).

Nevertheless, the use of DBS measurement data for therapeutic drug monitoring (TDM) still requires extensive clinical validation since capillary blood from finger pricks could present different concentrations from venous blood (16). Moreover, the prediction of plasma or serum levels from DBS measurements is affected by the distribution of the drug within the blood cells, which is also affected by the blood's hematocrit and the physiopathological state of the patients (101). Furthermore, the small amount of specimen (5 to 50 μ L) obtained after a finger prick requires sensitive analytical methods, such as liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (16,101). Currently, there is no report of an assay for vancomycin measurement in DBS.

Considering the potential clinical utility of a DBS assay for the determination of vancomycin and creatinine, this study describes the development, validation, and clinical evaluation of a LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of vancomycin and creatinine in DBS.

2. Experimental

2.1 Standards, solvents, and materials

Vancomycin, creatinine, and teicoplanin were acquired by Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), and deuterated creatinine (CRE-D3) from Toronto Research Chemicals. Acetonitrile, methanol, and formic acid were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The same batch of teicoplanin standard was used throughout the study, to assure a stable composition. Whatman 903[®] paper was obtained from GE

Healthcare (Westborough, USA). Blank blood samples used for the preparation of calibration and quality control samples, with background plasma creatinine levels lower than $8.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, were obtained from healthy volunteers.

2.2 Solutions

DBS extraction solution was a mixture of methanol and water (1:1, v/v), containing 0.1% of formic acid, containing the internal standards teicoplanin and CRE-D3 at the concentrations of 1 and $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Mobile phase A was purified water containing 0.1% formic acid and mobile phase B was acetonitrile with 0.1% formic acid.

2.3 Chromatographic and mass spectrometric conditions

The analysis was performed in an Ultimate 3000 XRS liquid chromatography system coupled to a TSQ Quantum access triple quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) interface, from Thermo Scientific (San Jose, USA). The analytes were separated in a reversed-phase Accucore C18 (100 x 2.1 mm, p.d. $2.6 \mu\text{m}$) column (Thermo Scientific), maintained at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phase was eluted in gradient mode at 0.4 mL min^{-1} . Initial eluent composition was 98% mobile phase A, maintained for 2.0 min, followed by a linear gradient up to 50% mobile phase A in at 4 min, held for 1.0 min, returning to the initial composition at 5.5 min. Column equilibration time was 3 min, resulting in a total run time of 8.5 min. Ionization was performed in positive mode with a capillary voltage of 4.0 kV; sheath gas, nitrogen, 40 arb; auxiliary gas, nitrogen, 15 arb; collision gas, argon, 1.5 mTor; vaporizer temperature, $300 \text{ }^\circ\text{C}$ and ion transfer temperature $210 \text{ }^\circ\text{C}$. Monitored multiple reaction transitions were: vancomycin m/z 725 \rightarrow 144 (quantification); 725 \rightarrow 82.9 and 725 \rightarrow 100.2 (qualification); creatinine m/z 114 \rightarrow 44.4 (quantification) and 114 \rightarrow 86.3 (qualification); teicoplanin m/z 941 \rightarrow 315.9 (quantification); 941 \rightarrow 144 and 941 \rightarrow 204 (qualification) and CRE-D3 m/z 117 \rightarrow 47.4 (quantification) and 114 \rightarrow 89.3 (qualification). Collision energies were 15, 14, and 29 V for vancomycin; 17 and 11 V for creatinine; 12, 20, and 22 V for teicoplanin and 17 and 11 V for CRE-

D3. Tube lens voltage was 126, 90, 130, and 97 V for vancomycin, creatinine, teicoplanin, and CRE-D3, respectively.

2.4 Preparation of DBS calibrators and quality control samples

Calibration and quality control (QC) samples were prepared diluting working solutions of vancomycin and creatinine with venous blood, with hematocrit (Hct) 40%, in the proportion of 1:20 (v/v). After, 50 μL of the blood samples were pipetted on the Whatman 903[®] paper, and dried for at least 3 hours at room temperature. DBS samples from patients were obtained from finger pricks by application of one drop of the blood to the collection paper, directly from the patient finger, without touching the surface of the collection area. The DBS samples were allowed to dry at room temperature for 3 h and then stored in plastic bags with desiccants at room temperature and analyzed within 24 h.

2.5. DBS liquid extraction

One DBS disk with 8 mm diameter was cut into 4 pieces and transferred to a 2mL polypropylene microtube, followed by the addition of 400 μL of the DBS extraction solution. The tube was agitated at 1.000 rpm for 30 min at 45 °C. After 10 min centrifugation at 10.000 g, an aliquot of 350 μL from the supernatant was evaporated at 45 °C in a vacuum centrifuge. The dried extract was recovered with 100 μL of mobile phase A, centrifuged for 10 min at 10.000 g, and 20 μL of the supernatant injected into the LC-MS/MS system.

2.6. Linearity

Calibration samples at concentrations of 1, 2, 5, 10, 20, 50, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for vancomycin and 5, 10, 20, 50, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for creatinine were analyzed in sextuplicate. The curves were constructed relating the nominal concentrations with the peak area ratios from vancomycin to teicoplanin and creatinine to CRE-D3. DBS prepared with blank blood was processed in triplicate and the obtained creatinine to CRE-D3 area ratio was subtracted from the calibrator's ratios. Weighted least-squares

linear regression was used to generate calibration models, which were evaluated through their coefficients of correlation (r).

2.7. Precision and accuracy

Precision and accuracy were tested at three concentration levels: 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (quality control at low concentration, QCL), 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (quality control at medium concentration, QCM), and 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (quality control at high concentration, QCH). QC samples were processed and analyzed in triplicate, in each of the five days. DBS prepared with blank blood was processed in triplicate and the resulting creatinine to CRE-D3 area ratios were subtracted from the QC's ratios before calculation of concentrations. Within-assay precision and between-day precision were calculated by one-way analysis of variance with the grouping variable "day" and were expressed as CV%. Accuracy was defined as the percentage of the nominal concentration represented by the measured concentration. Acceptance criteria for accuracy were mean values within $\pm 15\%$ of the theoretical value and for precision a maximum CV of 15% (102).

2.8. Effect of hematocrit on accuracy

Blood samples with a %Hct of 25 and 50 were obtained by centrifuging EDTA whole blood and then adding or removing plasma, as previously described (103). QCL and QCH samples were prepared from the blood and analyzed in triplicate. The influence of the Hct% on vancomycin and creatinine determinations was expressed as the percentages of nominal concentrations measured in DBS. Acceptance criteria were values between 85 and 115%.

2.9. Lowest limit of quantification

The method sensitivity was tested through the evaluation of the precision and accuracy of the lowest calibrator (Quality control at the limit of quantification, QCLOQ) in triplicate on three different days. The acceptance criteria were accuracy within $100\pm 20\%$ of the nominal concentration and a maximum CV% of 20 (102).

2.10. Extract stability at the autosampler

The stability of processed samples kept at the chromatograph's autosampler was tested in sextuplicate at CQL and CQH concentrations. The extracts obtained at each concentration were pooled and injected under the conditions of a normal analytical run at time intervals of 1 h, during 12 h. Tendencies of instability for identified by regression analysis plotting absolute peak areas at each concentration versus injection time. A decrease or an increase of up to 15% in the measured peak areas through the time was considered acceptable (102).

2.11. Thermal stability of vancomycin and creatinine in DBS samples

Quality control DBS samples (QCL and QCH), prepared as previously described, were maintained at 22 and 45 °C and analyzed in triplicate on days 1, 7, and 14 after spotting on the Whatman® card. Stability was acceptable if measurements were within 85 to 115% of the concentrations estimated at the beginning of the series.

2.12. Matrix effect and extraction yield

Matrix effect (ME) and extraction yield (EY) were estimated by a post-extraction spike method with the analysis of three series (A, B, and C) of QC samples (QCL and QCH) [19]. (A) solutions containing vancomycin and creatinine, in the mobile phase, at a concentration equivalent to complete recovery, (B) pooled blank DBS extracts from five different sources, spiked post-extraction with the analytes and internal standard (IS) in concentrations corresponding to 100% extraction yield for QC samples, and (C) DBS extracts samples from five different sources, analyzed separately, enriched with vancomycin and creatinine before extraction. DBS prepared with blank blood was processed in triplicate and the resulting creatinine to CRE-D3 area ratios were subtracted from the QC's ratios before calculation. Each QC sample was analyzed in quintuplicate. ME on ionization was estimated as the percentages of reduction or increase of vancomycin and creatinine area ratios on post-extraction spiked (B), comparing to the solutions (A), calculated as $ME = [100 - (B/A\%)]$. The extraction yield was calculated by comparing the analyte/IS area ratio before extraction (C) and after extraction (B), using the formula $EY = C/B\%$.

2.13. Impact of hematocrit in extraction yield

Aliquots of 18 μL of blood (Hct% 25, 40, and 50) containing vancomycin and creatinine at the concentrations of QCL and QCH and non-spiked blood were added to Whatman 903[®] paper. Whole spots were extracted in triplicate as described previously. The volume of 18 μL was used because this is the typical volume of blood in an 8 mm punch, obtained from a DBS produced with blood with an average Hct% of 40 (104). Non-spiked extracts were also added with vancomycin and creatinine to obtain concentrations equivalent to 100% extraction yield. The extraction yield was calculated by comparing the area ratios of vancomycin and creatinine to the internal standard in control and non-spiked samples.

2.14. Impact of spotted blood volume on accuracy

Different volumes (30, 40, and 55 μL) of QCL and QCH blood samples, with Hct 40%, were pipetted onto the Whatman 903[®] paper. After drying, the DBS samples were analyzed as described above and vancomycin and creatinine were quantified with a calibration curve prepared after pipetting 50 μl of the blood to the paper. All the extractions used a fixed 8-mm disk. The influence of the spotted blood volume on vancomycin and creatinine measurements was determined as percentages of the nominal concentrations measured in the DBS samples. The acceptance criterion was a maximum deviation of $\pm 15\%$.

2.15. Determination of creatinine and vancomycin in plasma samples

Vancomycin plasma concentrations followed a protein precipitation protocol, as previously described (42). An aliquot of 50 μL of the plasma was added to 100 μL of trichloroacetic acid 10% after vortex-mixing and centrifugation 1 μL of the supernatant was injected into the LC-MSMS system. Chromatographic and mass spectrometric conditions were the same as those used for DBS samples. The method was linear in the range of 1 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a $1/x$ weighting factor and $r > 0.99$. The accuracy of the method was between 96.31-104.75%, intra-assay imprecision was in the range of 3.84-7.73%, and inter-assay imprecision of 2.26-6.44%.

Creatinine measurement followed a protein precipitation protocol as well, 50 μL of plasma was added to 500 μL of acetonitrile containing the internal standard CRE-D3 at 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. After vortex mixing and centrifugation, the supernatant was evaporated and the extract was recovered with 200 μL of purified water, added to 200 μL of dichloromethane, vortexed, and centrifuged. An aliquot of 10 μL of the aqueous layer was injected into the LC-MS/MS system at the same analytical conditions. Calibration curves were obtained by relating area ratios of creatinine to CRE-D3 areas to the nominal concentration of the calibrator, with $1/x$ weighting. The blank plasma, used to prepare calibration and control samples, was processed in triplicate and the resulting area ratios were subtracted from the calibrator ratios before obtaining calibration curves. The method was linear in the range of 5 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with $r > 0.99$. The accuracy of the method was between 96.36-103.0%, intra-assay imprecision was in the range of 2.68-5.99%, and inter-assay imprecision of 2.78-4.59%.

2.16. Clinical assessment

Paired DBS and plasma samples were collected from 29 patients hospitalized at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. All patients were older than 18 years and were under vancomycin therapy for at least 48 hours before the blood collection. DBS and plasma samples were collected at peak and trough or trough only conditions.

The study was approved by the institutional review board of the institution and informed consent was obtained from all patients.

Estimated plasma concentration (EPC) was calculated using the equation: $EPC_{Hct} = (DBS_{conc}/[1-(Hct/100)]) \times f_p$ where DBS_{conc} is the concentration measured in DBS, Hct is the individual hematocrit of patient and f_p is the fraction of the drug in plasma, according to Antunes *et al* (105). The f_p value was adjusted to obtain a mean ratio between the measured vancomycin and creatinine plasma concentrations and EPC of 1, using the above described equation. In a second approach, EPC was calculated using a correction factor (CF) based on the mean ratio of the plasma to DBS levels, without considering the individual Hct value ($EPC_{correction\ factor} = DBS_{conc} \times CF$). Finally, in a third approach, the EPC was calculated by using the Passing-bablok regression equation correlating plasma (x) to DBS concentrations (y) ($EPC_{regression\ equation}$) as follows, vancomycin $EPC_{regression\ equation} = (DBS_{conc} + 1.1841)/0.4992$, and creatinine $EPC_{regression} = (DBS_{conc} - 1.049278)/0.834906$

The agreement between vancomycin and creatinine concentrations in plasma and DBS samples was evaluated using Passing-Bablok regression analysis, with 95% confidence intervals (95% CI) for slope and intercept. Bland-Altman plots were used to assess the relative differences between the two methods by plotting the percentage differences against the mean analyte concentrations from both assays. The mean relative differences and the 1.96 standard deviations (SD) of the differences were calculated and within 1.96 SD were considered acceptable. All collected samples were compared for vancomycin measurements. Samples with creatinine measured levels below the lower limit of quantification (LLOQ) in either DBS or plasma were excluded from the method comparison statistics. Acceptation criteria for the agreement between measured plasma concentrations and EPC from DBS measurements was if the difference in concentration was within $\pm 20\%$ of their mean for at least 67 % of the samples (EMA, 2011). Statistical analyses were performed with Medcalc® software (Ostend, Belgium).

3. Results and Discussion

3.1. Chromatography

Immunoenzymatic techniques and liquid chromatography with fluorescence or UV detection, and, more recently, associated with mass-spectrometry are the most relevant methods for the quantification of vancomycin in biological fluids (29). Immunoassays are widely used for TDM in clinical practice due to their high sensitive, speed and simplicity. However, there are several issues associated with their use, such as lower precision at high concentrations; substantial between-method differences in commercial immunoassays; and insufficient specificity, with the possibility of cross-reactivity with the vancomycin crystalline degradation product (CDP-1) (29,106–108). Polyclonal antibody immunoassays showed up to 60% overestimation of vancomycin concentrations when compared with LC-MS/MS in patients with severe renal impairment (29).

LC-MS/MS is considered the method of choice for quantitative measurement of drugs in biological specimens. (108). This highly sensitive method fulfills all requirements for DBS drug measurement, permitting the introduction of microsampling in TDM, which is particularly important for children and newborns, or patients with difficult venous access (29).

The total chromatographic run time was 8.5 minutes, including re-equilibration, similar to those previously described (109–111), allowing an acceptable throughput for clinical testing. Retention times were 0.5 min for creatinine and CRE-D3, 3.8 min for vancomycin, and 4.5 min for teicoplanin (Figure 1).

Figure 1

Whatman 903[®] paper was used as a DBS substrate due to its wide availability, low purchase cost, and high degree of standardization (16). Sample preparation was simple, based on a liquid extraction with a mixture of water and methanol containing internal standards, similar to the procedure described by Parker *et al.* for dried plasma spots (112). Extract evaporation and recovery with the mobile phase permitted the injection of higher volumes with satisfactory peak shape, increasing test sensitivity.

3.2. Assay validation

The method presented satisfactory linearity with coefficients of correlation above 0.99 for both the analytes. The blank subtraction approach for the measurement of creatinine concentrations, as applied by others, proved to be efficient, as demonstrated previously (42,113). The results of precision, accuracy, sensitivity, and processed sample stability experiments met the acceptance criteria (Table 1). Vancomycin intra-assay imprecision ranged from 2.1 to 3.7%, and inter-assay imprecision between 4.7 to 7.0%, demonstrating adequate repeatability of the method. The accuracy was between 94.4 and 101.8%. Similarly, creatinine accuracy was from 99.6 and 102.6%, and intra-assay and inter-assay imprecision ranged from 2.6 to 5.6%, and 3.5 to 6.1%, respectively, also within the criteria of acceptance for bioanalytical assays (114). The quality control samples at the LLOQ, with a concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for vancomycin and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for creatinine had acceptable imprecision (from 2.7 to 9.8%) and accuracy (94.9-104.6%) for both compounds.

Stability at the autosampler was acceptable once vancomycin concentration changes after 12 hours ranged between -6.39 and +2.99% and creatinine between -2.82 and -2.54%, indicating that large analytical batches can be processed without special measures, such as refrigeration, to preserve extracts.

Table 1

Thermal stability was also tested in DBS samples stored at 22 and 45 °C for two weeks, to simulate conditions that samples could potentially be exposed to during transportation (Table 2). No significant changes were observed for creatinine, whereas vancomycin concentrations were markedly lower in DBS samples kept at 45°C for 14 days, representing 80.6% (QCL) and 77.2% (QCH) of the initial series values. At this temperature, vancomycin remained stable for seven days. A reduction in vancomycin concentrations from day 14 at room temperature was also noticed, but within the acceptable range (85.3-86.5%) [11]. Thus, our data indicate that DBS samples containing creatinine do not require special storage conditions, allowing transport and

storage at 45 °C for up to 14 days, which is compatible with the postal service, as shown previously (115). However, DBS samples for vancomycin measurements kept under the tested conditions should be analyzed within a week. Matrix effects for vancomycin were 9.6-11.2%, considered acceptable. Creatinine also presented small matrix effects, of 1.5-5.2%.

Table 2

Once the hematocrit affects the blood viscosity and, as a consequence, the amount of sample in a fixed diameter spot, as well as the extraction yield, the impact of the Hct on vancomycin and creatinine DBS measurements was also tested (16,63,101,103). Vancomycin levels measured in DBS prepared with Hct 25% and 50% whole blood samples resulted in concentrations in the range of 91.8 to 97.7 % and 98.2 to 108% of the nominal values, respectively, with minimal impact on drug measurement. Similar results were found for creatinine, with accuracy ranging from 91.8 to 102.2 % for Hct 25% and 97.3 to 106% for Hct 50%. The extraction yield was between 63.6 and 71.9% for vancomycin, and between 61.5 and 70.6% for creatinine, with higher values corresponding to the lower Hct in both cases. However, the extraction yield was not affected by Hct since the extent of recovery was consistent for the different Hct at QCL, QCM, and QCH (Table 3).

Table 3

3.3. Clinical evaluation

The method was applied to the quantification of vancomycin and creatinine in 54 paired DBS and plasma samples, obtained from 29 patients ongoing vancomycin therapy. Patients' %Hct were between 20.8 and 46.40%. Vancomycin was administered by intermittent infusion twice a day, with doses from 750 to 2,000 mg. Vancomycin and creatinine measured plasma concentrations and estimated plasma levels from DBS measurements are presented in tables S1 and S2, respectively (supplementary material). Vancomycin concentrations in capillary DBS samples

ranged from 2.04 to 62.83 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while plasma levels were 6.57 to 89.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Vancomycin concentrations in DBS and plasma were significantly correlated ($r = 0.892$, $p < 0.01$, $n = 54$). However, plasma to DBS drug concentration ratios were highly variable, ranging from 1.148 to 5.022 and with an average of 2.36. Vancomycin concentrations were also measured in venous blood DBS from 19 patients, with concentrations between 4.74 and 54.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and correlation with capillary DBS levels presenting $r = 0.926$ ($P < 0.01$, $n = 19$).

Vancomycin EPC from DBS measurements were calculated using three different approaches, considering patients' Hct and f_p of 1.48 (EPC_{Hct}), using a correction factor of 2.36 ($\text{EPC}_{\text{factor}}$), and using the regression equation ($\text{EPC}_{\text{regression equation}}$). Passing–Bablok regressions were performed to evaluate the existence of constant and/or proportional errors between vancomycin concentrations measured in plasma, DBS, and EPC (Table 4). No deviation of linearity or systematic bias was observed. However, there was a wide range in the 95% IC interval of regression intercepts, 52.8% of EPC_{Hct} values, 47.2% of $\text{EPC}_{\text{factor}}$, and 49.1% of $\text{EPC}_{\text{regression equation}}$ were outside $\pm 20\%$ of the vancomycin measured plasma levels. In addition, there was proportional bias in EPC using a multiplying factor, with 95% CI of the slope of 1.0478 to 1.4373, which was not observed for the Hct correction formula and for the EPC regression equation. Passing–Bablok scatter diagram and regression line for vancomycin is presented in figure 2.

Considering the high correlation between vancomycin levels in venous and capillary DBS, the poor prediction of plasma levels is probably related to a variable partition between plasma and blood cells, or even to interactions with the paper substrate. Parker *et al.* reported that vancomycin concentration measurements in dried plasma samples be affected by changes in extraction recovery across time, as a result of an effect produced by the interaction among the analyte, substrate, and matrix [22]. Indeed, the estimated f_p of 1.48 and the correction factor of 2.36 could be indicative of a presence of more than 100% of all vancomycin content of blood present in plasma, which is not possible. One justification for this finding is a smaller extraction yield of vancomycin in the clinical samples when compared with the calibration samples, once it was not practically possible to have the same drying time. A reduction in

vancomycin extraction yields in dried plasma spots was observed by Parker *et al.* with the increasing drying time of the specimens [22].

Creatinine concentrations in capillary DBS samples ranged from 5.51 to 20.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and were similar to those measured in plasma, which presented values from 5.22 to 25.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with $r = 0.945$ ($P < 0.01$). Creatinine plasma to DBS concentration ratios ranged from 0.800 to 1.283 with an average of 1.07. Creatinine concentrations measured in venous DBS samples ($n=12$) presented high correlation to concentrations obtained in capillary DBS ($r = 0.965$, $P < 0.01$).

Creatinine EPC was calculated using the same approaches described above for vancomycin. No deviation of linearity was observed. For creatinine, proportional and systematic differences were observed in the DBS method and EPC using a multiplying factor, when compared to measured plasma concentrations (table 4). Proportional bias was observed in the DBS method and EPC using a multiplying factor of 1.07, with 95% confidence interval (CI) of slope of 0.7426 to 0.9182 and 0.8029 to 0.9881, respectively. However, neither proportional nor systematic bias was observed for EPC_{Hct} and for $\text{EPC}_{\text{regression equation}}$ when compared to measured plasma concentrations. Considering the narrow variation of the intercept, both DBS method and EPC equations were accurate in estimating plasma creatinine concentrations (Table 4). Considering patients' Hct and f_p values of 0.75, 17.1% of EPC_{Hct} values were outside $\pm 20\%$ of the creatinine measured plasma concentrations. The other strategies met the acceptance criteria as well, with only 5.7% of $\text{EPC}_{\text{factor}}$ values and 11.4% of $\text{EPC}_{\text{regression equation}}$ values outside $\pm 20\%$ of the creatinine measured plasma concentrations. Passing–Bablok scatter diagram and regression line for creatinine is presented in figure 2.

Table 4

Figure 2

Thus, our data indicate that creatinine plasma levels can be accurately

predicted by DBS measurements. Considering the comparable performance of the three approaches to estimate creatinine plasma concentrations, the use of the correction factor seems to be adequate and preferable due to its simplicity.

4. Conclusions

An LC-MS/MS method for quantification of vancomycin and creatinine in DBS samples was developed and validated. All analytical parameters met the acceptance criteria. However, vancomycin plasma levels could not be accurately predicted from DBS measurements in clinical specimens. Further studies should be performed to elucidate the causes of the high variability of vancomycin plasma to DBS concentration ratios. Conversely, creatinine plasma concentrations were satisfactorily predicted from DBS measurements.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS, Brazil.

Ethical Conduct of Research

The authors have no conflict of interest to declare. All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institution, approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA. The research was conducted under the aegis of Resolution 466 of December 12, 2012 - National Health Council for Scientific Research in Human Beings. All data had confidentiality ensured during the survey. All contestants signed an informed consent form.

References

1. Crew P, Heintz SJ, Heintz BH. Vancomycin dosing and monitoring for patients with end-stage renal disease receiving intermittent hemodialysis. *Am J Heal Pharm.* 2015;72(21):1856–64.
2. Tsutsuura M, Moriyama H, Kojima N, Mizukami Y, Tashiro S, Osa S, et al. The monitoring of vancomycin: a systematic review and meta-analyses of area under the concentration-time curve-guided dosing and trough-guided dosing. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1–15.
3. Al-Ghazawi M, Daoud NEH, Hadidi KA, Alzweiri M, Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2021;78(1):3–10.
4. Levine DP. Vancomycin : A History. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1):5–12.
5. Moellering RC. Vancomycin : A 50-Year Reassessment. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1):3–4.
6. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MAT, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67(9):631–44.
7. Drennan PG, Begg EJ, Gardiner SJ, Kirkpatrick CMJ, Chambers ST. The dosing and monitoring of vancomycin: what is the best way forward? *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019;53(4):401–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.12.014>
8. Rybak M, J L, Lodise T, DP L, Bradley J, Liu C, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin: A revised consensus guideline and review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society and the Society of Infectious Diseases. *Am Soc Heal Pharm* [Internet]. 2020;77(11):835–64. Available from: <https://www.ashp.org/-/media/assets/policy-guidelines/docs/draft-guidelines/draft-guidelines-ASHP-IDSA-PIDS-SIDP-therapeutic-vancomycin.ashx>
9. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, Levine DP, Bradley JS, Liu C, et al. 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 pediatri. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1361–4.
10. Page-Sharp M, Nunn T, Salman S, Moore BR, Batty KT, Davis TME, et al. Validation and Application of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Jan;60(1):14–23. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01740-15>
 11. Vitória MP Da, Alvarenga CGDS, Vasconcellos Filho LM, Birro JDCT, Barbosa MC, Ferreira MAM, et al. Low Serum Trough Concentrations and High Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* from Hemodialysis Patients in Brazil. *Ther Drug Monit*. 2019;41(1):38–43.
 12. Barco S, Risso FM, Bruschetini M, Bandettini R, Ramenghi LA, Tripodi G, et al. A validated LC-MS/MS method for the quantification of piperacillin/tazobactam on dried blood spot. *Bioanalysis*. 2014;6(21):2795–802.
 13. Chen C, Li M, Ma L, Zhai X, Luo D, Zhou Y, et al. Precision and accuracy of commercial assays for vancomycin therapeutic drug monitoring : evaluation based on external quality assessment scheme. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(8):2110–9.
 14. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments. *Clin Biochem*. 2008;41(9):649–62.
 15. Keevil BG. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2011;44(1):110–8.
 16. Antunes MV, Charão MF, Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin Biochem* [Internet]. 2016;49(13–14):1035–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004>
 17. Vu DH, Koster RA, Alffenaar JWC, Brouwers JRBJ, Uges DRA. Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(15–16):1063–70.

18. de Freitas FM, Zamoner W, Dos Reis PF, Balbi AL, Ponce D. Vancomycin for dialytic therapy in critically ill patients: Analysis of its reduction and the factors associated with subtherapeutic concentrations. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):1–12.
19. Kirwan M, Munshi R, O’Keeffe H, Judge C, Coyle M, Deasy E, et al. Exploring population pharmacokinetic models in patients treated with vancomycin during continuous venovenous haemodiafiltration (CVVHDF). *Crit Care*. 2021;25(1):1–9.
20. Fan Y, Peng X, Wu H, Liang X, Chen Y, Guo B, et al. Simultaneous separation and determination of vancomycin and its crystalline degradation products in human serum by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring. *J Sep Sci*. 2020;43(21):3987–94.
21. Somerville AL, Pharm D, Wright DH, Pharm D, Rotschafer JC, Pharm D. Implications of Vancomycin Degradation Products on Therapeutic Drug Monitoring in Patients with End-Stage Renal Disease. *Pharmacotherapy*. 1999;19(6):702–7.
22. Hu MW, Anne L, Forni T, Gottwald K. Measurement of vancomycin in renally impaired patient samples using a new high-performance liquid chromatography method with vitamin B12 internal standard: comparison of high-performance liquid chromatography, emit, and fluorescence polarization immunoassay. *Ther Drug Monit Drug Monit*. 1990;12(6):562–9.
23. J R Kingery, Sowinski KM, Kraus MA, Klaunig JE, Mueller BA. Vancomycin assay performance in patients with end-stage renal disease receiving hemodialysis. *Pharmacotherapy*. 2000;20(6):653–6.
24. Najjar TA, Al-Dhuwailie AA, Tekle A. Comparison of high-performance liquid chromatography with fluorescence polarization immunoassay for the analysis of vancomycin in patients with chronic renal failure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1995;672(2):295–9.
25. Smith PF, Morse GD. Accuracy of Measured Vancomycin Serum Concentrations in Patients with End-Stage Renal Disease. *Ann Pharmacother*.

- 1999;33(12):1329–35.
26. Smith PF, Petros WP, Soucie MP, Copeland KR. New modified fluorescence polarization immunoassay does not falsely elevate vancomycin concentrations in patients with end-stage renal disease. *Ther Drug Monit.* 1998;20(2):231–5.
 27. Tanaka M, Orii T, Gomi T, Kobayashi H, Kanke M, Hirono S. Clinical estimation of vancomycin measurement method on hemodialysis patient. *Yakugaku Zasshi.* 2002;122(4):269–75.
 28. Oyaert M, Peersman N, Kieffer D, Deiteren K, Smits A, Allegaert K, et al. Novel LC-MS/MS method for plasma vancomycin: Comparison with immunoassays and clinical impact. *Clin Chim Acta [Internet].* 2015;441:63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.012>
 29. Brozmanová H, Kacířová I, Uřinová R, Šišťík P, Grundmann M. 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. *Clin Chim Acta.* 2017;469:136–43.
 30. Usman M, Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *Springerplus.* 2016;5:124.
 31. Andriguetti NB, Andriguetti NB, Lisboa LL, Hahn RZ, Antunes MV, Pagnussat LR, et al. Comparison of Vancomycin Serum Concentrations Measured by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS / MS) in a Group of Patients with a Wide Range of Creatinine Levels. *Lat Am J Pharm.* 2019;38(5):891–5.
 32. Barco S, Castagnola E, Gennai I, Barbagallo L, Tripodi G, Cangemi G, et al. Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice. *J Chemother Chemother.* 2016;28(5):395–402.
 33. Fan Y, Peng X, Yu J, Liang X, Chen Y. An ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin

- in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference. *Bioanalysis*. 2019;11(10):941–55.
34. Budd J, Durham A, Gwise T, Iriarte B, Kallner A, Linnet K, et al. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition (EP09-A3). CLSI Doc EP09-A3. 2013;33(11):p1-40.
 35. Do Nascimento PA, Kogawa AC, Nunes Salgado HR. Current status of vancomycin analytical methods. *J AOAC Int*. 2020;103(3):755–69.
 36. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: US. epartment Heal Hum Serv. 2019;
 37. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, Levine DP, Bradley JS, Liu C, et al. Validity of 2020 vancomycin consensus recommendations and further guidance for practical application. *Am J Heal Pharm*. 2021;78(15):1364–7.
 38. Bailie GR, Morton R, Ross Y, Waldek S. VANCOMYCIN, RED NECK SYNDROME, AND FITS. *Lancet*. 1985;326(8449):279–80.
 39. Rybak LP, Ramkumar V, Mukherjea D. Ototoxicity of Non-aminoglycoside Antibiotics. *Front Neurol*. 2021;12(March):1–11.
 40. Van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):734–44.
 41. Javorska L, Krcmova LK, Solichova D, Solich P, Kaska M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review. *J Sep Sci*. 2016;39(1):6–20.
 42. Andrigueti NB, Lisboa LL, Hahn SR, Pagnussat LR, Antunes M V, Linden R. Simultaneous determination of vancomycin and creatinine in plasma applied to volumetric absorptive microsampling devices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;165:315–24.
 43. Choi G, Gomersall CD, Tian Q, Joynt GM, Freebairn R, Lipman J. Principles of antibacterial dosing in continuous renal replacement therapy. *Crit Care Med*. 2009;37(7):2268–82.
 44. AB P, MP P. Vancomycin dosing in high flux hemodialysis: a limited-sampling

- algorithm. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 2004;61(17):1812–6. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=cookie,ip,shib&db=rzh&AN=106544767&site=ehost-live>
45. Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev.* 2013;65(3):1053–90.
 46. Abdul-Aziz MH, Lipman J, Mouton JW, Hope WW, Roberts JA. Applying pharmacokinetic/pharmacodynamic principles in critically ill patients: Optimizing efficacy and reducing resistance development. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36(1):136–53.
 47. Onufrak NJ, Forrest A, Gonzalez D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Anti-infective Dosing. *Clin Ther* [Internet]. 2016;38(9):1930–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.06.015>
 48. Vandecasteele SJ, De Vriese AS, Tacconelli E. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin in clinical practice: Evidence and uncertainties. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):743–8.
 49. Larsson AJ, Walker KJ, Raddatz JK, Rotschafer JC. The concentration-independent effect of monoexponential and biexponential decay in vancomycin concentrations on the killing of *Staphylococcus aureus* under aerobic and anaerobic conditions. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38(4):589–97.
 50. Cunha BA. Vancomycin Revisited: A Reappraisal of Clinical Use. *Crit Care Clin.* 2008;24(2):393–420.
 51. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17(3):479–501.
 52. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med.* 2009;37(3):840–51.
 53. Neely MN, Youn G, Jones B, Jelliffe RW, Drusano GL, Rodvold KA, et al. Are vancomycin trough concentrations adequate for optimal dosing? *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):309–16.
 54. Brocks D, Hamdy D. Bayesian estimation of pharmacokinetic parameters: An

- important component to include in the teaching of clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Res Pharm Sci.* 2020;15(6):503–14.
55. Guido PC, Pavan CH, Otamendi E, Bramuglia GF. Principles of Bayesian statistics and its relationship with applied pharmacokinetics. *Rev Chil Pediatr.* 2020;91(5):838–9.
 56. Ye Z-K, Li C, Zhai S-D. Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: A Systematic Review. Conly J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 16;9(6):e99044. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099044>
 57. Heil EL, Claeys KC, Mynatt RP, Hopkins TL, Brade K, Watt I, et al. Making the change to area under the curve-based vancomycin dosing. *Am J Heal Pharm.* 2018;75(24):1986–95.
 58. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, et al. 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. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;49(3):325–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/600877>
 59. Lewis SJ, Mueller BA. Evaluation and Development of Vancomycin Dosing Schemes to Meet New AUC/MIC Targets in Intermittent Hemodialysis Using Monte Carlo Simulation Techniques. *J Clin Pharmacol.* 2021;61(2):211–23.
 60. Wilson FP, Berns JS. Vancomycin levels are frequently subtherapeutic during continuous venovenous hemodialysis (CVVHD). *Clin Nephrol.* 2012;77(4):329–31.
 61. Schetz M. Drug dosing in continuous renal replacement therapy: general rules. *Curr Opin Crit Care.* 2007;13(6):645–51.
 62. Ueda T, Takesue Y, Nakajima K, Ichiki K, Ishikawa K, Yamada K, et al. Validation of Vancomycin Area under the Concentration— Time Curve Estimation by the Bayesian Approach Using One-Point Samples for Predicting Clinical Outcomes in Patients with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Antibiotics.* 2022;11(1).

63. Wilhelm AJ, den Burger JCG, Swart EL. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(11):961–73.
64. Mukap M, Sprod C, Tefuaran N, Laman M, Page-Sharp M, Salman S, et al. Validation of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay in Papua New Guinean Children with Severe Bacterial Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e00940.
65. Chaudhari BB, Sridhar P, Moorkoth S, Lewis LE, Mallayasamy S. Validation of an HPLC method for estimation of cefotaxime from dried blood spot: alternative to plasma-based PK evaluation in neonates. *Bioanal.* 2021;Sep 2.
66. Martens-Lobenhoffer J, Matthias Hinderhofer 2, Uwe Tröger 2 SMB-B. Stability of ceftolozane in human plasma and dried blood spots: Implications for transport and storage. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2020;May-Jun(103: 106692).
67. Martens-Lobenhoffer J, Angermair S, M.Bode-Bögera S. Quantification of ceftazidime/avibactam in human plasma and dried blood spots: Implications on stability and sample transport. *J Chromatogr B.* 2022;1193.
68. Martens-Lobenhoffer J, Monastyrski D, Tröger U, Bode-Böger SM. Stability of meropenem in plasma versus dried blood spots (DBS). *J Pharm Biomed Anal.* 2019;170:279–84.
69. la Marca G, Giocaliere E, Villanelli F, Malvagia S, Funghini S, Ombrone D, et al. Development of an UPLC-MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2012;61:108–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.018>
70. Santos ALA Dos, Silva ACC da, Lizot L de LF, Schneider A, Meireles YF, Hahn RZ, et al. Development and validation of an assay for the measurement of gentamicin concentrations in dried blood spots using UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;208(114448).
71. Huang X, Liu X, Wang Y, Zhang J. Determination of polymyxin B in dried blood spots using LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2022;1192(123131).

72. Tsai IL, Kuo CH, Sun HY, Chuang YC, Chepyala D, Lin SW, et al. An on-spot internal standard addition approach for accurately determining colistin A and colistin B in dried blood spots using ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;145:783–93.
73. Ferrone V, Carlucci M, Cotelleso R, Raimondi P, Cichella A, Marco L Di, et al. Development of a dried blood spot HPLC-PDA method for the analysis of linezolid and ciprofloxacin in hospital-acquired pneumonia patients. *Drug Test Anal.* 2017;9(10):1611–9.
74. la Marca G, Villanelli F, Malvagia S, Ombrone D, Funghini S, De Gaudio M, et al. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for the analysis of antibiotic linezolid on dried blood spot. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;67–68:86–91.
75. Vu DH, Koster RA, Bolhuis MS, Greijdanus B, Altena R V, Nguyen DH, et al. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. *Talanta.* 2014;121:9–17.
76. Kole PL, Majithia R, Singh TRR, Garland MJ, Migalska K, Donnelly RF, et al. Dried blood spot assay for estimation of metronidazole concentrations in rats and its application in single animal drug pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(19):1713–6.
77. Jager NGL, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review. *Bioanalysis.* 2014;6(18):2481–514.
78. Sharma A, Jaiswal S, Shukla M, Lal J. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Test Anal.* 2014;6(5):399–414.
79. Enderle Y, Foerster K, Burhenne J. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;130:231–43.
80. Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtke S, Brunet L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis.* 2011;3(14):1567–75.

81. Timmerman P, White S, Cobb Z, De Vries R, Thomas E, Van Baar B. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis*. 2013;5(17):2129–36.
82. Capiou S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit*. 2019;41(4):409–30.
83. Den Burger JCG, Wilhelm AJ, Chahbouni AC, Vos RM, Sinjewel A, Swart EL. Haematocrit corrected analysis of creatinine in dried blood spots through potassium measurement. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(2):621–7.
84. Akash MSH, Rehman K. Essentials of pharmaceutical analysis. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd.; 2019. 1–222 p.
85. Zimdahl Kahlin A. Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2020.
86. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* [Internet]. 2009;30(1):19–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224008><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2643089>
87. Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim Nova*. 2008;31(3):623–36.
88. Food and Drug Administration FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, FDA. 2013. 28 p.
89. European Medicines Agency (EMA) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. 2012;44(July 2011):1–23.

Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

90. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem*. 2019;90:215–81.
91. Tsoi V, Bhayana V, Bombassaro AM, Tirona RG, Kittanakom S. Falsely Elevated Vancomycin Concentrations in a Patient Not Receiving Vancomycin. *Pharmacotherapy*. 2019;39(7):778–82.
92. Singer B, Stevens RW, Westley BP, Nicolau DP. Falsely elevated vancomycin-concentration values from enzyme immunoassay leading to treatment failure. *Am J Heal Syst Pharm*. 2020;77(1):9–13.
93. Iwamoto T, Kagawa Y, Kojima M. Factors Influencing the Overestimation of Plasma Vancomycin Concentrations Measured by the Abbott TDx Technique. *Ther Drug Monit*. 2005;27(1):58–62.
94. Tanaka M, Orii T, Gomi T, Kobayash H, Kanke M, Hirono S. Clinical Estimation of Vancomycin Measurement Method on Hemodialysis Patient. *Yakugaku Zasshi*. 2002;122(4):269–75.
95. Elbarbry F. Vancomycin Dosing and Monitoring: Critical Evaluation of the Current Practice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 2018 Jun 19;43(3):259–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13318-017-0456-4>
96. Peyko V, Friedman-Jakubovics M. Novel approach to vancomycin level Monitoring: Impact of a multidisciplinary monitoring system on timing of vancomycin levels. *Am J Heal Pharm*. 2018;75(3):121–6.
97. Marsot A, Boulamery A, Bruguerolle B, Simon N. Vancomycin: A Review of Population Pharmacokinetic Analyses. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(1):1–13.
98. Colin PJ, Allegaert K, Thomson AH, Touw DJ, Dolton M, de Hoog M, et al. Vancomycin Pharmacokinetics Throughout Life: Results from a Pooled Population Analysis and Evaluation of Current Dosing Recommendations. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30656565>
99. Stoessel AM, Hale CM, Seabury RW, Miller CD, Steele JM. The Impact of

AUC-Based Monitoring on Pharmacist-Directed Vancomycin Dose Adjustments in Complicated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *J Pharm Pract* [Internet]. 2018 Mar 19;089719001876456. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0897190018764564>

100. Knippenberg B, Page-Sharp M, Salman S, Clark B, Dyer J, Batty KT, et al. Validation and Application of a Dried Blood Spot Assay for Biofilm-Active Antibiotics Commonly Used for Treatment of Prosthetic Implant Infections. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Aug;60(8):4940–55. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00756-16>
101. Zakaria R, Allen KJ, Koplín JJ, Roche P, Greaves RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *Ejifcc* [Internet]. 2016;27(4):288–317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28149263> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5282914>
102. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. 2013.
103. Koster RA, Alffenaar J-WC, Botma R, Uges DR, Greijdanus B, Kosterink JG, et al. What is the right blood hematocrit preparation procedure for standards and quality control samples for dried blood spot analysis? *Bioanalysis*. 2015;7(3):345–51.
104. Hahn RZ, Antunes MV, Arnhold PC, Andriguetti NB, Verza SG, Linden R. Determination of topiramate in dried blood spots using single-quadrupole gas chromatography – mass spectrometry after flash methylation with trimethylanilinium hydroxide. *J Chromatogr B* [Internet]. 2017;1046:131–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.047>
105. Antunes MV, Raymundo S, De Oliveira V, Staudt DE, Gössling G, Peteffi GP, et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in dried blood spots - Development, validation and clinical application during breast . *Talanta*. 2015;132:775–84.

106. Anne L, Hu M, Chan K, Colin L, Gottwald K. Anne 1989 CDP-1 immunoassay cross-reactivity vancomycin.pdf. *Ther Drug Monit.* 1989;11:585–91.
107. Roberts WL. Crystalline Degradation Product Cross-Reactivity with Vancomycin Fluorescence Polarization Immunoassays. *Pharmacotherapy.* 1999;19(12):1467–8.
108. Barco S, Castagnola E, Gennai I, Barbagallo L, Loy A, Tripodi G, et al. Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice. *J Chemother.* 2016;28(5):395–402.
109. Jesús Valle MJ de, López FG, Navarro AS. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(3):835–9.
110. Usman M, Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *Springerplus.* 2016;5(1):1–7.
111. Liu M, Yang Z-H, Li G-H. A Novel Method for the Determination of Vancomycin in Serum by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Application in Patients with Diabetic Foot Infections. *Molecules.* 2018;23(11):2939.
112. Parker SL, Guerra Valero YC, Lipman J, Roberts JA, Wallis SC. Effect of time on recovery of plasma microsamples for the quantitative determination of vancomycin. *Bioanalysis.* 2016;8(21):2235–42.
113. Koster RA, Greijdanus B, Alffenaar JWC, Touw DJ. Dried blood spot analysis of creatinine with LC-MS/MS in addition to immunosuppressants analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2014;407(6):1585–94.
114. P. Shah V, K. Midha K, W. A. Findlay J, M. Hill H, D. Hulse J, J. McGilveray I, et al. Bioanalytical method validation- a revisit with a decade of progress. *Pharm Res.* 2000;17(12):1551–7.
115. Strickland PT, Graham DR, Silbergeld EK, Freeman JD, Rosman LM, Ratcliff JD. State of the Science in Dried Blood Spots. *Clin Chem.* 2017;64(4):656–79.

116. Landersdorfer CB, Nation RL. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. *Front Pharmacol.* 2021;12(October):1–9.
117. Andriguetti NB, Andriguetti NB, Lisboa LL, Hahn RZ, Antunes MV, Pagnussat LR, et al. Comparison of Vancomycin Serum Concentrations Measured by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS / MS) in a Group of Patients with a Wide Range of Creatinine Levels. *Lat Am J Pharm.* 38(5):891–5.
118. Leven C, Padelli M, Chauvet J, Foulquier J, Carré J. Letter to the Editor Vancomycin immunoassay : does the Advia Centaur XPT underestimate the exposure of patients ? A method comparison study. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(8):192–5.
119. FDA F and DA. Bioanalytical method validation Guidance for Industry. *Rev Rom Med Lab [Internet].* 2018;(May):1–41. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
120. Sym D, Smith C, Meenan G, Lehrer M. Fluorescence polarization immunoassay: Can it result in an overestimation of vancomycin in patients not suffering from renal failure? *Ther Drug Monit.* 2001;23(4):441–4.
121. Fan Y, Peng X, Yu J, Liang X, Chen Y, Liu X, et al. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference. *Bioanalysis.* 2019;11(10):941–54.
122. Zhao W, Kaguelidou F, Biran V, Zhang D, Allegaert K, Capparelli E V., et al. External evaluation of population pharmacokinetic models of vancomycin in neonates: The transferability of published models to different clinical settings. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(4):1068–80.
123. Legatt DF, Blakney GB, Higgins TN, Schnabl KL, Shalapay CE, Dias VC, et al. The effect of paraproteins and rheumatoid factor on four commercial immunoassays for vancomycin: Implications for laboratorians and other health care professionals. *Ther Drug Monit.* 2012;34(3):306–11.

124. Anandan J V., Touchette MA. Vancomycin clearance with high-flux dialysis membranes. *Int J Artif Organs*. 1998;21(3):131–3.

Figure captions

Figure 1. Typical ion chromatograms obtained from DBS. **1:** Patient DBS containing CRE and VAN at the concentrations of 5.50 and 5.90 mg L⁻¹, respectively. **2:** QCL containing CRE and VAN at the concentrations of 7.50 and 7.50 mg L⁻¹, respectively. **3:** QCH containing CRE and VAN at the concentrations of 75 and 75 mg L⁻¹, respectively. Monitored transitions are VAN m/z 725→144.1, CRE m/z 114→44.4, teicoplanin m/z 941→315.9 and CRE-D3 m/z 117→47.4.

Figure 2. Passing-Bablok comparison of vancomycin (VAN) and creatinine (CRE) measured in plasma with DBS and estimated plasma concentrations (EPC). **A)** VAN plasma vs. VAN DBS. **B)** VAN plasma vs. VAN EPC_{Hct}. **C)** VAN plasma vs. VAN EPC_{factor}. **D)** VAN plasma vs. VAN EPC_{regression equation}. **E)** CRE plasma vs. CRE DBS. **F)** CRE plasma vs. CRE EPC_{Hct}. **G)** CRE plasma vs. CRE EPC_{multiplying factor}. **H)** CRE plasma vs. CRE EPC_{regression equation}.

Figure 1. Typical ion chromatograms obtained from DBS. **1:** Patient DBS containing CRE and VAN at the concentrations of 5.50 and 5.90 mg L⁻¹, respectively. **2:** QCL containing CRE and VAN at the concentrations of 7.50 and 7.50 mg L⁻¹, respectively. **3:** QCH containing CRE and VAN at the concentrations of 75 and 75 mg L⁻¹, respectively. Monitored transitions are VAN m/z 725→144.1, CRE m/z 114→44.4, teicoplanin m/z 941→315.9 and CRE-D3 m/z 117→47.4.

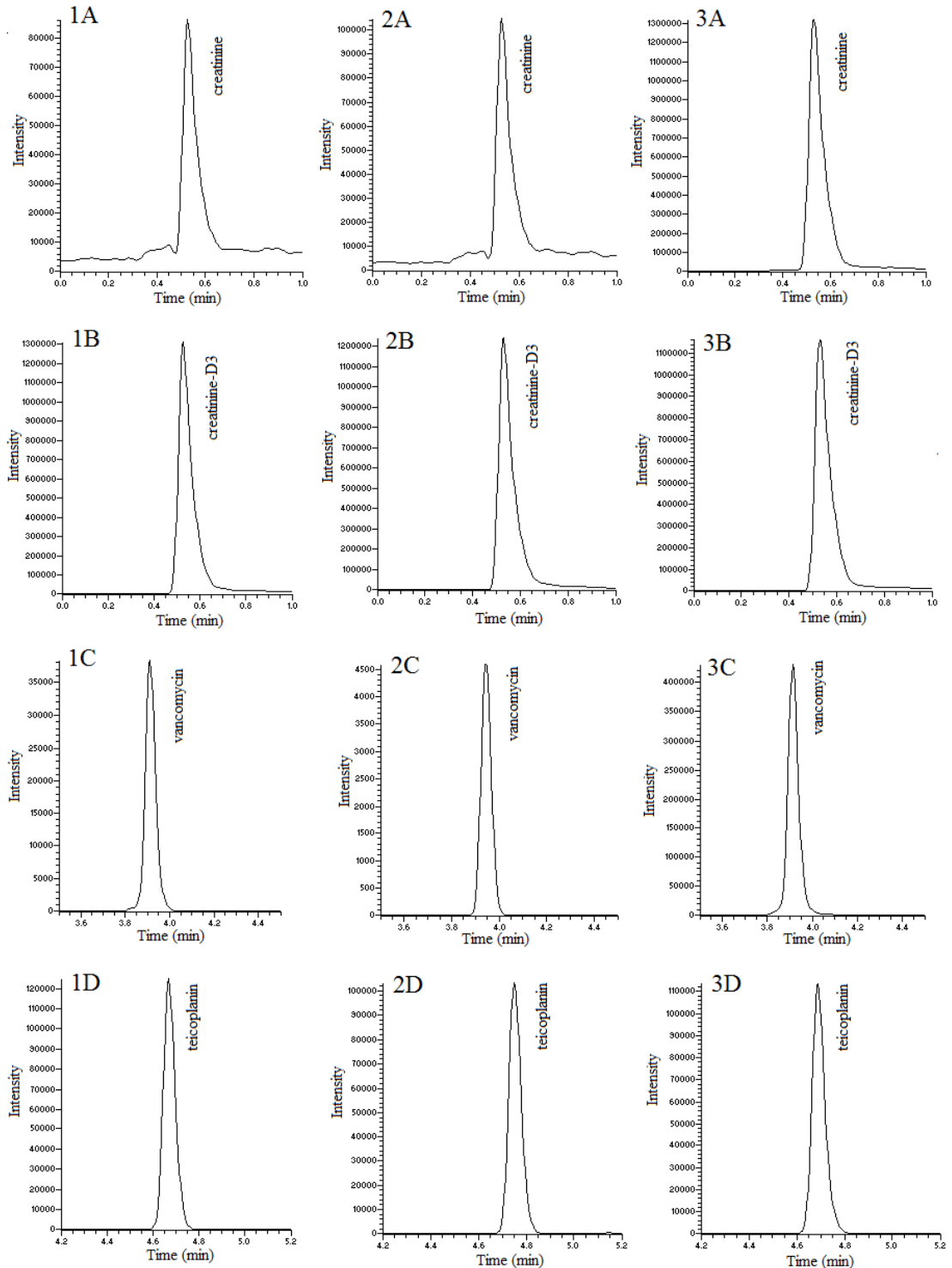


Figure 2. Passing-Bablok comparison of vancomycin (VAN) and creatinine (CRE) measured in plasma with DBS and estimated plasma concentrations (EPC). **A)** VAN plasma vs. VAN DBS. **B)** VAN plasma vs. VAN EPC_{Hct}. **C)** VAN plasma vs. VAN EPC_{factor}. **D)** VAN plasma vs. VAN EPC_{regression equation}. **E)** CRE plasma vs. CRE DBS. **F)** CRE plasma vs. CRE EPC_{Hct}. **G)** CRE plasma vs. CRE EPC_{multiplying factor}. **H)** CRE plasma vs. CRE EPC_{regression equation}.

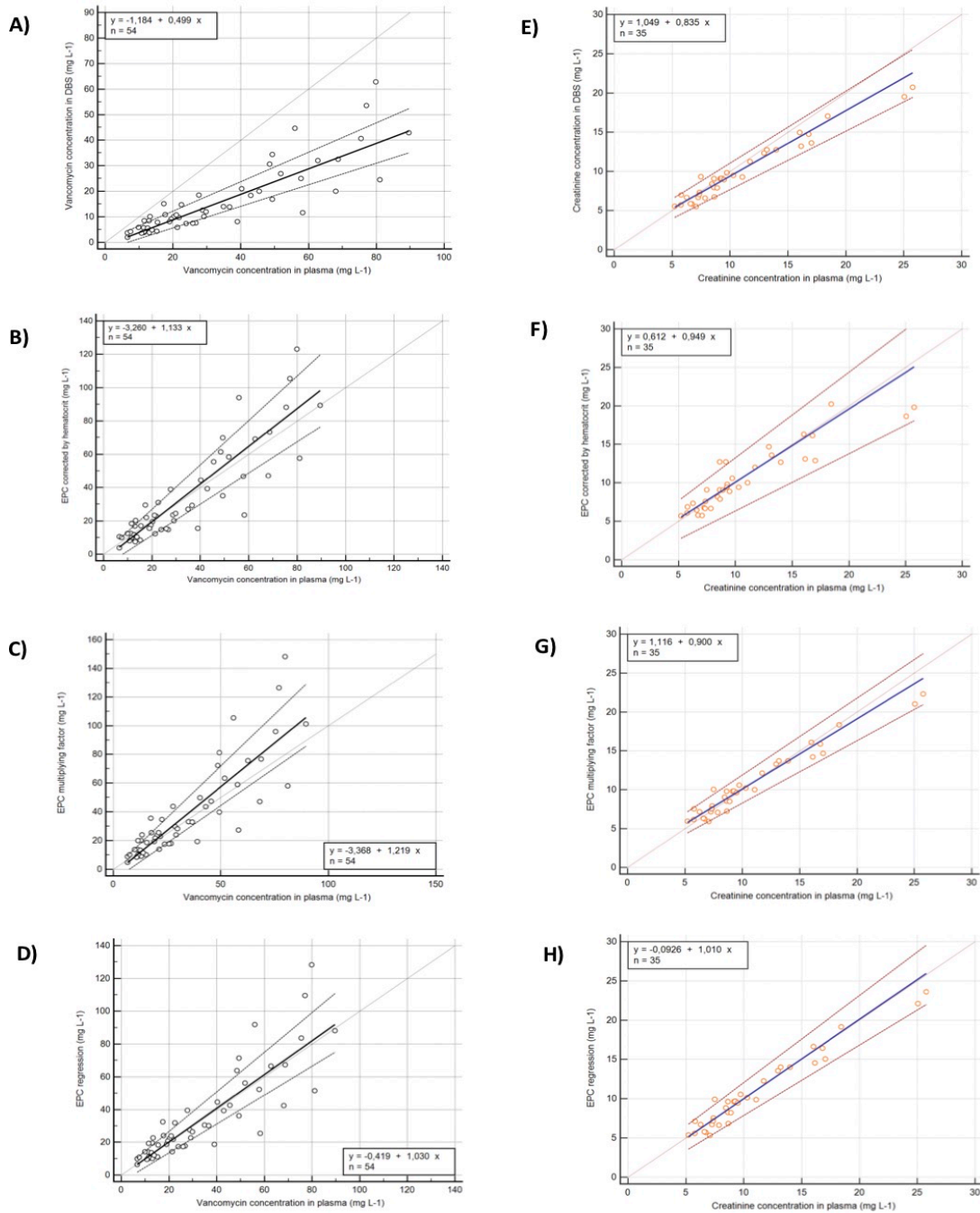


Table 1. Method validation parameters: precision, accuracy, and processed sample stability at autosampler.

Analyte	QC sample	Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precision (CV %)		Accuracy (%)	Processed sample concentration change after 12 h in AS (%)
			Intra-assay	Inter-assay		
Vancomycin	QCLOQ	1	2.7	7.6	104.6	-
	QCL	7.5	2.1	4.7	94.4	+2.99
	QCM	35	2.7	6.9	101.6	-
	QCH	75.0	3.7	7.0	101.8	-6.39
Creatinine	QCLOQ	5	8.5	9.8	94.9	-
	QCL	7.5	5.6	3.5	99.6	-2.82
	QCM	35	2.6	6.1	102.6	-
	QCH	75	3.9	4.3	101.1	-2,54

Table 2. Two-week stability of creatinine and vancomycin in DBS maintained at different temperatures (percentage of nominal concentration).

Analyte	QC sample	Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Day 1	Day 7	Day 14
Vancomycin	QCL	7.5	22	105.7	92.5	85.3
			45	100.1	88.7	80.6
	QCH	75.0	22	105.3	103.3	87.5
			45	100.9	90.3	77.2
Creatinine	QCL	7.5	22	102.9	104.5	97.4
			45	105.6	106.6	102.5
	QCH	75.0	22	100.8	99.7	93.4
			45	107.2	105.2	91.3

QCL: quality control low, QCH: quality control (linearity $n=3$ for each concentration at each day and temperature).

Table 3. Evaluation of the influence of Hct on accuracy and extraction yield.

Analyte	Hct%	QC sample	Nominal concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Accuracy* (%)	Extraction yield (%)
Vancomycin	25	QCL	7.5	97.7	71.9
		QCM	35	-	70.1
		QCH	75	91.8	69.5
	40	QCL	7.5	-	64.2
		QCM	35	-	66.1
		QCH	75	-	63.6
	50	QCL	7.5	108.0	64.6
		QCM	35	-	65.7
		QCH	75	98.2	66.5
Creatinine	25	QCL	7.5	102.2	70.6
		QCM	35	-	67.2
		QCH	75	91.8	68.8
	40	QCL	7.5	-	65.9
		QCM	35	-	66.3
		QCH	75	-	65.2
	50	QCL	7.5	106.0	63.9
		QCM	35	-	62.0
		QCH	75	97.3	61.5

Hct%: Hematocrit. QCL: quality control low. QCM: quality control medium. QCH: quality control high (n =3 for each control sample, at each Hct% value).

*Accuracy at Hct% 40 is presented in table 1.

Table 4. Comparative evaluation of vancomycin and creatinine concentrations measured in plasma to DBS and estimated plasma concentrations from DBS measurements.

Analyte	Evaluation parameter	DBS	Hct correction formula	Multiplying factor	Regression equation
Vancomycin	Range of % difference between DBS and plasma estimated levels to plasma measurements (mg L ⁻¹)	114.81 - 502.22	39.62 - 170.74	46.98 - 205.51	43.96 - 188.16
	Passing-Bablok correlation coefficient	0.892	0.883	0.892	0.892
	Passing-Bablok regression slope (95% CI)	0.4992 (0,4219 - 0,5757)	1.1330 (0,9399 - 1,3357)	1.2191 (1,0478 - 1,4373)	1.0303 (0,8822 - 1,2072)
	Passing-Bablok regression intercept (95% CI)	-1.1841 (-2,7233 - 0,7715)	-3.2595 (-7,7666 - 0,1875)	-3.3676 (-8,0663 - 0,2044)	-0.4190 (-4,0947 - 2,6716)
	Cusum (P)	0.30	0.72	0.92	0.72
	Range of % difference between DBS and plasma estimated levels to plasma measurements (mg L ⁻¹)	80.01 - 128.29	74.48 - 147.70	83.88 - 134.50	75.60 - 132.90

Creatinine	Passing-Bablok correlation coefficient	0.945	0.926	0.945	0.945
	Passing-Bablok regression slope (95% CI)	0.8349 (0.7426 – 0.9182)	0.9488 (0.7420 – 1.1122)	0.8999 (0.8029 – 0.9881)	1.0098 (0.8958 – 1.1079)
	Passing-Bablok regression intercept (95% CI)	1.0493 (0.2514 – 1.8770)	0.6123 (-1.0703 – 2,1349)	1.1162 (0.2706 – 2.0140)	-0.09263 (-1.0863 – 0.9693)
	Cusum (P)	0.42	0.94	0.42	0.28

Table S1. Comparison of measured and estimated plasma concentrations from DBS measurement for vancomycin (VAN) (n = 54).

Sample	Plasma (mg/mL)	DBS (mg/mL)	Plasma/ DBS ratio	Estimated plasma concentration		
				(% of plasma levels)		
				Hct correction formula	Multiplying factor (2.36)	Regression equation
1	13.3	10.2	1.3	153.4	180.5	171.1
2	48.5	30.7	1.6	126.9	149.4	131.7
3	11.3	5.8	1.9	109.3	121.3	124.0
4	42.9	18.5	2.3	91.5	101.5	91.7
5	12.7	5.3	2.4	88.0	97.7	101.6
6	21.7	9.7	2.2	105.1	105.7	100.6
7	81.0	24.6	3.3	71.2	71.6	63.7
8	11.4	3.9	2.9	80.1	80.4	89.0
9	68.0	20.0	3.4	69.1	69.5	62.4
10	26.7	7.7	3.5	55.1	67.7	66.3
11	34.9	14.1	2.5	77.4	95.1	87.5
12	6.6	3.8	1.7	158.3	135.1	150.6
13	45.5	20.1	2.3	122.2	104.3	93.7
14	25.9	7.5	3.4	59.2	68.5	67.3
15	58.2	11.6	5.0	40.6	47.0	44.0
16	28.7	12.6	2.3	82.3	103.8	96.4
17	57.8	25.0	2.3	81.0	102.1	90.8
18	20.1	10.0	2.0	96.8	116.7	110.9
19	7.5	4.3	1.7	132.5	135.5	146.7
20	15.2	4.4	3.5	55.8	68.1	73.4
21	13.0	3.8	3.4	56.8	69.3	77.1
22	23.8	7.4	3.2	61.6	73.7	72.5
23	29.1	10.1	2.9	68.8	82.3	78.0
24	6.6	2.0	3.2	58.5	73.1	98.2
25	38.9	8.2	4.8	39.6	49.5	48.1
26	19.5	9.2	2.1	89.4	111.4	106.8
27	19.0	8.2	2.3	81.9	101.5	98.6
28	11.5	4.3	2.7	85.8	88.4	95.7
29	12.9	8.5	1.5	129.4	155.2	150.1

30	77.0	53.6	1.4	137.0	164.2	142.5
31	11.5	8.5	1.4	159.6	173.5	167.9
32	75.5	40.7	1.9	116.9	127.1	111.1
33	21.3	5.9	3.6	57.3	65.4	66.7
34	49.3	16.9	2.9	71.0	81.0	73.6
35	12.6	5.7	2.2	92.3	106.4	109.2
36	29.7	12.0	2.5	82.6	95.2	88.8
37	13.8	4.9	2.8	74.4	83.7	88.3
38	36.6	13.9	2.6	79.8	89.7	82.6
39	9.9	5.9	1.7	125.4	140.5	143.3
40	40.3	21.1	1.9	110.3	123.6	110.8
41	17.7	10.9	1.6	124.8	145.0	136.5
42	49.3	34.5	1.4	142.0	165.0	144.9
43	10.7	3.6	3.0	75.0	78.3	88.6
44	68.7	32.5	2.1	106.9	111.7	98.3
45	21.0	10.8	1.9	112.0	121.6	114.6
46	51.8	26.9	1.9	113.0	122.7	108.7
47	17.3	15.1	1.1	170.7	205.5	188.2
48	79.8	62.8	1.3	154.3	185.7	160.6
49	22.5	14.7	1.5	137.7	154.4	141.6
50	55.9	44.7	1.3	168.0	188.3	164.1
51	27.7	18.6	1.5	140.2	158.5	143.1
52	89.5	42.9	2.1	100.0	113.0	98.6
53	15.4	7.9	1.9	111.0	121.4	118.4
54	62.7	32.1	2.0	110.4	120.7	106.2
Range	2.0 - 62.8	6.6 - 89.5	1.2 - 5.0	39.6 - 170.7	47.0 - 205.5	44.0 - 188.2
Average	33.0	15.9	2.4	100.0	112.4	107.1

Table S2. Comparison of measured and estimated plasma concentrations from DBS measurement for creatinine (CRE) (n = 35).

Sample	Plasma (mg mL ⁻¹)	DBS (mg mL ⁻¹)	Plasma/DBS ratio	Estimated plasma concentration		
				(% of plasma levels)		
				Hct correction formula	Multiplying factor (1.07)	Regression equation
1	7.2	6.7	1.1	93.4	99.0	92.9
2	7.9	6.6	1.2	85.1	90.2	84.4
3	9.7	9.9	1.0	109.3	109.3	108.7
4	9.3	9.1	1.0	105.8	105.8	104.2
5	11.1	9.3	1.2	90.5	90.5	89.3
6	18.4	17.1	1.1	109.8	99.6	104.0
7	12.9	12.4	1.0	113.6	102.9	104.8
8	7.5	9.3	0.8	121.6	134.5	132.9
9	8.4	8.4	1.0	97.2	107.5	104.8
10	8.6	9.1	0.9	147.7	113.6	111.8
11	9.2	9.1	1.0	139.0	106.9	105.3
12	9.2	9.1	1.0	102.1	106.5	104.9
13	7.4	7.4	1.0	103.2	107.6	102.7
14	7.3	7.0	1.0	90.9	103.2	97.8
15	17.0	13.6	1.3	75.9	86.2	88.6
16	16.1	13.2	1.2	81.1	88.1	90.3
17	8.7	6.7	1.3	91.1	83.9	78.9
18	5.8	7.0	0.8	118.6	130.4	123.4
19	25.8	20.8	1.2	76.9	86.7	91.6
20	25.1	19.5	1.3	74.5	83.9	88.3
21	14.0	12.8	1.1	90.9	98.2	100.3
22	6.7	5.8	1.1	86.6	93.6	85.4
23	7.1	5.5	1.3	81.6	83.9	75.6
24	5.8	5.7	1.0	105.8	107.1	97.4
25	11.7	11.3	1.0	102.6	103.6	104.6
26	13.2	12.8	1.0	103.1	104.1	106.4
27	5.2	5.6	0.9	109.3	114.4	103.3
28	8.6	8.0	1.1	105.5	99.3	96.0
29	8.9	7.9	1.1	102.1	96.1	92.8

30	6.6	5.9	1.1	98.1	96.0	87.8
31	6.3	6.7	0.9	116.9	114.3	107.2
32	9.5	9.0	1.1	93.8	101.8	100.0
33	10.3	9.5	1.1	91.6	99.4	98.4
34	16.0	15.0	1.1	102.0	100.5	104.0
35	16.8	14.8	1.1	96.2	94.8	98.0
Range	5.2 - 25.8	5.5 - 20.8	0.8 - 1.3	74.5 - 147.7	83.9 - 134.5	75.6 - 132.9
Average	10.8	9.9	1.1	100.4	101.2	99.1

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MT da vancomicina é recomendado por *guidelines* internacionais. Visando otimizar o monitoramento da concentração sérica da vancomicina, um novo método de análise por LC-MS/MS amostras de sangue seco em papel foi validado e o desempenho de dois imunoenaios foi avaliado.

Este estudo validou um novo método de LC-MS/MS para análise simultânea de vancomicina e de creatinina sérica a partir de manchas de sangue seco em papel, ou *Dried Blood Spots* – DBS. Amostras de sangue capilar em DBS têm despertado crescente interesse para o MT como alternativa ao sangue venoso, pois a coleta é fácil e menos invasiva, necessitam de pequena quantidade de sangue, oferecem maior estabilidade, facilitando o armazenamento e o transporte. Todos os parâmetros analíticos estudados, incluindo precisão, acurácia e sensibilidade apresentaram critérios satisfatórios tanto para dosagem de vancomicina quanto para creatinina. As amostras de DBS se mostraram estáveis a 22°C e a 45°C por uma semana para vancomicina e duas semanas para creatinina, condições pelas quais as amostras podem ser expostas sem necessidade de condições especiais para o transporte. O impacto do hematócrito também foi avaliado, uma vez que pode afetar a viscosidade do sangue e, conseqüentemente, a quantidade de amostra fixada no diâmetro da mancha a ser analisada. Diferentes níveis de hematócrito foram testados com mínimo impacto nas concentrações da vancomicina e da creatinina.

Apesar da alta correlação entre os níveis de vancomicina no sangue venoso e capilar, não foi possível prever as concentrações plasmáticas a partir de amostras clínicas de DBS. A interação das moléculas de vancomicina com a matriz de papel ou a partição variável entre plasma e células sanguíneas podem explicar este resultado. O tempo entre a coleta em DBS e a extração da amostra pode afetar as concentrações de vancomicina, conforme reportado por Parker e col., por consequência da interação do analito, do substrato e da matriz (112). Para creatinina, os resultados indicaram que as concentrações plasmáticas podem ser previstas com precisão a partir de amostras de

DBS. Até o desenvolvimento deste trabalho, não havia outro estudo que tenha validado um método de LC-MS/MS para dosagem de vancomicina e creatinina em DBS.

A presença de interferentes em imunoenaios para vancomicina provocando níveis séricos falsamente elevados voltou a chamar atenção em estudos publicados recentemente por Singer e col. (92) e Tsoi e col. (91) por ter resultado em falha terapêutica. Vários fatores podem contribuir para a superestimativa dos níveis de vancomicina quando os imunoenaios são utilizados, entretanto o mais citado é o aumento do produto de degradação da vancomicina chamado CDP-1 (*Crystalline Degradation Product*) em pacientes com função renal comprometida.

A fim de avaliar o desempenho de dois imunoenaios para a dosagem de vancomicina sérica em pacientes sob terapia de substituição renal, amostras de sangue analisadas por CMIA e por KIMS para o MT foram comparadas com LC-MS/MS, considerado método de referência. Os imunoenaios apresentaram boa correlação com o método cromatográfico. Não foi observado erro sistemático, mas um pequeno erro proporcional foi observado para os dois imunoenaios. Ou seja, a diferença entre os métodos tende a aumentar proporcionalmente com o aumento da concentração.

Embora as concentrações de CDP-1 não tenham sido medidas neste estudo, a remoção deste produto de degradação por dialisadores de alta permeabilidade pode explicar os resultados encontrados. Além disso, o uso de anticorpos monoclonais utilizados nos imunoenaios avaliados aumentam a especificidade, diminuindo a probabilidade de interferências nas análises.

Ao final, o objetivo geral de validação de método de dosagem de vancomicina a partir de amostras de sangue capilar e de avaliação do desempenho de dois métodos de imunoenensaio em pacientes que fazem diálise foi alcançado.

Espera-se que, a partir dos resultados apresentados, o MT da vancomicina seja otimizado desde a coleta até a análise das amostras e que este estudo contribua para novas pesquisas relacionadas a este tema.

09. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a validação de um método de LC-MS/MS para dosagem da vancomicina e da creatinina em amostras de DBS, o MT pode se tornar acessível em hospitais cujos laboratórios não possuem estrutura para dosagem de nível sérico de medicamentos. A coleta de sangue em pacientes pediátricos ou em pacientes com restrições de coleta de sangue venoso será facilitada pelo uso deste método menos invasivo e menos dolorido. Entretanto, como não foi possível prever as concentrações plasmáticas de vancomicina a partir das concentrações em DBS, estudos futuros são necessários para explicar e excluir as causas da alta variabilidade das razões entre as concentrações de vancomicina no plasma e em DBS, como o tempo de secagem das amostras e a influência de diferentes matrizes.

A avaliação de dois imunoenaios, CMIA e KIMS, comparados com LC-MS/MS, mostrou boa correlação e concordância. O pequeno erro proporcional encontrado indica que, quanto maior a concentração de vancomicina, maior a diferença entre os métodos, embora não significativa. O acúmulo de CDP-1 poderia explicar este achado, entretanto a presença de CDP-1 não foi avaliada neste estudo. Sugere-se, então, que estudos futuros avaliem a presença deste produto de degradação em amostras de pacientes sob terapia de substituição renal.

APÊNDICES

Apêndice 1 - **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do Projeto CAAE: 68999917.9.1001.5327

Título do Projeto: Monitoramento Terapêutico de Antibióticos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas utilizando Sangue Capilar em DBS - DRIED BLOOD SPOTS (mancha de sangue seco em papel): Validação Analítica e Clínica

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é otimizar o tratamento de infecções graves causadas por bactérias resistentes a quase todos os antibióticos. Estamos testando uma técnica nova de coleta de sangue, através de punção da ponta do dedo com uso de uma lanceta. A gota de sangue é coletada por um papel filtro, igual ao utilizado no teste do pézinho em recém-nascidos. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Infectologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Estamos realizando este estudo, porque não existem novos antibióticos para o tratamento deste tipo de infecção, sendo necessário aumentar a dosagem dos antibióticos que já existem, em especial da vancomicina, mas sem atingir níveis tóxicos. Para isso, utilizam-se recursos como a dosagem da quantidade do antibiótico no sangue para que o médico escolha uma dose que seja suficiente para eliminar a bactéria sem causar prejuízo para o paciente. Esta nova técnica de coleta tem vantagens sobre a coleta de sangue venoso normalmente utilizada: é menos invasiva, menos dolorida, utiliza menor volume de sangue coletado e é mais estável até ser analisada.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

As coletas das amostras de sangue serão realizadas no HCPA. A coleta de amostras de sangue será realizada para dosagem do nível sanguíneo da vancomicina. As coletas serão realizadas de duas maneiras, por punção digital, de onde serão colhidas de 4 a 5 gotas de sangue e por punção venosa, de onde serão colhidos 5 ml de sangue, quantidade equivalente a 1 colher de chá. Estas amostras serão enviadas para o Laboratório de Toxicologia da Feevale, em Novo Hamburgo, onde serão realizadas as medidas de concentração do antibiótico nas amostras de sangue. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão descartadas.

Também será realizada consulta de dados referentes ao paciente, como resultados de exames e informações sobre o diagnóstico, obtidos através do prontuário. Os dados obtidos não influenciam de nenhum modo o tratamento do paciente, nem a conduta do seu médico assistente.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são relacionados à punção venosa, como dor, inflamação, hematoma, formação de coágulo, infecção ou extravasamento no local da coleta.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa não são diretos, entretanto sua participação contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e deverá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Em caso de dúvidas, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Alexandre Prehn Zavascki, pelos telefones 997149578 ou 33621850 ou com a pesquisadora Letícia Vale Scribel Zimmer pelo telefone 998585410 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do responsável (se aplicável)

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Apêndice 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Nº do Projeto CAAE: 29805320.3.1001.5327****Título do Projeto: “Avaliação de dois métodos comerciais para dosagem de vancocinemia em pacientes sob terapia de substituição renal”**

Você está sendo convidado (a) a participar dessa pesquisa pois verificamos que você está/estava realizando tratamento com o antibiótico chamado VANCOMICINA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou Hospital Moinhos de Vento (HMV), e fez o procedimento de hemodiálise durante este tratamento.

O objetivo principal deste projeto é melhorar o tratamento de infecções graves causadas por bactérias resistentes a quase todos os antibióticos. Neste caso, vamos comparar dois métodos de laboratório diferentes que medem a quantidade do antibiótico vancomicina no sangue de pacientes que fazem hemodiálise durante este tratamento. Dosar o nível de vancomicina no sangue é importante para calcular a dose ideal deste antibiótico de forma individualizada, melhorando o tratamento e diminuindo o risco das bactérias causadoras da infecção se tornarem resistentes a todos os antibióticos disponíveis para seu tratamento.

Estamos realizando este estudo porque a dose de vancomicina pode precisar ser aumentada para ter melhor efeito contra a bactéria causadora da infecção, mas sem atingir níveis tóxicos para seu corpo. Para isso, utilizam-se recursos como a dosagem da quantidade do antibiótico no sangue para que o médico escolha uma dose que seja suficiente para eliminar a bactéria sem causar prejuízo para o paciente. Este estudo é importante pois permite calcular a dose do medicamento com mais precisão, podendo aumentar sua concentração com segurança, evitando toxicidade e diminuindo o risco de resistência da bactéria ao antibiótico. Assim, aumenta a eficácia do tratamento eliminando as bactérias causadoras da infecção em menor tempo e com menos efeitos colaterais.

Como a vancomicina é degradada pelos rins, pacientes que fazem hemodiálise durante o tratamento com este antibiótico podem acumular no sangue um produto de degradação que não tem ação contra as bactérias, mas que interfere no resultado do exame laboratorial, produzindo resultados falsamente aumentados dependendo o método utilizado. Resultados falsamente aumentados podem levar o médico a prescrever uma dose menor do que a necessária, podendo levar a resistência bacteriana e até falha no tratamento.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Infectologia do HCPA e pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HMV.

Se você concordar em participar, será aproveitada uma amostra de sangue que já foi coletada para seus exames de rotina, não sendo necessário fazer uma nova coleta de sangue específica para esta pesquisa. Depois da análise no laboratório do Hospital no qual você está recebendo o tratamento – HCPA ou HMV -, uma parte destas amostras serão enviadas para o Laboratório de Toxicologia da Feevale, em Novo Hamburgo, onde serão feitas as medidas de concentração do antibiótico por um

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 3

método diferente daquele realizado no hospital, e os resultados serão comparados.

Não serão realizadas novas coletas além daquelas previstas na rotina da prescrição médica. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão descartadas.

Também será realizada consulta do prontuário para obter informações como resultados de exames e informações sobre o diagnóstico. Os dados obtidos não influenciam de nenhum modo o tratamento do paciente, nem a conduta do seu médico assistente.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são relacionados à punção venosa, como dor, inflamação, hematoma, formação de coágulo, infecção ou extravasamento no local da coleta.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa não são diretos, entretanto sua participação contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e deverá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Em caso de dúvidas, se a sua coleta foi realizada no HCPA, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Alexandre Prehn Zavascki, pelo telefone 33597749, com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h. Se a sua coleta foi realizada no Hospital Moinhos de Veto – sob coordenação do Dr. Guilherme Alcides Flores Rollin, eu fica na rua Tiradentes, 198, subsolo, Bairro Floresta, Porto Alegre – RS, e-mail cep.iep@hmv.org.br, telefone 3314 3537, das 8h às 18h. Você ainda pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale pelo e-mail: cep@feevale.br ou pelo telefone: (51) 3586 8800, ramal 9065.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do responsável (se aplicável)

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____