



VNIVERSITATĒ VALÈNCIA

() **Facultat de Química**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS AJUSTADOS A PROPÓSITO
PARA LA MONITORIZACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS CLÍNICO.
APLICACIÓN A ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS**

Memoria para alcanzar el Grado de Doctor en Química dentro del Programa de
Doctorado en Química (R.D. 1999/2011) presentada por:

CARLOS EZQUER GARIN

Directoras:

Dra. M^a José Medina Hernández

Dra. Laura Escuder Gilabert

Tutor:

Dr. Rafael Ferriols Lisart

Valencia, diciembre de 2022

Programa de Doctorado 3154 en Química (RD 99/2011)

Facultad de Química

Universitat de València

Doctorando

Carlos Ezquer Garin

Licenciado en Farmacia

Máster en Técnicas Experimentales en Química

Universitat de València

Directoras

Dra. M^a José Medina Hernández

Catedrática de Universidad. Departamento de Química Analítica. Facultad de Farmacia. Universitat de València

Dra. Laura Escuder Gilabert

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universitat de València

Tutor

Dr. Rafael Ferriols Lisart

Profesor Asociado Asistencial. Departamento de Tecnología Farmacéutica y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universitat de València

Facultativo Especialista de Departamento del Servicio de Farmacia. Hospital Clínico Universitario de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Clínico Universitario de Valencia

Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

Publicado en Valencia, 2023



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

D^a. M^a José Medina Hernández, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la de la Universitat de València, D^a. Laura Escuder Gilabert, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València y D. Rafael Ferriols Lisart, Profesor Asociado del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada "Desarrollo y validación de métodos cromatográficos ajustados a propósito para la monitorización de antimicrobianos de interés clínico. Aplicación a estudios farmacocinéticos" constituye la Tesis Doctoral de D. CARLOS EZQUER GARIN

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado los distintos aspectos del presente trabajo, así como su redacción y dan el visto bueno para su depósito.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, diciembre de 2022.

Dra. M^a José Medina Hernández Dra. Laura Escuder Gilabert Dr. Rafael Ferriols Lisart

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que esta Tesis Doctoral sea hoy una realidad.

En primer lugar a mis Directoras de Tesis. De manera especial a la Dra. Ma José Medina, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia y a la Dra. Laura Escuder, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, quienes me ofrecieron la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral en su Departamento. También a mi tutor de Tesis, el Dr. Rafael Ferriols, Profesor Asociado del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia, y Farmacéutico Especialista en Farmacia Hospitalaria del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por aportar su experiencia y conocimiento del ámbito clínico a esta Tesis.

En segundo lugar, agradecer a todo el personal del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por su apoyo y comprensión durante todos estos años. De manera especial al Dr. José Magraner y al Dr. Manuel Alós, por la oportunidad que me han brindado de poder desarrollar mi labor investigadora dentro del apasionante mundo del análisis cromatográfico aplicado a las ciencias farmacéuticas.

Agradecer al Dr. Gerardo Aguilar del Servicio de Anestesia y Reanimación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, a la Dra. Nieves Carbonell de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y al Dr. Carlos Solano del Servicio de Oncohematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por las facilidades que me han ofrecido para realizar esta Tesis.

Agradezco al Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, en especial, a la línea de investigación de Farmacia su cobertura en la ejecución de este proyecto.

Agradecer también a la Dra. Gloria Segarra y al Dr. Pascual Medina, por abrirme las puertas del laboratorio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, por esas emocionantes y largas tardes de análisis cromatográfico que hemos tenido. Espero que el futuro nos brinde nuevos e interesantes proyectos de investigación (y publicaciones científicas). A mi amigo y compañero de trabajo, el Dr. José Enrique Muñoz, por esas conversaciones durante el café que hacen la jornada laboral más amena. A los ya ex-residentes y especialistas en Farmacia Hospitalaria, Pablo Fernández (Gauss) y a Manuel Koninckx.

Mi agradecimiento a mis padres, porque sin ellos no habría llegado a donde he llegado. A mi hermana Mariángeles por confiar en mí y apoyarme en todo momento. A mi hermano Nacho que se que siempre está ahí y con quien, debido a su trayectoria científica y profesional (ATGC), puedo hablar de ciencia en casa. A mi tia Maricarmen por nuestras conversaciones filosóficas para tratar de arreglar el mundo. A mi mujer, por su inmenso apoyo y comprensión a lo largo de toda esta etapa, especialmente en los duros momentos propios de toda investigación. A mis hijos, Andrea y Pablo, por el tiempo que les he robado. A Concha y a Pedro, por su apoyo durante todos estos años.

Por último, agradecer a mi primo Gelchu, a mi "maestro Samurái" y a mis amigos más cercanos, Edu, Kike, Carlos, Salva, Nacho, Javi, Juanma, y a todos los demás que no puedo incluir aquí (disculparme).

A todos ellos, muchas gracias.

A mi Padre

RESUMEN

La infección en el entorno hospitalario es a día de hoy uno de los mayores desafíos en el ámbito sanitario. La elevada incidencia a nivel mundial en la aparición de estas infecciones incrementa la tasa de morbimortalidad y el gasto sanitario, y es considerado un problema de salud pública. Las infecciones tanto en pacientes críticos como oncohematológicos trasplantados presentan una incidencia elevada y se asocian a un incremento en la tasa de mortalidad hospitalaria. El tratamiento de estas infecciones se basa en el uso racional de antimicrobianos como antibacterianos y antifúngicos capaces de eliminar al patógeno. Las pautas empleadas para la dosificación de antimicrobianos en este tipo de pacientes pueden no ser adecuadas, ya que éstas derivan de estudios realizados con sujetos sanos con características diferentes a las de los pacientes a tratar. Esto puede dar lugar a concentraciones inadecuadas de fármaco en el organismo, con consecuencias no deseadas.

La optimización de estas terapias mediante la individualización posológica es un objetivo en el tratamiento de estas infecciones. Así, la implementación de programas para la monitorización de antimicrobianos y su estudio farmacocinético ha demostrado ser efectiva en este tipo de pacientes. Para conseguir este objetivo, existen guías publicadas por parte de diferentes sociedades científicas que recomiendan el empleo de métodos validados basados en cromatografía de líquidos de alta resolución que sean capaces de dar un resultado analítico con rapidez para ser útiles en el ámbito asistencial (~24 h desde la extracción de la muestra hasta la notificación de los resultados analíticos).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo, puesta a punto y validación de métodos cromatográficos ajustados a propósito para la monitorización de antimicrobianos de interés en muestras de plasma de pacientes tratados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los antimicrobianos monitorizados incluyen antibacterianos (meropenem, piperacilina, ceftolozano combinado con tazobactam y amikacina) y antifúngicos (voriconazol, caspofungina y anidulafungina).

Se realizó una validación completa de las características analíticas de cada uno de los métodos desarrollados siguiendo las recomendaciones descritas en la guía publicada por la Agencia Europea del Medicamento. Los métodos cromatográficos desarrollados y validados en la presente Tesis Doctoral se emplearon en la monitorización clínica de pacientes bajo tratamiento antimicrobiano, así como en el estudio del perfil farmacocinético de ciertos antimicrobianos en pacientes sometidos a técnicas de depuración extracorpórea.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN	3
I.1.- Epidemiología de la infección en el ámbito hospitalario	3
I.2.- Etiología de la infección en el ámbito hospitalario	5
I.3.- Terapia antimicrobiana frente a la infección en el ámbito hospitalario	7
I.4.- Problemática del empleo de la terapia antimicrobiana en el paciente crítico y paciente oncohematológico trasplantado en el ámbito hospitalario	9
I.5.- Optimización de la terapia antimicrobiana frente a la infección en el ámbito hospitalario	12
I.6.- Implementación de programas para la monitorización de antimicrobianos en la práctica clínica	15
I.6.1.- Modelos farmacocinéticos	16
I.6.2.- Métodos de ajuste de datos	18
I.6.3.- Optimización de la terapia antimicrobiana mediante la monitorización	23
I.7.- Papel de las Unidades Hospitalarias de Farmacocinética Clínica en la monitorización de fármacos	24
I.8.- Empleo de técnicas analíticas para la monitorización de antimicrobianos	25
I.8.1.- Técnicas de inmunoensayo	26
I.8.2.- Técnicas cromatográficas	28
I.9.- Validación de métodos analíticos para la monitorización de fármacos en el ámbito hospitalario	46
CAPÍTULO II.- OBJETIVOS	49
CAPÍTULO III.- EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA GENERAL	53
III.1.- Instrumentación	55
III.2.- Reactivos y disoluciones	57
III.3.- Procedimientos	58
III.3.1.- Acondicionamiento de los sistemas cromatográficos	58
III.3.2.- Cálculo de los factores de retención y de los factores de asimetría	58
III.3.3.- Validación de los métodos desarrollados según las recomendaciones de la EMA	59
III.3.4.- Aseguramiento interno de la calidad de los resultados	62
III.3.5.- Análisis farmacocinético	63
III.4.- Programas informáticos empleados	65
CAPÍTULO IV.- ANTIBACTERIANOS I: MEROPENEM Y PIPERACILINA	67
IV.1.- Introducción	69
IV.1.1.- Características generales	69
IV.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	70
IV.1.3.- Propiedades farmacológicas	70
IV.1.4.- Espectro antimicrobiano	71
IV.1.5.- Perfil farmacocinético	72
IV.1.6.- Perfil farmacodinámico	73
IV.1.7.- Perfil de seguridad	73
IV.2.- Objetivos	75

IV.3.- Experimental	76
IV.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles	76
IV.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa	77
IV.3.3.- Procedimientos	77
IV.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo	77
IV.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	78
IV.3.3.3.- Condiciones cromatográficas	78
IV.4.- Resultados y discusión	79
IV.4.1.- Desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de MER y PIP en muestras de plasma	79
IV.4.1.1.- Composición de la fase móvil	79
IV.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma	80
IV.4.2.- Validación de los métodos desarrollados	84
IV.4.3.- Monitorización de MER y PIP en pacientes críticos hospitalizados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia	91
IV.5.- Conclusiones	95

CAPÍTULO V.- ANTIBACTERIANOS II: CEFTOLOZANO COMBINADO CON TAZOBACTAM

V.1.- Introducción	99
V.1.1.- Características generales	99
V.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	99
V.1.3.- Propiedades farmacológicas	100
V.1.4.- Espectro antimicrobiano	100
V.1.5.- Perfil farmacocinético	100
V.1.6.- Perfil farmacodinámico	101
V.1.7.- Perfil de seguridad	101
V.2.- Objetivos	102
V.3.- Experimental	103
V.3.1.- Preparación de patrones de calibración, controles y PI	103
V.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa	104
V.3.3.- Procedimientos	104
V.3.3.1.- Dosificación del paciente en estudio y tiempos de muestreo	104
V.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	105
V.3.3.3.- Condiciones cromatográficas	105
V.4.- Resultados y discusión	106
V.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de CEF/TAZ en muestras de plasma	106
V.4.1.1.- Composición de la fase móvil	106
V.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma	108
V.4.2.- Validación del método desarrollado	110
V.4.3.- Monitorización de CEF y TAZ en un paciente crítico sometido a RRT hospitalizado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental	116
V.5.- Conclusiones	120

CAPÍTULO VI.- ANTIBACTERIANOS III: AMIKACINA	121
VI.1.- Introducción	123
VI.1.1.- Interés clínico de los antibióticos aminoglucósidos	123
VI.1.2.- Determinación de amikacina en muestras de plasma	127
VI.2.- Objetivos	130
VI.3.- Experimental	131
VI.3.1.- Disoluciones	131
VI.3.2.- Procedimientos	132
VI.3.2.1.- Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de AMK	132
VI.3.2.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	132
VI.3.3.- Tratamiento de datos. Cálculo de los estadísticos de calidad	132
VI.4.- Resultados y discusión	134
VI.4.1.- Estudios preliminares	134
VI.4.1.1.- Estudio espectrofotométrico del derivado OPA-NAC-AMK. Influencia del pH sobre la estabilidad del derivado	134
VI.4.1.2.- Influencia del cambio de pH a posteriori sobre la estabilidad del derivado	136
VI.4.1.3.- Estudio cromatográfico. Composición de la fase móvil	137
VI.4.2.- Estudio cromatográfico. Optimización de la reacción de derivatización	138
VI.4.2.1.- Relaciones molares OPA-NAC/AMK	139
VI.4.2.2.- Relaciones molares NAC/AMK	140
VI.4.2.3.- Condiciones de incubación	141
VI.4.2.4.- Condiciones óptimas	142
VI.4.3.- Validación preliminar del método analítico para la determinación de AMK en muestras de plasma	144
VI.4.3.1.- Linealidad	144
VI.4.3.2.- Estimación de la exactitud y precisión	145
VI.4.3.3.- Estudio comparativo entre HPLC y FPIA	146
VI.5.- Conclusiones	149
CAPÍTULO VII.- ANTIFÚNGICOS I: VORICONAZOL	151
VII.1.- Introducción	153
VII.1.1.- Características generales	153
VII.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	153
VII.1.3.- Propiedades farmacológicas	154
VII.1.4.- Espectro antimicrobiano	154
VII.1.5.- Perfil farmacocinético	155
VII.1.6.- Perfil farmacodinámico	155
VII.1.7.- Perfil de seguridad	156
VII.2.- Objetivos	157
VII.3.- Experimental	158
VII.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles	158
VII.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa	159

VII.3.3.- Procedimientos	159
VII.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo	159
VII.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	159
VII.3.3.3.- Condiciones cromatográficas	160
VII.4.- Resultados y discusión	161
VII.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de VOR en muestras de plasma	161
VII.4.1.1.- Composición de la fase móvil	161
VII.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma	162
VII.4.2.- Validación del método desarrollado	165
VII.4.3.- Monitorización de VOR en pacientes tratados en el Servicio de Oncohematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia	170
VII.5.- Conclusiones	173
CAPÍTULO VIII.- ANTIFÚNGICOS II: CASPOFUNGINA	175
VIII.1.- Introducción	177
VIII.1.1.- Características generales	177
VIII.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	178
VIII.1.3.- Propiedades farmacológicas	178
VIII.1.4.- Espectro antimicrobiano	178
VIII.1.5.- Perfil farmacocinético	178
VIII.1.6.- Perfil farmacodinámico	179
VIII.1.7.- Perfil de seguridad	180
VIII.2.- Objetivos	181
VIII.3.- Experimental	182
VIII.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles	182
VIII.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa	183
VIII.3.3.- Procedimientos	183
VIII.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo	183
VIII.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	183
VIII.3.3.3.- Condiciones cromatográficas	184
VIII.4.- Resultados y discusión	185
VIII.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de CASP en muestras de plasma	185
VIII.4.1.1.- Composición de la fase móvil	185
VIII.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma	186
VIII.4.2.- Validación del método desarrollado	189
VIII.4.3.- Monitorización de CASP en pacientes críticos hospitalizados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental	193
VIII.5.- Conclusiones	198

CAPÍTULO IX.- ANTIFÚNGICOS III: ANIDULAFUNGINA	199
IX.1.- Introducción	201
IX.1.1.- Características generales	201
IX.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	201
IX.1.3.- Espectro antimicrobiano	202
IX.1.4.- Perfil farmacocinético	202
IX.1.5.- Perfil farmacodinámico	203
IX.1.6.- Perfil de seguridad	203
IX.2.- Objetivos	204
IX.3.- Experimental	205
IX.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles	205
IX.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa	206
IX.3.3.- Procedimientos	206
IX.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo	206
IX.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma	207
IX.3.3.3.- Condiciones cromatográficas	207
IX.4.- Resultados y discusión	208
IX.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de ANI en muestras de plasma	208
IX.4.1.1.- Composición de la fase móvil	208
IX.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma	209
IX.4.2.- Validación del método desarrollado	211
IX.4.3.- Monitorización de ANI en un paciente crítico hospitalizado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental	215
IX.5.- Conclusiones	219
 CAPÍTULO X.- CONCLUSIONES	 221
 CAPÍTULO XI.- BIBLIOGRAFÍA	 225
 CAPÍTULO XII.- ANEXOS	 269
XII.1.- Anexo I: Nomenclatura	271
XII.1.1.- Abreviaturas	271
XII.1.2.- Símbolos de parámetros farmacocinéticos, fisicoquímicos, cromatográficos y estadísticos	274
XII.2.- Anexo II: Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral	277
XII.3.- Anexo III: Documentos del Comité Ético de Investigación Clínica	281

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La **infección** se define como el proceso en el que un microorganismo invade a otro organismo llamado hospedador y se multiplica en sus tejidos. Puede llegar a ser clínicamente imperceptible o, por el contrario, puede dar lugar a un daño celular a nivel local debido a la acción de toxinas, a la replicación intracelular o a una respuesta inmunitaria exacerbada [1]. El proceso de la infección se basa en una serie de eventos bien organizados que pueden dar lugar a la destrucción de los tejidos del hospedador o incluso a la muerte de este último. La gravedad de una infección depende del microorganismo involucrado en la infección, del lugar donde se localiza la misma y de las características intrínsecas del hospedador.

Los microorganismos presentan ciertas características generales como una elevada transmisibilidad y adherencia a células del hospedador, capacidad para invadir sus tejidos y órganos, así como para evadir su sistema inmunitario. Se entiende por invasión al proceso en el que microorganismos con capacidad patógena frente al hospedador penetran en sus células o tejidos y llegan a diseminarse dentro del organismo.

Según Bone y col., la **sepsis** se define como la respuesta inflamatoria sistémica en el organismo hospedador frente a la infección causada por un microorganismo. La enfermedad y sus secuelas se manifiestan como estadios progresivos de un mismo proceso, en el cual la respuesta del hospedador a la infección da lugar a una reacción inflamatoria generalizada de órganos distantes a la lesión inicial que puede incluso provocar una disfunción multiorgánica [2]. Cuando la sepsis va asociada a esta disfunción, hipotensión arterial e hipoperfusión, se habla de sepsis severa [3-5]. Igualmente, se define el choque séptico como el cuadro de sepsis severa que cursa con hipotensión arterial que no responde a reanimación mediante fluidos de reposición [3], y que requiere del empleo de fármacos vasopresores [4, 6].

La sepsis es un problema importante, ya que representa aproximadamente la décima causa de muerte en los países industrializados, y la principal causa de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) [7].

I.1.- Epidemiología de la infección en el ámbito hospitalario

La infección en el ámbito hospitalario, también denominada infección nosocomial, es a día de hoy uno de los mayores problemas en el ámbito sanitario. Se estima que entre siete y diez de cada cien pacientes hospitalizados pueden adquirir infecciones [8-9]. Según los estudios de extensión realizados tanto en Estados Unidos como en Europa recientemente, se ha calculado una incidencia en la

aparición de infecciones hospitalarias que puede oscilar entre 13-20 episodios cada 1000 días, por cada paciente hospitalizado [10].

Este problema de gran relevancia afecta a un elevado número de pacientes a nivel mundial, lo que incrementa significativamente tanto la tasa de mortalidad hospitalaria como el gasto económico sanitario [11]. Se calcula que en países desarrollados la tasa de incidencia en la aparición de infecciones hospitalarias se sitúa entre el 3.5-12 %, mientras que en países en vías de desarrollo está entre el 5.7-19.1 % [12]. En cuanto al aspecto económico, se ha visto que en Estados Unidos las infecciones hospitalarias pueden llegar a incrementar el gasto sanitario total anual en una cifra aproximada de 10 billones de dólares, lo que supone un problema de salud pública en lo que a gestión de recursos sanitarios en materia económica se refiere [13].

Los pacientes con mayor riesgo de padecer una infección en el ámbito hospitalario son aquellos ingresados en las UCI [14-15], unidades de quemados o neonatología, así como los pacientes oncohematológicos sometidos a trasplante de órganos.

De todas las infecciones hospitalarias, las infecciones de pacientes ingresados en las UCI son las que mayor incidencia presentan en comparación con el resto de unidades hospitalarias [14-15]. Así, se ha observado que, en estos casos, la proporción de pacientes infectados puede llegar a ser del 51 % a pesar de que hasta un 71 % de éstos se encuentra bajo terapia antimicrobiana [7, 16-17]. Las infecciones hospitalarias más frecuentes en las UCI son aquellas relacionadas con procedimientos altamente invasivos previos a la administración parenteral de la terapia antimicrobiana [18]. En este sentido, son las infecciones de tracto urinario, las asociadas a cateterismos, las respiratorias causadas por ventilación mecánica, o las de piel y tejidos blandos las encontradas más frecuentemente en el paciente ingresado en las UCI. En los estudios *European Prevalence of Infection in Intensive Care* (EPIC I) y *Extended Study on Prevalence of Infection in Intensive Care* (EPIC II y EPIC III) [7, 16-17], se ha puesto de manifiesto que las infecciones hospitalarias presentan cada vez mayor prevalencia y están asociadas a un peor pronóstico clínico para el paciente hospitalizado. Se indica que los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de una infección hospitalaria son el tiempo de ingreso o de permanencia en una UCI y el empleo de cateterismos o de ventilación mecánica. Adicionalmente, los autores señalan un aumento en la incidencia por infecciones hospitalarias causadas por microorganismos resistentes a la terapia antimicrobiana empleada habitualmente en la práctica clínica.

Los pacientes oncohematológicos sometidos a procedimientos de trasplante de órganos presentan un mayor riesgo de desarrollo de infecciones fúngicas invasivas (IFI) [19-22]. Se ha observado que el riesgo de desarrollo de IFI a nivel hospitalario puede llegar a ser del 14-18 % para aquellos pacientes con algún síndrome mielodisplásico bajo tratamiento con quimioterapia, y de un 9 % para pacientes sometidos a trasplante hematopoyético de células madre [23]. Adicionalmente, también se ha observado que las IFI en el paciente oncohematológico están directamente relacionadas con un aumento significativo de la mortalidad hospitalaria, resultando especialmente alarmante en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético de células madre (tasas de mortalidad de entre el 20-50 %) a pesar de disponer de terapia antifúngica.

I.2.- Etiología de la infección en el ámbito hospitalario

Los principales microorganismos responsables de las infecciones en el ámbito hospitalario son las bacterias, los hongos y los virus. En la Tabla I.1 se muestran los resultados obtenidos en el estudio EPIC III realizado en 2017 en el que se analizaron los datos correspondientes a 15202 pacientes adultos, de los cuales 8135 (54 %) presentaban una infección confirmada o estaban bajo sospecha de la misma. En el estudio participaron 1150 centros de un total de 88 países [7].

Tabla I.1.- Prevalencia de los microorganismos encontrados en el estudio EPIC III [7].

Patógeno	Prevalencia (%)
Bacterias gramnegativas	67.1
▪ Enterobacterias (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> y <i>Enterobacter spp.</i>)	25.5
▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.2
▪ <i>Acinetobacter</i>	11.4
Bacterias grampositivas	
▪ <i>Staphylococcus aureus</i>	9.6
▪ <i>Staphylococcus aureus resistente a meticilina</i>	4.6
Hongos	16.4
Virus	3.7

Como se puede observar en la Tabla I.1, las **bacterias** son, con diferencia, los microorganismos responsables de la mayor parte de las infecciones hospitalarias (81 %), especialmente las bacterias gramnegativas (67 %), tanto a nivel hospitalario (71%) [7].

Frecuentemente, las bacterias causantes de este tipo de infecciones son bacterias de la propia flora saprófita de la especie humana que, en un momento dado, y debido a una eventual vulnerabilidad del sistema inmunitario, logran evadir las defensas del hospedador dando lugar a una infección. Las bacterias gramnegativas aisladas más frecuentemente son especies de los géneros *Enterobacter* (26 %), *Pseudomonas* (16 %) y *Acinetobacter* (11 %), y son relevantes aquellas bacterias resistentes a los antibióticos, como algunas especies de los géneros *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.*, ya que están asociadas a un aumento significativo del riesgo de mortalidad hospitalaria [7]. En cuanto a las bacterias grampositivas, cobra protagonismo la infección por *Staphylococcus aureus*, especialmente aquellas cepas resistentes a meticilina, también llamadas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM).

No menos importantes son las infecciones hospitalarias causadas por *Clostridium difficile*, ya que estas son relativamente frecuentes en el ámbito hospitalario [14]. Esta bacteria se encuentra en la flora de intestino y colon de la especie humana y puede llegar a generar una infección oportunista a causa de un desequilibrio en la composición de la flora bacteriana saprófita o por una disbiosis ocasionada por el empleo de ciertos antimicrobianos [24].

Otro de los microorganismos frecuentemente involucrado en las infecciones hospitalarias son los **hongos** (16.4 %, [7]), especialmente en aquellos pacientes inmunodeprimidos, como pueden ser los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor sometidos a trasplante, los pacientes oncohematológicos, o los pacientes críticos que pueden llevar algún tipo de cateterismo. Son frecuentes las infecciones durante la estancia hospitalaria por especies del género *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.* o *Candida spp.*, éstas últimas a través de la contaminación ambiental del aire [11, 25].

Los **virus** son los microorganismos causantes del menor número (3.7 %) de infecciones hospitalarias [7]. Tienen relevancia los virus de la hepatitis B y C, frecuentemente transmitidos por una mala praxis médica con agujas de inyección [26], los de la gripe, herpes-simplex, el virus de inmunodeficiencia humana y el rotavirus [27]. Dado su impacto a nivel mundial, cabe citar las infecciones hospitalarias causadas por los virus de la familia *Coronaviridae*, como pueden ser las del coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio, o las del recientemente aparecido coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo [28-29].

I.3.- Terapia antimicrobiana frente a la infección en el ámbito hospitalario

Se entiende por antimicrobiano una sustancia química con capacidad para destruir microorganismos, o evitar su crecimiento. Los antimicrobianos pueden ser de origen natural, semisintético o sintético.

A diferencia de la gran mayoría de terapias farmacológicas que actúan sobre las células propias del paciente, los antimicrobianos actúan sobre células distintas a las del paciente u hospedador, a las que pretende eliminar en su totalidad. Se trata de un tipo de terapia etiológica, que busca la eliminación del microorganismo sin lesionar las células del hospedador.

Los antimicrobianos pueden clasificarse atendiendo al tipo de microorganismo a tratar en: antibióticos (antibacterianos), antifúngicos, antivíricos, antimicobacterianos así como antiparasitarios. Esta Tesis Doctoral tiene por objeto la monitorización de agentes antibióticos y antifúngicos (agentes cuya actividad antimicrobiana es exclusiva frente a bacterias y hongos, respectivamente) que son los antimicrobianos de uso más frecuente a nivel hospitalario. En la Tabla I.2 y en la Tabla I.3 se muestran algunas de las principales familias químicas de agentes antibióticos y antifúngicos, respectivamente, empleadas para el tratamiento de infecciones en el ámbito hospitalario [30-31].

De acuerdo con los resultados del estudio *Global Point Prevalence Survey* realizado de enero a septiembre de 2015 en 303 hospitales de 53 países, el 89.3 % y el 4.2 % de las prescripciones de antimicrobianos fueron de antibióticos y antifúngicos de uso sistémico, respectivamente [32]. Los agentes antibióticos más empleados fueron las penicilinas, como piperacilina (PIP)/tazobactam (TAZ) (4.8 %) y amoxicilina/ácido clavulánico (8.9 %), las quinolonas (12.8 %), los carbapenémicos (principalmente meropenem (MER) con un 12.2%) y los glucopéptidos (principalmente vancomicina). Estos fármacos se utilizaron para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias (neumonía), piel, tejidos blandos y tracto urinario tanto en servicios de trasplantes, unidades de pacientes críticos (UCI/Reanimación), servicios de neumología, oncohematología, áreas quirúrgicas y plantas de hospitalización.

En cuanto al consumo hospitalario de antifúngicos, fue la familia de los triazoles (como fluconazol, voriconazol (VOR), posaconazol e itraconazol) la más utilizada seguida de las equinocandinas, como caspofungina (CASP) (la más prescrita), anidulafungina (ANI) y micafungina. El consumo hospitalario de antifúngicos fue mayoritario en las unidades de pacientes críticos así como en los servicios de oncohematología [33].

Tabla I.2.- Principales familias de antibióticos empleadas para el tratamiento de infecciones bacterianas en el ámbito hospitalario [30-31].

Familia		Principales fármacos	Mecanismo de acción
betalactámicos	Penicilinas	Amoxicilina-clavulánico, ampicilina, bencilpenicilinas, cloxacilina, fenoximetilpenicilina, piperacilina (PIP)	Inhibición de la síntesis de la pared celular
	Cefalosporinas	Cefazolina, cefditoreno, cefepima (CEFE), cefixima, cefonicida, cefotaxima, ceftaxidima, ceftazidima, ceftioxiel, ceftriaxona, cefuroxima, ceftolozano (CEF)	
	Monobactamas	Aztreonam, carumonam	
	Carbapenémicos	Imipenem, ertapenem, meropenem (MER)	
Aminoglucósidos	Estreptomicinas	Estreptomicina	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
	Otros	Amikacina (AMK), gentamicina, tobramicina	
Glucopéptidos		Dalvabancina, teicoplanina, vancomicina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Oxazolidinonas		Eprezolid, linezolid, tedizolid	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
Tetraciclinas		Doxiciclina, minociclina, tetraciclina, tigeciclina	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
Fenicoles		Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
Lincosamidas		Clindamicina	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
Quinolonas	1ª generación	Tosufloxacin, miloxacin, ácido nalidixico	Interferencia en la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos
	2ª generación	Ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino	
	3ª generación	Gatifloxacino, grepafloxacino	
	4ª generación	Moxifloxacino, cinafloxacino	
Sulfamidas		Sulfadiazina, sulfametoxazol	Antimetabolito del ácido fólico
Trimetoprima		Trimetoprim	Antimetabolito del ácido fólico
Nitrofurantoina		Nitrofurazona	Inhibición de múltiples enzimas bacterianas
Otros		Mupirocina	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana
		Espectinomocina	
		Polimixinas	Alteración de la membrana citoplasmática
		Bacitracina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
		Fosfomicina	

Tabla I.3.- Principales familias de antifúngicos empleados en el ámbito hospitalario [30-31].

Familia		Principales fármacos	Mecanismo de acción
Poliénicos		Anfotericina B, nistatina	Alteración de la pared celular fúngica
No poliénicos		Griseofulvina	Inhibición de la división celular
Azoles	Imidazoles	Miconazol, ketoconazol	Inhibición del Citocromo P450 Alteración de la pared celular fúngica
	Triazoles	Fluconazol, isavuconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol (VOR)	
Pirimidinas fluoradas		Flucitosina	Inhibición de la división celular
Equinocandinas		Caspofungina (CASP), anidulafungina (ANI), micafungina	Alteración de la pared celular fúngica

I.4.- Problemática del empleo de la terapia antimicrobiana en el paciente crítico y paciente oncohematológico trasplantado en el ámbito hospitalario

Las concentraciones de fármaco en sangre están directamente relacionadas tanto con la seguridad como con la eficacia. Concentraciones subterapéuticas por una infradosificación son causa de fracaso terapéutico y de un aumento de la morbimortalidad hospitalaria [34-36], mientras que valores excesivamente altos pueden causar reacciones adversas como neurotoxicidad, hepatotoxicidad, alteraciones de la visión o encefalopatía [37-39].

Las pautas estándar para dosificación de antimicrobianos empleadas en la actualidad con frecuencia no resultan adecuadas para su empleo en el **paciente crítico** (UCI/Reanimación)[40-42], ya que éstas derivan de estudios realizados con individuos sanos o pacientes ambulatorios que no tienen en cuenta las diferentes características fisiológicas y farmacocinéticas encontradas en el paciente crítico.

La propia naturaleza de la infección, que provoca alteraciones y/o cambios significativos en el estado fisiológico del paciente crítico, así como las intervenciones que se realizan sobre estos pacientes (empleo de fluidoterapia, administración de fármacos vasoconstrictores, empleo de técnicas de depuración extracorpóreas, etc.) originan una alteración de los parámetros farmacocinéticos de los antimicrobianos en estos pacientes, y por consiguiente de la concentración y grado de exposición a los mismos. Así, en pacientes críticos con sepsis o choque séptico se produce:

- i. Aumento del volumen de distribución (V_d) y elevada variabilidad interindividual. El V_d de un fármaco, se define como el volumen aparente en el que se distribuye el fármaco en el organismo. En pacientes críticos este parámetro presenta una elevada variabilidad interindividual y puede llegar a duplicar el valor obtenido en pacientes no críticos. Esta alteración es frecuente con antimicrobianos hidrófilos, y puede dar lugar a una reducción de sus concentraciones en el organismo, especialmente en etapas tempranas de la sepsis [43]. Por ello, numerosos autores sugieren el empleo de dosis elevadas de estos fármacos para compensar el efecto dilución [41, 44-45]. Los principales factores involucrados en la alteración del V_d en el paciente crítico son:
- Aumento de la permeabilidad capilar. A consecuencia del desplazamiento de fluidos desde el compartimento intravascular hacia los espacios intersticiales (terceros espacios) durante el proceso de sepsis.
 - Procedimientos o intervenciones médicas. El empleo de fluidos de reanimación [46], circuitos extracorpóreos [47], ventilación mecánica [48] o la presencia de drenajes post-quirúrgicos [49].
 - Hipoalbuminemia. En pacientes críticos hay una reducción en la síntesis de proteínas con lo que existe una mayor fracción de antimicrobiano libre en el plasma, lo que da lugar a un mayor V_d [50-53].
- ii. Aumento del aclaramiento plasmático (Cl) y de su variabilidad interindividual. El Cl es el volumen de sangre, plasma o suero, filtrado de fármaco por unidad de tiempo. En este proceso intervienen diferentes vías de eliminación, como son la renal, la biliar o el metabolismo hepático. En el contexto del paciente crítico se ha observado un aumento significativo del Cl, así como de su variabilidad interindividual.

La infección severa cursa frecuentemente con el llamado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que puede desencadenar un aumento de la actividad cardíaca y de la perfusión sanguínea a diferentes órganos. Uno de esos órganos altamente perfundidos son los riñones, con lo que aumenta su función eliminadora y, por tanto, el Cl sobre ciertos fármacos [54-57]. Adicionalmente, una de las prácticas frecuentes en el cuidado de pacientes críticos se basa en la administración de fármacos vasoconstrictores, que también aumentan la actividad cardíaca [58].

También hay que tener en cuenta que si el paciente crítico con sepsis o *shock* séptico presenta un empeoramiento de la función renal se recurre a diferentes terapias de reemplazo renal (RRT, acrónimo de *renal replacement therapies*), como las terapias de reemplazo renal continuas (CRRT, acrónimo de *continuous renal replacement therapies*), hemodiálisis intermitente, o diálisis sostenida de baja eficiencia, que permiten eliminar productos de detoxificación generados. De todas ellas, la CRRT [59] es la más utilizada en el paciente crítico. El empleo de esta técnica provoca una alteración de los parámetros farmacocinéticos en muchos de los antimicrobianos empleados [60-61].

Al igual que las RRT, el empleo de la terapia de oxigenación mediante membranas extracorpóreas (ECMO, acrónimo de *extracorporeal membrane oxygenation*) puede alterar parámetros farmacocinéticos como el V_d y el CI de muchos antimicrobianos [62-65].

Por otra parte, concentraciones bajas de antimicrobiano en los pacientes críticos pueden provocar el desarrollo de resistencias a estos agentes [66]. Estas resistencias provienen de la capacidad de ciertos microorganismos para neutralizar el efecto de los antimicrobianos, y puede surgir por una mutación en el microorganismo o por la adquisición del gen de resistencia. Esta resistencia se ha observado principalmente en quinolonas [67] y betalactámicos [68-69]. Para ilustrar la magnitud del problema, en 2019 se registraron en la Unión Europea un total de 426277 infecciones causadas por microorganismos resistentes, las cuales dieron lugar a 33110 muertes atribuibles directamente a este fenómeno [70]. Adicionalmente, otro de los aspectos que también preocupa es el incremento anual de la prevalencia por infecciones hospitalarias causadas por cepas resistentes, especialmente las causadas por SARM, *Escherichia coli* multiresistente, así como las de la familia *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos [70-71].

Como se ha comentado anteriormente, en los **pacientes oncohematológicos sometidos a trasplante de órganos** también existe una alta predisposición a la aparición de infecciones hospitalarias, especialmente a las infecciones fúngicas. Al igual que se ha descrito para el paciente crítico, en el paciente oncohematológico algunos de los antifúngicos más empleados podrían presentar una elevada variabilidad en sus parámetros farmacocinéticos, lo que puede dar lugar a pautas de dosificación no ajustadas a las características fisiológicas y farmacocinéticas reales encontradas en estos pacientes [35].

En el caso concreto de VOR, empleado tanto para el tratamiento como para la profilaxis antifúngica, se ha visto que las principales causas que originan la elevada variabilidad de sus parámetros farmacocinéticos son el metabolismo

hepático saturable de carácter no lineal [72], la presencia de polimorfismos genéticos a nivel de las isoenzimas CYP2C19 que proporcionan diferentes tasas de metabolización hepática del fármaco [73-75], además de otros factores [35].

Una baja concentración de antifúngico en pacientes oncohematológicos trasplantados puede provocar el desarrollo de resistencias a los mismos. Esta resistencia se ha atribuido a una presión selectiva sobre determinadas especies de hongos a concentraciones de fármaco subterapéuticas [76]. Preocupan especialmente cepas del género *Candida spp.*, resistentes a tratamientos con triazoles o equinocandinas por su uso frecuente como tratamientos de primera y segunda línea. Se estima que hasta un 70% de las resistencias a los antifúngicos corresponden a cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei* [77]. Hay que destacar también que en los últimos años ha habido un aumento significativo en la tasa de infecciones hospitalarias causadas por cepas resistentes de *Candida auris* [78-79].

I.5.- Optimización de la terapia antimicrobiana frente a la infección en el ámbito hospitalario

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para mejorar la calidad asistencial del paciente hospitalizado. Se ha visto que cuando éste presenta un cuadro de infección, sepsis o *shock* séptico, la terapia antimicrobiana proporciona mejores resultados de morbimortalidad que las nuevas estrategias de tratamiento basadas en el empleo de proteína C (autotrombina II-A), antitrombina II o insulina [41]. Por lo tanto, es lógico pensar que la optimización del empleo de estas terapias debe de ser el eje central y objetivo prioritario en el tratamiento de las infecciones dentro del ámbito hospitalario.

Por otro lado, en las últimas décadas ha habido una disminución progresiva en el desarrollo y comercialización de nuevos antimicrobianos [80], así como un incremento progresivo y generalizado de las resistencias a los mismos [80-81]. La Organización Mundial de la Salud y la Unión Europea instan a los países a implementar estrategias para el uso racional y prudente del arsenal terapéutico disponible y a optimizar su uso, tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario [81-83].

Una de las estrategias propuestas para la optimización de la terapia con antimicrobianos es la basada en los denominados **índices u objetivos farmacocinéticos/farmacodinámicos**.

Las variables más importantes en farmacocinética en relación a la dosificación de antimicrobianos son el V_d , el CI, la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y mínima ($C_{m\acute{i}n}$) alcanzadas en el intervalo de dosificación y el área bajo la curva concentración plasmática-tiempo (AUC, acrónimo de *area under curve*) de 0 a 24 horas.

Por otra parte, la variable farmacodinámica más importante en terapia antimicrobiana es la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo, tras un periodo de incubación. El parámetro CMI indica si el grado de exposición al antimicrobiano es adecuado.

Generalmente, los valores de CMI encontrados en los microorganismos aislados en las unidades hospitalarias para el cuidado de pacientes críticos son superiores a los valores encontrados en otros entornos no hospitalarios [84-85]. Lo ideal sería disponer de un valor de CMI para cada microorganismo en cada centro hospitalario. Sin embargo, a menudo este valor no puede obtenerse experimentalmente. En este caso, se recomienda el empleo de un valor CMI epidemiológico que sea superior a todos aquellos valores de CMI individuales de cada cepa estudiada. En Europa este valor epidemiológico es el ECOFF (*Eucast Epidemiological Cut-OFF*). El valor del ECOFF es el valor de CMI más alto obtenido de aquellas cepas que presentan ausencia de mecanismos adquiridos de resistencia fenotípicamente detectados. Por otra parte, hay que mencionar que otra alternativa disponible, también recomendable, es la modulación del valor ECOFF teniendo en cuenta la ecología local de cada medio hospitalario específico [86].

Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar básicamente en tres categorías [87]:

- **Antimicrobianos con actividad concentración dependiente.** Su eficacia antimicrobiana es mayor cuanto mayor es su concentración máxima. El objetivo farmacocinético/farmacodinámico que mejor describe su actividad es el cociente entre la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada en el intervalo de dosificación y la CMI ($C_{m\acute{a}x}/CMI$).
- **Antimicrobianos con actividad tiempo dependiente.** Su eficacia antimicrobiana es mayor cuanto mayor es el tiempo en el que su concentración en sangre se encuentra por encima de la CMI. El objetivo farmacocinético/farmacodinámico que mejor describe su actividad es el porcentaje de tiempo del intervalo de dosificación (% fT) durante el cual la concentración de antimicrobiano permanece por encima de la CMI (% $fT > CMI$).

- **Antimicrobianos con actividad concentración- y tiempo-dependientes.** El objetivo farmacocinético/farmacodinámico que mejor describe su actividad es el cociente AUC/CMI.

Cada agente antimicrobiano dispone de su propio objetivo farmacocinético/farmacodinámico, para el cual existen diferentes valores numéricos óptimos en función del microorganismo en cuestión y su CMI, así como de las condiciones fisiopatológicas del paciente bajo tratamiento. La consecución de estos objetivos se correlaciona con una mayor efectividad del tratamiento.

El éxito o fracaso terapéutico en el tratamiento de la infección hospitalaria depende de la selección del antimicrobiano adecuado y de la rapidez con la que éste se debe administrar una vez diagnosticado el agente causal infeccioso, aunque también del **tipo de administración sistémica** utilizado [40, 88].

Existen discrepancias en cuanto al beneficio clínico obtenido mediante el empleo de métodos de perfusión alternativos, como la perfusión continua o extendida, frente a la perfusión intermitente clásica [89-91]. Algunos autores reportan un beneficio global cuando se hace uso de la perfusión continua o extendida en casos concretos, como podría ser en el cuidado de pacientes críticos o en el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos con susceptibilidad reducida (valores elevados de CMI) [89]. Los estudios indican que el método de perfusión continua debe de ir acompañado de una dosis de carga inicial, ya que de no ser así el tiempo para alcanzar concentraciones adecuadas de fármaco en sangre se podría retrasar significativamente, con el perjuicio clínico que ello puede conllevar [89]. Actualmente, se está llevando a cabo el ensayo clínico multicéntrico *Betalactam Infusion Group* (BLING III) con el objetivo de demostrar si el empleo de la perfusión extendida podría estar correlacionado directamente con una disminución en la tasa de mortalidad a nivel hospitalario, cuando se compara con la mortalidad asociada al empleo de sistemas clásicos de perfusión [92].

Una práctica que puede emplearse para optimizar el tratamiento antimicrobiano se basaría en el empleo de varias alternativas, todas ellas orientadas a ajustar la dosificación de regímenes estandarizados. Una alternativa sería el empleo de técnicas de administración adecuadas, otra el reajuste posológico basado en la monitorización de las concentraciones plasmáticas seguido del cálculo de parámetros farmacocinéticos, así como la combinación de ambas.

I.6.- Implementación de programas para la monitorización de antimicrobianos en la práctica clínica

La idea de que las concentraciones plasmáticas de un fármaco en el paciente podían ser utilizadas para mejorar y optimizar los tratamientos farmacológicos fue propuesta en 1950 al aplicarse al tratamiento de las arritmias cardíacas con quinidina. Fue entonces cuando se estableció una correlación más estrecha y evidente entre la concentración y la respuesta, que la encontrada entre la dosis administrada y la respuesta, y, por tanto, la posible utilización de dichas concentraciones para la optimización de los tratamientos farmacológicos administrados [93].

La monitorización de las concentraciones de fármaco en plasma junto con la aplicación de criterios farmacocinéticos/farmacodinámicos, permite optimizar el tratamiento farmacológico de pacientes concretos. El objetivo final de la monitorización es encontrar un equilibrio entre la eficacia máxima y la toxicidad mínima de un fármaco mediante el ajuste o individualización de la dosis, todo ello basado o guiado por la determinación de las concentraciones de fármaco en el organismo empleando las técnicas analíticas adecuadas.

La monitorización requiere del conocimiento previo de datos clínicos, de los tiempos exactos de recogida de las muestras, de la existencia de tratamientos concomitantes, así como de disponer de un intervalo terapéutico o concentración diana [94]. En la Figura I.1 se muestra el esquema general para la interpretación farmacocinética haciendo uso de las concentraciones séricas en la estrategia de monitorización.

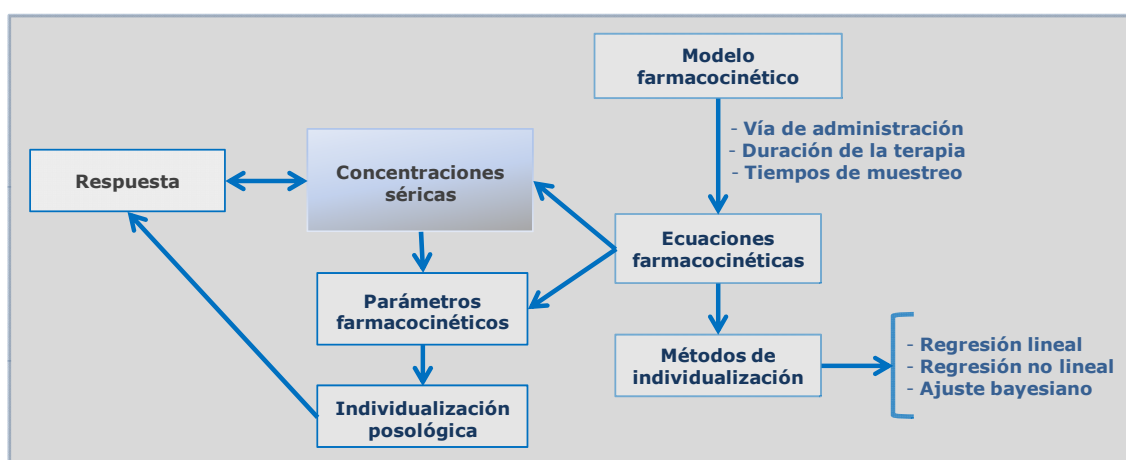


Figura I.1.- Esquema general de interpretación farmacocinética y utilización de concentraciones séricas en monitorización.

I.6.1.- Modelos farmacocinéticos

Un modelo farmacocinético describe la concentración plasmática de fármaco en el tiempo tras una determinada pauta de administración. Un modelo es la relación matemática entre los valores observados (por ejemplo, concentraciones plasmáticas) y todos aquellos factores que afectan a dicho valor (como función renal, hepática, etc.).

Los modelos farmacocinéticos permiten:

- Predecir las concentraciones de fármaco en los fluidos biológicos para cualquier régimen de dosificación empleado
- Calcular el régimen de dosificación óptimo para cada paciente
- Estimar la posible acumulación de fármaco o de sus metabolitos en el organismo
- Establecer una correlación entre las concentraciones de fármaco y el efecto farmacológico y/o toxicológico
- Evaluar las diferencias de biodisponibilidad y/o bioequivalencia entre diferentes presentaciones o formulaciones
- Describir el efecto de los cambios fisiológicos o patológicos en el proceso de absorción
- Estudiar tanto la distribución como la eliminación de los fármacos en el organismo
- Explicar fenómenos de interacción farmacológica entre diferentes fármacos administrados

Existen principalmente 2 tipos de modelos farmacocinéticos, los modelos compartimentales y los modelos fisiológicos. Los **modelos compartimentales** son modelos determinísticos, porque las concentraciones observadas determinan el tipo de modelo requerido para la descripción del perfil cinético del fármaco. Este tipo de modelos representa al organismo como una serie de compartimentos conectados de manera reversible entre ellos. El número de compartimentos necesarios para describir adecuadamente el comportamiento del fármaco en el organismo es el índice empleado para categorizar estos modelos. Así, se habla de modelos monocompartimentales, bicompartimentales o multicompartimentales. Desde el punto de vista matemático, estos modelos se construyen empleando ecuaciones diferenciales lineales. Conceptualmente, el fármaco tiene un comportamiento dinámico y la velocidad de los procesos se cuantifica mediante constantes de velocidad tanto de entrada como de salida para ese compartimento.

El modelo monocompartimental considera al organismo como un sistema homogéneo en donde la evolución temporal de las concentraciones de fármaco en sangre representa adecuadamente la evolución en cualquier punto del mismo. Cuando se asume este modelo, los cálculos que permiten determinar los parámetros son sencillos, pudiéndose realizar a partir de un número relativamente pequeño de datos experimentales. Adicionalmente, estos parámetros permiten realizar predicciones adecuadas, tanto de las concentraciones de fármaco como de las necesidades de dosificación. Por este motivo, el modelo monocompartimental se presenta como uno de los modelos farmacocinéticos más empleados en la monitorización.

Para otros fármacos cuya distribución es amplia en el organismo y su acceso a diferentes tejidos se realiza a una menor velocidad, es preferible emplear el modelo bicompartmental. Este modelo es más realista ya que tiene en cuenta con mayor rigor los procesos fisiológicos del organismo y presenta una mejor capacidad predictiva para aquellos fármacos con una marcada fase de distribución. Sin embargo, su empleo lleva implícito no sólo la disponibilidad de mayor información experimental, sino también una adecuada selección de los tiempos de muestreo que permitan una correcta caracterización de las fases de rápida y lenta disposición. En caso de no disponer de suficientes datos y optar por el modelo más sencillo, es necesario considerar los posibles errores, tanto en los parámetros farmacocinéticos obtenidos como en las recomendaciones posológicas derivadas de los mismos. En este punto es interesante resaltar que el uso de los métodos bayesianos en monitorización ha flexibilizado de manera considerable la selección del modelo farmacocinético, gracias a la disminución tanto de las necesidades de información experimental como de los criterios estrictos en los tiempos de muestreo.

Por otro lado, los **modelos fisiológicos**, también conocidos como modelos de flujos o de perfusión, están basados en el conocimiento de datos anatómicos y fisiológicos. La principal diferencia frente a los modelos compartimentales es que los modelos fisiológicos pueden ser aplicados a diferentes especies animales, permitiendo una extrapolación de los resultados obtenidos a la especie humana de manera sencilla y fiable.

En la actualidad los datos de concentración de fármaco en sangre, junto con toda la información clínica relevante y de tratamiento del paciente, es interpretada con ayuda de programas informáticos, en los cuales se incluyen diferentes modelos farmacocinéticos (mono, bi y tricompartmental con cinética lineal y modelo monocompartimental con cinética no lineal). Existen distintos programas

disponibles en el mercado. Aunque estos programas tienen una filosofía similar, presentan diferentes prestaciones con respecto a consideraciones farmacocinéticas subyacentes, fármacos disponibles, complejidad en el manejo, requerimiento de *hardware* o características de *software* [95-96]. El objetivo de estos programas informáticos es asistir al personal clínico en el diseño de regímenes de dosificación individualizados, así como facilitar la automatización de funciones en una Unidad de Farmacocinética Clínica de un Servicio de Farmacia Hospitalario.

I.6.2.- Métodos de ajuste de datos

En la práctica clínica la caracterización de parámetros farmacocinéticos individuales se obtiene ajustando los datos experimentales concentración-tiempo de cada paciente, a las ecuaciones matemáticas del modelo farmacocinético empleado. Para ello, se hace uso de los siguientes métodos de ajuste:

i.- Regresión lineal: este análisis consiste en ajustar una serie de datos experimentales a una ecuación definida por unos parámetros, con el fin de predecir los valores que tomará la variable dependiente en función de una variable independiente. Cuando la relación entre estas variables se ajusta a la ecuación de una recta, se habla de análisis por regresión lineal. La regresión lineal en farmacocinética ha sido un método de cálculo muy empleado debido a la facilidad para linealizar las ecuaciones farmacocinéticas mediante transformaciones logarítmicas. Esta técnica trata de ajustar una serie de datos experimentales (concentración-tiempo) a una ecuación farmacocinética con el fin de encontrar los parámetros que hacen mínimo el valor del sumatorio, denominado habitualmente suma de cuadrados (SS):

$$SS = \sum_{i=1}^n [\ln C_i - f(t, P_m)]^2 \quad (\text{Ec. I.1})$$

Donde n es el número de concentraciones disponibles, C_i el valor de concentración observado a tiempo t , P_m los parámetros a estimar y $f(t, P_m)$ la ecuación linealizada del modelo al que se pretenden ajustar los datos.

La regresión lineal tiene la ventaja de la sencillez, rapidez y simplicidad de cálculo. Sin embargo, presenta el inconveniente de una mayor incertidumbre asociada a la estimación de los parámetros, ya que precisa la transformación de concentraciones en sus correspondientes logaritmos, no permitiendo esta transformación en las varianzas o errores a ellas asociadas. Adicionalmente, los

parámetros pueden presentar una capacidad predictiva limitada a un periodo temporal corto y concreto, ya que sólo emplea información experimental correspondiente a un determinado intervalo posológico.

ii.- Regresión no lineal: es sin duda alguna, uno de los ajustes más frecuentemente empleados en la actualidad. La diferencia fundamental es que no requiere la linealización de la ecuación o transformación de las variables originales. En este caso, se emplea la ecuación correspondiente al modelo sin transformar, y el ajuste de los datos se realiza también por mínimos cuadrados:

$$SS = \sum_{i=1}^n W_i [C_i - f(t, P_m)]^2 \quad (\text{Ec. I.2})$$

El término W_i es un factor de ponderación que considera el distinto grado de incertidumbre que poseen los datos experimentales, y determina su mayor o menor influencia en el ajuste. Para el ajuste de las funciones se utilizan algoritmos de tipo iterativo, que a partir de un valor inicial de los parámetros (estimaciones iniciales), los va modificando hasta encontrar aquellos valores que hacen mínimo el valor de SS . Se pueden emplear algoritmos de búsqueda directa que consiguen una buena estimación, aunque las estimaciones iniciales estén muy alejadas de las reales, o bien algoritmos de gradiente, más precisos, pero más sensibles a errores en las estimaciones iniciales. Estos últimos incorporan errores de estimación que permiten proporcionar información sobre la fiabilidad de los parámetros estimados.

Las técnicas de regresión no lineal permiten emplear ecuaciones más complejas, utilizar toda la información disponible de concentraciones a lo largo del tiempo, e introducir en estas ecuaciones las variables clínicas relacionadas con los parámetros (p.ej., peso, CI), dando lugar a una mayor capacidad de predicción. El principal inconveniente de este tipo de ajuste es que requiere de un número mínimo de datos superior al número de parámetros a estimar. Por este motivo, en la práctica clínica el número de datos de concentración disponibles suele ser insuficiente para caracterizar correctamente los parámetros farmacocinéticos mediante este tipo de regresión.

iii.- Estimación bayesiana: este método de ajuste alternativo es de utilización creciente en el terreno de la farmacocinética. Su particularidad es la incorporación no sólo de la información experimental individual (concentración-tiempo), sino también de la información conocida sobre el comportamiento farmacocinético del fármaco en una población con características

fisiopatológicas similares a las del paciente tratado. La aplicación de la estimación bayesiana implica disponer de información farmacocinética en la población de estudio, como puede ser la población pediátrica, neonatos prematuros, ancianos, pacientes críticos o con insuficiencia renal o hepática.

Los parámetros poblacionales necesarios para ser implementados en un algoritmo bayesiano son de tres tipos:

- Parámetros de efectos fijos, que cuantifican tanto el comportamiento cinético medio poblacional, así como la relación entre diferentes variables fisiopatológicas (edad, sexo, Cl, etc.) y sus parámetros.
- Parámetros de efectos aleatorios interindividuales, que cuantifican la magnitud de la variabilidad interindividual de cada uno de los parámetros farmacocinéticos del modelo al que se ajusta el fármaco.
- Parámetros de efectos aleatorios residuales, que cuantifican la magnitud de la variabilidad residual, la cual incluye fundamentalmente la variabilidad intraindividual y el error analítico de las determinaciones.

La estimación individualizada de los parámetros mediante esta técnica es similar a la empleada en regresión no lineal por mínimos cuadrados. En este caso la suma de cuadrados incluye un término adicional que evalúa las diferencias entre los parámetros estimados en el paciente, a través de las concentraciones séricas, y los parámetros predichos considerando la población a la que pertenece dicho paciente:

$$SS = \sum_{i=1}^m \frac{(P_i - P_j)^2}{\sigma_{P_i}^2} + \sum_{i=1}^n \frac{(C_i, t - f(P_m, t))^2}{\sigma_{C_i}^2} \quad (\text{Ec. I.3})$$

Donde P_m es el número de parámetros a estimar, P_i los valores medios poblacionales de los parámetros farmacocinéticos, P_j los parámetros farmacocinéticos estimados en el individuo, $\sigma_{P_i}^2$ la varianza interindividual de los parámetros en la población, n el número de concentraciones conocidas en el individuo, C_i los valores observados en dichas concentraciones, $f(P_m, t)$ los valores de concentración predichos de acuerdo al modelo cinético propuesto y $\sigma_{C_i}^2$ la varianza residual de las concentraciones observadas.

A la vista de la ecuación I.3, se puede deducir que cuando la información individual de concentraciones plasmáticas es alta, el primer término del sumatorio en la ecuación pierde influencia en la estimación de los parámetros,

asemejándose a una regresión de tipo no lineal. Por el contrario, cuando se dispone de información experimental limitada, la influencia de los parámetros poblacionales en el ajuste es grande, evitando así obtener valores de parámetros individuales muy diferentes a los predichos de acuerdo a sus características fisiopatológicas. El valor de la varianza de los parámetros limita el rango de valores que pueden presentar los parámetros estimados, de modo que a menor varianza menor será la amplitud del rango alrededor del valor medio que puedan tomar los parámetros individuales. El valor de la varianza de las concentraciones determina la contribución de estas últimas en la estimación de los parámetros. De este modo, cuanto menor sea la varianza mayor será la contribución de las concentraciones en la estimación de los parámetros, y viceversa.

Los algoritmos bayesianos más empleados están basados en parámetros de población obtenidos a partir de métodos paramétricos, que asumen una distribución conocida (normal o logaritmo normal) a los parámetros cinéticos del modelo, de forma que los parámetros poblacionales están caracterizados por valores únicos (media, varianza). El problema de asumir este tipo de distribuciones es que pueden incluir errores en la estimación de parámetros, especialmente en casos de elevada variabilidad atribuida a subpoblaciones diferentes (p. ej., diferentes tipos de metabolizadores). Alternativamente, se ha propuesto el empleo de parámetros de población estimados con métodos no paramétricos, y que no asumen una distribución conocida. En este caso se obtienen múltiples conjuntos de estimadas de los parámetros en la población, asociados cada uno con su probabilidad. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de los parámetros poblacionales no paramétricos, es su dificultad a la hora de ser incorporados en programas de farmacocinética clínica habituales, donde se incorporan valores medios y variabilidades de los parámetros farmacocinéticos.

El empleo de los métodos de estimación bayesiana en monitorización farmacocinética presenta ventajas importantes que han contribuido a su amplia utilización en el ámbito clínico. Estas ventajas se pueden resumir en las siguientes:

- Información experimental mínima. En teoría, el número de muestras preciso será menor que el necesario para estimar los parámetros farmacocinéticos individuales mediante regresión no lineal. No obstante, se requiere su confirmación mediante estudios clínicos que lo demuestren para cada fármaco y subpoblación en particular.

- Flexibilidad en los tiempos de muestreo. La selección de los tiempos de muestreo es menos crítica cuando se utilizan métodos bayesianos, debido a la mayor contribución de los parámetros poblacionales en la estimación, especialmente cuando el número de concentraciones obtenidas del paciente es mínimo. Esta ventaja adquiere importancia en el contexto clínico, donde muchos fármacos presentan un tiempo de muestreo óptimo que puede no corresponder con el más adecuado para el tratamiento del paciente.
- Versatilidad de los modelos farmacocinéticos. Aunque muchos de los fármacos monitorizados intentan ajustarse a modelos sencillos, como el mono o bicompartimental, las técnicas bayesianas han mostrado su utilidad para modelos más complejos como el tricompartmental. Asimismo, la utilización de modelos no lineales en situaciones de no equilibrio pueden ser asumidos por esta técnica.
- Consistencia en los resultados. La estimación bayesiana evita obtener parámetros muy alejados del margen de variación de los parámetros poblacionales, minimizando de esta manera los riesgos inherentes a la técnica analítica y a los errores de medicación. Adicionalmente, proporcionan recomendaciones consistentes sobre la dosificación, lo cual supone una ventaja cuando los programas de monitorización implican la participación de personal diferente.

Por el contrario, entre los principales inconvenientes hay que destacar los siguientes:

- Complejidad de cálculo. Los métodos bayesianos son complejos y requieren un software específico. No obstante, se han desarrollado numerosos programas de fácil uso que realizan este tipo de estimación.
- Fiabilidad de los parámetros poblacionales. Una inadecuada selección de la información poblacional puede influir de manera significativa en la fiabilidad y capacidad predictiva de los métodos bayesianos, especialmente cuando la información individual es limitada. Aunque idealmente el paciente debe ser representativo del grupo de población, en numerosas ocasiones se emplean parámetros poblacionales obtenidos de fuentes bibliográficas, que pueden no corresponderse con el paciente monitorizado. La ausencia de esta información poblacional limita la utilización de esta estrategia para fármacos nuevos o poblaciones específicas de pacientes.

I.6.3.- Optimización de la terapia antimicrobiana mediante la monitorización

En un metanálisis en el que se recogen varios ensayos clínicos y estudios observacionales, se puso de manifiesto que la implementación de diferentes medidas de control en el ámbito hospitalario, entre ellas un plan para la monitorización de antimicrobianos, resultó en: (i) un beneficio clínico significativo para los pacientes hospitalizados, así como una reducción de eventos adversos derivados y de la tasa de mortalidad; (ii) disminución de la tasa de aparición de resistencias a los antimicrobianos; (iii) un descenso significativo del tiempo de estancia hospitalaria y en consecuencia (iv) un menor coste económico [97].

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la monitorización de antibióticos betalactámicos repercute en un beneficio clínico en los pacientes de las UCI [98-100]. Por otro lado, existe un consenso generalizado de que esta monitorización podría ayudar a conseguir objetivos farmacocinéticos/farmacodinámicos predefinidos para estos antimicrobianos, en este tipo de pacientes [89, 101]. Esta monitorización podría ser particularmente útil en situaciones en donde hay dificultad en alcanzar un grado adecuado de exposición al fármaco como en pacientes obesos, inmunodeprimidos, con un CI renal elevado, sometidos a técnicas de depuración extracorpórea, o con infección por microorganismos con susceptibilidad antibiótica reducida [102]. En este sentido, las guías de la *Society of Pharmacology and Therapeutics/French Society of Anaesthesia and Intensive Medicine* recomiendan la necesidad de implementar sistemas para la monitorización farmacocinética de antibióticos betalactámicos en el paciente crítico [86].

La monitorización de antibióticos aminoglucósidos también proporciona un beneficio clínico significativo en el paciente hospitalizado. Clásicamente el objetivo principal de la monitorización de estos antimicrobianos ha sido el control de su toxicidad, especialmente renal y auditiva [103-105]. Sin embargo, recientemente se han incorporado también objetivos relacionados con la eficacia, que permiten la implementación de dosificaciones para alcanzar concentraciones terapéuticas adecuadas [106]. Se ha visto que estas estrategias son especialmente útiles en pacientes con infecciones por neumonía asociada a ventilación mecánica u otras infecciones causadas por organismos multiresistentes [107-109].

También existe un interés clínico en la monitorización de antifúngicos, especialmente de la familia de equinocandinas y triazoles, ya que son los agentes más empleados en la prevención y tratamiento de las IFI [110-112]. Este interés se debe a que presentan una elevada variabilidad farmacocinética inter- e

intraindividual, un alto riesgo de interacciones farmacológicas con otros compuestos, y una elevada toxicidad [73-75, 113]. La monitorización de antifúngicos es de interés en pacientes críticos [114-115] y, en el caso concreto de los triazoles, también en pacientes oncohematológicos [116]. En este sentido, las guías publicadas por la *Infectious Disease Society of America* recomiendan que cuando se empleen terapias antifúngicas con triazoles para la prevención o el tratamiento de las IFI, éstas se realicen guiadas por un programa de monitorización farmacocinética [117].

I.7.- Papel de las Unidades Hospitalarias de Farmacocinética Clínica en la monitorización de fármacos

El Servicio de Farmacia de un hospital es considerado un servicio general, clínico, que se encuentra integrado funcional y jerárquicamente en el hospital. De acuerdo con la legislación vigente, sobre regulación de los servicios farmacéuticos de hospitales, Ley de Hospitales de 21 de julio de 1962, Orden 1 de febrero de 1977 (BOE 19 de febrero de 1977) [118], y a la Ley del Medicamento 25/1990, de 20 de diciembre (BOE número 306, 22 de diciembre de 1990) [119], este servicio tiene encomendado, entre otros objetivos, llevar a cabo actividades de farmacocinética clínica, efectuar trabajos de investigación propios o en colaboración, así como participar en ensayos clínicos y llevar a cabo cuantas funciones puedan redundar en un mejor uso y control de los medicamentos.

Habitualmente, la monitorización de fármacos se realiza en una Unidad de Farmacocinética Clínica, ubicada dentro del Servicio de Farmacia hospitalario. Es en esta unidad donde la monitorización debe implicarse activamente en las principales vertientes de la farmacocinética clínica: asistencial e investigadora.

Como **actividad asistencial**, la farmacocinética clínica trata de mejorar la capacidad del personal médico para predecir la respuesta individualizada a un tratamiento determinado. Esta actividad puramente asistencial se puede dividir en tres fases bien diferenciadas:

- Valoración del paciente, recomendaciones de dosificación inicial, así como la programación para la obtención de las muestras.
- Determinación de la concentración de fármaco en el fluido biológico e interpretación farmacocinética de los datos, seguida de una recomendación posológica.

- Monitorización del paciente para valorar la respuesta clínica, los posibles factores que pueden modificar el perfil farmacocinético del fármaco, y la necesidad o no de nuevas determinaciones de concentraciones del fármaco.

La farmacocinética clínica, además de la individualización posológica, permite identificar y resolver fenómenos de infra- o sobredosificación, reacciones adversas, interacciones farmacológicas, así como errores de medicación. De este modo, constituye un componente esencial en la consecución de los objetivos de la atención farmacéutica y ayuda a alcanzar mejores resultados en el paciente (descenso de la morbimortalidad, reducción de la estancia hospitalaria y prevención de la aparición de eventos adversos) [120].

En cuanto a la **vertiente investigadora**, todos los trabajos realizados, con sus consiguientes datos obtenidos en las Unidades Hospitalarias de Farmacocinética Clínica, constituyen una base excelente para la investigación. Esta actividad debe de estar orientada hacia la resolución de aspectos clínicos concretos, como pueden ser la detección de interacciones farmacológicas o de problemas de biodisponibilidad, así como la obtención de información farmacocinética relevante en determinadas poblaciones de pacientes (grandes quemados, fibrosis quística, críticos u oncológicos) y de sus requerimientos de dosificación, o la evaluación de diferentes modelos y métodos de ajuste de datos.

I.8.- Empleo de técnicas analíticas para la monitorización de antimicrobianos

Los métodos más utilizados para la monitorización de antimicrobianos en muestras biológicas (sangre, plasma, orina, ...) se basan en técnicas de inmunoensayo y de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, acrónimo de *high-performance liquid chromatography*) [121]. También se han descrito metodologías que emplean técnicas de cromatografía gaseosa (GC, acrónimo de *gas chromatography*) y de electroforesis capilar (CE, acrónimo de *capillary electrophoresis*) [122].

A continuación, se describen brevemente las características principales de los métodos y de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de antimicrobianos en muestras de plasma, objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

I.8.1.- Técnicas de inmunoensayo

Las técnicas de inmunoensayo se basan en la formación de un complejo estable de estequiometría definida entre el analito (antígeno, Ag) y un anticuerpo específico (Ac) utilizando distintos trazadores o marcadores, técnicas analíticas y diferentes formatos de ensayo.

Los trazadores o marcadores (Ac* o Ag*) son moléculas de Ac o Ag unidas a una molécula (como enzimas, isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes o quimioluminiscentes) que permite el revelado de la reacción Ag-Ac. En función de la naturaleza de dichos marcadores se habla de técnicas de enzimoensayo (EIA, acrónimo de *enzyme immunoassay*), radioinmunoensayo (RIA, acrónimo de *radioimmunoassay*), fluoroinmunoensayo (FIA, acrónimo de *fluoroimmunoassay*) y quimioinmunoensayo, entre otras.

Con independencia del marcador empleado, los inmunoensayos se clasifican en competitivos y no competitivos [123]:

- En los **inmunoensayos competitivos**, para la determinación de un Ag en una muestra, se añade el Ac correspondiente y una cantidad conocida del Ag*, así ambos antígenos compiten en su interacción con el Ac. Una vez finalizada la reacción, se determina la cantidad de Ag* libre, que es inversamente proporcional a la de Ag presente en la muestra.
- En los **inmunoensayos no competitivos**, para determinar un Ag, se utiliza un Ac*. En este caso, la señal obtenida es directamente proporcional a la cantidad de Ag presente en la muestra.

Además, los **inmunoensayos** también pueden clasificarse en **heterogéneos** u **homogéneos** en función de si se utiliza alguna técnica de separación o no previamente a la medida, respectivamente. En los métodos basados en inmunoensayos heterogéneos los reactivos se encuentran en fase sólida y se separa el complejo Ag-Ac de las moléculas libres mediante lavados. Estos inmunoensayos permiten alcanzar límites inferiores de cuantificación (LLOQ, acrónimo de *lower limit of quantification*) más bajos que los homogéneos [123].

Se han desarrollado métodos analíticos de **EIA** homogéneos (EMIT, acrónimo de *enzyme multiplied immunoassay technique*) y heterogéneos (ELISA, acrónimo de *enzyme-linked immunoassay*). Entre ellos, los ensayos ELISA son los más utilizados en la determinación de antimicrobianos en el ámbito hospitalario debido a su mayor sensibilidad [124].

Los ensayos ELISA competitivos pueden ser de captura de Ag o de captura de Ac, dependiendo de si la fase sólida está recubierta de Ac o de Ag,

respectivamente. En los primeros, se produce una competencia entre el Ag de la muestra y el trazador (Ag* marcado con una enzima) por un número limitado de sitios de unión del Ac inmovilizado. En los segundos, el Ag de la muestra compite con el Ag inmovilizado para unirse al Ac primario. En este caso, el trazador es un Ac secundario marcado con enzimas que interacciona con el Ac primario. En ambos casos, la cantidad de trazador unido se determina mediante la adición de un sustrato enzimático cromogénico. La intensidad del color desarrollado en el último paso es inversamente proporcional a la concentración de Ag en la muestra.

Los ELISA no competitivos suelen implicar la unión del Ag de la muestra a un exceso de Ac inmovilizado. Para determinar el Ag del complejo Ag-Ac, se emplea un segundo anticuerpo (Ac* marcado con enzimas) y un sustrato cromogénico. En este procedimiento, que también se conoce como ELISA en sándwich o ensayo inmunométrico de dos sitios, la señal medida es directamente proporcional a la cantidad de Ag en la muestra.

Los ELISA que se han desarrollado para fármacos y otros compuestos de pequeña masa molecular son, en su mayoría, de tipo competitivo, ya que estas moléculas suelen poseer un solo sitio de unión a anticuerpos.

Las **técnicas de RIA** son técnicas de inmunoensayo heterogéneo competitivas. Se basan en la competición entre el Ag, y el analito marcado con un radioisótopo (^{125}I , Ag*) por un número limitado de sitios de unión de un Ac. Tradicionalmente, se añade un segundo Ac que precipita al complejo Ag-Ac. Se mide la radiación gamma emitida por el precipitado. Estas técnicas destacan frente a otras de inmunoensayo por sus bajos LLOQ alcanzados. Su mayor inconveniente es la manipulación por parte del analista de material radiactivo, así como la gestión de dichos residuos [124].

El **FIA heterogéneo** es análogo al RIA, salvo que el marcador es un fluoróforo como la rodamina o la fluoresceína en lugar de un radioisótopo. El **FIA homogéneo competitivo** se denomina inmunoensayo de fluorescencia de luz polarizada (FPIA, acrónimo de *fluorescence polarization immunoassay*). **FPIA** es una técnica muy utilizada en ensayos de laboratorio clínico para la cuantificación de analitos que se encuentran en muy baja concentración en los fluidos biológicos. Esta técnica ha supuesto una mejora en términos de sensibilidad, precisión y exactitud. Se utiliza un Ag* que compite con el Ag en la muestra por la unión a un Ac.

En estos ensayos se hace incidir sobre la muestra un haz de luz polarizada en plano vertical que provoca la excitación del fluoróforo del Ag*. La intensidad de fluorescencia se mide a través de otro filtro polarizador vertical. Las moléculas de

Ag* libres giran rápidamente en la disolución y emiten radiación en planos diferentes a la luz incidente y no se detecta. Sin embargo, el complejo Ag*-Ac tiene una rotación mucho más lenta y emite radiación casi en el mismo plano que la luz incidente y, por tanto, se detecta. A medida que la concentración del analito aumenta, disminuye la formación del complejo Ac-Ag*, y aumenta la de Ag* libre, por tanto, la intensidad de la luz polarizada obtenida es inversamente proporcional a la cantidad de analito.

Los **inmunoensayos de quimioluminiscencia directa** son técnicas de inmunoensayo heterogéneo competitivo, análogas al RIA, salvo que el marcador es un éster de acridinio quimioluminiscente. Se utilizan micropartículas de óxido férrico recubiertas con el Ac. El Ag, el éster de acridinio del fármaco (Ag*) y los Ac se incuban durante un periodo determinado de tiempo y, a continuación, las micropartículas se separan con la ayuda de un campo magnético. Para determinar la cantidad de Ag* unido al Ac se adiciona un reactivo oxidante que provoca la formación de *N*-metilacridona. Este compuesto se descompone y emite una intensa radiación que se detecta con la ayuda de un fotomultiplicador. La sensibilidad es al menos tan alta como la de RIA y mejor que la de la mayoría de los demás inmunoensayos no isotópicos [125].

El éxito en el ámbito clínico de las técnicas de inmunoensayo se debe fundamentalmente al desarrollo y comercialización de equipos automatizados que permiten obtener resultados de forma muy rápida. Entre sus inconvenientes cabe indicar el elevado coste de los reactivos y equipos de medida, la falta de selectividad en la determinación de algunos antimicrobianos debido a la existencia de reactividad cruzada entre diferentes antígenos por un anticuerpo [126-127] y su aplicabilidad a un número limitado de analitos.

1.8.2.- Técnicas cromatográficas

Existe un interés creciente en la implementación de métodos cromatográficos en el ámbito hospitalario para la monitorización de antimicrobianos. De hecho, guías recientemente publicadas por parte de diferentes sociedades científicas recomiendan el empleo de métodos validados basados en HPLC para conseguir este objetivo que sean capaces de dar un resultado analítico con rapidez para ser útiles en el ámbito asistencial (~24 h desde la extracción de la muestra hasta la notificación de los resultados analíticos) [86, 128-129]. Por este motivo, las Unidades de Farmacocinética Clínica de los Servicios de Farmacia, desempeñan un papel crucial, tanto en la vertiente asistencial como investigadora de la farmacocinética clínica.

En los últimos años, se han propuesto diferentes métodos cromatográficos para la determinación de antimicrobianos en matrices biológicas complejas. Las técnicas cromatográficas pueden proporcionar resultados rápidos y precisos, lo que resulta de gran interés para mejorar la eficacia bactericida en el ámbito clínico. La variedad de mecanismos de separación permite la identificación y determinación de antimicrobianos de diferentes grupos, como penicilinas, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas y nitroimidazoles, entre otros [122].

Existen pocas referencias respecto al empleo de técnicas de **cromatografía gas-líquido** (GLC, acrónimo de *gas-liquid chromatography*) para la determinación de antimicrobianos y sus metabolitos en muestras de plasma. Ello es debido a que estos compuestos no son volátiles, por lo que su determinación directa mediante GLC resulta imposible; así, las metodologías desarrolladas incluyen una etapa de derivatización. En lo que respecta a la detección, para el análisis de muestras de plasma se han empleado fundamentalmente el detector de ionización en llama, de captura electrónica (para derivados fluorados) y de espectrometría de masas (MS, acrónimo de *mass spectrometry*) [124, 130].

La técnica cromatográfica más empleada en la monitorización de fármacos en muestras biológicas [122, 131], así como en los estudios sobre su estabilidad química es **HPLC**. En la Tabla I.4 se resumen las características más significativas de los métodos de HPLC desarrollados para determinar los antimicrobianos estudiados en esta Tesis Doctoral en plasma, MER y PIP, CEF/TAZ, AMK, VOR, CAS y ANI [132-245].

La mayoría de metodologías cromatográficas descritas en la bibliografía para la determinación de antimicrobianos emplean cromatografía líquida de reparto en la modalidad de trabajo en fase inversa (RPLC, acrónimos de *reversed phase liquid chromatography*). En estos métodos la fase estacionaria más utilizada con diferencia es la compuesta por C18, aunque también se han utilizado otras fases estacionarias, como por ejemplo la C8 [137, 173, 181, 227-228, 235-236, 238, 243], C4 [225], fenilo [134, 144, 150, 166, 209, 214, 216, 220] y cianoalquilo [229, 231]. En estas aplicaciones se emplean fases móviles basadas en mezclas hidroorgánicas compuestas por metanol (MeOH) o acetonitrilo (ACN) como modificador orgánico.

La mayoría de antimicrobianos son muy poco solubles en disolventes orgánicos apolares, por lo que la cromatografía líquida en fase normal no ha tenido mucho éxito para su determinación. No obstante, la modalidad de trabajo basada en cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC acrónimo de *hydrophilic interaction liquid chromatography*) con fases móviles ACN/agua ha mostrado su

utilidad para la determinación de algunos antimicrobianos como MER [142, 147] y AMK en muestras de plasma [184].

En lo que respecta a la detección en HPLC, tal y como se observa en las Tabla I.4, el detector más utilizado para la determinación de antimicrobianos, es el de absorción ultravioleta/visible (UV-vis), seguido del de fluorescencia (FLD) y el de MS. Las principales ventajas de la MS son los bajos límites de cuantificación y que permite la identificación inequívoca de los compuestos que eluyen de la columna. El inconveniente del empleo de detectores de MS es su coste, por lo que no siempre están al alcance de un laboratorio clínico de un centro asistencial hospitalario. En el caso de la determinación de AMK (compuesto muy hidrófilo y que, además, no posee grupos cromóforos), con el objetivo de mejorar tanto la separación como la detección UV-Vis, suele someterse a un proceso de derivatización previo o posterior a la separación cromatográfica, este aspecto se trata con mayor detalle en el Capítulo VI.

En lo que respecta al tratamiento de la muestra previo al análisis cromatográfico, como se puede observar en la Tabla I.4, en la mayoría de métodos para la determinación de antimicrobianos en plasma, se utiliza ACN para precipitar las proteínas, seguido de centrifugación para recuperar el analito del sobrenadante. El ACN en comparación con otros agentes precipitantes (p. ej., MeOH) presenta la ventaja de que el precipitado se adhiere bien a las paredes del tubo y el sobrenadante queda libre de partículas [130]. También se han desarrollado procedimientos que emplean extracción en fase sólida (SPE, acrónimo de *solid phase extraction*). Así, se han utilizado cartuchos con rellenos de sílice, C18, C8 y resinas de intercambio catiónico [149-150, 154, 161-163, 168, 171-172, 178, 184, 214, 227, 230, 234, 236, 242]. Aunque en menor extensión, también se han descrito metodologías en las que se utiliza la extracción líquido-líquido (LLE, acrónimo de *liquid-liquid extraction*) con diferentes disolventes, como por ejemplo cloroformo, CH₂Cl₂, éter metil tert-butílico (MTBE) y mezclas de diferentes disolventes [132, 136, 150, 164, 170-171, 177, 193, 207-208, 212, 218]. Finalmente, en algunas aplicaciones se ha utilizado la ultrafiltración [140, 152, 155, 163, 171-172, 179, 192] que permite la separación de la fracción de fármaco unida a las proteínas plasmáticas de la fracción libre. Para ello, se utilizan filtros de celulosa regenerada que no permiten el paso de especies de masa molecular superior a 10 kDa.

Tabla I.4.- Resumen de algunos métodos de cromatografía de líquidos descritos en la bibliografía para la determinación de los antimicrobianos estudiados en la presente Tesis Doctoral en muestras de plasma.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> LLE (Kit comercial MassTox[®] TDM Series) Dilución con tampón comercial (Kit comercial MassTox[®] TDM Series) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) -Fase B: HCOOH/MeOH (0.1:99.9, v/v) 	MER: 1.25-45 PIP: 1.25-45	MER: - ^a , 1.25 ^b PIP: - ^a , 1.25 ^b	MER: <14.2 ^e , <11.7 ^f PIP: <18.9 ^e , <13.7 ^f	MER: <12.8 ^e , <9.4 ^f PIP: <7.5 ^e , <8.8 ^f	[132]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Evaporación con N₂ Reconstitución con NH₄AcO 5 mM (pH 2.4)/ACN (93:7, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) -Fase A: NH₄AcO 0.05 M (pH 2.4) -Fase B: HCOOH/ACN (0.1/99.9, v/v) 	MER: 0.1-50 PIP: 0.1-50	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.1 ^b	MER: <12.2 ^e , <16.7 ^f PIP: <9.0 ^e , <11.0 ^f	MER: <17 ^e , <7.8 ^f PIP: <17.6 ^e , <16.5 ^f	[133]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> FE: PFP FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) -Fase B: HCOOH/MeOH(0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.2-100 PIP:0.2-100	MER: 0.14 ^a , 1.0 ^b PIP: 0.02 ^a , 1.0 ^b	MER: <5.0 ^e , <6.3 ^f PIP: <2.6 ^e , <5.4 ^f	MER: <14.8 ^e , <3.4 ^f PIP: <2.6 ^e , <6.1 ^f	[134]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> Adición de 1-octilamina y ACN Recolección de la fracción orgánica y dilución con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: HCOOH 0.5%/ACN (70:30, v/v) 	0.1-100	MER: 0.03 ^a , 0.1 ^b	<5 ^e , <8 ^f	-	[135]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN LLE con H₂CCl₂ 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: (elución en gradiente) -Fase A: H₂O -Fase B: ACN 	0.1-100	<0.1 ^a , 0.1 ^b	<10.1 ^e , <8.6 ^f	<2.4 ^e , <5 ^f	[136]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con MeOH/MTBE (90:10, v/v) Dilución con H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C8 FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOONH₄ 0.01 M/HCOOH (99.9:0.1, v/v) -Fase B: MeOH 	MER: 0.25-120 PIP:0.5-400	MER: - ^a , 0.25 ^b PIP: - ^a , 0.5 ^b	MER: <6.5 ^e , <7.1 ^f PIP: <7.3 ^e , <5.5 ^f	MER: <6.1 ^e , <7.5 ^f PIP: <1.7 ^e , <8.1 ^f	[137]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Dilución con H₂O/HCOOH (99.9:0.1, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.1-150 PIP: 0.1-150	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.1 ^b	MER: <17.5 ^e , <18.9 ^f PIP: <14.6 ^e , <11.7 ^f	MER: <18.3 ^e , <8.4 ^f PIP: <15.3 ^e , <10.0 ^f	[138]
PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con MeOH Dilución con fase A 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) - Fase A: NH₄HCO₃ 0.01 M/NH₄OH (99.6/0.4, v/v) - Fase B: MeOH/NH₄OH (99.6/0.4, v/v) 	0.25-352	- ^a , 0.25 ^b	<3.8 ^e , <12.8 ^f	<3.3 ^e , <12.7 ^f	[139]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
PIP	UV	• Ultrafiltración	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: TF 0.01M (pH 7.4) - Fase B: TFA/ACN (0.1:99.9, v/v)	2-200	- ^a , 2 ^b	<11.0 ^e , <10.0 ^f	<22.0 ^e , <18.0 ^f	[140]
PIP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H ₂ O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v)	0.5-1000	0.01 ^a , 0.5 ^b	<5.8 ^e , <3.0 ^f	<10 ^e , <9.3 ^f	[141]
MER PIP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con con ACN acidificado con 0.1% HCOOH	• FE: HILIC • FM: HCOONH ₄ 0.1M (pH 6.5)/ACN (20:80, v/v)	MER: 0.2-40 PIP: 0.4-80	MER: - ^a , 0.2 ^b PIP: - ^a , 0.4 ^b	MER: <2.9 ^e , <6.3 ^f PIP: <1.7 ^e , <8.2 ^f	MER: <5.0 ^{e,f} PIP: <7.6 ^{e,f}	[142]
MER PIP	MS-MS	• Dilución con HCOOH 0.025 M en H ₂ O • Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH 0.025 M en H ₂ O -Fase B: HCOOH 0.025 M en ACN	MER: 0.2-50 PIP:0.2-50	MER: - ^a , 0.2 ^b PIP: - ^a , 0.2 ^b	MER: <12.0 ^e , <12.5 ^f PIP: <7.5 ^e , <7.4 ^f	MER: <7.0 ^e , <7.0 ^f PIP: <7.0 ^e , <9.0 ^f	[143]
MER PIP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con MeOH • Dilución con H ₂ O	• FE: PFP • FM (elución en gradiente) -Fase A: NH ₄ AcO 0.002M con HCOOH 0.1% en H ₂ O -Fase B: NH ₄ AcO 0.002M con HCOOH 0.1% en MeOH	MER: 0.1-100 PIP: 0.1-100	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.1 ^b	MER: <8.6 ^e , <9.1 ^f PIP: <9.4 ^e , <13.3 ^f	MER: <13.5 ^e , <4.2 ^f PIP: <16.1 ^e , <19.7 ^f	[144]
MER PIP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con MeOH/HCOOH (99.9:0.1, v/v) • Dilución con H ₂ O/HCOOH (99.9:0.1, v/v)	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOONH ₄ 0.002 M/HCOOH (99.9:0.1, v/v) -Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v)	MER: 0.5-32 PIP: 0.5-32	MER: 0.03 ^a , 0.5 ^b PIP: 0.02 ^a , 0.5 ^b	MER: <8.9 ^e , <8.9 ^f PIP: <6.8 ^e , <7.8 ^f	MER: <6.9 ^e , <6.9 ^f PIP: <3.9 ^e , <3.9 ^f	[145]
MER PIP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con Fase A	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H ₂ O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v)	MER: 0.5-175 PIP: 0.5-175	MER: - ^a , 0.5 ^b PIP: - ^a , 0.5 ^b	MER: <16.1 ^e , <18.1 ^f PIP: <15.4 ^e , <16.9 ^f	MER: <8.6 ^e , <7.3 ^f PIP: <16.0 ^e , <8.4 ^f	[146]
MER	MS-MS	• Dilución de la muestra con HCOONH ₄ 0.001 M (pH 3) • Precipitación de proteínas con ACN	• FE: HILIC • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOONH ₄ 0.01 M/HCOOH (99.9:0.1, v/v) - Fase B: ACN	1-50	0.05 ^a , 1 ^b	<1.7 ^e , <4.4 ^f	<3.3 ^{e,f}	[147]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
MER PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: H₃PO₄/H₂O (0.2:99.8, v/v) (pH 2.2) - Fase B: ACN 	MER: 2 – 200 PIP: 5 – 200	MER: - ^a , 2.0 ^b PIP: - ^a , 5.0 ^b	MER: <1.1 ^e , <8.2 ^f PIP: <4.1 ^e , <6.6 ^f	MER: <5.9 ^e , <1.4 ^f PIP: <2.5 ^e , <3.5 ^f	[148]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: - FE: C18 - Eluyente: MeOH/H₂O (70:30, v/v) • Dilución con H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: Tris-HCl 100 mM (pH 8.5)/ MeOH (85:15, v/v) 	5-50	- ^a , 3.5 ^b	<3.8 ^e , <18.5 ^f	<11 ^{e,f}	[149]
PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Método 1: - Precipitación de proteínas con ACN - LLE con H₂CCl₂ • Método 2 (SPE) - FE: C8 - Eluyente: MeOH/Fase B (60:40, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: ACN/TFA 0.1% (3:97, v/v) - Fase B: ACN/TFA 0.1% (90:10, v/v) 	1-200	Método 2 0.4 ^a , 1.0 ^b	Método 2 <3.4 ^e , <4.8 ^f	Método 2 <5.0 ^e , <8.0 ^f	[150]
PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN/HCOOH (99.9:0.1, v/v) • Evaporación con N₂ a 40 °C • Reconstitución con H₃PO₄ 10 mM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM (elución en gradiente) - Fase A: H₃PO₄ 10 mM - Fase B: ACN 	2-100	- ^a , 2 ^b	<6.8 ^e , <11.3 ^f	<5.3 ^e , <3.5 ^f	[151]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrafiltración • Dilución con H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/NH₄AcO 2 mM (0.1:99.9, v/v) -Fase B: HCOOH / NH₄AcO 2 mM en MeOH (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.5-75 PIP: 1.1-157	MER: - ^a , 0.5 ^b PIP: - ^a , 1.1 ^b	MER: <11.4 ^e , <9.1 ^f PIP: <3.7 ^e , <8.1 ^f	MER: <2.8 ^e , <5.6 ^f PIP: <7.4 ^e , <0.8 ^f	[152]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	MER: 1.25-40 PIP: 6.25-200	MER: - ^a , 0.15 ^b PIP: - ^a , 0.08 ^b	MER: <5.1 ^e , <6.9 ^f PIP: <4.2 ^e , <6.0 ^f	MER: <6.2 ^e , <4.2 ^f PIP: <4.4 ^e , <4.4 ^f	[153]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con MeOH/H₂O (10:90, v/v) • SPE - FE: HLB - Eluyente: MeOH/ACN (80:20, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.25-50 PIP: 0.5-60	MER: - ^a , 0.5 ^b PIP: - ^a , 0.5 ^b	MER: <3.7 ^e , <5.5 ^f PIP: <3.2 ^e , <5.2 ^f	MER: <4.0 ^{e,f} PIP: <5.0 ^{e,f}	[154]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
MER	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Ultrafiltración Dilución con HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.27–150	0.09 ^a , 0.27 ^b	<16.4 ^e , <17,2 ^f	<10 ^{e,f}	[155]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> Dilución con MES Precipitación de proteínas con ACN Evaporación con N₂ a 37 °C Reconstitución con MES 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: TF 0.1 M (pH 7)/MeOH (87:13, v/v) 	0.5–100	- ^a , 0.5 ^b	<6.5 ^e , <8.4 ^f	<3 ^e , <5 ^f	[156]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN acidificado con 0.1% HCOOH Dilución con 0.1% HCOOH en H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.1-50 PIP: 0.1-25	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.1 ^b	MER: <10 ^e , <10 ^f PIP: <11 ^e , <14 ^f	MER: <3 ^e , <5 ^f PIP: <5.0 ^e , <8.0 ^f	[157]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Dilución con FM (1:3, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/H₂O (0.01:99.99, v/v) -Fase B: MeOH 	MER: 0.1-5 PIP: 0.1-5	MER: 0.04 ^a , 0.1 ^b PIP: 0.04 ^a , 0.1 ^b	MER: <18 ^e , <6 ^f PIP: <18 ^e , <14 ^f	MER: - PIP: -	[158]
PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: TF 0.02 M/ACN (75:25, v/v) 	1-500	- ^a , 1.0 ^b	<8.6 ^e , <2.2 ^f	-	[159]
MER PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con MeOH Evaporación Reconstitución con TF 0.05 M (pH 2.5) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	MER: 2-200 PIP: 2-200	MER: - ^a , 2.0 ^b PIP: - ^a , 2.0 ^b	MER: <4.9 ^e , <6.5 ^f PIP: <3.6 ^e , <4.7 ^f	MER: <9.4 ^e , <20.9 ^f PIP: <6.6 ^e , <18.1	[160]
MER	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> SPE: - FE: HLB - Eluyente: ACN/NH₄AcO 2 mM (pH 4.8) (50:50, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: NH₄AcO 2 mM/ACN (80:20, v/v) 	0.2-200	- ^a , 0.19 ^b	<9.5 ^e , <8.2 ^f	<6.2 ^e , <4.1 ^f	[161]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> SPE - FE: MCX - Eluyente: NH₄OH 5% en ACN/MeOH (60:40, v/v) - Dilución con HCOONH₄ 1 M 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOONH₄ 0.001 M/ACN (95:5, v/v) -Fase B: ACN 	MER: 0.2-20.1 PIP:0.3-38.6	MER: - ^a , 0.2 ^b PIP: - ^a , 0.3 ^b	MER: <8.2 ^e , <7.5 ^f PIP: <17.7 ^e , <15.5 ^f	MER: <6.1 ^{e,f} PIP: <5.2 ^{e,f}	[162]
MER PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> Ultrafiltración Dilución con MES 1 M (pH 6.6) 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: TF 0.05 M (pH 2.4)/ACN (92:8, v/v) 	MER: 0.1-50 PIP: 0.1-50	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.1 ^b	MER: <2.6 ^e , <4.2 ^f PIP: <4.7 ^e , <8.6 ^f	MER: <7.2 ^{e,f} PIP: <7.2 ^{e,f}	[163]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con H₂O • LLE con H₂CCl₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) -Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.5-100 PIP: 1.5-100	MER: - ^a , 0.5 ^b PIP: - ^a , 1.5 ^b	MER: <14.8 ^{e,f} PIP: <12.8 ^{e,f}	MER: <5.8 ^{e,f} PIP: <5.7 ^{e,f}	[164]
PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HCl 0.01% en MTBE • Evaporación con N₂ • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: HCOOH 0.02%/ACN (65:35, v/v) 	0.1-10	- ^a , 0.1 ^b	<5.5 ^e , <9.1 ^f	<4.2 ^e , <5.1 ^f	[165]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación con N₂ a 30 °C • Reconstitución con MES 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM (elución en gradiente) -Fase A: TF 0.01M (pH 7.0) -Fase B: MeOH 	0.5-100	- ^a , 0.5 ^b	<2.9 ^e , <2.3 ^f	<4.9 ^e , <3.7 ^f	[166]
MER PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: H₃PO₄ 0.01M (pH 2.0) -Fase B: ACN 	MER: 2-250 PIP: 2-250	MER: 1.0 ^a , 2.0 ^b PIP: 1.0 ^a , 2.0 ^b	MER: <3.9 ^e , <3.4 ^f PIP: <4.1 ^e , <3.3 ^f	MER: <2.1 ^e , <6.0 ^f PIP: <4.0 ^e , <16.0 ^f	[167]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • SPE - FE: HLB - Eluyente: MeOH • Evaporación con N₂ a 50 °C • Reconstitución con HCOONH₄ 0.01M/MeOH (95:5, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOONH₄ 0.01 M/HCOOH (99.9:0.1, v/v) -Fase B: MeOH/HCOOH (99.9:0.1, v/v) 	MER: 0.1-50 PIP: 0.1-50	MER: 0.05 ^a , 0.1 ^b PIP: 0.001 ^a , 0.1 ^b	MER: <9.4 ^e , <14.6 ^f PIP: <11.1 ^e , <6.3 ^f	MER: <6.2 ^e , <7.6 ^f PIP: <6.3 ^e , <9.3 ^f	[168]
MER PIP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con DMSO 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) -Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) -Fase B: HCOOH/MeOH (0.1:99.9, v/v) 	MER: 0.1-50 PIP: 0.3-150	MER: - ^a , 0.1 ^b PIP: - ^a , 0.3 ^b	MER: <5.9 ^e , <7.8 ^f PIP: <7 ^e , <8.2 ^f	MER: <7.6 ^e , <7.6 ^f PIP: <7.7 ^e , <7.9 ^f	[169]
MER PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • LLE con CHCl₃ 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.05M (pH 2.4)/ACN (92:8, v/v) 	MER: 5-250 PIP: 10-1000	MER: - ^a , 5.0 ^b PIP: - ^a , 10.0 ^b	MER: <4.9 ^e , <5.5 ^f PIP: <2.4 ^e , <3.2 ^f	MER: <15.0 ^e , <12.0 ^f PIP: <10.0 ^e , <3.0 ^f	[170]
PIP	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Método 1 – Fracción total - Precipitación de proteínas con ACN - LLE con H₂CCl₂ • Método 2 – Fracción libre - Ultrafiltración 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.2M (pH 2.6)/ACN (90:10, v/v) 	0.5-500	Método 1 0.24 ^a , 0.5 ^b Método 2 0.24 ^a , 0.5 ^b	Método 1 <6.6 ^e , <9.4 ^f Método 2 <7.7 ^e , <9.3 ^f	Método 1 <3.0 ^e , - ^f Método 2 <3.0 ^e , - ^f	[171]
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrafiltración 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.1 M (pH 7.8)/MeOH (78:22, v/v) 	0.04-25	- ^a , 0.04 ^b	<1.9 ^{e,f}	-	[172]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
MER	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación con N₂ a 30 °C • Reconstitución con MOPS (pH 6.8) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM (elución en gradiente) - Fase A: TF 0.1 M (pH 6.8) - Fase B: MeOH 	0.5-80	- ^a , 0.5 ^b	<3.3 ^e , <10.4 ^f	<3.9 ^e , <3.6 ^f	[173]
CEF	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HClO₄ 2.5 M 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: TFA/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: MeOH 	0.5-50	- ^a , 0.5 ^b	<7.33 ^{e,f}	-	[174]
CEF TAZ	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	CEF: 0.1-40 TAZ: 0.05-20	CEF: - ^{a,b} TAZ: - ^a , 0.05 ^b	CEF: <14.8 ^e , <13.3 ^f TAZ: <12.5 ^e <10.7 ^f	CEF: <10.5 ^e , <1.8 ^f TAZ: <13.6 ^e , <9.8 ^f	[175]
CEF TAZ	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con la Fase A 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	CEF: 1-125 TAZ: 1-125	CEF y TAZ:- ^a , 0.95 ^b	CEF y TAZ: <12.5 ^{e,f}	CEF y TAZ: <6.50 ^{e,f}	[176]
CEF TAZ	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • LLE con H₂CCl₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.05 M/ACN (97.5:2.5, v/v) 	CEF: 0.1-250 TAZ: 0.05-125	CEF: 0.05 ^a , 0.025 ^b TAZ: 0.1 ^a , 0.05 ^b	CEF: <1.8 ^e , <5.2 ^f TAZ: <2.5 ^e , <2.8 ^f	CEF: <2 ^{e,f} TAZ: <3.8 ^{e,f}	[177]
CEF TAZ	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatización con cloroformiato de n-propilo al 15 % en acetona • Neutralización con glicina 0.5 M • SPE: - FE: C18 - Eluyente: ACN/ HCOONH₄ 10%/ NH₄OH 1.5%/ ácido cítrico 1.25%/ H₂O (120:3:1:0.173:675, v/v/v/v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: HCOOH al 0.1% y 2.7 µg mL⁻¹ ácido cítrico en H₂O/HCOOH al 0.1% y 2.7 µg mL⁻¹ ácido cítrico en ACN (75:25, v/v) 	CEF: 0.25-150 TAZ: 0.1-50	CEF:- ^a , 0.25 ^b TAZ: - ^a , 0.1 ^b	CEF:- ^e , <7.1 ^f TAZ:- ^e , <5.3 ^f	CEF:- ^e , <4.4 ^f TAZ:- ^e , <9.0 ^f	[178]
CEF TAZ	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Ultracentrifugación con filtro de celulosa regenerada 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.01 M pH 2.7/MeOH (90.9:9.1, v/v) 	CEF: 0.4-50 TAZ: 0.4-50	CEF:- ^a , 0.4 ^b TAZ: - ^a , 0.4 ^b	CEF: <2.0 ^e , <4.1 ^f TAZ: <4.8 ^e , <4.8 ^f	CEF: <2.4 ^e , <2.3 ^f TAZ: <4.1 ^e , <3.3 ^f	[179]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
AMK	MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O/HCOOH (99.05:0.05, v/v) - Fase B: ACN/HCOOH (99.05:0.05, v/v) 	2.3-150	0.6 ^a , 2.3 ^b	< 6.4 ^e < 11.4 ^f	< 11.4 ^{e,f?}	[180]
AMK	FLD	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Derivatización con FMC, 20 min a T ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C8 FM: H₂O/ACN (35:65, v/v) 	0.5-22	0.09 ^a , 0.3 ^b	< 5.6 ^e < 4.7 ^f	< 3.3 ^e < 4.4 ^f	[181]
AMK	FLD	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Derivatización con FNBD, 30 min a 75 °C 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: NaAcO 0.01 M (pH 3)/ACN (85:15, v/v) 	0.1-10	0.05 ^a , 0.1 ^b	2.8 ^e	< 4.9 ^e , - ^f	[182]
AMK	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con HFBA 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: HFBA 40 mM/MeOH (30:70, v/v) 	1-30	- ^a , 1.0 ^b	< 5.8 ^e < 4.7 ^f	< 5.0 ^e < 5.2 ^f	[183]
AMK	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> SPE: - FE: mezcla intercambio catiónico y fase reversa - Eluyente: MeOH/NH₄AcO (75:25, v/v) • Evaporación a 70 °C por corriente de aire y redisolución con mezcla de ACN/NH₄AcO 2 mM/HCOOH 	<ul style="list-style-type: none"> FE: HILIC FM (elución en gradiente): <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: ACN/NH₄AcO 2 mM/HCOOH (5:95:0.2, v/v/v) - Fase B: ACN/NH₄AcO 2 mM/HCOOH (95:5:0.2, v/v/v) 	0.1-5.0	- ^a , 0.1 ^b	< 9.4 ^e , - ^f	< 5.6 ^e , - ^f	[184]
AMK	CLD	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con EtOH y Na₂CO₃ Derivatización post-columna con luminol/Cu²⁺/NaOH/NaCl/H₂O₂/Triton X-100 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: hidrógenoftalato de potasio (pH 3.35)/ACN (90:10, v/v) 	0.15-2.0	0.06 ^a , 0.15 ^b	< 6.4 ^e < 8.9 ^f	-	[185]
AMK	UV	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con ACN Derivatización con NITC/piridina, 1 h a 70° C Adición de metilamina/ACN, 5 min a 70 °C 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM: H₂O/ACN (57:43, v/v) 	6-30	0.6 ^a , 5.9 ^b	< 2.4 ^e < 5.8 ^f	< 9.5 ^e < 8.3 ^f	[186]
AMK	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación de proteínas con TCA 	<ul style="list-style-type: none"> FE: C18 FM (elución en gradiente): <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O/HFBA (99:1, v/v) - Fase B: MeOH 	0.25-25	- ^a , 0.25 ^b	< 4.5 ^e < 6.7 ^f	< 8.8 ^e , - ^f	[187]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
AMK	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con TCA 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente): <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O - Fase B: ACN - Fase C: HFPA 200 mM/ NH₄AcO 130 mM (50:50, v/v) 	0.3-50	- ^a , 0.3 ^b	< 2.8 ^e < 12.5 ^f	< 3.3 ^e , - ^f	[188]
AMK	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Derivatización con FMC, 20 min a T ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente): <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O - Fase B: ACN - Fase C: HFPA 200 mM/ NH₄AcO 130 mM (50:50), v/v) 	0.5-10	0.05 ^a , 0.4 ^b	< 5.1 ^e < 5.8 ^f	< 12.0 ^e < 10.0 ^f	[189]
AMK	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Derivatización con el reactivo Hantzsch (acetilacetona/formaldehído/tampón acetato 0.1M (pH 5)/H₂O (20:10:10:60, v/v/v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: NaAcO 0.01 M (pH 5.0)/ACN (70:30, v/v) 	0.1-25	0.02 ^a , 0.07 ^b	< 4.1 ^e < 5.8 ^f	-	[190]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	0.005-5	- ^a , 0.005 ^b	<5.1 ^e <13.1 ^f	<7.9 ^e <8.0 ^f	[191]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Método 1 – VOR total - Precipitación de proteínas con ACN • Método 2 – VOR libre - Ultracentrifugación 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O - Fase B: ACN 	Método 1: 0.1 – 10 Método 2: 0.02-2.5	Método 1: - ^a , 0.1 ^b Método 2: - ^a , 0.02 ^b	Método 1: <4.9 ^e <5.4 ^f Método 2: <4.3 ^e <4.7 ^f	Método 1 y 2: <5.0 ^e <6.0 ^f	[192]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • LLE con MTBE • Evaporación de la fracción orgánica con centrifugación a vacío • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: H₂O/ACN/MeOH (25:70:5, v/v) 	0.001-0.2	- ^a , 0.001 ^b	<7.3 ^e <6.0 ^f	<18.2 ^e <16.8 ^f	[193]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN-MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HAcO (35 mL L⁻¹), NH₄AcO (5 g L⁻¹), TFA (2mL L⁻¹) - Fase B: H₂O - Fase C: ACN 	0.1-10.1	- ^a , 0.1 ^b	<4.9 ^e <6.0 ^f	<4.2 ^{e,f}	[194]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
VOR	UV	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: H ₂ O - Fase B: ACN	0.25-16.0	- ^a , 0.25 ^b	<3.7 ^e <8.3 ^f	<8.7 ^e <8.4 ^f	[195]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/NH ₄ AcO 0.01 M (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/MeOH (0.1:99.9, v/v)	0.1-6.5	- ^a , 0.1 ^b	<4.4 ^e <7.0 ^f	<7 ^e <5 ^f	[196]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM: HCOOH 0.1 %/ACN (45:55, v/v)	0.1-6.0	- ^a , 0.1 ^b	<2.7 ^e <5.6 ^f	<10.5 ^e <4.6 ^f	[197]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación a vacío • Reconstitución con FM	• FE: C18 - FM: HCOOH 0.1 % en NH ₄ AcO 0.01 M/ACN (50:50, v/v)	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<7.2 ^e <7.9 ^f	<6.7 ^e <12.2 ^f	[198]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con MeOH	• FE: C18 • FM: HCOOH 1 %/ACN (55:45, v/v)	0.002-1.0	- ^a , 0.002 ^b	<8.7 ^e <9.5 ^f	<3.3 ^e <3.2 ^f	[199]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con HCl 1 M / ACN (0.1:99.9, v/v)	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H ₂ O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v)	0.7-5.0	- ^a , 0.7 ^b	<1.8 ^e <2.2 ^f	<2.4 ^{e,f}	[200]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con HCOOH/ACN (0.5:99.5, v/v)	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH ₄ AcO 0.002 M en H ₂ O/HCOOH (99.9:0.1, v/v) - Fase B: NH ₄ AcO 0.002 M en MeOH/HCOOH (99.9:0.1, v/v)	0.1-10.0	- ^a , 0.1 ^b	<6.6 ^e <7.4 ^f	<2.7 ^e <3.6 ^f	[201]
VOR	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H ₂ O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN(0.1:99.9, v/v)	0.06-15.0	- ^a , 0.06 ^b	<4.4 ^e <4.5 ^f	<6.1 ^{e,f}	[202]
VOR CASP	MS-MS	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H ₂ O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v)	VOR: 0.2-15.0 CASP: 0.5-50.0	VOR: - ^a , 0.2 ^b CASP: - ^a , 0.5 ^b	VOR: <6.6 ^e <18.6 ^f CASP: <11.9 ^e <18.8 ^f	VOR: <10.0 ^e <11.7 ^f CASP: <10.5 ^e <13.6 ^f	[203]
VOR	FLD	• Precipitación de proteínas con ACN	• FE: C18 - FM: NH ₄ AcO 0.1 M/ACN/TFA (40.9:59:1, v/v/v)	0.1-10.0	- ^a , 0.1 ^b	<8.2 ^e <14.4 ^f	<2.5 ^e <3.9 ^f	[204]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
VOR	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH • Evaporación con N₂ • Reconstitución con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 - FM: NaH₂PO₄ 0.05 M (pH 3.1)/ACN (45:55, v/v) 	0.13-8.0	- ^a , 0.13 ^b	-	-	[205]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH₄AcO 0.002 M en H₂O acidificada con HCOOH - Fase B: NH₄AcO 0.002 en MeOH acidificado con HCOOH 	0.1-10.0	0.06 ^a , 0.1 ^b	<3.1 ^e <2.8 ^f	<6.0 ^{e,f}	[206]
VOR	UV	<ul style="list-style-type: none"> • LLE con éter dietílico/H₂CCl₂/hexano/alcohol n-amílico • Evaporación con N₂ • Reconstitución con H₂O/ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH₄HCO₃ 10 M (pH 10) - Fase B: ACN 	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<3.5 ^e <9.1 ^f	<16.3 ^{e,f}	[207]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • LLE con éter tert-butílico • Evaporación con N₂ • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOONH₄ 0.01 M (pH 3.0) - Fase B: ACN 	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<2.7 ^e <4.8 ^f	<6.7 ^e <6.8 ^f	[208]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HClO₄ 0.1 % en ACN/HClO₄ 0.1 % en MeOH (50:50, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOONH₄ 0.01 M (pH 3.0 HCOOH) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.1-15.0	- ^a , 0.1 ^b	<9.2 ^e <6.6 ^f	<7.9 ^e <8.7 ^f	[209]
VOR	MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: HCOOH 0.1%/ACN (60:40, v/v) 	0.002-0.3	- ^a , 0.002 ^b	<4.2 ^e <5.3 ^f	<5.7 ^{e,f}	[210]
VOR	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 - FM: H₂O/ACN (30:70, v/v) 	0.25-16.0	- ^a , 0.25 ^b	<7.6 ^e <14.9 ^f	<15.1 ^e <14.9 ^f	[211]
VOR	UV	<ul style="list-style-type: none"> • LLE con hexano/H₂CCl₂ (70:30, v/v) y retroextracción con MeOH/NaOH • Evaporación con N₂ • Reconstitución con TF 0.01 M pH 2.5/MeOH (40:60, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C6 Fenil • FM (elución en gradiente) - Fase A: TF 0.01 M pH 2.5 - Fase B: TF 0.01 M pH 2.5/ACN (30:70, v/v) 	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<2.9 ^e <1.9 ^f	<3.0 ^{e,f}	[212]
VOR	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación a vacío • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.05 M pH 4.8/MeOH/ACN, (65:10:25, v/v/v) 	0.1-8.0	- ^a , 0.1 ^b	<4.9 ^e <9.5 ^f	<4.7 ^e <12.9 ^f	[213]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH/ ZnSO₄ 0.2 M (80:20, v/v) • SPE: <ul style="list-style-type: none"> - FE: Oasis HLB - Eluyente: ACN/H₂O (80:20, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM: HCOONH₄ 0.002 M/ACN (80:20, v/v) 	0.014-10.0	- ^a , 0.014 ^b	<8.7 ^e <8.1 ^f	<6.0 ^e <2.7 ^f	[214]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN/MeOH/ ZnSO₄ 0.2 M (28:12:60, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH 0.1 %/NH₄AcO 0.002 M (0.1:99.9, v/v) en H₂O - Fase B: HCOOH 0.1 %/NH₄AcO 0.002 M (0.1:99.9, v/v) en ACN 	0.06-20.0	0.06 ^a , 0.1 ^b	<3.5 ^e <11.7 ^f	<9.0 ^e <11.0 ^f	[215]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: <ul style="list-style-type: none"> - FE: fase reversa C18 - Eluyente: HCOOH 0.1 % en H₂O/ HCOOH 0.1 % en MeOH (20:80, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C6 Fenil • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/MeOH (0.1:99.9, v/v) 	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<4.0 ^e <3.3 ^f	<1.4 ^e <4.2 ^f	[216]
VOR	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con n-hexano/acetato de etilo/NH₄OH (70:20:10, v/v/v) • Evaporación a vacío • Reconstitución con H₂O/ACN (50:50, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/H₂O (0.05:99.95, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.05:99.95, v/v) 	0.06-15	- ^a , 0.06 ^b	<9.8 ^e <9.9 ^f	<9.4 ^e <0.5 ^f	[217]
VOR	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • LLE con n-hexano/acetato de etilo (3:1, v/v) • Evaporación con N₂ • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.01M pH 2.5/ACN (55:45, v/v) 	0.1-10.6	- ^a , 0.1 ^b	<6.0 ^e <5.1 ^f	<8.6 ^e <4.5 ^f	[218]
CASP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: MeOH 	0.2-20.0	0.07 ^a , 0.2 ^b	<9.3 ^e <7.7 ^f	<10.13 ^e <7.5 ^f	[219]
CASP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: PFP • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: H₂O/i-PrOH/HCOOH (90:10:0.1, v/v/v). - Fase B: MeOH/i-PrOH/HCOOH con NH₄AcO 2 mM (90:10:0.1, v/v/v) 	1.3-40	- ^a , 1.3 ^b	<8.0 ^e <15.8 ^f	<9.4 ^e <10.3 ^f	[220]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
CASP ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HCOOH/ACN (0.5:99.5, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	CASP: 0.2-10.0 ANI: 0.2-10.0	CASP: 0.01 ^a , 0.2 ^b ANI: 0.05 ^a , 0.2 ^b	CASP: <4.4 ^e <9.0 ^f ANI: <11.2 ^e <8.9 ^f	CASP: <11.8 ^e <12.8 ^f ANI: <6.2 ^e <5.6 ^f	[221]
CASP	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación con N₂ • Reconstitución con TF 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: TF 0.02 M (pH 2.5)/ACN (65:35, v/v) 	1.0-20.0	0.5 ^a , 1.0 ^b	<10.47 ^e <13.63 ^f	<4.8 ^e <4.6 ^f	[222]
CASP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: MeOH 	0.05-20.0	0.001 ^a , 0.05 ^b	<5.3 ^e <5.5 ^f	<2.0 ^e <3.8 ^f	[223]
CASP ANI	FLD	-	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: TFA 0.1% en H₂O - Fase B: TFA 0.1% en ACN 	CASP: 0.13-100 ANI: 0.05-10	CASP: - ^a , 0.13 ^b ANI: - ^a , 0.05 ^b	CASP: <6.5 ^{e,f} ANI: <2.4 ^{e,f}	-	[224]
CASP ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C4 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	CASP: 0.11-5.4 ANI: 0.06-6.4	CASP: 0.03 ^a , 0.11 ^b ANI: 0.008 ^a , 0.06 ^b	CASP: <8.9 ^e <7.3 ^f ANI: <15.4 ^e <18.2 ^f	CASP: <11.9 ^e <3.4 ^f ANI: <11.7 ^e <6.8 ^f	[225]
CASP ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HCOOH/ACN (0.5:99.5, v/v) • Dilución con MeOH/HCOOH 0.1% en HCOONH₄ 10 mM (50:50, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOONH₄ 10 mM/HCOOH (99.9:0.1, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	CASP: 0.06-30 ANI: 0.1-12.0	CASP: - ^a , 0.06 ^b ANI: - ^a , 0.1 ^b	CASP: <11.1 ^e <4.2 ^f ANI: <2.4 ^e <8.9 ^f	CASP: <6.8 ^e <2.8 ^f ANI: <8.7 ^e <8.8 ^f	[226]
CASP	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: - FE: fase reversa C18 - Eluyente: HAcO 4% en MeOH - Evaporación con N₂ • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM: TFA (pH 3.0 DEA)/ACN (60:40, v/v) 	-	- ^a , 0.1 ^b	<7.0 ^e <10.0 ^f	-	[227]
CASP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Método 1 - Precipitación de proteínas con ACN - Dilución con FM • Método 2 - Precipitación de proteínas con ACN - Evaporación con N₂ - Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM: HAcO 1% en NH₄AcO 10 mM/HAcO 1% en ACN 	0.04-20	Método 1 - ^a , 0.04 ^b	Método 1 <11.6 ^e <7.8 ^f	Método 1 <5.7 ^e <5.3 ^f	[228]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
CASP	AD	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Evaporación con N₂ • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: CN • FM: ácido cítrico (0.05M pH 6.3)/ACN (67:33, v/v) 	0.07-35	- ^a , 0.07 ^b	<9.7 ^e <10.3 ^f	<5.7 ^e <8.3 ^f	[229]
CASP	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: - FE: fase reversa C8 - Eluyente: TFA 0.05 % y NaOH 0.25 M en MeOH (50:50, v/v) - Evaporación con N₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: TFA (pH 3.0)/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	0.13-10.0	- ^a , 0.13 ^b	<5.7 ^e <5.3 ^f	<1.7 ^e <10.7 ^f	[230]
CASP	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: - FE: fase normal Diol • Eluyente: ACN/HCOOH 0.1 % en H₂O (20:80, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: CN • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: ACN 	0.2-20	- ^a , 0.2 ^b	<16.1 ^e <12.1 ^f	<16.4 ^e <10.4 ^f	[231]
ANI	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH₄AcO/H₂O (0.1:99.9, v/v) (pH 5.0) - Fase B: ACN 	0.10-10.0	0.01 ^a , 0.10 ^b	<15.0 ^{e,f}	-	[232]
ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con Fase B 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.0078-5	- ^a , 0.0078 ^b	-	-	[233]
ANI	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • SPE: - FE: fase reversa C8 - Eluyente: ACN/KH₂PO₄ 10 mM (70:30, v/v) - Evaporación a 40 °C • Reconstitución con ACN/KH₂PO₄ 10 mM (50:50, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: KH₂PO₄ 10 mM (pH 4.5) - Fase B: ACN 	0.03-20	0.008 ^a , 0.03 ^b	<23.7 ^e <14.6 ^f	-	[234]
ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH/ACN/HCOOH (33.3:33.3:33.3, v/v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM (elución en gradiente) - Fase A: HCOOH 0.1% en H₂O - Fase B: HCOOH 0.1% en ACN 	0.5-12.0	- ^a , 0.5 ^b	<7.8 ^e <10.2 ^f	-	[235]

Tabla I.4.- Cont.

Análito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
ANI	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN/ NH₄AcO pH 4.0 (10:90, v/v) • SPE: <ul style="list-style-type: none"> - FE: fase reversa C8 - Eluyente: ACN/NH₄AcO pH 4.0 (70:30, v/v) - Evaporación a 40°C • Reconstitución con FM 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM: NH₄AcO 50 mM (pH 4.0)/ACN (50:50, v/v) 	0.02-5.1	- ^a , 0.02 ^b	- ^e , <11.6 ^f	- ^e , <4.5 ^f	[236]
ANI	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: TFA/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: TFA/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<2.4 ^e , - ^f	-	[237]
ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH • Dilución con NH₄AcO 50 mM pH 4.0 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.05-20.0	- ^a , 0.05 ^b	<7.3 ^e , - ^f	<4.3 ^e , - ^f	[238]
ANI	FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: TFA/H₂O (0.1:99.9, v/v) - Fase B: TFA/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.006-10.0	- ^a 0.006 ^b	<4.7 ^e , - ^f	<5.0 ^e , - ^f	[239]
ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con HCOOH/ACN (0.5:99.9, v/v) • Dilución (no específica disolvente) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: HCOOH/HCOONH₄ 10 mM (0.1:99.9, v/v) - Fase B: HCOOH/ACN (0.1:99.9, v/v) 	0.1-50.0	- ^a , 0.1 ^b	-	<10.1 ^e , - ^f	[240]
ANI	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con ACN • Dilución con Fase A 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM (elución en gradiente) <ul style="list-style-type: none"> - Fase A: NH₄AcO 0.1 % (m/v) pH 7.0 - Fase B: ACN 	0.1-20.0	- ^a , 0.1 ^b	<4.4 ^e , <8.4 ^f	<10.4 ^e , <12.6 ^f	[241]
ANI	MS-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH/ZnSO₄ 0.2 M (80:20, v/v) • SPE: <ul style="list-style-type: none"> - FE: HLB - Eluyente: MeOH/NH₄AcO 10 mM + HAcO 0.1 % (97:3, v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C18 • FM: H₂O/MeOH (50:50, v/v) 	0.04-10.0	0.01 ^a , 0.04 ^b	<6.6 ^e , <5.3 ^f	<1.5 ^e , <2.5 ^f	[242]
ANI	UV	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitación de proteínas con MeOH 	<ul style="list-style-type: none"> • FE: C8 • FM: (NH₄)₃PO₄ 5 mM/ MeOH (55:45, v/v) 	1.0-10.0	- ^a , 1.0 ^b	<1.8 ^e , <4.1 ^f	<6.9 ^e , <7.3 ^f	[243]

Tabla I.4.- Cont.

Analito	Detección	Tratamiento de la muestra	Fase estacionaria y fase móvil	Intervalo de calibración (mg L ⁻¹)	LOD ^a LOQ ^b (mg L ⁻¹)	Precisión, RSD ^c (%)	Exactitud, E _r ^d (%)	Ref.
ANI	UV	• Precipitación de proteínas con MeOH	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH ₄ AcO 10 mM pH 4.0 - Fase B : MeOH	0.05-10.0	- ^a , 0.05 ^b	<5.1 ^e <6.5 ^f	-	[244]
ANI	MS-MS	• Precipitación de proteínas con MeOH	• FE: C18 • FM (elución en gradiente) - Fase A: NH ₄ HCO ₃ 1 M/H ₂ O/MeOH/ NH ₄ OH (1:90:8.4:0.6, v/v/v/v) - Fase B: NH ₄ HCO ₃ 1 M/H ₂ O/ACN (1:4:95, v/v/v)	0.05-20.0	- ^a , 0.05 ^b	<4.8 ^{e,f}	<4.7 ^{e,f}	[245]

^a Límite de detección. ^b Límite de cuantificación. ^c Desviación estándar relativa. ^d Error relativo. ^e Intradía. ^f Interdía.

Abreviaturas: **2-PrOH:** 2-propanol. **ACN:** acetonitrilo. **AD:** detección amperométrica. **AMK:** amikacina. **ANI:** anidulafungina. **C18:** octadecilsilano. **C4:** butilsilano. **C6:** hexilsilano. **C8:** octilsilano. **CASP:** caspofungina. **CEF:** ceftolozano. **CLD:** detector de quimioluminiscencia. **CN:** ciano. **DEA:** dietilamina. **DMSO:** dimetilsulfóxido. **EtOH:** etanol. **FE:** fase estacionaria. **FLD:** detector de fluorescencia. **FM:** fase móvil. **FMC:** 9-fluorenilmetil cloroformato. **FNBD:** 7-fluoro-4-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol. **HAcO:** ácido acético. **HCl:** ácido Clorhídrico. **HFBA:** ácido heptafluorobutírico. **HFPA:** ácido heptafluoropentanóico. **HILIC:** cromatografía líquida de interacción hidrofílica. **HLB:** balance Hidrofílico-Lipofílico. **IDA:** 1-metoxycarbonil indolicina-3,5-dicarbaldéhid. **i-PrOH:** isopropanol. **LLE:** extracción líquido-líquido. **MCX:** intercambio catiónico. **MeOH:** metanol. **MER:** meropenem. **MES:** ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico. **MOPS:** ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico. **MS:** espectrometría de masas. **MS-MS:** espectrometría de masas en tándem. **MTBE:** eter metil tert-butílico. **NaAcO:** acetato de sodio. **NaAcO:** acetato sódico. **NH₄AcO:** acetato amónico. **NH₄AcO:** acetato de amonio. **NITC:** 1-naftil isotiocianato. **PFP:** pentafluorofenilo. **PIP:** piperacilina. **SPE:** extracción en fase sólida. **TAZ:** tazobactam. **TCA:** ácido tricloroacético. **TDM:** monitorización terapéutica de fármacos. **TEA:** trietilamina. **TF:** tampón fosfato. **TFA:** ácido trifluoacético. **UV:** espectrofotómetro UV-visible. **VOR:** voriconazol.

I.9.- Validación de métodos analíticos para la monitorización de fármacos en el ámbito hospitalario

La validación de métodos analíticos que generen datos cuantitativos de concentración de fármaco en diferentes matrices biológicas (p. ej. suero, plasma, sangre, orina o saliva) y que vayan a utilizarse en ensayos clínicos o para la determinación de parámetros farmacocinéticos o toxicocinéticos en humanos o animales es imprescindible.

Para llevar a cabo la validación de un método bioanalítico se pueden seguir las recomendaciones descritas en guías de diferentes organismos o instituciones de prestigio. Algunos ejemplos de estas guías son las publicadas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, acrónimo de *European Medicines Agency*) [246], o las guías de la *Food and Drug Administration* (FDA) [247].

En la presente Tesis Doctoral se han seguido las recomendaciones de la EMA. Según esta guía, se debe realizar una validación completa de cualquier método analítico ya sea nuevo o bien adaptado de la bibliografía. Esta validación debe realizarse para cada analito y para cada matriz en la que se vaya a realizar dicha determinación.

Según la EMA, las "características de un método bioanalítico" esenciales para asegurar la aceptabilidad y la fiabilidad de los resultados analíticos son: LLOQ, aceptabilidad de la curva de calibrado, exactitud, precisión y selectividad. También se incluyen otros aspectos que pueden afectar a la exactitud y precisión: integridad de dilución, contaminación por efecto memoria, estabilidad del analito en las disoluciones durante el periodo completo de almacenamiento y en las condiciones de procesado, en este último caso también la del patrón interno (PI) (si procede). Todas las disoluciones empleadas en la validación del método deben prepararse aditivando con el analito blancos de la muestra biológica. En la Tabla I.5 se resumen para cada una de estas características analíticas la metodología a utilizar para su validación, así como, los criterios de aceptación.

Tabla I.5.- Características analíticas a validar según la guía de la EMA.

Característica	Disoluciones	Criterio de aceptación	Comentario
Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	<ul style="list-style-type: none"> Blancos de muestra aditivados con analito Blanco de muestra 	<ul style="list-style-type: none"> Señal (LLOQ) \geq 5·Señal (blanco) 	<ul style="list-style-type: none"> El LLOQ debe adaptarse a las concentraciones objetivo de estudio
Aceptabilidad de la curva de calibrado	<ul style="list-style-type: none"> Blancos de muestra aditivados con analito ($nc \geq 6$) Blanco de muestra Muestra cero (blanco de muestra aditivado con PI) 	<ul style="list-style-type: none"> E_r (LLOQ) $\leq \pm 20\%$ E_r (resto) $\leq \pm 15\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Intervalo de concentraciones: LLOQ-ULOQ Se deben realizar réplicas de cada control Deben construirse al menos 3 curvas de calibración El 75% de los patrones de calibración deben cumplir los criterios de aceptación
Exactitud	<ul style="list-style-type: none"> $nc \geq 4$: <ul style="list-style-type: none"> LLOQ 3·LLOQ (QC bajo) 30-50% del intervalo de concentraciones de la curva de calibrado (QC medio) 0.75·ULOQ (QC alto) 	<ul style="list-style-type: none"> E_r (LLOQ) $\leq \pm 20\%$ E_r (QCs) $\leq \pm 15\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Exactitud intra-día: en una misma sesión de trabajo, se deben realizar al menos 5 réplicas por nc Exactitud inter-día: se deben realizar al menos 3 sesiones de trabajo en al menos 2 días
Precisión	<ul style="list-style-type: none"> $nc \geq 4$: <ul style="list-style-type: none"> LLOQ 3·LLOQ (QC bajo) 30-50% del intervalo de concentraciones de la curva de calibrado (QC medio) 0.75·ULOQ (QC alto) 	<ul style="list-style-type: none"> RSD (LLOQ) $\leq 20\%$ RSD (QCs) $\leq 15\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Precisión intra-día: en una misma sesión de trabajo, se deben realizar al menos 5 réplicas por nc Precisión inter-día: se deben realizar al menos 3 sesiones de trabajo en al menos 2 días
Selectividad	<ul style="list-style-type: none"> Al menos 6 blancos de muestra independientes (sin aditivar) Blanco de muestra aditivado con analito al LLOQ 	<ul style="list-style-type: none"> Señal (blanco) $\leq 0.2 \cdot$ Señal (LLOQ) 	
Integridad de dilución	<ul style="list-style-type: none"> Blanco de muestra aditivado con analito a una concentración mayor al ULOQ y diluido con blanco de muestra sin aditivar 	<ul style="list-style-type: none"> $E_r \leq \pm 15\%$ RSD $\leq 15\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Se deben realizar al menos 5 determinaciones por dilución
Efecto memoria	<ul style="list-style-type: none"> Blanco de muestra aditivado con analito a una concentración igual al ULOQ o alternativamente una muestra con una concentración elevada de analito Blanco de muestra sin aditivar 	<ul style="list-style-type: none"> Señal (blanco) $\leq 0.2 \cdot$ Señal (LLOQ) 	<ul style="list-style-type: none"> El blanco de muestra sin aditivar se procesa justo después de las disoluciones que contienen analito
Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> $nc = 2$: <ul style="list-style-type: none"> 3·LLOQ (QC bajo) 0.75·ULOQ (QC alto) 	<ul style="list-style-type: none"> $E_r \leq \pm 15\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Se deben realizar estudios de estabilidad a corto y largo plazo en las condiciones de almacenamiento (temperatura, tiempo, ...) y en los equipos de medida

Abreviaturas: E_r : error relativo. LLOQ: límite de cuantificación inferior. nc : nivel de concentración. PI: patrón interno. QC: control. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Tal y como se ha comentado en el Capítulo I, la implementación en el ámbito hospitalario de un plan para la monitorización de antimicrobianos junto con la aplicación de objetivos farmacocinéticos/farmacodinámicos, permite optimizar el tratamiento farmacológico de pacientes hospitalizados, lo que resulta en un beneficio clínico significativo para los mismos. Este hecho cobra especial importancia en el caso de pacientes críticos ingresados en las UCI, así como en pacientes oncohematológicos, ya que se ha demostrado que las pautas estandarizadas para la dosificación de antimicrobianos no resultan adecuadas para estos pacientes debido a que las alteraciones en su estado fisiológico (provocadas por la infección y las intervenciones que se realizan en estos pacientes) alteran los parámetros farmacocinéticos de estos fármacos y, por consiguiente, su concentración plasmática y grado de exposición a los mismos.

Para llevar a cabo esta monitorización, existen guías que recomiendan el empleo de técnicas cromatográficas validadas que sean capaces de proporcionar resultados analíticos con relativa rapidez, en un plazo máximo de 24 h, considerado útil dentro del ámbito asistencial.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo, puesta a punto y validación de métodos cromatográficos ajustados a propósito utilizando el equipamiento disponible en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Farmacia y en el Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de antimicrobianos de interés en plasma de pacientes críticos ingresados en la UCI y pacientes atendidos en el Servicio de Oncohematología.

Los antimicrobianos estudiados en esta Tesis Doctoral incluyen:

- Antibacterianos:
 - Betalactámicos: MER, PIP (Capítulo IV) y CEF combinado con TAZ (Capítulo V)
 - Aminoglucósidos: AMK (Capítulo VI)
- Antifúngicos:
 - Triazoles: VOR (Capítulo VII)
 - Equinocandinas: CASP (Capítulo VIII) y ANI (Capítulo IX)

La instrumentación disponible en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Servicio de Farmacia es un cromatógrafo de líquidos de alta resolución provisto de un sistema de inyección automático, detector UV-Vis de longitud de onda variable y detector FLD; así como, una columna C18. Para el desarrollo del método de AMK en

el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Farmacia se disponía de un cromatógrafo de líquidos provisto de un sistema de inyección manual y detector FLD, también con una columna C18.

Los objetivos específicos para la consecución de este objetivo general se indican en cada uno de los capítulos correspondientes.

CAPÍTULO III

EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA GENERAL

En el presente capítulo se exponen aspectos generales sobre el experimental y la metodología (equipos utilizados, reactivos, preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, procedimientos para el acondicionamiento de los sistemas cromatográficos, validación de los métodos desarrollados según las recomendaciones de la EMA, aseguramiento interno de la calidad y el análisis farmacocinético, procesamiento y tratamiento de los datos, y programas informáticos utilizados) seguida en los capítulos posteriores. Los aspectos concretos acerca de los métodos cromatográficos, preparación de disoluciones de los analitos, tratamiento de las muestras de plasma, dosificación de pacientes y tiempos de muestreo se detallan en el apartado de experimental de cada uno de los capítulos.

III.1.- Instrumentación

El agua utilizada para la preparación de todas las disoluciones y fases móviles fue de calidad ultrapura obtenida con los sistemas Ultra Clear TWF UV (Siemens Water Technologies, Barsbüttel, Alemania) y ELGA-PURELAB flex (ELGA Lab. Water., Madrid, España). Para el ajuste del pH de las fases móviles y disoluciones tampón se utilizaron dos pH-metros ambos provistos de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos (Crison Instruments, S.A., modelo micropH 2000, Alella, Barcelona, España).

Durante el tratamiento de las muestras se utilizó el vórtice Vortex Mixer SA3 (Stuart Scientific, Staffordshire, Reino Unido). Se empleó una centrífuga para tubos de tipo Vacutainer® para extracción de muestra de sangre (Nahita – Instrumentación Científico-técnica S.L., Madrid, España) y una centrífuga para tubos Eppendorf® (Abbott Laboratories, Illinois, EE.UU.). En los estudios para la optimización del tratamiento de muestras para la determinación de MER y PIP se utilizaron tubos de ultrafiltración Centrifree® Ultrafiltration Devices (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irlanda) con membranas Ultracel® de celulosa regenerada (masa molecular de corte: 30 kDa).

En el caso particular de AMK, las muestras se agitaron con un vórtice Velp Científica Vortex (Usmate, Italia) y se usó una centrífuga para tubos de ensayo (Heraeus, S.A., Sepatech Medifuge, Boadilla del Monte, Madrid, España). Se utilizó un baño termostático JP Selecta S.A. (modelo Frigiterm-10, Abrera, Barcelona, España) con temperaturas regulables desde -10 °C hasta 100 °C.

Para la obtención de los espectros de absorción UV-Vis de aquellos analitos analizados mediante detección UV-Vis, excepto AMK, se utilizó el espectrofotómetro de fila de diodos modelo zuzi-4488 (AUXILAB S.L., Beriain, Navarra, España). Para

el control de este instrumento, la adquisición y el tratamiento de los espectros se utilizó el programa UVWIN 5.0 (PG Instruments Limited, Woodway Lane, Leicestershire, Reino Unido).

Los espectros de absorción UV-Vis de AMK se obtuvieron con el espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard modelo 8453 (HP inc., Palo Alto, California, EE.UU.). Para el control de este instrumento, la adquisición y el tratamiento de los espectros de absorción obtenidos se utilizó el software ChemStation HP (A.07.01 [52] © HP 1999). Los espectros FLD (excitación y emisión) de los derivados de AMK se obtuvieron con el fluorímetro Perkin Elmer Prec Sey modelo LS-45 (Perkin Elmer INC., Cambridge, Reino Unido) provisto del programa Molecular Spectroscopy FL WinLAB (4.00.02 - Perkin Elmer INC., 2001).

Para la realización de todos los estudios, excepto los de AMK, se empleó un equipo HPLC de módulos integrados Waters (Waters Corporation, Milford, EE.UU.) constituido por un módulo que incluye una bomba cuaternaria, un sistema de desgasificación en línea, un inyector automático, un horno para la columna (modelo Waters e2695), un detector UV-Vis con longitud de onda dual (modelo Waters 2489) y un detector FLD (modelo Waters 2475 Multi λ). Para el control del equipo, la adquisición y el tratamiento de los cromatogramas se utilizó el software Empower (Versión Empower 2, Waters Corporation, Milford, EE.UU.).

El equipo cromatográfico empleado para la determinación de AMK fue el sistema de módulos integrados Jasco (Jasco Corporation, Ishikawa-machi, Hachiojishi. Tokyo, Japón) constituido por una bomba de elución isocrática (modelo JASCO PU-2080 Plus Intelligent HPLC pump), un detector FLD (modelo JASCO FP-2020 Intelligent Fluorescence Detector) y una válvula Rheodyne (Cotati, CA, EE.UU.) con un bucle de 20 μ L para la inyección manual de las disoluciones. Para el control del equipo, la adquisición y el tratamiento de cromatogramas se utilizó el software Jasco-ChromNAV (1.17.01 [Build 10] Jasco Corp. 2006-2011).

La determinación de AMK mediante FPIA se realizó en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Valencia mediante un autoanalizador Abbott TDx (Abbott Scientific, Illinois, USA).

Todas las disoluciones de reactivos, así como las fases móviles se filtraron a través de filtros desechables de Nylon® con un diámetro de poro de 0.45 μ m de Micron Separations (Micron Separations Inc., Westboro, Massachusetts, EE.UU.) o PALL (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.). Para la desgasificación de las fases móviles se utilizaron los baños de ultrasonidos Elmasonic S60 (Elma GmbH, Singen, Alemania) y JP Selecta S.A. (modelo Ultrasons 9L, Abrera, Barcelona, España). Para la filtración de las disoluciones que contienen analito, se emplearon

filtros de jeringa de diámetro de poro de 0.45 μm o 0.22 μm de diferente naturaleza: Nylon[®], politetrafluoruro de etileno (PTFE o teflón) y fluoruro de polivinilideno (PVDF, acrónimo de *polyvinylidene difluoride*), acoplables a una jeringa de vidrio (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) de 1 mL.

III.2.- Reactivos y disoluciones

El plasma empleado para la preparación de las disoluciones de los patrones de calibración y controles de analito fue cedido por el Banco de Sangre del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Este plasma se obtuvo de manera aleatoria de sujetos sanos que no estaban bajo tratamiento farmacológico alguno. Inmediatamente tras su recepción, éste se alicuotó en tubos heparinizados de 5 mL que se almacenaron a -20 °C hasta su empleo. Estas muestras se descongelaron a temperatura ambiente previamente a su utilización.

Se emplearon ACN, MeOH, etanol (EtOH), diclorometano (CH_2Cl_2) de grado HPLC (@Multisolvent, Scharlau, S.L, Barcelona, España). El ácido fórmico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido bórico, dihidrogenofosfato de potasio e hidróxido sódico fueron de calidad para análisis (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España). Como reactivos derivatizantes de AMK se utilizaron *o*-ftalaldehído (OPA) (99%, para fluorescencia y HPLC, Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Steinheim am Albuch, Alemania) y *N*-acetil-L-cisteína (NAC) (para análisis, Fluka, Butch, Suiza).

Las disoluciones de tampón fosfato 0.05 M utilizadas para la preparación de las fases móviles o para la dilución de los blancos de plasma aditivados con MER y PIP, así como las muestras de plasma de MER y PIP, se prepararon por disolución de las cantidades adecuadas de dihidrogenofosfato de potasio en agua. El pH se ajustó potenciométricamente a pH 3.0 con ácido fosfórico al 8 % (m/v) o a pH 7.0 y 7.5 con hidróxido sódico 1 M.

La disolución tampón bórico-borato 0.1 M a pH 9.5 utilizada en el Capítulo VI, se preparó por disolución de la cantidad adecuada de ácido bórico en agua. El pH se ajustó potenciométricamente con hidróxido sódico 1 M.

La disolución de reactivo derivatizante OPA-NAC utilizada en el capítulo VI se preparó semanalmente por disolución de una cantidad adecuada de OPA y de NAC en la mínima cantidad necesaria de EtOH. El volumen se completó con la disolución tampón bórico-borato 0.1 M a pH 9.5. Las concentraciones de OPA y NAC fueron 2.55×10^{-3} y 2.55×10^{-2} M, respectivamente. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C.

III.3.- Procedimientos

III.3.1.- Acondicionamiento de los sistemas cromatográficos

Previamente a la inyección de las muestras en el cromatógrafo, es necesario acondicionar el sistema con la fase móvil. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento:

Las columnas estaban almacenadas en ACN. Para su empleo se bombearon unos 10 mL de agua a flujo 1 mL min⁻¹ para evitar la precipitación del tampón en la columna. A continuación, se bombeó la fase móvil a flujo 1 mL min⁻¹ y se mantuvo al menos durante 30 min para asegurar la estabilización del sistema cromatográfico. Con un flujo de fase móvil de 1 mL min⁻¹, la presión se debe encontrar entre 1400 y 1700 PSI. Durante todo el estudio realizado, la presión se mantuvo prácticamente constante, siendo las variaciones máximas de 50 PSI tras una semana de trabajo.

Una vez finalizada la sesión de trabajo las columnas se almacenaron en ACN, para ello, se repitió el proceso anterior en sentido inverso, realizando en primer lugar el cambio de la fase móvil a agua, y finalmente, de agua a ACN. Una presión en el sistema cromatográfico de aproximadamente 600 PSI con un flujo de ACN de 1 mL min⁻¹, es indicativo de que no ha habido ninguna obstrucción en el sistema cromatográfico.

III.3.2.- Cálculo de los factores de retención y de los factores de asimetría

Para el cálculo de los factores de retención (k) se utilizó la expresión:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{Ec. III.1})$$

donde t_R es el tiempo total de retención del analito y t_M es el "tiempo total básico", estimado a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma.

Para el cálculo de los factores de simetría (A/B) se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{Factor de simetría} = \frac{A}{B} \quad (\text{Ec. III.2})$$

donde A y B son la semianchuras izquierda y derecha, respectivamente, al 10% de la altura de pico (asimetría de Foley y Dorsey).

III.3.3.- Validación de los métodos desarrollados según las recomendaciones de la EMA

Para la validación de los métodos desarrollados para la determinación de MER y PIP (Capítulo IV), CEF/TAZ (Capítulo V), VOR (Capítulo VII), CAS (Capítulo VIII) y ANI (Capítulo IX) en muestras de plasma se siguieron las recomendaciones de la guía de la EMA para la validación de métodos bioanalíticos [246] (apartado I.9, Tabla I.5). Todos los controles utilizados se prepararon aditivando con el analito blancos de muestra de plasma. Los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para cada uno de los analitos se indican en el capítulo correspondiente. A continuación, se describen los procedimientos seguidos para la validación de cada una de las características analíticas.

- **LLOQ:** la guía de la EMA no indica ningún método para estimar el LLOQ, sólo indica que debe adaptarse a las concentraciones de analito esperadas en las muestras y que la señal analítica obtenida para el LLOQ debe ser al menos cinco veces mayor que la señal de un blanco de muestra. Por ello, para cada analito, se fijaron LLOQs prácticos teniendo en cuenta los niveles mínimos usuales del analito en los pacientes tratados.

Para cada analito, se prepararon seis disoluciones de blanco de plasma aditivado a los LLOQs prefijados y se procesaron con los métodos analíticos desarrollados. Paralelamente, para cada analito, se procesaron seis disoluciones de blanco de plasma sin aditivar. Se estimaron los valores de la relación Señal (LLOQ) / Señal (blanco) y se comprobó su conformidad al criterio de aceptación.

- **Linealidad y aceptabilidad de la curva de calibración:** la guía de la EMA no contempla la validación de la linealidad de la curva de calibración. No obstante, es un criterio de calidad de interés analítico.

Con el fin de evaluar la linealidad, la estabilidad del proceso de calibración y la aceptabilidad de las curvas de calibrado, durante seis sesiones de trabajo (seis días) se prepararon calibrados independientes y se evaluó la respuesta lineal entre la concentración de analito y su señal analítica (área de pico). El intervalo de concentraciones estudiados (LLOQ-ULOQ) en la curva de calibrado de cada analito se seleccionó de modo consistente con los niveles usuales de éste en los pacientes tratados.

Para la validación de la linealidad se examinó el valor del coeficiente de determinación (R^2) y se utilizó el criterio $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO

17025:2017 (*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración*).

Para evaluar la estabilidad del proceso de calibración, se compararon los valores de las ordenadas en el origen (b_0) y de las pendientes (b_1) obtenidos en cada una de las sesiones de trabajo. Diferencias entre los valores obtenidos para b_1 inferiores al 10% se consideró una indicación de una estabilidad satisfactoria.

Para la validación de la aceptabilidad de las curvas de calibrado, se calcularon los valores de E_r de las concentraciones estimadas a partir de la curva de calibrado para cada uno de los controles utilizados en la correspondiente sesión de trabajo. Se comprobó la conformidad de estos valores con los criterios de aceptación.

- **Exactitud y precisión:** estas características analíticas se evaluaron simultáneamente. Para evaluar la exactitud y precisión **intra-día** se prepararon controles sobre matriz plasma a cuatro niveles de concentración (LLOQ, QC bajo, QC medio y QC alto, ver Tabla I.5), para cada nivel de concentración se prepararon cinco réplicas independientes. Estas réplicas se procesaron en una única sesión de trabajo. Las señales analíticas se interpolaron en la recta de calibrado preparada y procesada en la misma sesión de trabajo, se estimaron los valores de concentración para cada uno de los controles procesados, junto con los correspondientes valores de E_r y RSD. Se comprobó la conformidad de los valores de E_r y de RSD a los criterios de aceptación.

Para evaluar la exactitud y precisión **inter-día**, se prepararon diariamente, durante cuatro días, controles de los mismos valores de concentración a los utilizados en los estudios intra-día. Las señales analíticas se interpolaron en la recta de calibrado correspondiente al mismo día y se estimaron los valores de concentración para cada uno de los controles procesados, junto con los correspondientes valores de E_r y RSD. Se comprobó la conformidad de los valores de E_r y RSD a los criterios de aceptación.

- **Selectividad:** se analizaron muestras de pacientes ingresados, ninguno de ellos bajo tratamiento con el analito (blancos de muestra) pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes (por ejemplo, ácido valpróico, ceftriaxona, cilastatina, ertapenem, fenitoína, ibuprofeno, levofloxacino, paracetamol o warfarina, entre otros) que pueden ser potenciales interferentes. Paralelamente, para cada analito, se prepararon disoluciones de blanco de plasma aditivado a los LLOQs prefijados. Se estimaron los valores

de la relación Señal (blanco)/ Señal (LLOQ) y se comprobó su conformidad al criterio de aceptación.

- **Integridad de dilución:** tal y como se ha comentado en el apartado I.9, la guía de la EMA también considera la validación de la integridad de dilución puesto que la dilución de las muestras puede afectar a la exactitud y precisión de los métodos analíticos.

Para validar este parámetro, se prepararon blancos de muestra aditivados con una concentración superior al ULOQ y se diluyeron con blanco de muestra sin aditivar. Para cada analito, las diluciones ensayadas se seleccionaron por su adecuación y aplicabilidad a la práctica clínica. Para cada dilución estudiada, se prepararon siete réplicas independientes. Las señales analíticas se interpolaron en la correspondiente recta de calibrado preparada y procesada en la misma sesión de trabajo. Se estimaron los valores de concentración para cada uno de los controles procesados, junto con los correspondientes valores de E_r y RSD. Se comprobó la conformidad de los valores de E_r y RSD a los criterios de aceptación.

- **Efecto memoria por arrastre de muestra:** el impacto del posible arrastre de analito residual en el equipo de medida procedente de determinaciones anteriores (efecto memoria) debe evaluarse y minimizarse durante el desarrollo del método.

Para la evaluación del efecto memoria, se prepararon blancos de muestra aditivados con una concentración igual al ULOQ y blancos de muestra sin aditivar. Éstos últimos se inyectaron inmediatamente después de las disoluciones aditivadas. Se estimaron los valores de la relación Señal (blanco)/ Señal (LLOQ) y se comprobó su conformidad al criterio de aceptación.

- **Estabilidad:** para evaluar la estabilidad **a corto y largo plazo** de los analitos en plasma se prepararon controles sobre matriz plasma a dos niveles de concentración (QC bajo y QC alto, ver Tabla I.5). Para cada nivel de concentración se prepararon réplicas independientes que se almacenaron (sin tratar) en distintas condiciones y se analizaron a tiempos prefijados:
 - Para estudios de estabilidad a corto plazo: 0 – 7 días en nevera (4 °C) y congelador (-20 °C).
 - Para estudios de estabilidad a largo plazo: 14 y 30 días en congelador (-20 °C).

Para cada condición de almacenamiento, tiempo y nivel de concentración se realizaron tres réplicas independientes. Se estimaron los

valores de concentración para cada uno de los controles procesados para cada tiempo y condición de almacenamiento estudiado (por interpolación de las señales analíticas en la correspondiente recta de calibrado preparada y procesada en la misma sesión de trabajo) junto con los correspondientes valores de E_r . Se comprobó la conformidad de los valores de E_r a los criterios de aceptación.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de realizar secuencias de trabajo en el análisis de rutina de muestras, se estudió la estabilidad en el **inyector automático** a temperatura ambiente de los analitos en las disoluciones de plasma obtenidas tras aplicar el tratamiento de muestra desarrollado. Para ello, se utilizaron blancos de plasma aditivados con analito a los mismos niveles de concentración que en los estudios de estabilidad a corto y largo plazo (QC bajo y alto), se almacenaron en el inyector a temperatura ambiente y se analizaron a diferentes tiempos. Para cada nivel de concentración y tiempo ensayado se realizaron tres réplicas independientes. De modo análogo a los estudios de estabilidad a corto y largo plazo, se comprobó la conformidad de los valores de E_r a los criterios de aceptación.

III.3.4.- Aseguramiento interno de la calidad de los resultados

Durante el análisis de muestras reales de pacientes con los métodos bioanalíticos desarrollados y validados, se comprobó periódicamente que éstos seguían bajo control, es decir, que proporcionaban resultados válidos.

Para el aseguramiento interno de la calidad, se realizaron actividades (verificación y control) utilizando los controles QC bajo y QC alto. Como criterios de aceptación se utilizaron los indicados por la EMA para exactitud y precisión (Tabla I.5). Así, cada sesión de trabajo se inició con la calibración del método y a continuación con la verificación del mismo. Adicionalmente, en cada sesión de trabajo, se analizaron los controles en periodos prefijados e insertados en los ensayos de rutina.

III.3.5.- Análisis farmacocinético

La **toma de muestras de sangre** de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia fue realizada por el personal de enfermería a los tiempos previamente establecidos para cada uno de los fármacos y que se indican en cada uno de los capítulos. Para evitar fenómenos de hemodilución de las muestras, se desechó un volumen suficiente de sangre y, a continuación, se recogieron ~2-3 mL en el tubo adecuado para cada analito:

- Para MER, PIP, CEF/TAZ, AMK, CAS y ANI se emplearon tubos Vacutainer® de 5 mL (tapón verde) con heparina de litio como agente anticoagulante.
- Para VOR se emplearon tubos Vacutainer® de 5 mL (tapón morado) con K₂EDTA como agente anticoagulante.

Una vez extraídas las muestras se centrifugaron inmediatamente a 3500 rpm durante 5 min, a fin de separar el plasma del resto de los componentes de la sangre. Las muestras de plasma se almacenaron en tubos de poliestireno de 5 mL o tubos Eppendorf® estándar (sin ningún tipo de aditivo) hasta su empleo.

Para la **estimación de la exposición al fármaco**, el análisis farmacocinético de MER, PIP, VOR y CAS se realizó mediante métodos bayesianos con regresión no lineal comentados en el apartado I.6.2. Para ello, y para cada paciente, se creó un archivo en el programa Abbottbase Pharmacokinetic System™ (ver apartado III.4) en el que se incluyó la información biométrica, las concentraciones de creatinina sérica durante el periodo de estudio, las dosis administradas y las concentraciones experimentales de antimicrobiano en plasma. Los valores de aclaramiento de creatinina se calcularon mediante la fórmula de Cockcroft-Gault [248-249].

En la Tabla III.1 se resumen los indicadores de eficacia empleados en esta Tesis Doctoral para los fármacos objeto de monitorización [128, 250-257].

En esta Tesis Doctoral se han empleado los valores ECOFF para el análisis farmacocinético/farmacodinámico, publicados y actualizados periódicamente por parte del comité EUCAST, a través de sus guías de acceso público [258]. El estudio microbiológico para el aislamiento del microorganismo responsable del proceso infeccioso fue realizado por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Tabla III.1.- Indicadores de eficacia empleados para los fármacos monitorizados.

Fármaco	Microorganismo	Indicador de eficacia		Ref.
		Objetivo farmacocinético/farmacodinámico	C _{mín} (mg L ⁻¹)	
MER	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50% fT > 4·CMI	-	[250-251]
	<i>Escherichia coli</i>			
PIP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50% fT > 4·CMI	-	[250-251]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
VOR	Profilaxis antifúngica	ND	≥0.5	[128, 252]
CASP	<i>Candida albicans</i>	AUC/CMI > 865	≥2	[253-257]
	<i>Candida glabrata</i>	AUC/CMI > 450		
	<i>Candida parapsilosis</i>	AUC/CMI > 1185		

Abreviaturas: % fT: Fracción porcentual de tiempo del intervalo de dosificación. AUC: área bajo la curva concentración plasmática-tiempo CAS: caspofungina. CMI: concentración mínima inhibitoria. MER: meropenem. ND: No disponible. PIP: piperacilina. VOR: voriconazol.

Para CAS, ANI y CEF/TAZ, se realizó un **análisis farmacocinético no compartimental** con el programa informático Abbottbase Pharmacokinetic SystemTM (ver apartado III.4). Este tipo de análisis se emplea cuando resulta difícil establecer un modelo farmacocinético apropiado a la hora de interpretar las curvas de perfil farmacocinético y su incidencia en la estimación de la biodisponibilidad. Una alternativa para este caso se basa en aplicar la teoría de los momentos estadísticos cuando se estudia la evolución temporal del fármaco en el organismo. Esta teoría considera que el movimiento de las moléculas de fármaco en el organismo puede ser considerado una variable aleatoria continua con un valor medio y una varianza determinada cuya función de densidad de probabilidad se correlaciona con las concentraciones de fármaco en el organismo.

Para el análisis no compartimental tanto de ANI como de CEF/TAZ, los valores de C_{máx} y C_{mín} se estimaron directamente de las curvas de niveles plasmáticos.

Los valores de AUC a lo largo del intervalo de dosificación se calcularon mediante el método de cálculo trapezoidal. El CI se calculó como la dosis/AUC. El V_d durante la fase de estado estacionario se calculó como el producto del CI y la semivida plasmática de eliminación.

III.4.- Programas informáticos empleados

Para los cálculos relativos a la validación de los métodos analíticos desarrollados, así como para el aseguramiento interno de la calidad se empleó Microsoft® Excel (©Microsoft Corporation, versión 2007).

Para la obtención de los estadísticos relacionados con la validación de la veracidad y precisión del método desarrollado para la determinación de AMK se empleó Matlab® para Windows (©The Mathworks Inc., versión 2007).

Para el análisis farmacocinético se empleó el programa Abbottbase Pharmacokinetic System™ (PKs, versión 1.10) de Abbott Laboratories Diagnostic Division (Abbott Laboratories, Illinois, EE.UU.).

CAPÍTULO IV

ANTIBACTERIANOS I: MEROPENEM Y PIPERACILINA

IV.1.- Introducción

IV.1.1.- Características generales

MER es un antibiótico betalactámico de la familia de los carbapenémicos (ver Tabla I.2). Esta familia está considerada de amplio espectro antibiótico y deriva de diferentes especies del género *Streptomyces spp.*, cuya principal característica estructural es que presentan el anillo principal betalactámico condensado con otro anillo tiazolidínico no saturado de cinco átomos, en donde se ha sustituido un átomo de azufre por un carbono en la posición 4 de su núcleo (Tabla IV.1).

En 1985 se empleó el primer antibiótico carbapenémico, la tienamicina. Este fármaco fue aislado del hongo *Streptomyces cattleya* por investigadores del laboratorio Merck Sharp & Dohme [259-260]. El problema de este compuesto es su baja estabilidad química, por lo que tras su modificación por semisíntesis química se consiguió un nuevo compuesto químicamente más estable, imipenem [261-262]. Imipenem debe formularse combinado con cilastatina para impedir la acción hidrolítica de la enzima dehidropeptidasa-1 humana renal (DHP-1), una carbapenemasa presente en las células del túbulo renal proximal [263-264]. Los esfuerzos posteriores para el desarrollo de nuevos compuestos fueron encaminados a la consecución de moléculas estables frente a la DHP-1, de donde surgió MER [265-266]. Actualmente, MER es uno de los antibióticos carbapenémicos más empleados en el ámbito clínico, junto con imipenem, ertapenem y doripenem.

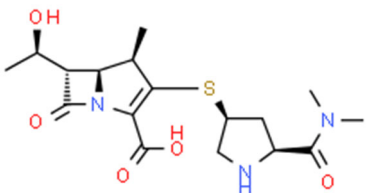
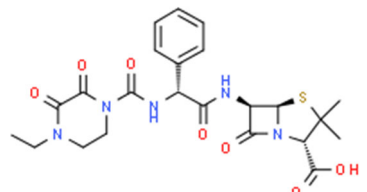
PIP es un antibiótico betalactámico de la familia de las penicilinas (ver Tabla I.2), concretamente del subgrupo de las ureidopenicilinas. Este subgrupo puede clasificarse dentro del grupo de las penicilinas resistentes a penicilinasas. En 1959, se comercializó la meticilina, primera penicilina de este grupo, de origen semisintético. Aunque la meticilina se ha reemplazado por otras penicilinas semisintéticas similares pero más estables, el término "*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina" o SARM se sigue utilizando hoy en día para describir cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos betalactámicos [267].

PIP incorpora en su estructura química una cadena lateral con un marcado carácter polar (Tabla IV.1), lo que mejora sustancialmente la penetración en bacterias gramnegativas y evita su desactivación por parte de enzimas betalactamasas. En cambio, cuando este fármaco se emplea solo, pierde gran parte de su capacidad bactericida frente a bacterias grampositivas a causa de su hidrólisis por parte de las enzimas betalactamasas. Por este motivo, la administración de PIP va siempre acompañada de TAZ, inhibidor de las enzimas betalactamasas.

IV.1.2.- Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla IV.1 se muestran las estructuras y algunas propiedades fisicoquímicas de MER y PIP. Como se puede observar, ambos compuestos son muy hidrófilos, con valores del logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$) de -4.4 y -0.3 para MER y PIP, respectivamente. Ambos poseen en su estructura un grupo carboxilo con un valor de pK_a de 3.5. MER, además posee un grupo amino secundario con un valor de pK_a (del ácido conjugado) de 6.4.

Tabla IV.1.- Número registrado en el *Chemical Abstracts Service* (CAS), estructura química, logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$), del menos logaritmo de la constante de acidez (pK_a) y de la masa molecular relativa (M_r) de MER y PIP.

Compuesto (N° CAS)	Estructura	$\log P^a$	pK_a^a	M_r
MER (119478-56-7)		-4.4	3.5 6.4 ^b	383.5
PIP (66258-76-2)		-0.3	3.5	516.5

^a Valores estimados con el programa ChemAxon disponible *on-line* en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). ^b Valores correspondientes al ácido conjugado del grupo amino.

IV.1.3.- Propiedades farmacológicas

MER y PIP, al igual que otros antibióticos betalactámicos, presentan actividad bactericida debido a la inhibición irreversible a las enzimas PBP (acrónimo de *penicillin-binding protein*) [268]. Las enzimas PBP son clave en la síntesis y formación de la pared celular bacteriana ya que catalizan la unión final de las hebras de peptidoglicano o mureína [269]. El peptidoglicano es el principal componente de la pared bacteriana, le proporciona protección frente a la lisis osmótica y, por tanto, ayuda a mantener la morfología de la bacteria y contribuye de este modo a su crecimiento y división celular [270].

IV.1.4.- Espectro antimicrobiano

En la Tabla IV.2 se muestra el espectro de actividad antibiótico de MER [271-272] y PIP combinado con TAZ [273].

Tabla IV.2.- Espectro de actividad antibacteriano de MER y de la combinación PIP/TAZ

Antibiótico	Bacterias gramnegativas	Bacterias grampositivas
MER	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes especies de los géneros <i>Haemophilus spp.</i>, <i>Neisseria spp.</i> y <i>Moraxella spp.</i> ▪ Enterobacterias (<i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Citrobacter amanoliticus</i> y <i>Aeromonas hydrophila</i>) ▪ Bacilos gramnegativos no fermentadores (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> y diferentes especies del género <i>Acinetobacter spp.</i>) ▪ Especies del género <i>Bacteroides spp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Streptococcus pneumoniae</i> y otras especies del género <i>Streptococcus spp.</i> ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies del género <i>Staphylococcus spp.</i>, incluyendo especies consideradas coagulasa negativos
PIP (combinada con TAZ)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes especies de la familia <i>Enterobaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>, <i>Serratia marcescens</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Klebsiellas pneumoniae</i> y <i>oxytoca</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Citrobacter spp.</i>) ▪ <i>Moraxella catarrhalis</i> ▪ Algunas cepas de <i>Haemophilus influenzae</i> ▪ Bacilos gramnegativos no fermentadores (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ▪ Diferentes especies del género <i>Acinetobacter spp.</i>, incluido <i>Acinetobacter baumannii</i> ▪ Bacterias anaerobias del grupo <i>Bacteroides</i> (<i>Bacteroides fragilis</i>), <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> ▪ Un gran número de cepas de <i>Klebsiella Pneumoniae</i> productoras de betalactamasas y de espectro extendido 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Staphylococcus aureus</i>, excepto <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, así como otras especies del género <i>Staphylococcus spp.</i> ▪ Diferentes especies del género <i>Streptococcus spp.</i> (<i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, así como aquellas del grupo C y G) ▪ <i>Enterococcus faecalis</i>

Como se puede observar en la Tabla IV.2, el espectro de actividad antibacteriano *in vitro* de MER incluye a la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente activas en la actualidad. Esto es debido a su facilidad de entrada en bacterias, su buena estabilidad frente a hidrólisis enzimática por betalactamasas así como su buena afinidad a las enzimas involucradas en la biosíntesis de mureína, como se ha comentado anteriormente [271-272].

Por otro lado, gracias a la combinación PIP/TAZ, PIP mantiene la actividad antimicrobiana frente a gran cantidad de bacterias grampositivas (excepto SARMs) [267], y es especialmente útil en infecciones intraabdominales, de piel y de tejidos blandos [274].

IV.1.5.- Perfil farmacocinético

MER presenta un comportamiento farmacocinético lineal, así los valores del AUC y $C_{m\acute{a}x}$ son proporcionales a la dosis administrada [275-276]. La semivida plasmática de eliminación es aproximadamente de 1 h, el V_d medio de aproximadamente 0.25 L kg^{-1} (11-27 L), y el Cl medio de 287 mL min^{-1} y 205 mL min^{-1} para dosis de 250 mg y 2 g, respectivamente [277].

En cuanto a su distribución, MER penetra rápida y extensamente en diversos fluidos y tejidos corporales, así como en el líquido cefalorraquídeo [278-281]. La unión a proteínas plasmáticas promedio de MER es del 2 % con independencia de la concentración de fármaco. Tras una administración rápida ($\leq 5 \text{ min}$), la farmacocinética es biexponencial y pierde dicho carácter tras 30 min de perfusión [277].

MER se metaboliza por hidrólisis del anillo betalactámico y genera un metabolito microbiológicamente inactivo. Su vía primaria de excreción es la renal y tras la administración de 1 g se excreta aproximadamente el 54-79 % de manera inalterada, y aproximadamente 19-27 % como metabolito [282]. El Cl renal se basa tanto en filtración como secreción tubular [277].

En la bibliografía existe cierta controversia sobre si PIP presenta una farmacocinética lineal [283-285] o no lineal [286-287].

Los valores de V_d en el estado estacionario (V_{dss}) son de 14.9 L y 15.8 L tras la administración por vía intravenosa de dosis de 3 g y 4 g, respectivamente [288]. PIP se distribuye ampliamente en los tejidos y líquidos corporales, lo que incluye a la mucosa intestinal, vesícula biliar, pulmón, bilis y huesos [289-290]. Generalmente, las concentraciones tisulares medias corresponden al 50 - 100 % de las concentraciones plasmáticas. La difusión del fármaco al fluido cerebroespinal es baja (5 %) en pacientes que no presentan inflamación meníngea [291]. La unión a proteínas plasmáticas es de un 20 - 30 % [288], incluso para pacientes críticos con sepsis [283].

PIP se metaboliza para dar lugar a *N*-desetil-piperacilina, metabolito de menor actividad y tras la administración de una dosis de 4 g por vía intravenosa, se excreta por orina un ~50 % de PIP a las 24 h [292]. PIP también se elimina a través de la bilis ($0.7 \pm 0.4 \%$ a las 12 h de administración de una dosis de 4 g) [293]. El valor de Cl total, renal y biliar es de $280 \pm 130 \text{ mL min}^{-1}$, $100 \pm 50 \text{ mL min}^{-1}$ y $1.7 \pm 1.3 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente [101].

IV.1.6.- Perfil farmacodinámico

MER y la combinación PIP/TAZ se consideran antibióticos con actividad tiempo dependiente (ver apartado I.5). Por tanto, el objetivo farmacocinético/farmacodinámico que mejor describe su actividad es el porcentaje de tiempo en el que la concentración de fármaco permanece por encima de la CMI del patógeno para el que se está tratando (% $fT > CMI$) [98, 159, 294-299].

Adicionalmente, algunos autores indican que el efecto bactericida de MER y PIP es mayor cuando sus concentraciones en sangre son superiores a 4-5 veces la CMI del agente patógeno durante al menos un 40-70 % [300-302] y 50-100 % [98, 159, 296-299] del tiempo del intervalo de dosificación, respectivamente.

Para pacientes críticos, existen estudios que indican que se consigue un mayor beneficio clínico cuando éstos se someten a exposiciones más prolongadas durante el tiempo de tratamiento [250, 294, 296-297]. Por ello, alternativamente, en estos pacientes se ha sugerido que se debe conseguir mantener las concentraciones de fármaco por encima de la CMI durante al menos el 90 % o el 100 % del intervalo de dosificación (90-100% $fT > CMI$) tanto para MER [250, 303] como para PIP [91, 299]. Para PIP, también se ha sugerido el criterio $C_{min}/CMI \geq 3$ para evitar la aparición de resistencias bacterianas *in vitro* [91, 299].

IV.1.7.- Perfil de seguridad

En la Tabla IV.3 se muestran los eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con MER y PIP. En el caso de PIP, el tipo de evento adverso, así como la incidencia en su aparición dependen significativamente del tipo de paciente que se esté tratando. Además, aunque los eventos adversos suelen ser desde moderados a graves, rara vez se requiere la interrupción del tratamiento [273].

Tabla IV.3.- Eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con MER y con la combinación PIP/TAZ.

Antibiótico	Evento adverso
MER [277]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diarrea (2.3 %) ▪ Erupción cutánea (1.4 %) ▪ Náuseas/vómitos (1.4 %) ▪ Inflamación en el lugar de la inyección (1.1 %) ▪ Eventos adversos de laboratorio más frecuentes: trombocitosis (1.6 %), aumento de las enzimas hepáticas (1.5-4.3%)
PIP (combinada con TAZ) [304-306]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pacientes tratados por infección intraabdominal <ul style="list-style-type: none"> – Diarrea (7.5 %) – Flebitis (3.3 %) ▪ En pacientes tratados por neumonía nosocomial: <ul style="list-style-type: none"> – Aumento de las enzimas: α-glutamyltransferasas (1.8 %), alanina aminotransferasas (0.9 %) y aspartato aminotransferasas (0.9 %) – Trombocitopenia (2.3 %) – Diarrea (2.3 %) – Flebitis (0.9 %) – Aumento del recuento eosinofílico (0.5 %) ▪ Pacientes tratados por infección por pie diabético: <ul style="list-style-type: none"> – Diarrea (14 %) – Náuseas (7 %) – Dolor de cabeza (6 %) – Eventos adversos de laboratorio (10 %)

Se ha observado un buen perfil de tolerabilidad de MER a nivel del sistema nervioso central [307], a diferencia de otros antibióticos carbapenémicos para los que se ha descrito la aparición de convulsiones [308-309]. A nivel gastrointestinal, aunque es frecuente en otros agentes antibióticos, no existe asociación entre el uso de MER y la aparición de infecciones oportunistas por *Clostridium difficile* [310]. Se debe de tener especial precaución con el uso de MER en pacientes que hayan sufrido un historial previo de hipersensibilidad a penicilinas [277]. Este aspecto debe de tenerse en cuenta, ya que se ha observado que el riesgo de hipersensibilidad cruzada es similar (9–11 %) para MER e imipenem/cilastatina [311].

En el caso de PIP, al igual que con otros antibióticos betalactámicos, existe un riesgo de toxicidad asociada al uso de dosis altas, empleadas frecuentemente para el tratamiento de bacterias poco susceptibles (p. ej. *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*) y que cursa con convulsiones, episodios de confusión mental, nefritis intersticial y elevación de los niveles de enzimas α -glutamyltransferasas [101]. Igualmente, merece especial atención el desarrollo de colitis pseudomembranosa en pacientes bajo tratamiento con PIP/TAZ [273, 312].

IV.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral descrito en el Capítulo II, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de la composición de la fase móvil hidroorgánica para llevar a cabo la determinación de MER y PIP en muestras de plasma utilizando una columna C18 y detección en el UV-Vis. La fase móvil seleccionada debe proporcionar tiempos de análisis cortos para la implementación del método en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Optimización del tratamiento de las muestras de plasma. Dicho tratamiento debe ser sencillo, rápido y compatible con las condiciones cromatográficas.
- Validación completa de los métodos cromatográficos desarrollados conforme a los criterios de aceptación de la EMA descritos en el apartado I.9.
- Implementación de los métodos cromatográficos en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización clínica de MER y PIP en plasma de pacientes críticos ingresados en la UCI del hospital bajo tratamiento con estos antibióticos.

IV.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, los procedimientos seguidos para el acondicionamiento de los sistemas cromatográficos, para la validación de los métodos desarrollados según las recomendaciones de la EMA, para el aseguramiento interno de la calidad y para el análisis farmacocinético, así como los programas informáticos empleados en este capítulo, se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

IV.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles

Para la preparación de las disoluciones de MER y PIP se emplearon las especialidades farmacéuticas que se indican en la Tabla IV.4. Se prepararon diariamente disoluciones de trabajo por disolución de la cantidad adecuada de polvo en agua ultrapura, a las concentraciones indicadas en la Tabla IV.4. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

Tabla IV.4.- Compuestos estudiados, especialidades farmacéuticas, distribuidor comercial, concentración de las disoluciones de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior

Antibiótico	Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
MER	Meronem [®] IV 500 mg Meronem [®] IV 1000 mg Observaciones: polvo para disolución inyectable y para perfusión Distribuidor: Pfizer Europe MA, EEIG (Bruselas, Bélgica)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 1000 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 0.25 (LLOQ), 0.75, 1.5, 4, 7, 11 y 15 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 0.25, 0.75, 7 y 11 – Selectividad: 0.25 – Integridad de dilución: 20, 40 – Efecto memoria: 15 – Estabilidad: 0.75 y 11
PIP	Piperacilina/Tazobactam [®] 2/0.25 g Piperacilina/Tazobactam [®] 4/0.5 g Observaciones: polvo y disolvente para disolución para perfusión Distribuidor: Fresenius Kabi España S.A.U. (Barcelona, España)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 500 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 2 (LLOQ), 10, 20, 40, 60, 80 y 100 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 2, 10, 40 y 80 – Selectividad: 2 – Integridad de dilución: 150 – Efecto memoria: 100 – Estabilidad: 5 y 80

^a Preparación diaria

Como se puede observar en la Tabla IV.4, para cada uno de los analitos se prepararon siete controles para la validación de la curva de calibrado por dilución de la disolución de trabajo en plasma de sujetos sanos. Estas concentraciones son las que se utilizaron para la construcción de las rectas de calibrado. De manera similar, se prepararon los controles empleados para la validación de la precisión, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO 17025 y ISO15189), selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, así como para la validación de la estabilidad del analito en las disoluciones de plasma y en el inyector automático. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la EMA indicadas en la Tabla I.5 [246].

IV.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa

Las especialidades farmacéuticas administradas a los pacientes son las indicadas en la Tabla IV.4. Las disoluciones de MER y PIP para perfusión se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante por disolución del contenido de los viales en una disolución para perfusión de NaCl al 0.9 % (m/v) o de dextrosa al 5 % (m/v). La concentración final de MER fue de 1000 a 20000 mg L⁻¹ y la de PIP de 13000 a 80000 mg L⁻¹.

IV.3.3.- Procedimientos

IV.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de las especialidades farmacéuticas, todas las disoluciones (apartado IV.3.2) se administraron inmediatamente tras su preparación. La pauta general de dosificación de MER en los pacientes en estudio fue de 1 g a 2 g cada 6-8 h, con una administración intravenosa en perfusiones de 30 min o de 3 h en algunos pacientes. La pauta de dosificación en el caso de PIP fue de 2 g o 4 g cada 6-8 h, con una administración intravenosa en perfusiones de 30 min o de 3 h en algunos pacientes.

Para la monitorización de MER y PIP, las muestras de sangre se obtuvieron inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a un tiempo equivalente a la C_{mín} del fármaco. La toma de muestras se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.5.

IV.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomaron 500 μL de plasma y se precipitaron las proteínas por adición de 1000 μL de ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). La mezcla resultante se agitó con un agitador vortex durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 10800 rpm durante 5 min. Tras ello, se tomaron 500 μL de sobrenadante que se diluyeron por adición del volumen adecuado (1000 y 750 μL , en el caso de MER y PIP, respectivamente) de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0).

IV.3.3.3.- Condiciones cromatográficas

Para la determinación de MER y PIP se utilizó el equipo cromatográfico de módulos integrados Waters. En ambos casos se utilizó como fase estacionaria una columna C18 XBridge (150 \times 4.6 d.i. mm, 5 μm). La velocidad de flujo de las fases móviles fue de 1 mL min^{-1} y el volumen de inyección de 10 μL . Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Para la determinación de MER se empleó una disolución de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN, (93:7, v/v) como fase móvil. La detección espectrofotométrica se efectuó en el UV-vis a 299 nm.

Para la determinación de PIP se empleó una disolución de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN, (80:20, v/v) como fase móvil. La detección espectrofotométrica se efectuó en el UV-vis a 207 nm.

IV.4.- Resultados y discusión

IV.4.1.- Desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de MER y PIP en muestras de plasma

IV.4.1.1.- Composición de la fase móvil

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado HPLC en su modalidad de RPLC por la compatibilidad de las fases móviles hidroorgánicas con las muestras de plasma, aunque también por su menor coste y toxicidad frente a las otras modalidades de trabajo en HPLC, lo que es consistente con los Objetivos para el Desarrollo Sostenible (ODS).

MER y PIP son compuestos muy hidrófilos (ver Tabla IV.1) y, además, están ionizados en todo el intervalo de pH ($\sim 3-9$) de trabajo de las fases estacionarias de sílice enlazadas. Por ello, para conseguir la retención de estos compuestos, la mayoría de los procedimientos cromatográficos utilizan una fase estacionaria C18 y fases móviles con poca fuerza eluyente (ver Tabla I.4). Además, en la mayoría de aplicaciones se utilizan fases móviles hidroorgánicas a un pH ácido (predomina la forma protonada del grupo carboxilo) que contienen ACN como modificador.

Por todo lo expuesto, se prepararon distintas fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M a pH 3.0 y ACN en proporciones variables (5-15 % para MER y 10-30 % para PIP). En la Figura IV.1 se muestran los cromatogramas obtenidos. Como se puede observar, con todas las fases móviles ensayadas se obtuvieron valores de tiempo total de retención (t_R) satisfactorios para análisis de rutina tanto para MER como PIP. A fin de reducir el tiempo de análisis y evitar el posible solapamiento de compuestos endógenos de las muestras de plasma en el frente del cromatograma, se seleccionó *a priori* para futuros estudios la fase móvil que contiene tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (93:7, v/v) para MER y tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (80:20, v/v) para PIP, sin descartar la necesidad de realizar reajustes en la composición de la fase móvil debido a la complejidad de la matriz de las muestras de plasma. En las condiciones seleccionadas, los valores de t_R , k (ec. III.1) y de A/B (ec. III.2) fueron:

- Para MER: $t_R = 6.8$ min, $k = 3.5$ y $A/B = 0.95$
- Para PIP: $t_R = 7.1$ min, $k = 4.1$ y $A/B = 0.95$

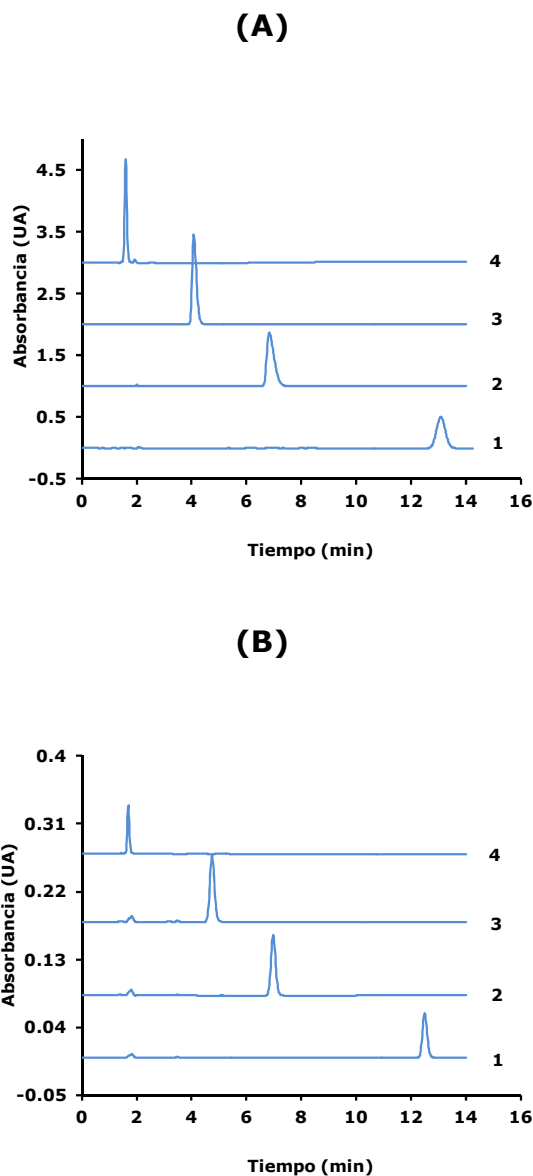


Figura IV.1.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 100 mg L^{-1} de: **(A)** MER, **(B)** PIP. La composición de las fases móviles ensayadas para MER fue: **(1)** 95:5, **(2)** 93:7, **(3)** 91:9 y **(4)** 87:13 tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (v/v). La composición de las fases móviles ensayadas para PIP fue: **(1)** 90:10, **(2)** 80:20, **(3)** 75:25 y **(4)** 70:30 tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (v/v). El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado IV.3.3.3.

IV.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma

En primer lugar, se evaluó si existía retención de los analitos en los filtros de jeringa. Para ello, se estudiaron filtros de diferente naturaleza (ver apartado III.1): Nylon® ($0.45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro), PTFE y PVDF (ambos de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro). Se inyectaron disoluciones acuosas de 11 mg L^{-1} de MER y 80 mg L^{-1} de

PIP antes y después de la filtración y se estimó la recuperación a partir de los valores de área de los picos cromatográficos. En todos los casos se obtuvieron valores de recuperación próximos al 100 %, por lo que se utilizaron cualquiera de ellos indistintamente.

Como se puede observar en la Tabla I.4, para la determinación cromatográfica de MER y PIP en muestras de plasma, el tratamiento de las muestras más empleado consiste en la precipitación de las proteínas plasmáticas, (habitualmente, con ACN o MeOH en presencia de un ácido orgánico como ácido fórmico o acético), seguida de centrifugación, dilución del sobrenadante (con agua, tampón o con la misma fase móvil) y finalmente, la inyección en el sistema cromatográfico. Esta dilución tiene por objeto reducir la concentración de disolvente orgánico en el sobrenadante para evitar la distorsión de los picos cromatográficos debido a la diferente fuerza eluyente de la disolución de la muestra y de la fase móvil [137-139, 144-146, 148-149, 152, 157-158, 167]. En otras aplicaciones, el sobrenadante obtenido, se lleva a sequedad con N₂ [133, 151, 156, 165-166] o mediante centrifugación a vacío y, posteriormente, se reconstituye con una disolución tampón [160]. Otros autores realizan una LLE del sobrenadante con CH₂Cl₂ [136, 150, 164, 171] o con cloroformo [170]. Finalmente, otros autores para eliminar las proteínas plasmáticas han utilizado la ultrafiltración [140, 152, 172]. Esta técnica permite el desarrollo de métodos analíticos más verdes ya que evitan el uso de reactivos [140, 152, 163, 172].

En esta Tesis Doctoral se ensayaron los siguientes tratamientos: precipitación de proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y ultrafiltración a través de membranas de celulosa regenerada (dispositivos Centrifree® Ultrafiltration, ver apartado III.1) a 3500 rpm durante 25 min. En los tratamientos de precipitación se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 µL de plasma/1000 µL de reactivo precipitante). Los experimentos se realizaron por triplicado. En la Figura IV.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para blancos de muestras de plasma aditivados con 15 mg L⁻¹ de MER y 100 mg L⁻¹ de PIP tras la realización de cada uno de los tratamientos indicados. También se incluyen los cromatogramas correspondientes a blancos de plasma tras someterse al correspondiente tratamiento. Como se puede observar, si se comparan los cromatogramas de los blancos de plasma con los correspondientes a los blancos de plasma aditivados, no existe coelución de compuestos endógenos presentes en el plasma con los analitos.

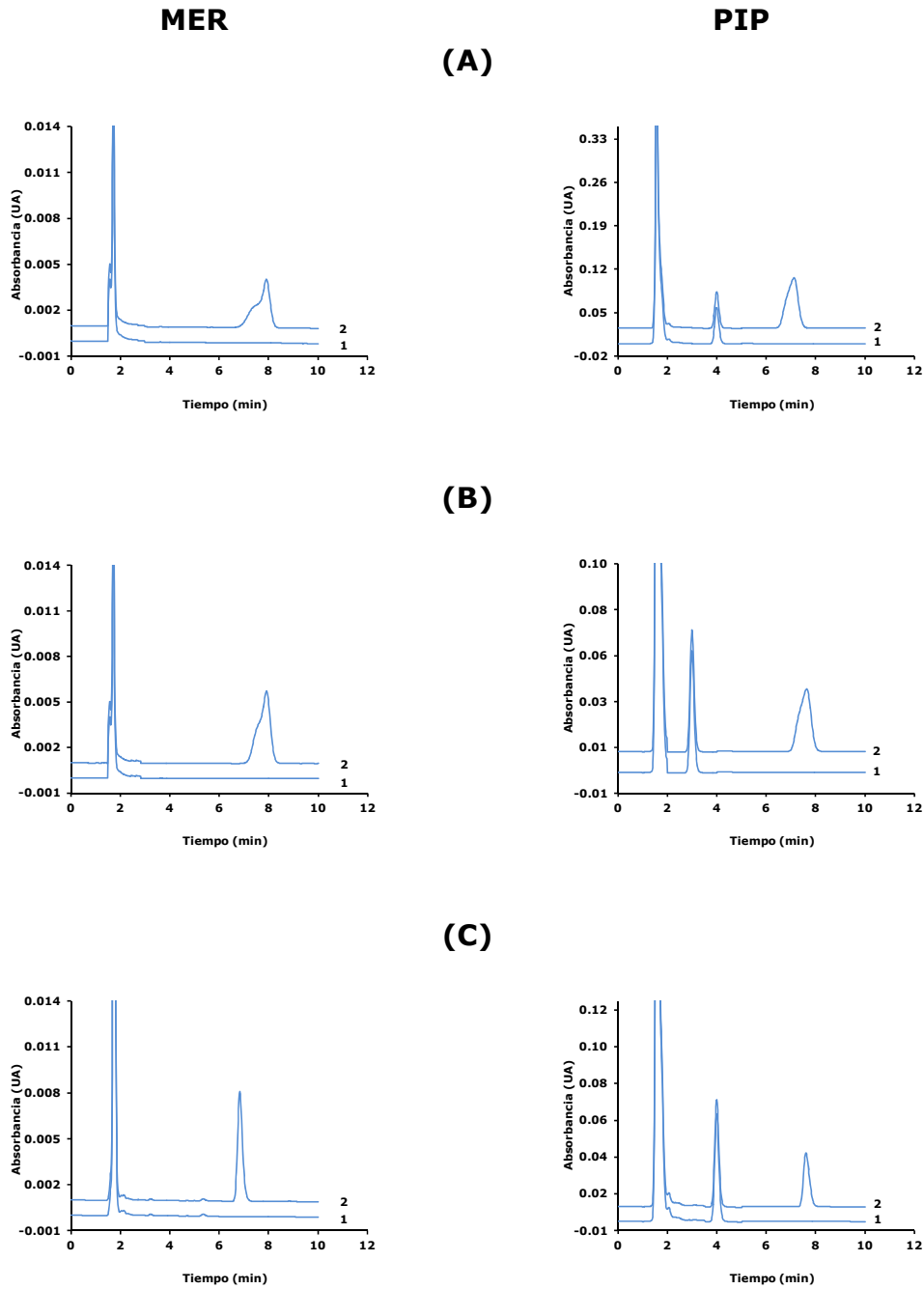


Figura IV.2.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 15 mg L⁻¹ de MER (parte izquierda) y con 100 mg L⁻¹ de PIP (parte derecha) tras los siguientes tratamientos: **(A)** precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) o **(B)** con MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y **(C)** ultrafiltración a través de membranas de celulosa regenerada (ver apartado III.1) a 3500 rpm durante 25 min. En los tratamientos de precipitación se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 µL de plasma/1000 µL de reactivo precipitante). Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado IV.3.3.3.

En la Tabla IV.5 se muestran los valores de A/B, así como de los porcentajes de recuperación estimados a partir del cociente entre el área de pico de analito obtenida tras el tratamiento del blanco de plasma aditivado y el área de una disolución de la misma concentración de analito en agua.

Tabla IV.5.- Influencia del tratamiento de las muestras de plasma sobre los valores del factor de asimetría (A/B) de los picos cromatográficos y de la recuperación de MER y PIP.

Analito	Tratamiento	A/B	Recuperación (%) ^a
MER	ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	2.28	92 ± 5
	MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	2.13	87 ± 4
	Ultrafiltración	0.97	90 ± 10
PIP	ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	2.12	94 ± 2
	MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	2.11	88 ± 3
	Ultrafiltración	0.97	92.0 ± 1.0

^a Media ± desviación estándar de las tres réplicas realizadas

Como se puede observar en la Tabla IV.5, todos los tratamientos proporcionaron valores de recuperación similares y aceptables para ambos analitos. Por ello, se descartó el empleo de la ultrafiltración debido a que requiere un mayor tiempo de análisis (centrifugación de 25 min en la ultrafiltración frente a 5 min en los tratamientos de precipitación) y mayor coste de los dispositivos comerciales. Por otro lado, si se comparan los valores de A/B obtenidos con ACN y MeOH como agentes precipitantes se observa que los picos cromatográficos obtenidos presentan una gran asimetría (ver también Figura IV.2.A) como consecuencia de la mayor fuerza eluyente de la disolución de la muestra frente a la de la fase móvil. Adicionalmente, si se comparan los valores de recuperación obtenidos con ambos agentes precipitantes, se observa que la precisión obtenida con ambos pretratamientos es similar, si bien, los resultados obtenidos con ACN son ligeramente mejores a los obtenidos con MeOH, por lo que se seleccionó ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) como agente precipitante para futuros estudios.

Para mejorar la simetría de los picos se estudió la posibilidad de diluir el sobrenadante obtenido con una disolución de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0) empleada para la preparación de las fases móviles en diferentes proporciones hasta alcanzar valores de A/B próximos a la unidad. Este objetivo se alcanzó en el caso de MER con una relación sobrenadante/tampón fosfato 1:2 (v/v) (A/B = 0.98, Recuperación (%) = 96 ± 10), y en el caso de PIP con una relación sobrenadante/tampón fosfato 1:1.25 (v/v) (A/B = 0.95, Recuperación (%) = 97 ± 3). En la Figura IV.3 se muestran los cromatogramas obtenidos con estas diluciones junto con los correspondientes blancos de plasma sometidos al mismo tratamiento y dilución.

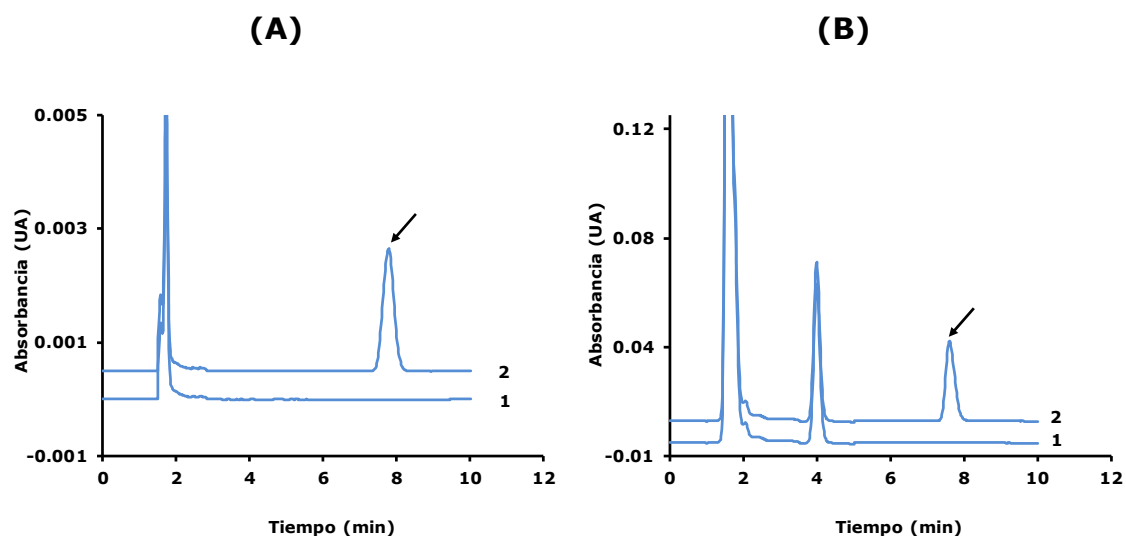


Figura IV.3.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con **(A)** 15 mg L⁻¹ de MER y **(B)** con 100 mg L⁻¹ de PIP tras la precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y la posterior dilución del sobrenadante con tampón fosfato 0.05 M a pH 3. Relaciones sobrenadante/tampón fosfato: 1:2 (v/v) para MER y 1:1.25 (v/v) para PIP. Con una flecha se identifica el pico correspondiente a los analitos. Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado IV.3.3.3.

Es interesante resaltar que, durante la ejecución de todos los ensayos realizados con los tratamientos seleccionados para MER y PIP, la presión del sistema cromatográfico se mantuvo entre los 1600-1700 psi (con un flujo de 1 mL min⁻¹) y se observó una variación máxima de 30-50 psi tras una sesión de trabajo continuo.

IV.4.2.- Validación de los métodos desarrollados

En el apartado III.3.3 se describen los procedimientos seguidos para la validación de los métodos desarrollados según la guía de la EMA (ver Tabla I.5). En la Tabla IV.4 se muestran los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para la validación de cada una de las características analíticas de los métodos. En el cuadro IV.1 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro IV.1.- Resumen de los resultados obtenidos en la validación de los métodos desarrollados para la determinación de MER y PIP.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN INFERIOR (LLOQ)

CONCENTRACIÓN:

- LLOQ práctico prefijado:
 - MER: 0.25 mg L⁻¹ (corresponde a 0.028 mg L⁻¹ en la disolución de medida)
 - PIP: 2.0 mg L⁻¹ (corresponde a 0.27 mg L⁻¹ en la disolución de medida)

RESULTADOS:

- Señal (LLOQ) / Señal(blanco):
 - MER: > 17
 - PIP: > 13

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (LLOQ) ≥ 5·Señal (blanco)): SÍ ✓

LINEALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO

INTERVALO DINÁMICO LINEAL:

- MER (LLOQ-ULOQ): 0.25– 15.0 mg L⁻¹ (0.028 - 1.667 mg L⁻¹ en las disoluciones de medida)
- PIP (LLOQ-ULOQ): 2.0 – 100 mg L⁻¹(0.27 – 13.33 mg L⁻¹ en las disoluciones de medida)

RESULTADOS:

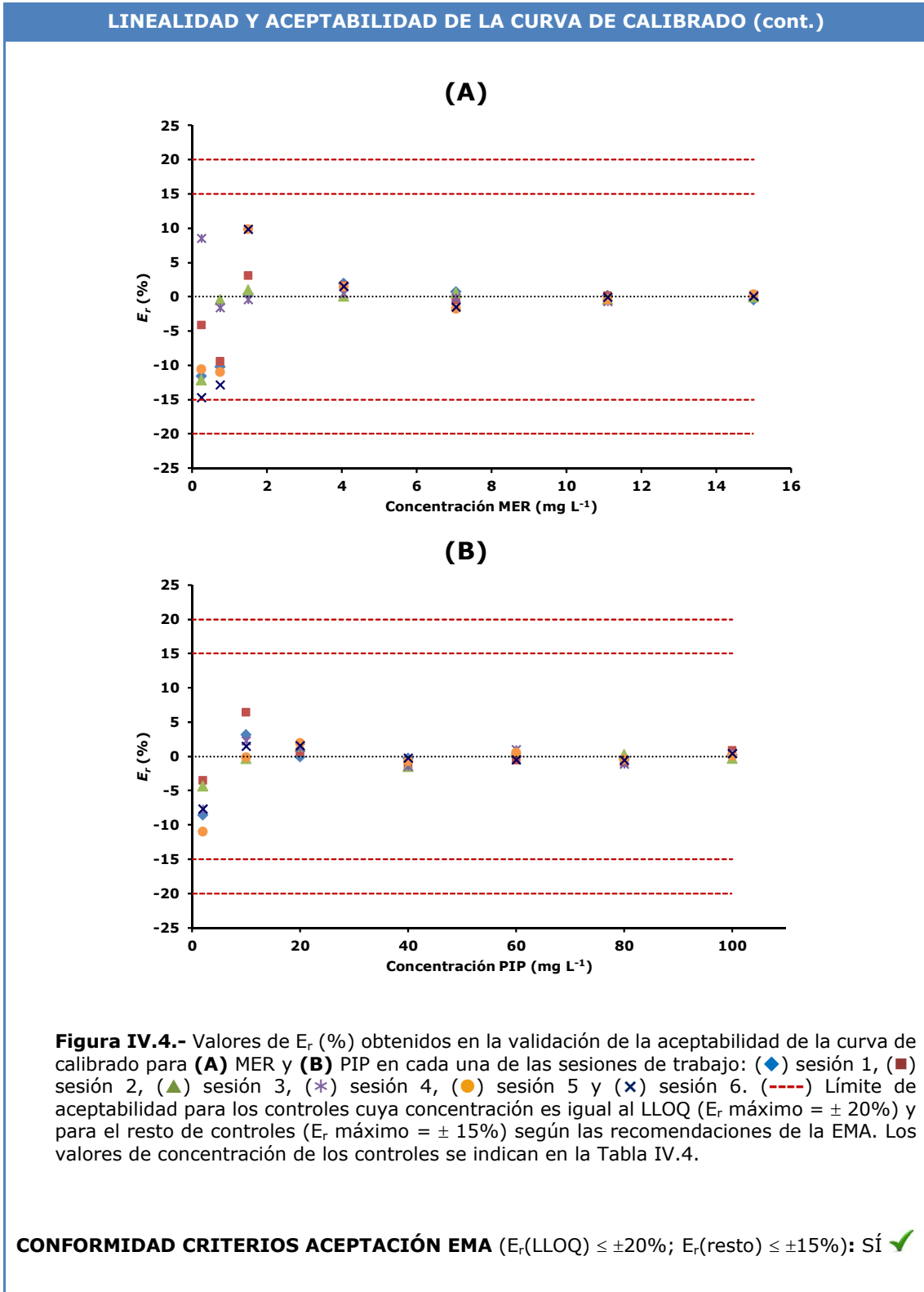
Tabla IV.6.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en seis sesiones de trabajo.

Analito	Sesión	b_0	b_1 ^a	R^2 ^b
MER	1	319	2930	0.99990
	2	267	2921	0.99992
	3	743	2858	0.99998
	4	118	2841	0.99996
	5	318	2842	0.9997
	6	273	2827	0.9998
PIP	1	2237	5439	0.99998
	2	879	5459	0.9997
	3	769	5761	0.99990
	4	1823	5345	0.9998
	5	3078	5118	0.99994
	6	1557	5341	0.99993

^a Diferencias en los valores de $b_1 < 10$ %. Se considera una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados. Por lo que no es necesario realizar una calibración metodológica en cada sesión de trabajo si la correspondiente verificación es conforme. Pese a ello, se optó por preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente

^b $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017

Cuadro IV.1.- Cont.



Cuadro IV.1.- Cont.**EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA E INTERDÍA****RESULTADOS:**

Tabla IV.7.- Evaluación de la exactitud y precisión intradía (réplicas de los controles preparados y procesados en la misma sesión de trabajo).

Analito	C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹					E _r , %	RSD, %
		R1	R2	R3	R4	R5		
MER	0.25 (LLOQ)	0.23	0.25	0.22	0.26	0.25	-3.2	6.1
	0.75 (QC bajo)	0.68	0.77	0.73	0.71	0.77	-2.4	4.8
	7.00 (QC medio)	6.98	7.07	7.12	7.05	6.96	0.5	0.6
	11.00 (QC alto)	10.88	10.82	11.02	10.88	10.78	-1.1	0.8
PIP	2.00 (LLOQ)	1.72	1.86	1.82	1.80	1.85	-9.5	3.1
	10.00 (QC bajo)	10.23	10.63	8.63	10.25	9.93	-0.7	7.8
	40.00 (QC medio)	41.21	39.99	38.03	41.57	39.20	0.0	3.6
	80.00 (QC alto)	82.77	79.19	78.48	83.00	78.36	-0.4	2.9

Tabla IV.8.- Evaluación de la exactitud y precisión interdía (controles preparados y procesados en cuatro días).

Analito	C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹				E _r , %	RSD, %
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
MER	0.25 (LLOQ)	0.25	0.25	0.25	0.23	-2.0	3.5
	0.75 (QC bajo)	0.77	0.74	0.78	0.77	2.0	2.0
	7.00 (QC medio)	6.96	7.11	6.93	7.01	0.03	1.0
	11.00 (QC alto)	10.78	11.00	10.85	10.82	1.2	0.8
PIP	2.00 (LLOQ)	1.89	1.84	1.86	1.87	-6.8	1.1
	10.00 (QC bajo)	9.57	10.25	10.24	10.00	-0.2	3.2
	40.00 (QC medio)	38.50	39.70	41.51	39.03	0.8	3.3
	80.00 (QC alto)	78.00	79.41	83.78	78.36	0.1	3.3

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA:

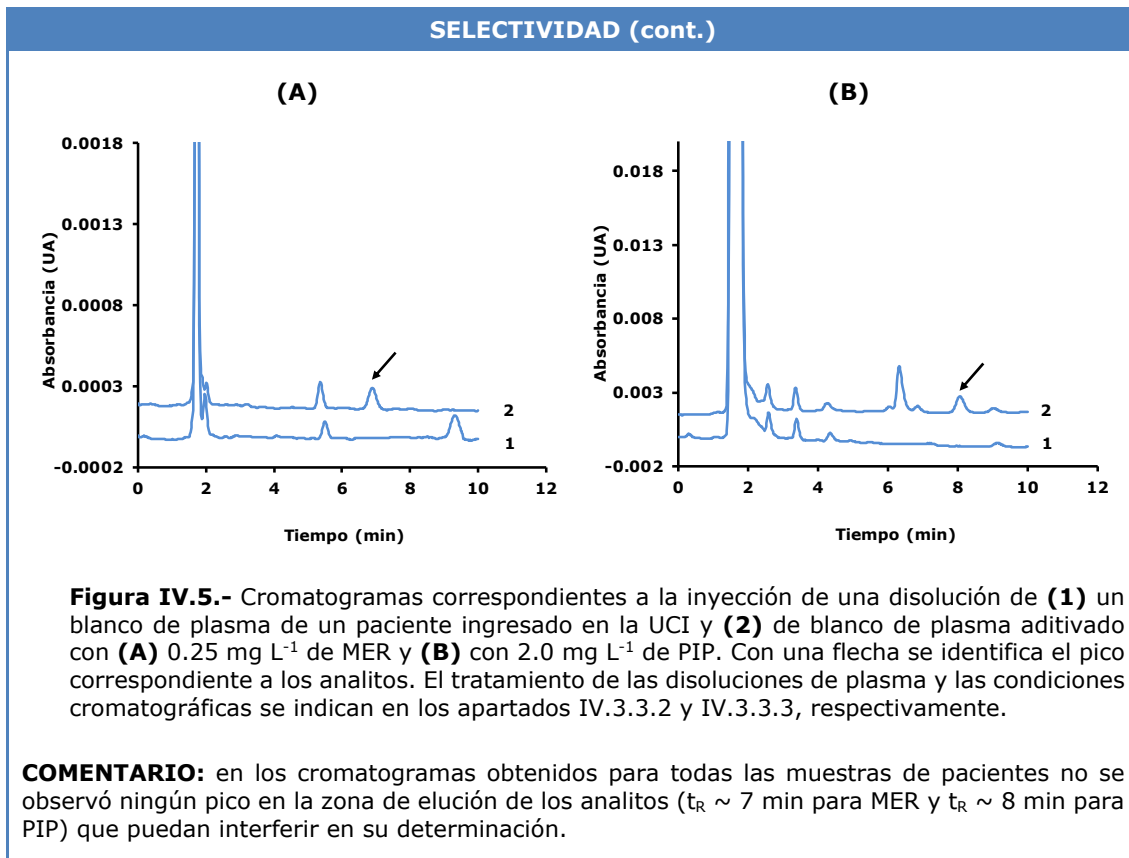
- E_r (LLOQ) ≤ ±20% y E_r (resto QCs) ≤ ±15%: SÍ ✓
- RSD (LLOQ) ≤ 20% y RSD (resto QCs) ≤ 15%: SÍ ✓

SELECTIVIDAD**RESULTADOS:**

- Señal (blanco^a) / Señal (LLOQ) < 0.2
 - ^a Muestras de pacientes ingresados en la UCI, ninguno de ellos bajo tratamiento con MER o PIP pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes:
 - MER: 17 pacientes
 - PIP: 20 pacientes

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

Cuadro IV.1.- Cont.



INTEGRIDAD DE DILUCIÓN

RESULTADOS:

Tabla IV.9.- Evaluación de la integridad de dilución.

Analito	C inicial, mg L ⁻¹ ^a	C final, mg L ⁻¹	Réplica	\hat{C} final, mg L ⁻¹	E_{rr} %	RSD, %
MER	20	10 ^b	1	9.81	0.6	2.7
			2	9.73		
			3	10.05		
			4	10.10		
			5	10.64		
			6	10.04		
			7	10.04		
	40	10 ^c	1	10.21	4.1	7.1
			2	11.02		
			3	10.75		
			4	9.82		
			5	10.53		
			6	11.50		
			7	9.10		
PIP	150	75 ^b	1	69.91	1.4	2.9
			2	74.13		
			3	74.02		
			4	75.75		
			5	76.56		
			6	74.08		
			7	73.21		

^a Superior al ULOQ (ULOQ(MER) = 15.0 mg L⁻¹; ULOQ(PIP) = 100 mg L⁻¹). Diluciones ensayadas (disolución analito/blanco): ^b 1:1 (v/v); ^c 1:3 (v/v)

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$ y $RSD \leq 15\%$): SÍ

Cuadro IV.1.- Cont.

EFECTO MEMORIA POR ARRASTRE DE MUESTRA

RESULTADOS:

- Señal (blanco) / Señal(LLOQ):
 - MER: < 0.05
 - PIP: < 0.04

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) \leq 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

COMENTARIO: el impacto del posible arrastre de analito residual en el equipo de medida procedente de determinaciones anteriores es despreciable

ESTABILIDAD

RESULTADOS:

Tabla IV.10.- Evaluación de la estabilidad a corto y largo plazo de MER y PIP en plasma en diferentes condiciones de almacenamiento.

Analito	nc, C, mg L ⁻¹	Tiempo de almacenamiento, días	4 °C		-20 °C	
			$\hat{C} \pm s,$ mg L ⁻¹	E_{rr} %	$\hat{C} \pm s,$ mg L ⁻¹	E_{rr} %
MER	QC bajo (0.75)	0	0.750 ± 0.007	0.0	0.750 ± 0.007	0.0
		1	0.711 ± 0.008	-6.7	0.743 ± 0.013	-1.3
		2	0.680 ± 0.009	-9.3	0.741 ± 0.010	-1.3
		3	0.665 ± 0.009	-12.0	0.734 ± 0.015	-2.7
		7	0.603 ± 0.006	-20.0^a	0.731 ± 0.010	-2.7
		14	-	-	0.732 ± 0.011	-2.7
		30	-	-	0.724 ± 0.011	-4.0
	QC alto (11.0)	0	10.83 ± 0.13	-1.5	10.83 ± 0.13	-1.5
		1	10.32 ± 0.13	-6.2	10.81 ± 0.16	-1.7
		2	10.03 ± 0.13	-8.8	10.83 ± 0.16	-1.5
		3	9.85 ± 0.09	-10.5	10.82 ± 0.11	-1.6
		7	9.1 ± 0.3	-17.5^a	10.69 ± 0.06	-2.8
		14	-	-	10.68 ± 0.18	-2.9
		30	-	-	10.6 ± 0.2	-3.8
PIP	QC bajo (5.0)	0	5.00 ± 0.09	0.0	5.00 ± 0.09	0.0
		1	4.98 ± 0.06	-0.4	5.00 ± 0.04	0.0
		3	4.74 ± 0.04	-5.2	5.03 ± 0.10	0.6
		7	4.28 ± 0.09	-14.4^a	4.95 ± 0.07	-1.0
		30	-	-	5.09 ± 0.05	1.8
	QC alto (80.0)	0	80.2 ± 0.9	0.2	80.2 ± 0.9	0.2
		1	77.9 ± 0.6	-2.6	79 ± 3	-0.9
		3	74.5 ± 0.3	-6.8	80.0 ± 1.6	0.0
		7	68.1 ± 1.4	-14.9^a	78.2 ± 0.6	-2.2
		30	-	-	80 ± 3	0.4

^a Valor no conforme al criterio de aceptación de la EMA ($E_r \leq \pm 15\%$)

Cuadro IV.1.- Cont.

ESTABILIDAD (cont.)				
Analito	nc (C, mg L ⁻¹)	Tiempo en el inyector automático, h	T ambiente	
			$\hat{C} \pm s$, mg L ⁻¹	E _r , %
MER	QC bajo (0.75)	0	0.750 ± 0.007	0.0
		3	0.750 ± 0.010	0.0
	QC alto (11.0)	0	10.83 ± 0.13	-1.5
		3	10.8 ± 1.0	-1.4
PIP	QC bajo (5.0)	0	4.56 ± 0.08	-8.8
		3	4.62 ± 0.09	-7.6
	QC alto (80.0)	0	81.9 ± 1.1	2.3
		3	80.1 ± 0.9	0.2

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (E_r ≤ ± 15 %): ≥ 7 días a 4 °C: NO ❌; Resto de condiciones: SÍ ✔

Símbolos y acrónimos: b_0 : ordenada en el origen. b_1 : pendiente. C: concentración preparada. \hat{C} : concentración encontrada. E_r: error relativo. QC: control. R: réplica. R²: coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

Como se puede observar en el cuadro IV.1, los resultados obtenidos para los controles utilizados en la validación de todas las características analíticas son conformes a los criterios de aceptación de la EMA con lo que se pueden dar por validados los métodos analíticos propuestos para su implementación en análisis de rutina en laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Es importante destacar que en el estudio de estabilidad de MER y PIP en plasma a corto y largo plazo, los valores de E_r para los dos controles de ambos analitos, fueron superiores o próximos al 15% a los 7 días de conservación a una temperatura controlada de 4 °C, lo que indica que ambos analitos no son estables en estas condiciones de almacenamiento. Por el contrario, los controles almacenados en congelador fueron estables durante todo el periodo estudiado (30 días) para ambos analitos. Por este motivo, se decidió incluir en el procedimiento de trabajo el almacenamiento de todas las muestras a una temperatura controlada de - 20 °C. Por otro lado, se fijó en 3 h el tiempo máximo en el inyector automático a temperatura ambiente de las muestras tratadas (ver Tabla IV.11), margen suficientemente amplio para programar secuencias de trabajo con un número de muestras (~18 muestras) más que suficiente para el volumen de trabajo diario.

IV.4.3.- Monitorización de MER y PIP en pacientes críticos hospitalizados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Antes de mostrar los resultados obtenidos del análisis de muestras de plasma de pacientes críticos, es importante destacar, que se realizaron actividades (verificación y control) para el aseguramiento interno de la calidad (ver apartado III.3.4).

Se recibieron muestras de sangre procedentes de 29 pacientes críticos (17 para MER y 12 para PIP). Todas las muestras se obtuvieron durante la práctica clínica, por decisión del personal médico responsable, para el ajuste individualizado y optimización de la dosis, en caso de necesidad. Tal y como se indica en el apartado IV.3.3.1, las muestras de sangre se extrajeron inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a un tiempo equivalente a la C_{\min} del fármaco. Para determinar los valores de C_{\min} de los pacientes tratados con MER y PIP se aplicaron los métodos cromatográficos desarrollados y validados descritos en este capítulo. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

A modo ejemplo, en la Figura IV.6 se muestran los cromatogramas obtenidos para un paciente bajo tratamiento con MER y para otro bajo tratamiento con PIP junto con sus correspondientes controles obtenidos en la misma sesión de trabajo.

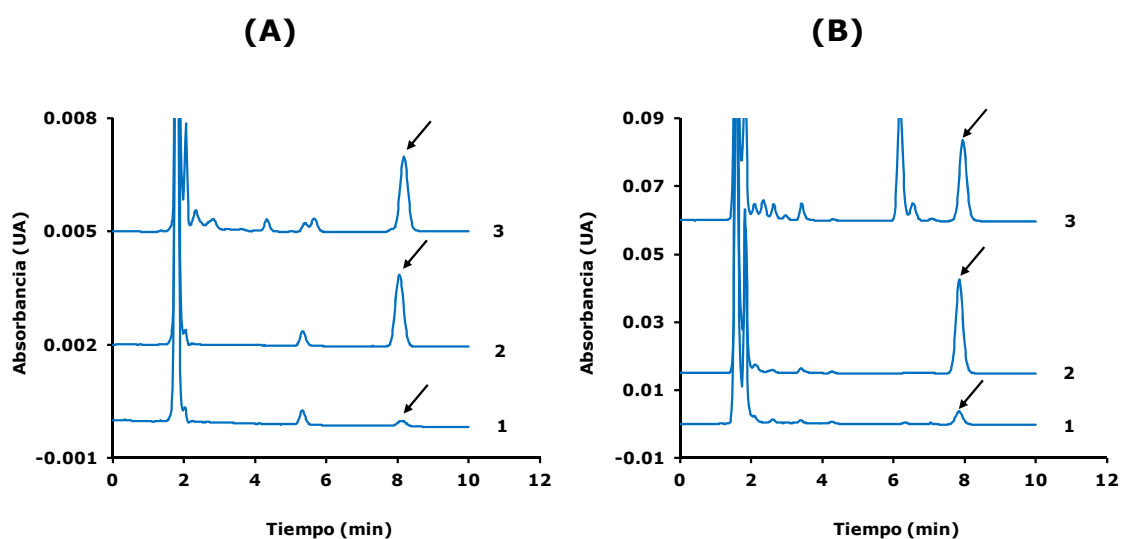


Figura IV.6.- Cromatogramas correspondientes a la determinación de **(A)** MER y **(B)** PIP en los controles **(1)** QC bajo (0.75 mg L⁻¹ de MER y 5 mg L⁻¹ de PIP), **(2)** QC alto (11 mg L⁻¹ de MER y 80 mg L⁻¹ de PIP) y **(3)** de pacientes críticos (M09 y P12) ingresados en la UCI bajo tratamiento con MER y PIP (M09: $C_{\min} = (9.3 \pm 0.2)$ mg L⁻¹ MER; P12: $C_{\min} = (61.4 \pm 1.4)$ mg L⁻¹ PIP, ver Tabla IV.12). Con una flecha se identifica el pico correspondiente a los analitos. El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados IV.3.3.2 y IV.3.3.3, respectivamente.

En la Tabla IV.12 se muestra, para cada paciente, la dosis de MER y PIP administrada y la $C_{\text{mín}}$ obtenida junto con su desviación estándar. Como se puede observar, en el caso de los pacientes MER15 y MER16, el valor de $C_{\text{mín}}$ supera el ULOQ (15 mg L^{-1}) por lo que para la determinación de MER se realizó una dilución previa de la muestra con blanco de plasma (relación muestra/blanco (v/v): 1:3 y 1:1, respectivamente). Análogamente, para la determinación de PIP en plasma del paciente PIP04, se realizó una dilución muestra/blanco 1:1 (v/v). Por último, para tres pacientes (MER03, MER14 y PIP08) se obtuvo una señal analítica inferior a la obtenida para el LLOQ.

Tabla IV.12.- Dosis administradas, tiempo de perfusión (t_p), C_{\min} de MER y PIP obtenidas para cada uno de los pacientes monitorizados. Estimación de la exposición (% $fT > 4 \cdot CMI$) a MER y PIP en función de la CMI del agente patógeno.

Paciente	Dosis administrada	t_p , h	$C_{\min} \pm s$, mg L ⁻¹	Agente patógeno ^a	CMI ECOFF, mg L ⁻¹ ^b	% $fT > 4 \cdot CMI$
MER01	1 g/8 h	0.5	0.92 ± 0.01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	46 ^f
MER02	1 g/8 h	0.5	0.38 ± 0.01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	40 ^f
MER03	1.25 g/8 h	0.5	< 0.25 ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	22 ^f
MER04	1 g/6 h	3.0	2.57 ± 0.01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	60
MER05	1 g/8 h	3.0	1.42 ± 0.06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	63
MER06	2 g/8 h	3.0	1.99 ± 0.02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	68
MER07	1 g/8 h	0.5	10.3 ± 0.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	100
MER08	1 g/8 h	0.5	9.31 ± 0.06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	92
MER09	2 g/8 h	0.5	9.3 ± 0.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	97
MER10	2 g/8 h	0.5	2.77 ± 0.02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	67
MER11	1 g/8 h	0.5	0.40 ± 0.03	<i>Escherichia coli</i>	0.25	67
MER12	1 g/8 h	0.5	1.58 ± 0.06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	36 ^f
MER13	1 g/8 h	0.5	4.04 ± 0.05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	50
MER14	1 g/8 h	0.5	< 0.25 ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	47 ^f
MER15	2 g/8 h	0.5	39.7 ± 0.7 ^d	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	100
MER16	1 g/8 h	0.5	20.4 ± 0.4 ^d	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	100
MER17	1 g/8 h	0.5	2.57 ± 0.01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	40 ^f
PIP01	2 g/8 h	0.5	9.9 ± 0.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	48 ^f
PIP02	4 g/8 h	3.0	14.9 ± 0.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	60
PIP03	4 g/8 h	0.5	3.2 ± 0.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	34 ^f
PIP04	4 g/8 h	3.0	126.8 ± 1.6 ^d	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	100
PIP05	4 g/6 h	3.0	20.2 ± 0.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	65
PIP06	4 g/8 h	0.5	21.7 ± 1.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	45 ^f
PIP07	4 g/6 h	0.5	56.7 ± 0.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	80
PIP08	4 g/8 h	0.5	< 2 ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	32 ^f
PIP09	4 g/8 h	0.5	2.07 ± 0.12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	45 ^f
PIP10	4 g/6 h	0.5	75 ± 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	92
PIP11	4 g/6 h	3.0	90.62 ^e	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	90
PIP12	4 g/6 h	0.5	61.4 ± 1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	98

^a Aislado por el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. ^b Valores tomados de EuCast [258]. ^c $C_{\min} < LLOQ$. Se asumió $C_{\min} = LLOQ$ para realizar la estimación de la exposición del paciente al fármaco. ^d Muestra diluida con un blanco de plasma. ^e No se pudieron realizar réplicas debido a que no se disponía de un volumen sangre suficiente. ^f Paciente para el que no se alcanza el objetivo farmacocinético/ farmacodinámico (50% $fT > 4 \cdot CMI$).

Para la estimación de la exposición de los pacientes a MER y PIP, se utilizó $50\% fT > 4 \cdot CMI$ (ver Tabla III.1, apartado III.3.5) como objetivo farmacocinético/farmacodinámico. Para ello, se estimó para cada uno de los pacientes el valor de $\%fT > 4 \cdot CMI$ mediante estimación bayesiana. Para realizar esta estimación en los pacientes con $C_{\min} < LLOQ$, se asumió el valor $C_{\min} = LLOQ$. En lo referente a la CMI del patógeno, se empleó el valor epidemiológico ECOFF (apartado III.3.5) para el agente patógeno a tratar. En la Tabla IV.12 se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar, la concentración plasmática de fármaco en algunos pacientes podría considerarse insuficiente al no alcanzar el porcentaje de exposición objetivo. En seis (MER01, MER02, MER03, MER12, MER14 y MER17) de los 17 pacientes tratados con MER, no se alcanzó el objetivo farmacocinético/farmacodinámico prefijado, lo que equivale aproximadamente al 35% del total de pacientes monitorizados. Tampoco se alcanzó este objetivo en cinco (PIP01, PIP03, PIP06, PIP08 y PIP09) de los 12 pacientes tratados con PIP (42%). A la vista de los resultados, se puede afirmar que aproximadamente el 38% de los pacientes monitorizados están infradosificados por presentar concentraciones plasmáticas de antibiótico en sangre por debajo de las concentraciones consideradas adecuadas para conseguir máxima efectividad clínica.

Esta infradosificación también se ha descrito en la bibliografía (6-20% de pacientes infradosificados para MER, 54-78% de pacientes infradosificados para PIP, [313-314]). La infradosificación repercute en un peor resultado clínico para el paciente, así como en una mayor probabilidad de desarrollar resistencias bacterianas [34, 315]. Por tanto, el desarrollo y validación de métodos analíticos rápidos (preferiblemente cromatográficos, ver apartado I.8.2) para la monitorización de MER y PIP en pacientes críticos (objetivo de este capítulo) es esencial para realizar un reajuste de la dosificación relativamente rápido (24 h máximo) en caso de disponer de concentraciones de fármaco inadecuadas.

IV.5.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento de las muestras de plasma propuesto para la determinación cromatográfica de MER y PIP que consiste en la precipitación de las proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), separación del precipitado y dilución del sobrenadante con tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0) (relaciones sobrenadante/tampón: 1:2 (v/v) para MER y 1:1.25 (v/v) para PIP), proporciona valores de recuperación satisfactorios (> 90%) en tiempos adecuados (5 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- Las condiciones cromatográficas (fase móvil: tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0) con 7 % (v/v) de ACN para MER o con 20 % (v/v) de ACN para PIP; fase estacionaria: C18; detección UV-Vis: 299 nm para MER y 207 nm para PIP; flujo: 1 mL min⁻¹) propuestas para MER y PIP proporcionan una separación satisfactoria de los interferentes presentes en la muestra, con tiempos de retención adecuados (< 9 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- La validación completa (LLOQ, aceptabilidad de la curva de calibrado, exactitud, precisión, selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, estabilidad del analito a corto y a largo plazo en las condiciones de almacenamiento y en el inyector automático) de los métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de MER y PIP en muestras de plasma de pacientes críticos es conforme a los criterios de aceptación de la EMA; por tanto, son adecuados para su implementación en el laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de MER y PIP en pacientes críticos.
- La aplicación de los métodos desarrollados a la monitorización de MER y PIP de pacientes críticos ingresados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia reveló que no se alcanzó el objetivo farmacocinético/farmacodinámico prefijado (50% $fT > 4 \cdot CMI$) en seis de los 17 pacientes tratados con MER (~35%) y en cinco de los 12 pacientes tratados con PIP (42%). Estos pacientes están infradosificados, lo que repercute en un peor resultado clínico y en una mayor probabilidad de desarrollar resistencias bacterianas. Por tanto, los métodos cromatográficos desarrollados y validados son muy útiles para realizar un reajuste rápido de la dosificación, esencial en el caso de este tipo de pacientes.

CAPÍTULO V

ANTIBACTERIANOS II: CEFTOLOZANO COMBINADO CON TAZOBACTAM

V.1.- Introducción

V.1.1.- Características generales

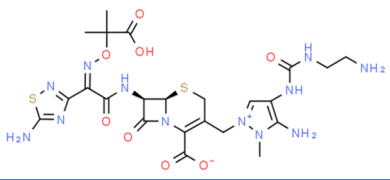
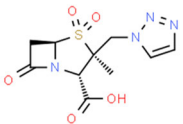
CEF es un antibiótico betalactámico del grupo de las cefalosporinas (ver Tabla I.2). Las cefalosporinas son un grupo de antibióticos que pueden clasificarse en 6 categorías, o generaciones, con un espectro de actividad diferente para cada una de ellas. Aunque el núcleo de la estructura principal es el mismo para todas las cefalosporinas, es la modificación en la posición siete del anillo betalactámico la que determina el espectro de actividad de cada generación (Tabla V.1) [316].

Las enzimas betalactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico. Por ello, CEF se coadministra con TAZ (inhibidor penicilinato sulfona de las enzimas betalactamasas) [317-318]. La combinación CEF/TAZ se ha incorporado recientemente al arsenal antibacteriano y debido a su espectro de actividad único y específico, todavía no se ha categorizado en ningún grupo o generación de cefalosporinas.

V.1.2.- Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla V.1 se muestran las estructuras y algunas propiedades fisicoquímicas de CEF y TAZ. Como se puede observar, ambos compuestos son muy hidrófilos, con valores de $\log P$ de -8.7 y -1.8 para CEF y TAZ, respectivamente. Ambos poseen en su estructura grupos carboxilo con un valor de pK_a próximo a 3. CEF, además posee grupos amino con valores de pK_a (del ácido conjugado) superiores a 9.

Tabla V.1.- Número registrado en el CAS, estructura química y valores de $\log P$, pK_a y M_r de CEF y TAZ.

Compuesto (N° CAS)	Estructura	$\log P^a$	pK_a^a	M_r
CEF (689293-68-3)		-8.7	2.8 3.2 9.1 ^b 10.4 ^b 10.7 ^b	666.7
TAZ (89786-04-9)		-1.8	3.0	300.3

^a Valores estimados con el programa ChemAxon disponible *on-line* en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). ^b Valores correspondientes al ácido conjugado del grupo amino.

V.1.3.- Propiedades farmacológicas

CEF presenta un mecanismo de acción equivalente al de los betalactámicos MER y PIP (ver apartado IV.1.3) [319-321].

V.1.4.- Espectro antimicrobiano

En la tabla IV.2 se muestra el espectro de actividad antibacteriano de la combinación CEF/TAZ [322].

Tabla V.2.- Espectro de actividad antibacteriano de CEF/TAZ.

Antibiótico	Bacterias gramnegativas	Bacterias grampositivas
CEF/TAZ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i> y varias cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> ▪ Enterobacterias (<i>Enterobacter cloacae</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella oxytoca</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>) ▪ Bacilos gramnegativos no fermentadores (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Serratia marcescens</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos (<i>Streptococcus pyogenes</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>Streptococcus anginosus</i>, <i>Streptococcus salivarius</i>) ▪ Diferentes especies del género <i>Pneumococcus spp.</i>

La combinación CEF/TAZ presenta excelente actividad antimicrobiana frente a bacilos gramnegativos, como *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (*Escherichia coli*, o diferentes especies de *Klebsiella spp.*) y frente a bacterias grampositivas como diferentes especies del género *Streptococcus spp.* [323-324]. Está indicado en infecciones intraabdominales graves, cuadros de pielonefritis [325], así como en casos graves de neumonía nosocomial [326].

V.1.5.- Perfil farmacocinético

Se ha estudiado el perfil farmacocinético de CEF, sólo y en combinación con TAZ, en voluntarios sanos a los que se les administró un intervalo de dosis amplio (250–2000 mg y 250–1000 mg para CEF y TAZ, respectivamente) [327-329]. Tras la administración de una dosis, única o múltiple, ambos fármacos presentan incrementos de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC proporcionales a la dosis administrada. CEF y TAZ presentan un V_d de 11-18 L y 19-19.2 L, respectivamente, lo cual refleja una distribución limitada al espacio extracelular. La tasa de unión a proteínas plasmáticas para CEF y TAZ es del 20 %, con una semivida plasmática de eliminación de 2-3 h y

0.8-0.9 h, respectivamente. Ambos fármacos se eliminan en su totalidad por vía renal en su forma inalterada (92 %). TAZ presenta un perfil lineal en su farmacocinética que no está alterado por su coadministración con CEF [292, 327]. La dosis habitual de CEF/TAZ para pacientes con una función renal normal es de 1000/500 mg cada 8 h administrados en 1 h de perfusión intravenosa. La reducción de la dosis está recomendada en aquellos pacientes que presentan la función renal reducida [330]. Se recomienda la administración de CEF/TAZ inmediatamente después del proceso de hemodialización ya que puede haber una eliminación a través de dicho proceso. No se requiere un ajuste de la dosis en pacientes con insuficiencia hepática.

V.1.6.- Perfil farmacodinámico

Se ha visto que el objetivo farmacocinético/farmacodinámico que mejor describe la efectividad de CEF es el porcentaje de tiempo en el cual las concentraciones de fármaco permanecen por encima de la CMI ($\% fT > CMI$). El valor medio de tiempo necesario para conseguir un efecto bactericida equivalente a la reducción del número de colonias en una unidad logarítmica fue del 31.5 % frente a *Pseudomonas aeruginosa*, 31.6 % frente a enterobacterias y 34.8 % frente a bacterias productoras de BLEE [331]. Estos resultados son similares a los obtenidos en otro estudio basado en un modelo farmacocinético *in vitro* de infección por *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* [332].

Para TAZ, se ha visto que el mejor indicador farmacodinámico de eficacia frente a infecciones por enterobacterias productoras de BLEE es el porcentaje de tiempo en el que las concentraciones de fármaco permanecen por encima de una CMI de 0.5 mg L^{-1} ($\% fT > 0.5$) [333]. De este modo, se ha visto que frente a este tipo de enterobacterias, ese porcentaje de tiempo para la reducción del número de colonias en 1 logaritmo es del 70 % [334-335].

V.1.7.- Perfil de seguridad

Por lo general, CEF/TAZ es bien tolerado desde el punto de vista de la seguridad, con un perfil de eventos adversos similar al encontrado para otras cefalosporinas como son náuseas, vómitos y diarrea [322].

En dos ensayos clínicos fase III (ASPECT-cUTI y ASPECT-cIAI) se vio que los eventos adversos más frecuentes (más de 3-5 %) que ocurrieron en los pacientes tratados fueron náuseas, cefalea, estreñimiento, diarrea, pirexia, elevación de niveles tanto de alanina como de aspartato aminotransferasas. Por lo general, estos eventos fueron de intensidad leve o moderada [336-337].

V.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral descrito en el Capítulo II, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto y validación completa conforme a los requerimientos de la EMA de un método cromatográfico para la determinación simultánea de CEF y TAZ en muestras de plasma utilizando una columna C18 y detección en el UV-Vis. Para la consecución de este objetivo, de modo análogo al Capítulo IV, se realiza un estudio de la optimización de la composición de la fase móvil hidroorgánica y del tratamiento de las muestras de plasma. El método debe ser rápido y sencillo para su implementación en análisis de rutina en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Estudio del perfil farmacocinético de CEF y TAZ en un paciente crítico ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia bajo tratamiento con una especialidad farmacéutica (Zerbaxa®) que contiene estos antibacterianos y sometido a RRT.

V.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, los procedimientos seguidos para el acondicionamiento del sistema cromatográfico, para la validación del método desarrollado según las recomendaciones de la EMA, para el aseguramiento interno de la calidad y para el análisis farmacocinético, así como los programas informáticos empleados en este capítulo, se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

V.3.1.- Preparación de patrones de calibración, controles y PI

Para la preparación de las disoluciones de CEF, TAZ y de PI (cefepima (CEFE)) se emplearon las especialidades farmacéuticas que se indican en la Tabla V.3. Se prepararon diariamente disoluciones de trabajo por disolución de la cantidad adecuada de polvo en agua ultrapura, en las concentraciones indicadas en la Tabla V.3. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C en la oscuridad.

Tabla V.3.- Compuestos estudiados, especialidad farmacéutica, distribuidor comercial, concentración de la disolución de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior

Antibiótico	Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
CEF	Zerbaxa [®] IV 1/0.5 g Observaciones: polvo para disolución para perfusión	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 1000 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 0.5 (LLOQ), 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 0.5, 1.5, 40 y 80 – Selectividad: 0.5 – Integridad de dilución: 120 – Efecto memoria: 100 – Estabilidad: 2.5 y 80
TAZ	Distribuidor: Merck Sharp & Dohme B.V. (Haarlem, Países Bajos)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 500 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 0.25 (LLOQ), 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 0.25, 0.75, 20 y 40 – Selectividad: 0.25 – Integridad de dilución: 60 – Efecto memoria: 50 – Estabilidad: 1.25 y 30
CEFE	Cefepima Accord [®] 1 g Observaciones: polvo para solución inyectable y para perfusión Distribuidor: Accord Healthcare S.L.U. (Barcelona, España)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 5000 ^a

^a Preparación diaria

Como se puede observar en la Tabla V.3, para CEF y TAZ se prepararon ocho controles para la validación de la curva de calibrado por dilución de la disolución de trabajo en plasma de sujetos sanos. Estas concentraciones son las que se utilizaron para la construcción de las rectas de calibrado. De manera similar, se prepararon los controles empleados para la validación de la precisión, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO 17025 y ISO15189), selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, así como para la validación de la estabilidad del analito en las disoluciones de plasma y en el inyector automático. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la EMA indicadas en la Tabla I.5 [246].

En cuanto a la preparación del PI (CEFE), la disolución de trabajo de 5000 mg L⁻¹ se diluyó en blanco de plasma a 500 mg L⁻¹. Esta última disolución se empleó para aditivar directamente los controles, blancos y muestras de plasma, dando lugar a una concentración final de PI (CEFE) de 50 mg L⁻¹ (previamente al tratamiento de muestra).

V.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa

La especialidad farmacéutica de Zerbaxa® administrada al paciente en estudio es la indicada en la Tabla V.3. Las disoluciones de CEF/TAZ para perfusión se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante por disolución del contenido del vial en una disolución para perfusión de NaCl al 0.9 % (m/v) o de dextrosa al 5% (m/v). La concentración final de CEF y TAZ fueron de 10000 mg L⁻¹ de 5000 mg L⁻¹, respectivamente.

V.3.3.- Procedimientos

V.3.3.1.- Dosificación del paciente en estudio y tiempos de muestreo

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de Zerbaxa®, todas las disoluciones (apartado V.3.2) se administraron inmediatamente tras su preparación. La pauta general de dosificación de CEF/TAZ en el paciente del estudio fue de 2/1 g cada 8 h, con una administración intravenosa en perfusiones de 60 min de duración.

En este capítulo se estudia un paciente (de 68 años) crítico ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia sometido a RRT, concretamente a una hemodiafiltración venovenosa continua (CVVHDF, acrónimo de *continuous venovenous hemodiafiltration*) que emplea un hemofiltro de polisulfona a flujos de

sangre, de fluido de dialización y de líquido de reposición de 100 mL min⁻¹, 2000 mL h⁻¹ y 1000 mL h⁻¹, respectivamente.

Para la monitorización de CEF/TAZ en el paciente en estudio, una vez alcanzado el estado estacionario en la etapa de mantenimiento (día 2 desde el inicio del tratamiento), se extrajeron muestras de sangre arterial previamente a la RRT y muestras de sangre venosa posteriormente a la RRT. Estas muestras se obtuvieron inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a las 0 h y a las 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 8.0 h (C_{\min}) tras la administración de la misma. La toma de muestras se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.5.

V.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomaron 500 µL de plasma, ya aditivado con PI (CEFE) a 50 mg L⁻¹, y se precipitaron las proteínas por adición de 1000 µL de ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). La mezcla resultante se agitó con un agitador vortex durante 20 s y, a continuación, se centrifugó a 10800 rpm durante 5 min. Tras ello, se tomaron 750 µL de sobrenadante y se adicionaron 3000 µL de CH₂Cl₂. La mezcla resultante se agitó con un agitador vortex durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. Tras ello, se tomó la fracción acuosa para su análisis cromatográfico.

V.3.3.3.- Condiciones cromatográficas

Para la determinación de CEF/TAZ se utilizó el equipo cromatográfico de módulos integrados Waters. Se utilizó una columna C18 XBridge (150 × 4.6 d.i. mm, 5 µm) y una fase móvil compuesta por una disolución de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN, (92:8, v/v). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹ y el volumen de inyección de 10 µL. Las separaciones se realizaron a una temperatura de 30 °C. La detección espectrofotométrica se efectuó en el UV-vis a 220 nm (TAZ) y a 260 nm (CEF y CEFE) que corresponden su máximo de absorción.

V.4.- Resultados y discusión

V.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de CEF/TAZ en muestras de plasma

V.4.1.1.- Composición de la fase móvil

Tal y como se ha comentado en el apartado IV.4.1.1, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado RPLC. Como se puede observar en la Tabla V.1, CEF y TAZ son compuestos muy hidrófilos y, además, están ionizados en todo el intervalo de pH (~3-9) de trabajo de las fases estacionarias de sílice enlazadas. Por ello, para conseguir la retención de estos compuestos, la mayoría de los métodos cromatográficos publicados en la bibliografía utilizan fases estacionarias C18 y fases móviles con poca fuerza eluyente (ver Tabla I.4). Además, en la mayoría de aplicaciones se utilizan fases móviles hidroorgánicas a un pH ácido (predomina la forma protonada de los grupos carboxilo) que contienen ACN como modificador.

Por todo lo expuesto, de modo similar al Capítulo IV, se prepararon distintas fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M a pH 3.0 y ACN en proporciones variables (3-20 %). En este Capítulo también se evaluó la posibilidad de utilizar un PI para compensar *a priori* posibles variaciones operacionales. Se estudiaron como PI los siguientes compuestos estructuralmente similares al CEF y al TAZ: cefazolina, CEFE, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona y cefuroxima. En las condiciones ensayadas, CEFE fue el único compuesto cuyo pico cromatográfico no que eluyó a valores de t_R próximos a los analitos sin solapamiento de los picos cromatográficos. Además, CEFE presenta una semivida plasmática de eliminación relativamente corta (aproximadamente 2 h) [338], por tanto, es muy poco probable su presencia en las muestras de pacientes reales, en caso que dichos pacientes estén bajo tratamiento con CEFE.

En la Figura V.1 se muestran los cromatogramas obtenidos con todas las fases móviles ensayadas. Como se puede observar, tan sólo se observó una separación completa de los picos de CEF, TAZ y PI con las fases móviles con un contenido de ACN del 3-8%. A fin de reducir el tiempo de análisis y evitar el posible solapamiento de compuestos endógenos de las muestras de plasma en el frente del cromatograma, se seleccionó *a priori* para futuros estudios la fase móvil que contiene tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (93:8, v/v).

También se estudió el efecto de la temperatura (25 - 50 °C) sobre la retención (Figura V.2).

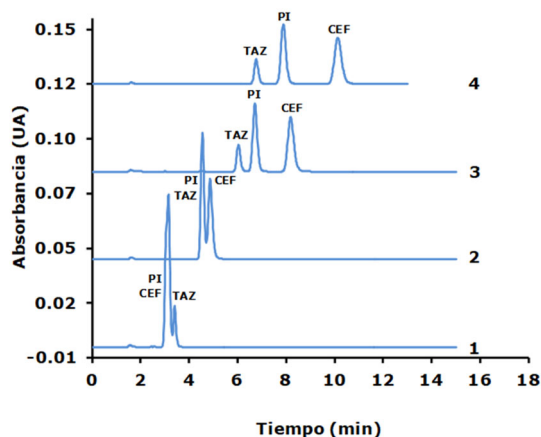


Figura V.1.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 50 mg L⁻¹ de CEF y PI (CEFE), y de 25 mg L⁻¹ de TAZ. La composición de las fases móviles ensayadas fue: **(1)** 82:20, **(2)** 86:14, **(3)** 92:8 y **(4)** 97:3 tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (v/v). El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado V.3.3.3. Se muestran los cromatogramas obtenidos con detección a $\lambda = 220$ nm.

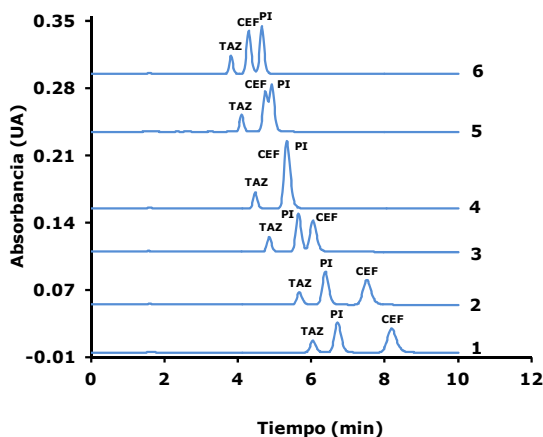


Figura V.2.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 50 mg L⁻¹ de: CEF, PI (CEFE), y de 25 mg L⁻¹ de TAZ. La temperatura de la columna cromatográfica fue: **(1)** 25, **(2)** 30, **(3)** 35, **(4)** 40, **(5)** 45 y **(6)** 50 °C. El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado V.3.3.3. Se muestran los cromatogramas obtenidos con detección a $\lambda = 220$ nm.

Como se puede observar en la Figura V.2., al aumentar la temperatura de la columna cromatográfica disminuyen los valores de los t_R de los analitos y PI. Curiosamente, a partir de los 45 °C se observó una inversión del orden de elución entre el PI (CEFE) y CEF. Se seleccionó una temperatura de 30 °C a fin de reducir el tiempo de análisis.

En las condiciones seleccionadas, tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (93:8, v/v), T = 30 °C (ver más detalles en el apartado V.3.3.3), los valores de t_R , k y A/B fueron:

- Para TAZ: $t_R = 5.8$ min, $k = 3.4$ y $A/B = 0.98$
- Para PI: $t_R = 6.5$ min, $k = 4$ y $A/B = 1.02$
- Para CEF: $t_R = 7.6$ min, $k = 4.8$ y $A/B = 0.98$

V.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma

En primer lugar, al igual que en el Capítulo IV (apartado IV.1.2) se evaluó la influencia de la naturaleza de los filtros de jeringa sobre la recuperación de los compuestos, empleando para ello disoluciones acuosas. En todos los casos se obtuvieron valores de recuperación próximos al 100 %, por lo que se utilizaron indistintamente filtros de Nylon® (0.45 μm), PTFE y PVDF (ambos de 0.22 μm).

Para la determinación cromatográfica de CEF y TAZ en muestras de plasma (ver Tabla I.4), el tratamiento de las muestras más empleado consiste en la precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN (en ocasiones en presencia de fórmico) [175-177]. En esta Tesis Doctoral se ensayó la precipitación de proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y con MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). En estos tratamientos se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μL de muestra/1000 μL de reactivo precipitante). Se emplearon blancos de muestras de plasma aditivados con 50 mg L^{-1} de CEF y PI (CEFE) y 25 mg L^{-1} de TAZ. Los experimentos se realizaron por triplicado. La inyección de las disoluciones obtenidas tras el tratamiento con MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) provocó un incremento de la presión (de hasta 300-400 psi) del sistema cromatográfico por lo que se descartó este tratamiento. Por otro lado, se observó un solapamiento de los picos cromatográficos en los cromatogramas correspondientes a la muestra obtenida tras el tratamiento con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) debido a la elevada fuerza eluyente de la disolución de inyección.

Con fin de eliminar el ACN de la disolución de medida, se investigó la realización de una LLE con CH_2Cl_2 [177]. Se ensayaron relaciones

sobrenadante/CH₂Cl₂ 1:4 (v/v) y 1:8 (v/v). Tras la etapa de LLE, se inyectó la fracción acuosa en el sistema cromatográfico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

En la Tabla V.4 se muestran para cada una de los tratamientos realizados, los valores de A/B, así como los porcentajes de recuperación estimados a partir del cociente entre el área de pico de analito obtenida tras el tratamiento del blanco de plasma aditivado y el área de una disolución de la misma concentración de analito en agua. Como puede observarse, en todos los casos se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que se seleccionó una relación sobrenadante/CH₂Cl₂ de 1:4 (v:v).

Tabla V.4.- Resultados obtenidos tras el tratamiento de precipitación de proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y LLE con CH₂Cl₂ de las muestras de plasma.

Compuesto	Relación sobrenadante/CH ₂ Cl ₂ (v/v)	A/B	Recuperación (%) ^a
CEF	1:4	0.99	100.2 ± 1.3
	1:8	0.99	100.0 ± 1.0
TAZ	1:4	1.00	99 ± 2
	1:8	1.00	99.2 ± 1.2
PI (CEFE)	1:4	0.99	99.5 ± 1.0
	1:8	1.00	99.1 ± 1.4

^a Media ± desviación estándar de las tres réplicas realizadas

En la Figura V.3 se muestran los cromatogramas obtenidos para un blanco de plasma aditivado con 50 mg L⁻¹ de CEF y PI (CEFE) y 25 mg L⁻¹ de TAZ, tras el tratamiento basado en una desproteización con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) con una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 µL de plasma/1000 µL de reactivo precipitante), seguido de una LLE con CH₂Cl₂ en una relación sobrenadante/ CH₂Cl₂ de 1:4 (v:v). También se incluye un cromatograma correspondientes a un blanco de plasma tras someterse al correspondiente tratamiento.

Es interesante resaltar que, durante la ejecución de todos los ensayos en matriz plasma, la presión del sistema cromatográfico se mantuvo entre los 1650-1750 psi (con un flujo de 1 mL min⁻¹) y se observó una variación máxima de 30-50 psi tras una sesión de trabajo continuo.

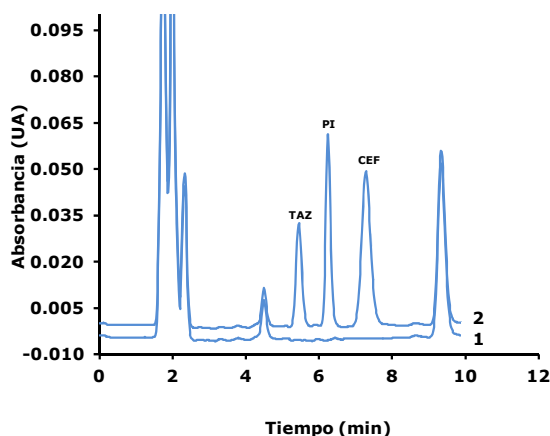


Figura V.3.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 50 mg L^{-1} de CEF y PI (CEFE), y con 25 mg L^{-1} de TAZ tras el tratamiento con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) seguido de una LLE con CH_2Cl_2 . Relación muestra/reactivo precipitante 1:2 (v/v) ($500 \mu\text{L}$ de agua/ $1000 \mu\text{L}$ de reactivo precipitante). Relación sobrenadante/ CH_2Cl_2 1:4 (v/v). Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado V.3.3.3. Cromatogramas obtenidos a $\lambda = 220 \text{ nm}$.

V.4.2.- Validación del método desarrollado

En el apartado III.3.3 se describen los procedimientos seguidos para la validación del método desarrollado según la guía de la EMA (ver Tabla I.5). En la Tabla V.3 se indican los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para la validación de cada una de las características analíticas del método. En este método analítico se utilizó el método de calibración del patrón interno, así como señal analítica se utilizó la relación Área (analito o blanco) / Área PI. En el cuadro V.1 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, los resultados obtenidos para los controles utilizados en la validación de todas las características analíticas son conformes a los criterios de aceptación de la EMA con lo que se puede dar por validado el método analítico propuesto para su implementación en análisis de rutina en laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Es importante destacar que en el estudio de estabilidad de CEF y TAZ en plasma a corto y largo plazo, ambos analitos fueron estables (Tabla V.9) hasta 1 y 15 días de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Por ello, se decidió incluir en el procedimiento de trabajo el almacenamiento de las muestras extraídas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ un máximo de 15 días o a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ máximo un día. Por otro lado, se fijó en 8 h el tiempo máximo en el inyector automático a temperatura ambiente de las muestras tratadas, margen suficientemente amplio para programar secuencias de trabajo con un número de muestras más que suficiente para el volumen de trabajo diario.

Cuadro V.1.- Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado para la determinación de CEF y TAZ.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN INFERIOR (LLOQ)

CONCENTRACIÓN:

- LLOQ práctico prefijado:
 - CEF: 0.50 mg L⁻¹
 - TAZ: 0.25 mg L⁻¹

RESULTADOS:

- Señal (LLOQ) / Señal(blanco):
 - CEF: > 38
 - TAZ: > 19

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (LLOQ) ≥ 5·Señal (blanco)): SÍ ✓

LINEALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO

INTERVALO DINÁMICO LINEAL (niveles usuales de CEF y TAZ en pacientes monitorizados):

- CEF (LLOQ-ULOQ): 0.5– 100 mg L⁻¹
- TAZ (LLOQ-ULOQ): 0.25 – 50 mg L⁻¹

RESULTADOS:

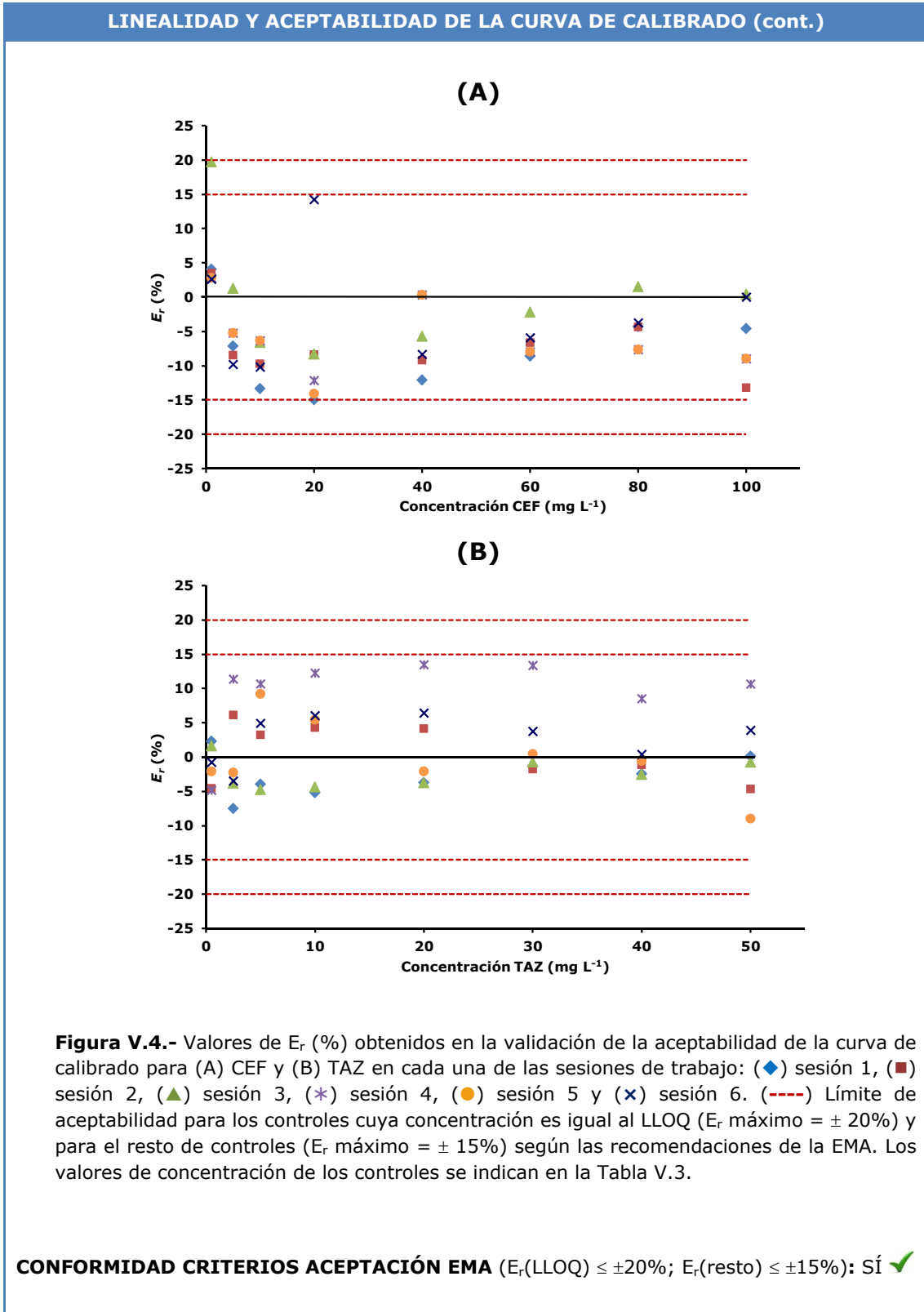
Tabla V.5.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en seis sesiones de trabajo.

Analito	Sesión	b_0	b_1 ^a	R^2 ^b
CEF	1	0.0015	0.43	0.995
	2	0.002	0.45	0.997
	3	0.0007	0.46	0.998
	4	0.0014	0.43	0.9991
	5	0.0019	0.42	0.9992
	6	0.0006	0.43	0.995
TAZ	1	0.0008	0.40	0.995
	2	0.0005	0.38	0.998
	3	0.0001	0.39	0.9992
	4	0.0002	0.38	0.9991
	5	0.003	0.38	0.996
	6	0.0006	0.38	0.9990

^a Diferencias en los valores de $b_1 < 10$ %. Se considera una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados. Por lo que no es necesario realizar una calibración metodológica en cada sesión de trabajo si la correspondiente verificación es conforme. Pese a ello se optó por preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente

^b $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017

Cuadro V.1.- Cont.



Cuadro V.1.- Cont.

EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA E INTERDÍA

RESULTADOS:

Tabla V.6.- Evaluación de la exactitud y precisión intradía (réplicas de los controles preparados y procesados en la misma sesión de trabajo).

Analito	C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹					E _r , %	RSD, %
		R1	R2	R3	R4	R5		
CEF	0.50 (LLOQ)	0.50	0.49	0.47	0.48	0.46	-2.2	2.9
	1.50 (QC bajo)	1.52	1.56	1.52	1.49	-	1.4	1.9
	40.00 (QC medio)	40.31	40.14	43.18	40.12	40.11	1.9	3.3
	80.00 (QC alto)	78.58	78.90	77.71	78.14	78.14	-2.1	0.6
TAZ	0.25 (LLOQ)	0.26	0.27	0.26	0.27	0.28	8.1	4.4
	0.75 (QC bajo)	0.68	0.75	0.85	0.81	0.77	2.7	9.6
	20.00 (QC medio)	21.16	21.95	20.55	21.75	21.35	6.7	2.9
	40.00 (QC alto)	43.19	43.65	43.10	41.94	42.97	7.4	1.7

Tabla V.7.- Evaluación de la exactitud y precisión interdía (controles preparados y procesados en cuatro días).

Analito	C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹				E _r , %	RSD, %
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
CEF	0.50 (LLOQ)	0.57	0.57	0.58	0.53	13.0	3.8
	1.50 (QC bajo)	1.59	1.44	1.66	1.36	0.8	9.3
	40.00 (QC medio)	44.4	41.11	43.68	40.30	5.9	4.7
	80.00 (QC alto)	87.03	79.44	88.44	78.59	4.2	6.1
TAZ	0.25 (LLOQ)	0.22	0.25	0.23	0.26	4.4	6.8
	0.75 (QC bajo)	0.73	0.71	0.76	0.68	4.3	4.9
	20.00 (QC medio)	19.35	19.62	18.75	21.16	1.4	5.2
	40.00 (QC alto)	37.8	38.4	35.4	43.2	3.3	8.5

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA:

- E_r (LLOQ) ≤ ±20% y E_r (resto QCs) ≤ ±15%: SÍ ✓
- RSD (LLOQ) ≤ 20% y RSD (resto QCs) ≤ 15%: SÍ ✓

SELECTIVIDAD

RESULTADOS:

- Señal (blanco^a) / Señal (LLOQ) < 0.2
- ^a Muestras de 20 pacientes ingresados en la UCI, ninguno de ellos bajo tratamiento con CEF/TAZ o CEFE pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

Cuadro V.1.- Cont.

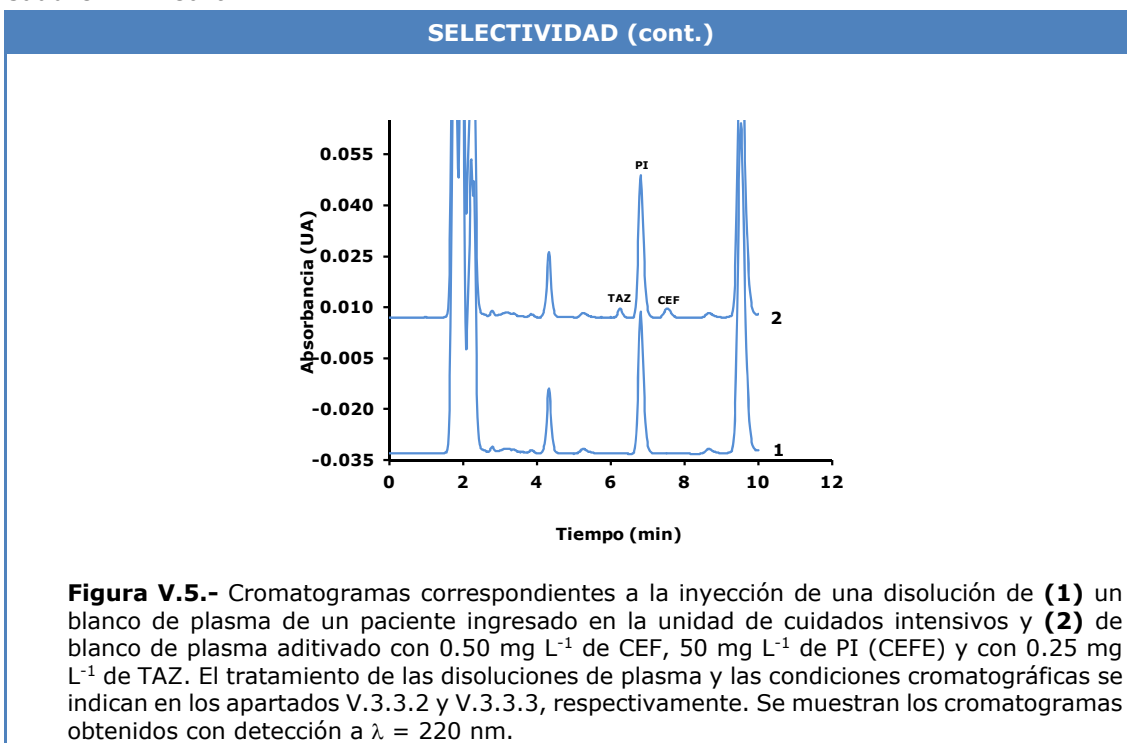


Figura V.5.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** un blanco de plasma de un paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 0.50 mg L⁻¹ de CEF, 50 mg L⁻¹ de PI (CEFE) y con 0.25 mg L⁻¹ de TAZ. El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados V.3.3.2 y V.3.3.3, respectivamente. Se muestran los cromatogramas obtenidos con detección a $\lambda = 220$ nm.

COMENTARIO: en los cromatogramas obtenidos para todas las muestras de pacientes no se observó ningún pico en la zona de elución de los analitos ($t_R \sim 6.3$ min para TAZ, $t_R \sim 6.8$ min para CEFE y $t_R \sim 7.5$ min para CEF) que puedan interferir en su determinación.

INTEGRIDAD DE DILUCIÓN

RESULTADOS:

Tabla V.8.- Evaluación de la integridad de dilución. Dilución ensayada: disolución analito/blanco, 1:3 (v/v).

Analito	C inicial, mg L ⁻¹ ^a	C final, mg L ⁻¹	Réplica	\hat{C} final, mg L ⁻¹	E_{rr} , %	RSD, %
CEF	120	30	1	29.71	1.1	2.6
			2	29.60		
			3	30.20		
			4	29.09		
			5	29.55		
			6	30.39		
			7	30.04		
TAZ	60	15	1	14.86	1.3	1.4
			2	14.80		
			3	15.10		
			4	14.54		
			5	14.75		
			6	15.20		
			7	9.10		

^a Superior al ULOQ (ULOQ(CEF) = 100 mg L⁻¹; ULOQ(TAZ) = 50 mg L⁻¹)

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$ y $RSD \leq 15\%$): SÍ ✓

Cuadro V.1.- Cont.

EFECTO MEMORIA POR ARRASTRE DE MUESTRA						
RESULTADOS:						
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Señal (blanco) / Señal(LLOQ): <ul style="list-style-type: none"> ○ CEF: < 0.03 ○ TAZ: < 0.05 						
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) \leq 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓						
ESTABILIDAD						
RESULTADOS:						
Tabla V.9.- Evaluación de la estabilidad a corto y largo plazo de CEF y TAZ en plasma en diferentes condiciones de almacenamiento.						
Analito	nc, C, mg L ⁻¹	Tiempo de almacenamiento, días	4 °C		-20 °C	
			$\hat{C} \pm s_r$, mg L ⁻¹	E _{r,r} , %	$\hat{C} \pm s_r$, mg L ⁻¹	E _{r,r} , %
CEF	QC bajo (2.50)	0	2.50 ± 0.04	0.0	2.50 ± 0.04	0.0
		1	2.49 ± 0.03	0.4	-	-
		15	-	-	2.48 ± 0.02	-0.8
		30	-	-	1.61 ± 0.02	-35.6^a
	QC alto (80)	0	80.0 ± 1.0	0.0	80.0 ± 1.0	0.0
		1	78.9 ± 0.9	-1.4	-	-
		15	-	-	77.9 ± 1.1	-2.6
		30	-	-	58.1 ± 0.9	-27.4^a
TAZ	QC bajo (1.25)	0	1.251 ± 0.011	0.1	1.251 ± 0.011	0.1
		1	1.221 ± 0.010	-1.7	-	-
		15	-	-	1.23 ± 0.02	-1.7
		30	-	-	0.870 ± 0.010	-29.7^a
	QC alto (30)	0	30.5 ± 0.3	1.7	30.5 ± 0.3	1.7
		1	29.1 ± 0.6	-3.0	-	-
		15	-	-	29.1 ± 0.8	-3.0
		30	-	-	23.8 ± 0.3	-20.7^a

^a Valor no conforme al criterio de aceptación de la EMA (E_r \leq ±15%)

Tabla V.10.- Evaluación de la estabilidad en el inyector automático de CEF, TAZ y CEFE (PI) tras el tratamiento de muestra desarrollado.

Analito	nc (C, mg L ⁻¹)	Tiempo en el inyector automático, h	T ambiente	
			$\hat{C} \pm s_r$, mg L ⁻¹	E _{r,r} , %
CEF	QC bajo (2.50)	0	2.50 ± 0.05	0.0
		8	2.48 ± 0.03	-0.5
	QC alto (80)	0	79.4 ± 0.8	-0.1
		8	77.8 ± 0.4	-0.3
TAZ	QC bajo (1.25)	0	1.25 ± 0.08	0.0
		8	1.22 ± 0.03	-2.1
	QC alto (30)	0	30.5 ± 0.8	1.7
		8	28.3 ± 0.7	-5.7
PI (CEFE)	50 mg L ⁻¹	0	49.3 ± 0.5	-2.2
		8	48.9 ± 0.7	-0.8

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (E_r \leq ± 15 %): 30 días a -20 °C: NO ✘; Resto de condiciones: SÍ ✓

Símbolos y acrónimos: b₀: ordenada en el origen. b₁: pendiente. C: concentración preparada. \hat{C} : concentración encontrada. E_r: error relativo. QC: control. R: réplica. R²: coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

V.4.3.- Monitorización de CEF y TAZ en un paciente crítico sometido a RRT hospitalizado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental

Tal y como se ha comentado en el apartado III.3.4, es importante destacar que se realizaron actividades (verificación y control) para el aseguramiento interno de la calidad de los resultados obtenidos para muestras reales.

Tal y como se indica en el apartado V.3.3.1, para la monitorización de CEF y TAZ en el paciente crítico estudiado se extrajeron muestras de sangre arterial y venosa con anterioridad y posterioridad a la RRT, respectivamente. Estas muestras se obtuvieron inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis de Zerbaxa[®], es decir, a las 0.0 h (tiempo equivalente a la C_{\min}) y a las 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 8.0 h tras la administración de la dosis. Para determinar las concentraciones plasmáticas de CEF y TAZ se aplicó el método cromatográfico desarrollado y validado descrito en este capítulo. No se pudieron realizar réplicas debido al escaso volumen de muestra extraído de este paciente.

En la Figura V.6 se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos de la muestra a $t = 0.0$ h (C_{\min}) para el paciente bajo tratamiento con Zerbaxa[®] junto con sus correspondientes controles obtenidos en la misma sesión de trabajo.

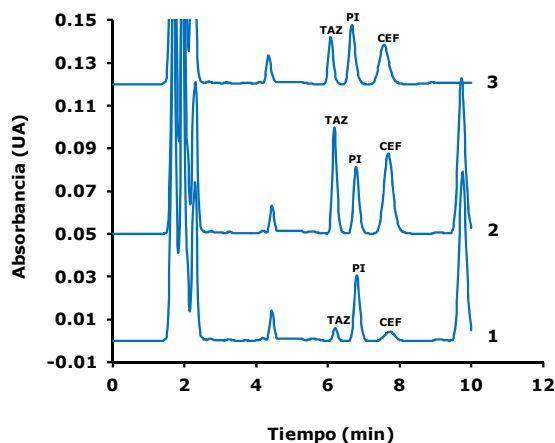


Figura V.6.- Cromatogramas correspondientes a la determinación de CEF y TAZ en los controles **(1)** QC bajo (5 mg L^{-1} de CEF, 50 mg L^{-1} de PI (CEFE) y 2.5 mg L^{-1} de TAZ), **(2)** QC alto (80 mg L^{-1} de CEF, 50 mg L^{-1} de PI (CEFE) y 40 mg L^{-1} de TAZ) y **(3)** de sangre arterial extraída inmediatamente antes a la siguiente dosis de Zerbaxa[®] (tiempo equivalente a la C_{\min}) del paciente crítico en estudio (CEF: $C_{\min} = 41.9 \text{ mg L}^{-1}$, TAZ: $C_{\min} = 10.6 \text{ mg L}^{-1}$, ver Tabla V.15). El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados V.3.3.2 y V.3.3.3, respectivamente.

En la Tabla V.11 se muestra, para cada tiempo de muestreo, los valores de concentración plasmática estimados para CEF y TAZ, tanto para sangre arterial como venosa.

Tabla V.11.- Concentraciones plasmáticas arteriales y venosas de CEF y TAZ para cada punto de muestreo obtenidas para el paciente crítico monitorizado sometido a RRT.

Tiempo de muestreo (h)	C, mg L ⁻¹			
	CEF		TAZ	
	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa
0.0	41.9	20.7	10.6	5.8
1.5	89.1	45.2	28.3	12.2
2.0	80.3	38.4	21.6	10.3
2.5	77.1	36.1	19.0	9.0
3.0	73.8	34.7	16.3	8.2
5.0	66.6	30.6	14.2	7.4
7.0	60.2	28.7	12.7	6.0
8.0	55.8	25.8	11.4	5.1

Para CEF y TAZ se realizó un análisis farmacocinético no compartimental a partir de las concentraciones mostradas en la Tabla V.11 (ver apartado III.3.5 y III.4). Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{i}n}$ se estimaron directamente del perfil concentración plasmática-tiempo (ver Figura V.7). Los valores de AUC, Cl, semivida plasmática de eliminación y V_d (ver Tabla V.12) se estimaron utilizando los criterios descritos en el apartado III.4.

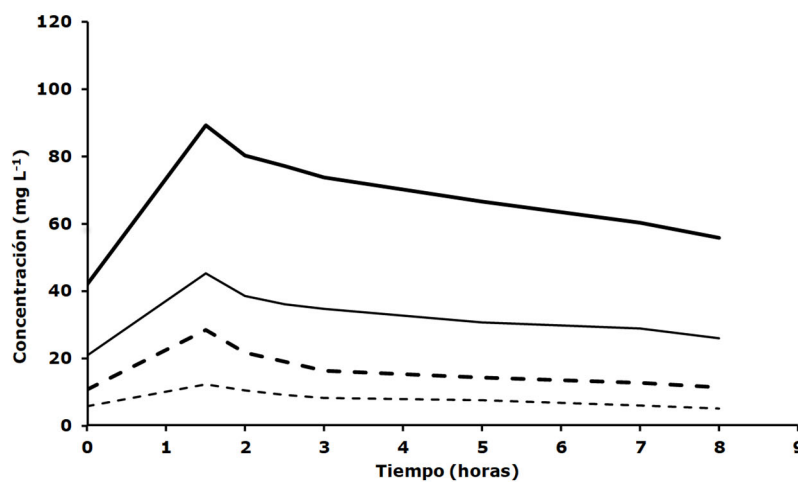


Figura V.7.- Perfiles concentración plasmática-tiempo, en el paciente crítico sometido a RRT, obtenidos tras el análisis farmacocinético no compartimental de CEF: (—) arterial, (—) venoso, y TAZ: (---) arterial, (---) venoso. Tiempo de muestreo: 0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 8.0 h.

Tabla V.12.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras el análisis farmacocinético no compartimental de CEF y TAZ en el paciente crítico sometido a RRT.

Parámetro farmacocinético	C, mg L ⁻¹			
	CEF		TAZ	
	Arterial	Venosa	Arterial	Venosa
AUC (mg h/L)	960	373	157	58
V _d (L)	53.9	97.5	108.9	194.2
Cl (L h ⁻¹)	2.1	5.4	6.4	17.4
C _{máx} (mg L ⁻¹)	99.0	53.0	37.1	15.0
C _{mín} (mg L ⁻¹)	55.9	25.8	11.4	5.1
Semivida plasmática (h)	17.9	12.6	11.9	7.8

Como se puede observar en la Figura V.7, existe una diferencia significativa entre las concentraciones de CEF y TAZ en sangre arterial frente a las obtenidas en sangre venosa, a causa de una notable pérdida de ambos fármacos durante el proceso de RRT. Esta pérdida es debida a que ambos fármacos presentan una tasa de unión a proteínas plasmáticas baja y al tener un tamaño molecular relativamente pequeño, la fracción libre no unida a estas proteínas se elimina durante la RRT. Los valores del porcentaje medio de fármaco no eliminado durante la RRT, calculado a partir del cociente entre las concentraciones de fármaco estimadas en sangre venosa y arterial, fueron de $49.3 \pm 1.8 \%$ y $41 \pm 5 \%$ para CEF y TAZ, respectivamente. Estos valores dependen de las características de la RRT empleada como son el flujo de sangre, la velocidad de ultrafiltrado o el tipo de hemofiltro empleado, entre otras variables. No obstante, a pesar de las pérdidas observadas para ambos fármacos durante la RRT, las concentraciones plasmáticas de CEF, considerado el principio activo bactericida, permanecieron en valores significativos.

Aunque la finalidad de la monitorización de CEF y TAZ en esta Tesis Doctoral ha sido la realización de un análisis farmacocinético no compartimental, sin entrar a valorar al detalle aspectos sobre exposición, se ha considerado clínicamente relevante realizar el siguiente inciso. Dado que CEF es considerado un antibiótico con actividad tiempo dependiente, se puede inferir el impacto clínico de la RRT sobre la potencial efectividad de este fármaco. Puesto que CEF está indicado para infecciones intraabdominales complicadas, es frecuente no disponer del aislamiento del agente causal del proceso infeccioso ni de sus valores de CMI. Sin embargo, la práctica totalidad de los microorganismos típicamente involucrados en este tipo de infecciones presentan valores de CMI inferiores a 8 mg L^{-1} y 4 mg L^{-1} para CEF y TAZ, respectivamente [258, 339]. Por este motivo, teniendo en cuenta que la concentración de CEF a lo largo de todo el intervalo de dosificación ha resultado

superior a 8 mg L^{-1} (ver Tabla V.11), la dosis administrada podría considerarse adecuada. Sin embargo, aunque CEF y TAZ presentan una farmacocinética lineal y dosis menores basadas en 1 g de CEF podrían ser suficientes para mantener concentraciones de este fármaco por encima de 8 mg L^{-1} , no ocurriría lo mismo con la dosis asociada de 0.5 g correspondiente a TAZ, cuya estimación revelaría concentraciones del mismo inferiores a 4 mg L^{-1} tanto en sangre arterial como venosa, consideradas potencialmente subterapéuticas.

Por todo lo expuesto, y teniendo en cuenta que el empleo de RRT durante el tratamiento con Zerbaxa[®] se ha asociado con un fracaso terapéutico a dosis de 1/0.5 g de CEF/TAZ [340-342], la dosificación empleada en este capítulo de la Tesis Doctoral (ver apartado V.3.3.1) se presenta como pauta alternativa a valorar. En una revisión sistemática de trabajos de investigación recientemente publicada se ha evidenciado la necesidad de aumentar la dosis de algunos antibióticos en muchos de los pacientes críticos sometidos a RRT [343]. A pesar de esto, todavía no hay suficiente información sobre el perfil farmacocinético de estos antibióticos, por lo que todavía no se han podido establecer guías con pautas de prescripción para estos tratamientos en estas situaciones concretas. Por este motivo, el impacto de las RRT sobre la dosis de Zerbaxa[®] debería de estudiarse con mayor profundidad en futuros trabajos de investigación, tomando los resultados obtenidos en estudios preliminares, como los obtenidos en este capítulo de la Tesis Doctoral, como punto de partida.

V.5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos de este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento de las muestras de plasma propuesto para la determinación cromatográfica simultánea de CEF y TAZ que consiste en la precipitación de las proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), seguida de LLE con CH₂Cl₂ en una relación sobrenadante/extractante de 1:4 (v/v) en presencia de CEFE como PI proporciona valores de recuperación satisfactorios (> 90%) en tiempos adecuados (10 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- Las condiciones cromatográficas (fase móvil: tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0) con 8 % (v/v) de ACN; fase estacionaria: C18; detección UV-Vis: 260 nm para CEF y PI (CEFE), y 220 nm para TAZ; flujo: 1 mL min⁻¹) propuestas para CEF y TAZ proporcionan una separación satisfactoria de los interferentes presentes en la muestra, con tiempos de retención adecuados (< 9 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- La validación completa (LLOQ, aceptabilidad de la curva de calibrado, exactitud, precisión, selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, estabilidad del analito a corto y a largo plazo en las condiciones de almacenamiento y en el inyector automático) del método cromatográfico desarrollado para la determinación simultánea de CEF y TAZ en muestras de plasma de pacientes críticos es conforme a los criterios de aceptación de la EMA; por tanto, es adecuado para su implementación en el laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de CEF y TAZ en pacientes críticos.
- La aplicación del método desarrollado a la monitorización de CEF y TAZ en plasma de un paciente crítico ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia bajo tratamiento con una dosis doble a la convencional de Zerbaxa[®] se empleó para investigar la influencia de la RRT sobre sus parámetros farmacocinéticos (estimados mediante análisis farmacocinético no compartimental). Este estudio ha evidenciado una notable pérdida de fármaco (49.3 ± 1.8 % para CEF y 41 ± 5 % para TAZ) durante la RRT. A pesar de que estas pérdidas no se consideran clínicamente relevantes con la dosis empleada en este estudio, la dosis convencional de Zerbaxa[®] (CEF/TAZ) establecida en la ficha técnica podría llegar a ser insuficiente para TAZ, por lo que la dosificación propuesta en esta Tesis se presentaría como pauta de dosificación alternativa a valorar en estas situaciones.

CAPÍTULO VI

ANTIBACTERIANOS III: AMIKACINA

VI.1.- Introducción

VI.1.1.- Interés clínico de los antibióticos aminoglucósidos

Los antibióticos aminoglucósidos (AGs) se emplean para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias aerobias gramnegativas y algunas grampositivas [344].

El primer antibiótico AG identificado fue la estreptomina en 1944, obtenida a partir de *Streptomyces griseus* durante la búsqueda de compuestos, estables y solubles en agua, que presentaran actividad antimicrobiana frente a las bacterias gramnegativas. En 1957, se aisló la kanamicina, obtenida a partir de *Streptomyces kanamyceticus*; antibiótico activo frente a bacterias que habían generado resistencias frente a la estreptomina. Posteriormente, las bacterias resistentes a la acción antibiótica de la kanamicina fueron aisladas y el mecanismo de resistencia resuelto.

La comprensión de dicho mecanismo permitió el desarrollo de más de 150 antibióticos AGs semisintéticos [345], con el objetivo de mejorar la actividad antimicrobiana y reducir los efectos tóxicos, muy presentes en sus precursores [346]. Entre los AGs semisintéticos se encuentra la AMK, que presenta menos puntos susceptibles de ser atacados por las enzimas bacterianas y, por tanto, menor resistencia y mayor acción bactericida. En la actualidad, la AMK es el AG de primera elección para el tratamiento de infecciones graves [344].

El mecanismo de acción de la AMK se relaciona con su capacidad de penetrar en la bacteria y unirse a las subunidades 30S y 50S de los ribosomas lo que inhibe la síntesis proteica. También induce falsas lecturas del código genético con la producción de proteínas no funcionales, que provoca la incorporación de aminoácidos en una secuencia equivocada de la cadena polipeptídica [345]. La AMK ha demostrado ser activa frente a muchas cepas de microorganismos (ver Tabla VI.1).

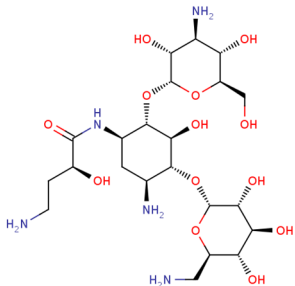
Tabla VI.1.- Espectro de actividad antibacteriano de AMK [344].

Bacterias gramnegativas	Bacterias grampositivas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Escherichia coli</i> y <i>Citrobacter freundii</i>. Diferentes especies de los géneros <i>Pseudomonas spp.</i>, <i>Proteus spp.</i> (Indol positivo e indol negativo), <i>Providencia spp.</i>, <i>Klebsiella spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>Serratia spp.</i> y <i>Acinetobacter spp</i> (<i>Mima-Herellea</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferentes especies del género <i>Staphylococcus spp.</i> productores y no productores de penicilinasa (incluyendo a aquellas cepas resistentes a meticilina).

Los antibióticos AGs presentan una estructura química compuesta por un anillo aminociclitol al cual se unen dos o más aminoazúcares mediante enlaces glucosídicos. Los diferentes aminoazúcares presentes en la estructura proporcionan las diferencias en su actividad, farmacocinética y toxicidad.

En la Tabla VI.2 se muestra la estructura y algunas propiedades fisicoquímicas de la AMK. Como se puede observar, de modo análogo a otros AGs, es un compuesto muy hidrófilo ($\log P = -8.7$) debido a la cantidad de grupos funcionales amino e hidroxilo que presenta su estructura química. Los valores de pK_a de los ácidos conjugados de los cuatro grupos amino primarios están comprendidos entre 8.3 y 9.8.

Tabla VI.2.- Número registrado en el CAS, estructura química, $\log P$, pK_a y M_r de AMK.

Compuesto (N° CAS)	Estructura	$\log P^a$	$pK_a^{a,b}$	M_r
AMK (37517-28-5)		-8.6	8.3 8.8 9.2 9.8	585.6

^a Valores estimados con el programa ChemAxon disponible *on-line* en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). ^b Valores correspondientes al ácido conjugado de los grupos amino.

La eficacia de los antibióticos AGs, y en concreto de la AMK, depende fundamentalmente de dos factores: la actividad bactericida concentración dependiente y el efecto postantibiótico [347]. El efecto postantibiótico se define como la inhibición que se produce del crecimiento bacteriano un tiempo después de que la concentración del fármaco se encuentre por debajo de la CMI.

En cuanto a la farmacocinética de la AMK, este AG se distribuye principalmente en fluidos extracelulares como plasma, líquido sinovial, peritoneal, pleural, ascítico, pericárdico, y más lentamente en bilis, heces, próstata y líquido amniótico, así como a tejidos altamente perfundidos como riñón, hígado y pulmones [347]. Por otro lado, el fármaco no se une de manera significativa a las proteínas plasmáticas (< 11 %). Su V_d en el organismo depende del grupo poblacional, pudiendo oscilar entre valores de $0.30 \pm 0.13 \text{ L kg}^{-1}$, en pacientes adultos y geriátricos, y $0.45 \pm 0.10 \text{ L kg}^{-1}$ en pacientes neonatos [348]. Estos valores pueden aumentar en casos de insuficiencia cardíaca congestiva, peritonitis, ascitis, fibrosis quística, o pacientes quemados (fase inicial).

La AMK se elimina por filtración glomerular, y al igual que el V_d , el CI renal del compuesto en el organismo depende del grupo poblacional, pudiendo oscilar entre valores de $0.08 \pm 0.03 \text{ L h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, en pacientes adultos, y $0.05 \pm 0.01 \text{ L h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ en pacientes neonatos [348].

La dosificación de AMK, en adultos, es $15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, pudiéndose aumentar a $22.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, en infecciones graves. La administración puede realizarse en perfusión intravenosa intermitente cada 8-12 h (dosis múltiples diarias - DMD) o como dosis única diaria cada 24 h (dosis única diaria o dosificación con ampliación del intervalo de administración - DAI) [347]. La DAI se fundamenta en la proporcionalidad existente entre la concentración sérica máxima de AMK y su capacidad bactericida y efecto postantibiótico. La dosificación se puede realizar a partir de nomogramas (Sarubbi-Hull, Sanford o Hartford) o de forma individualizada mediante la monitorización de las concentraciones séricas del fármaco y el cálculo de sus parámetros farmacocinéticos (constante de eliminación, CI renal, V_d , ...).

La AMK, como los antibióticos AGs en general, presenta un intervalo terapéutico estrecho debido a su toxicidad. Un nivel elevado del compuesto en plasma o un tratamiento prolongado puede generar problemas importantes de nefrotoxicidad y ototoxicidad [346, 349-351].

La nefrotoxicidad de los antibióticos AGs se debe a su acumulación en los complejos lisosomales de las células epiteliales del túbulo proximal renal dando lugar a la ruptura y la consecuente muerte celular [351]. Como consecuencia, el sistema renina-angiotensina local se activa dando lugar a una vasoconstricción y a un decrecimiento en la tasa de filtrado glomerular, también llamado "feed-back tubuloglomerular" [351]. La reducción en la tasa de filtración glomerular junto con el aumento de los niveles de creatinina en plasma son indicadores inequívocos de tal nefrotoxicidad. Niveles altos de creatinina en sangre pueden servir para realizar una

detección precoz del efecto tóxico que está generando el fármaco sobre el riñón antes de que los primeros síntomas sean evidentes.

La ototoxicidad se manifiesta como toxicidad auditiva coclear y vestibular, aunque no necesariamente se presentan simultáneamente. El mecanismo es similar al de nefrotoxicidad, pero en este caso el daño se produce en las células sensoriales de la cóclea y del laberinto del oído interno [352]. La frecuencia en la aparición de síntomas clínicos de ototoxicidad es mucho menor que en la de nefrotoxicidad. Sin embargo, no existe un indicador precoz de ototoxicidad relacionado con la administración de AGs. Por ello, la determinación de las concentraciones séricas de AMK se puede utilizar como un indicador subrogado de potencial ototoxicidad. La ototoxicidad de los diferentes antibióticos AGs ha sido estudiada y demostrada en un trabajo sobre el tratamiento de la enfermedad de Meniere en donde estos fármacos eran administrados intratimpánicamente [353].

Otra diferencia importante entre la nefrotoxicidad y ototoxicidad causada por los antibióticos AGs, y en concreto de la AMK, es que la primera genera daños que, tras un periodo de descanso de 3 a 6 semanas, pueden ser reversibles mediante la regeneración del tejido dañado, volviéndose a una función renal normal. Por el contrario, la ototoxicidad provoca daños irreversibles en los tejidos del paciente tratado [354].

Así pues, debido al estrecho margen terapéutico de los antibióticos AGs, es necesaria la monitorización de las concentraciones plasmáticas en aquellos pacientes que se encuentran bajo tratamiento farmacológico con este tipo de fármacos. Así, se realizan controles periódicos para determinar las concentraciones de fármaco en plasma para realizar el consiguiente estudio farmacocinético y valorar el reajuste posológico en caso de que sea necesario.

Los valores de las concentraciones plasmáticas para un tratamiento con AGs efectivo (concentraciones objetivo) dependen del tipo de infección y de la forma de dosificación. De esta manera se pueden encontrar diversas situaciones como las descritas en la Tabla VI.3, para el caso concreto de la AMK.

Tabla VI.3.- Concentraciones plasmáticas objetivo según tipo de infección y forma de dosificación de la AMK [348].

Gravedad de la infección	Tipo de infección	C _{máx} (mg L ⁻¹) ^a		C _{mín} (mg L ⁻¹) ^b	
		DMD	DAI	DMD	DAI
Graves	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neumonía por gramnegativos ▪ Choque séptico 	25-30	50-60	4-8	<1
Moderadas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Intraabdominal ▪ Pélvica ▪ Osteomielitis ▪ Pielonefritis ▪ Heridas 	20-25	40-50	1-4	-

^a C_{máx}: concentración de fármaco obtenida 30 min después de acabada la perfusión (1 h desde el inicio de la perfusión). ^b C_{mín}: concentración obtenida en los 15 min previos a la administración de la siguiente dosis.

En el caso concreto de pacientes bajo tratamiento con AMK, es de suma importancia la monitorización de aquellos que sufran alteraciones en el V_d (por ejemplo, quemados, patologías de fibrosis quística y ascitis, con sobrecarga de fluidos, pacientes bajo diálisis, etc.) o alteraciones en la eliminación (con CI renal reducido, ancianos, neonatos prematuros, tratados simultáneamente con otros fármacos nefrotóxicos o cuyo tratamiento excede los 10 días) [347].

VI.1.2.- Determinación de amikacina en muestras de plasma

Se han desarrollado metodologías analíticas para la determinación de diferentes AGs en diversas matrices, principalmente en muestras de plasma humano, por su mayor interés clínico, pero también en muestras de suero, orina, tejidos y preparados farmacéuticos [130, 355-357]. Puesto que estos compuestos también tienen uso veterinario, existen publicaciones referentes a su determinación en plasma y tejidos (hígado y riñones) animales [358], en piensos y alimentos de origen animal [359-362]. Adicionalmente, en la actualidad suscitan interés como contaminantes emergentes, así se han determinado en muestras de aguas residuales y de ríos, lodos y suelos [359, 363-365].

En lo que respecta a los métodos analíticos desarrollados para la determinación de AGs, en la bibliografía se han descrito metodologías basadas en ensayos inmunológicos (ver apartado I.8.1) [124, 366-370]. Entre éstas, las metodologías más utilizadas son las que emplean FPIA. Existen analizadores automáticos disponibles comercialmente basados en FPIA que permiten la realización de un análisis en un tiempo relativamente corto (15-20 min). Tal y como se ha comentado en el apartado I.8.1, su mayor inconveniente, desde un punto de vista

práctico en el ámbito asistencial, es el elevado coste económico de los reactivos patentados que suministra el fabricante del equipo. FPIA ha sido posiblemente la técnica más utilizada en los laboratorios clínicos para la determinación de determinados AGs, entre ellos de la AMK. Sin embargo, el coste global de cada análisis de muestra, fundamentalmente debido a los patrones de calibración y control, se puede estimar en torno a 20 €, lo que motiva a su sustitución por técnicas más económicas o menos fabricante-dependientes.

La mayoría de métodos analíticos desarrollados para la determinación de AGs se basan en el empleo de técnicas de separación [130], principalmente HPLC, pero también se han descrito metodologías que emplean GC y CE. Además de un artículo de revisión general sobre la determinación de AGs [124], existen en la bibliografía otros artículos de revisión más específicos dedicados a la determinación de AGs en fluidos biológicos y/o preparados farmacéuticos mediante HPLC y GC [130, 355, 371], en diferentes tipos de muestras mediante CE [372] y en alimentos con diferentes técnicas [359].

Tal y como se ha comentado en el apartado I.8.2, HPLC (debido a su alta selectividad y sensibilidad; así como a su amplio campo de aplicación) es la técnica más empleada en el ámbito de la farmacocinética [131], así como en estudios de estabilidad de fármacos. Los artículos de revisión comentados anteriormente [124, 130, 355, 371], recogen las metodologías desarrolladas para la determinación de AGs mediante HPLC. En la Tabla I.4 se muestra una actualización de estos artículos en la que se resumen las características más significativas de algunos de los métodos desarrollados para determinar AMK en plasma.

Como se ha comentado anteriormente, los AGs son compuestos muy hidrófilos, en disoluciones acuosas los grupos amino presentes en su estructura están usualmente protonados y, además, no poseen grupos cromóforos. Por ello, para mejorar tanto la separación como la detección, los antibióticos AGs suelen someterse a un proceso de derivatización previo o posterior a la separación cromatográfica.

La mayoría de metodologías cromatográficas descritas en la bibliografía para la determinación de AGs emplean RPLC, usualmente con fases estacionarias C18 y fases móviles hidroorgánicas con MeOH o ACN como modificador orgánico, o alternativamente fases móviles hidroorgánicas que contienen agentes para la formación de pares iónicos, tales como alquilsulfonatos o ácidos carboxílicos (p.ej., ácido heptafluorobutírico (HFBA) y ácido heptafluoropentanóico (HFPA)), [124, 130, 183, 187-189, 355].

En lo que respecta a la detección, como se observa en la Tabla I.4, uno de los detectores más utilizados en HPLC para la determinación de la AMK, y de los AGs en

general, es el de FLD, por su elevada selectividad y sensibilidad [181-182, 189]. Este tipo de detección, así como la detección espectrofotométrica UV-Vis [186, 190], requiere de una etapa de derivatización pre- o post-columna de los AGs. La detección MS es una alternativa que evita la necesidad de derivatización [180, 183-184, 187-188]. Además, tal y como se ha comentado en el apartado I.8.2, las principales ventajas de la MS son los bajos LLOQs que permite alcanzar y la elevada selectividad/especificidad. Sin embargo, debido su elevado coste no siempre están al alcance de un laboratorio de rutina o de control de un centro hospitalario.

En relación al proceso de derivatización para la detección FLD y UV-Vis, los AGs presentan múltiples grupos amino primarios fácilmente derivatizables. Además, pueden emplearse otros grupos funcionales como los grupos hidroxilo o los grupos amino secundarios. El reactivo derivatizante más empleado para la detección de AGs es el OPA que, en medio básico y en presencia de un agente reductor fuerte, históricamente 2-mercaptoetanol, reacciona con los grupos amino primarios para dar lugar a derivados fluorescentes, si bien muy inestables [356, 358, 362, 373-374]. Otros agentes derivatizantes que se han empleado son el 1-fluoro-2,4-dinitrobenzato que presenta serias limitaciones por las diferencias de solubilidades entre el reactivo (soluble en disolventes apolares) y los AGs (solubles en disolventes polares) [375-376]. También se ha empleado el cloruro de 9-fluorenilmetil cloroformato (FMC) pero presenta la limitación de la formación de otros productos de reacción que pueden interferir en el análisis cromatográfico posterior [130, 181, 189]. En la bibliografía también se han utilizado ocasionalmente otros agentes derivatizantes, como, por ejemplo, el 7-fluoro-4-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol (FNBD) [182], el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico [377-378], el cloruro de naftilo [379], el naftil isotiocianato (NITC) [186] y el reactivo de Hantzsch (mezcla acetilacetona, formaldehído y tampón acético/acetato de pH = 5) [190, 380], entre otros [364, 381].

Finalmente, como se puede observar en la Tabla I.4, la precipitación de las proteínas plasmáticas es el tratamiento de la muestra previo al análisis cromatográfico más utilizado en la mayoría de métodos para la determinación de AMK, así como de otros AGs, en plasma. El reactivo precipitante más utilizado es ACN [180-182, 186, 189], aunque también mezclas de EtOH y Na₂CO₃ [185] y ácidos, como por ejemplo, HFBA [183] y tricloroacético (TCA) [187-188]. También se han desarrollado procedimientos que emplean SPE. Así, se han utilizado cartuchos con rellenos de sílice, C18, resinas de intercambio catiónico y mezclas de fases C18 y de intercambio catiónico [130, 184, 361, 364]. La LLE de AGs se ha utilizado muy poco debido a la insolubilidad de estos compuestos en disolventes orgánicos apolares (la extracción suele realizarse tras la derivatización de los AGs) y la incompatibilidad de estos disolventes con las fases móviles cromatográficas empleadas [355].

VI.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral, se pretende desarrollar un método HPLC ajustado a propósito para la determinación de AMK en plasma y el control posológico de pacientes, que pueda sustituir ventajosamente al FPIA, utilizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Este objetivo general puede desglosarse en los siguientes objetivos concretos:

- Mejora de las prestaciones de los métodos cromatográficos tradicionalmente empleados para la derivatización pre-columna del analito, que permita la posterior determinación del derivado mediante un detector FLD (necesario para alcanzar los niveles de concentración requeridos y mejorar la selectividad debido a la complejidad de las muestras de plasma). Para la consecución de este objetivo, el agente elegido es el OPA, y como agente reductor, se propone N-acetil-L-cisteína (NAC), no empleada hasta nuestro conocimiento para esta determinación. Las variables a optimizar en la reacción de derivatización son el pH, la temperatura, la concentración de los reactivos derivatizantes, OPA y NAC y el tiempo de reacción.
- Selección de las condiciones cromatográficas adecuadas para llevar a cabo la determinación. Para la consecución de este objetivo la modalidad cromatográfica seleccionada es RPLC, con columnas convencionales C18 y ACN como modificador orgánico (condiciones más utilizadas en la bibliografía, aunque para otros derivados de AMK). La fase móvil seleccionada debe proporcionar tiempos de análisis cortos para la implementación del método en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Validación preliminar ajustada a propósito de las características analíticas más relevantes (linealidad de los calibrados, exactitud y precisión) y estimación de otros estadísticos de calidad necesarios para evaluar las prestaciones del método y para anticipar una eventual acreditación del mismo.
- Comparación del método candidato propuesto frente al FPIA, mediante el análisis, durante varias sesiones, de muestras de pacientes conservadas, previamente analizadas por FPIA.

VI.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles y de las disoluciones del reactivo derivatizante los procedimientos seguidos para el acondicionamiento del sistema cromatográfico, así como, los programas informáticos empleados en este capítulo se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

Las experiencias del presente capítulo se llevaron a cabo en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València.

VI.3.1.- Disoluciones

Para la preparación de las disoluciones de AMK se empleó como disolución madre de AMK la especialidad farmacéutica que se muestra en la Tabla IV.4. La disolución de trabajo de AMK de 1000 mg L⁻¹ se preparó diariamente por dilución de la disolución madre de AMK con agua ultrapura. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C.

Tabla VI.4.- Especialidad farmacéutica, distribuidor comercial, concentración de las disoluciones de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior.

Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
Amikacina Braun 10 mg/mL Observaciones: disolución (salina de cloruro sódico al 0.9 %) para perfusión Distribuidor: B. Braun Medical S.A. (Barcelona, España)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 1000 ^a ▪ Patrones de calibración: 1 (LLOQ), 5, 10, 20, 40 y 60 (ULOQ) ▪ Controles para la validación de la exactitud (veracidad) y precisión: 1.2 y 45

^a Preparación diaria

Las disoluciones de los patrones de calibración en concentraciones iniciales de AMK 1, 5, 10, 20, 40 y 60 mg L⁻¹ se prepararon por dilución de la disolución de trabajo de 1000 mg L⁻¹ en plasma de sujetos sanos. De manera similar, se prepararon las disoluciones de los controles en concentraciones iniciales de AMK de 1.2 y 45 mg L⁻¹.

VI.3.2.- Procedimientos

VI.3.2.1.- Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de AMK

El equipo cromatográfico empleado fue el sistema de módulos integrados de Jasco. Se utilizó una columna Kromasil C18 (5 μm , 150 \times 4.6 id mm) y una disolución tampón fosfato 0.05 M (pH 7.5)/ACN, (80:20, v/v) como fase móvil. La velocidad de flujo fue de 1 mL min^{-1} y el volumen de inyección de 20 μL . La detección fluorimétrica se efectuó a una longitud de onda de excitación de 337 nm y una longitud de onda de emisión de 439 nm.

VI.3.2.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (patrones de calibración, controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomó 1 mL de disolución de plasma (1 mL plasma de sujetos sanos sin aditivar con AMK en el caso de las disoluciones blanco) y se precipitaron las proteínas plasmáticas por adición de 1 mL de ACN frío. La mezcla resultante se agitó con un agitador vorticial durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. Tras ello, se tomó 1 mL del sobrenadante y se le adicionaron 2 mL de la disolución de reactivo derivatizante (ver preparación en el apartado III.2). La mezcla resultante se incubó en un baño de agua durante 5 min a 80 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se enfrió en un baño de agua durante 1 min a temperatura ambiente.

VI.3.3.- Tratamiento de datos. Cálculo de los estadísticos de calidad

Los estadísticos de calidad se estimaron con un enfoque armonizado [40] a partir de los resultados obtenidos para los controles correspondientes a $Nr = 2$ réplicas realizadas durante $Ns = 5$ días. El análisis de la varianza (ANOVA) de estos datos, organizados en forma de matriz $\mathbf{X}_{Nr \times Ns}$, permite la estimación de la desviación estándar de repetibilidad (s_r), entre días (s_{run}), de precisión intermedia (s_i) y de la media (s_{mean}^2) mediante las ecuaciones siguientes:

$$s_r^2 = MS_r \quad (\text{Ec. VI.1})$$

$$s_{run}^2 = (MS_{run} - MS_r) / Nr \quad (\text{Ec. VI.2})$$

$$s_i^2 = s_{run}^2 + s_r^2 \quad (\text{Ec. VI.3})$$

$$s_{mean}^2 = MS_{run} / Nr \quad (\text{Ec. VI.4})$$

donde MS_r y MS_{run} son los valores del cuadrado medio residual y del cuadrado medio entre días, respectivamente, obtenidos a partir del ANOVA.

La desviación estándar del proceso (S), para un eventual control de calidad (gráfico de control de Shewart), y la incertidumbre estándar (u), pueden estimarse como:

$$S = u = \sqrt{\left(s_{run}^2 + \frac{s_r^2}{Nrs}\right) + \left(\frac{s_{mean}^2}{Ns} + u_{ref}^2\right)} \quad (\text{Ec. VI.5})$$

donde Nrs es el número de réplicas realizadas para la muestra en análisis de rutina y u_{ref} es la incertidumbre asociada al valor aceptado como verdadero.

Para obtener la incertidumbre expandida, U , basta aplicar el factor de cobertura, k , por defecto igual a 2:

$$U = k u = 2 u \quad (\text{Ec. VI.6})$$

Para el empleo en rutina de este método se fijó un valor de $Nrs = 1$ réplica, de acuerdo con los protocolos empleados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (usando la metodología FPIA). El término u_{ref}^2 se omitió de la Ec. VI.5 ya que suele ser despreciable frente a las componentes de precisión (en este caso correspondería a la incertidumbre del control, preparado por aditivación de blanco de muestra, implicando sólo incertidumbres de pesada y medida de volúmenes, generalmente despreciables).

VI.4.- Resultados y discusión

VI.4.1.- Estudios preliminares

VI.4.1.1.- Estudio espectrofotométrico del derivado OPA-NAC-AMK. Influencia del pH sobre la estabilidad del derivado

Tal y como se ha comentado previamente en el apartado VI.1.2.2, la derivatización de los AGs es necesaria para su detección UV-vis y es una etapa crítica en su determinación. Se han utilizado diferentes reactivos derivatizantes y ninguno de ellos está exento de problemas. Así, por ejemplo, el reactivo más utilizado es OPA en combinación con 2-mercaptoetanol, si bien los derivados formados son muy inestables. Como es bien conocido, la NAC se ha empleado en la derivatización pre- y postcolumna de aminas primarias y aminoácidos [382]. Este tiol es un reactivo sólido, económico, prácticamente inodoro, que origina en menos de dos minutos derivados estables y altamente fluorescentes. Por todo lo expuesto, en esta Tesis Doctoral se evaluó la posibilidad de utilizar NAC para la derivatización de AMK.

Se ha descrito que las condiciones óptimas de derivatización de aminoácidos con OPA-NAC son valores de pH comprendidos entre 7.5 y 11 (generalmente se trabaja a pH 9.5) y relaciones molares de OPA/aminoácido y NAC/aminoácido mayores de 5 y 3, respectivamente [382]. Puesto que la AMK tiene cuatro grupos amino primarios susceptibles de reaccionar con OPA-NAC, se ensayaron relaciones molares OPA/NAC/AMK superiores a las empleadas para aminoácidos. Así, en primer lugar se prepararon seis disoluciones que contenían OPA, NAC y AMK en concentraciones 1.2×10^{-3} , 1.2×10^{-3} y 3.4×10^{-5} M, respectivamente (relaciones molares OPA/NAC/AMK de 35/35/1) en ácido bórico 0.1 M. Cada una de las disoluciones se ajustó a los siguientes valores de pH: 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 y 11.0.

A continuación, se registraron los valores de absorbancia a 337 nm (máximo de absorción) frente a un blanco de reactivos exento de AMK con una frecuencia de 10 min durante 2.5 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VI.1. Como puede observarse, a todos los valores de pH se obtuvieron valores de absorbancia bastante estables durante el periodo de tiempo estudiado, si bien los valores de absorbancia fueron mayores para los valores de pH más altos. Este hecho se observa claramente en la Figura VI.2 en la que se muestra la representación gráfica de los valores de absorbancia a 337 nm frente al pH de la disolución a los 40 min tras su preparación. Como se puede observar, los valores de pH óptimos que favorecen la formación del derivado OPA-NAC-AMK están comprendidos en torno a 9.5, valor de pH habitual para la derivatización con OPA. Por tanto, se seleccionó un tampón bórico-borato de pH 9.5 para posteriores estudios.

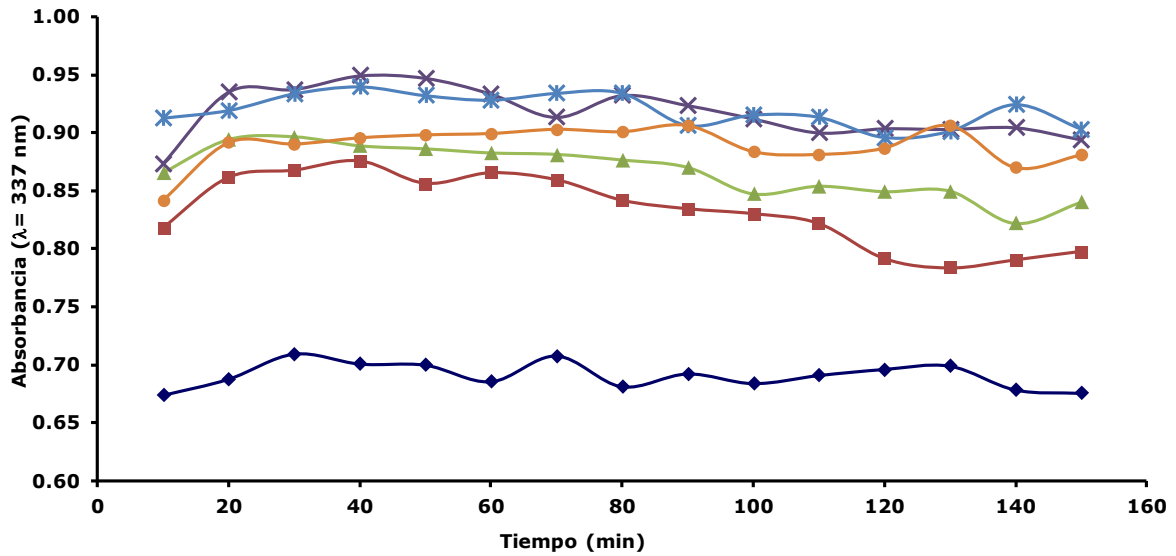


Figura VI.1.- Valores de absorbancia a $\lambda=337$ nm del derivado OPA-NAC-AMK en función del tiempo a diferentes valores de pH del reactivo derivatizante: (◆) 6.5, (■) 7.5, (▲) 8.5, (×) 9.5, (*) 10.5 y (●) 11.0. OPA 1.2×10^{-3} M, NAC 1.2×10^{-3} M y AMK 3.4×10^{-5} M (relaciones molares OPA/NAC/AMK de 35/35/1).

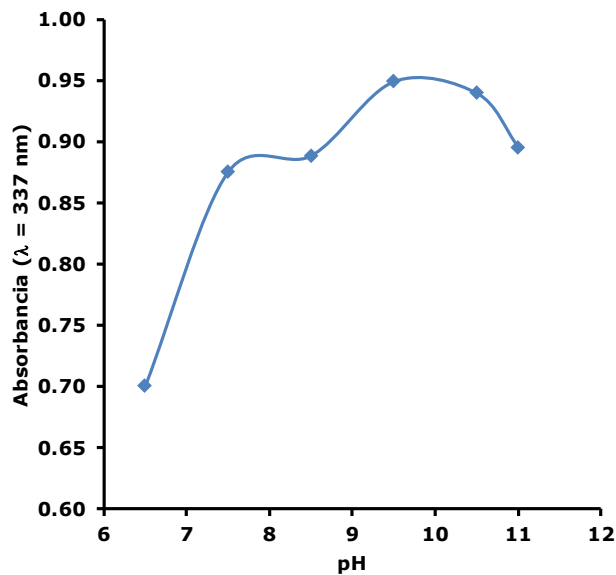


Figura VI.2.- Influencia del pH del reactivo derivatizante sobre la formación del derivado. Valores de absorbancia medidos a los 40 min tras preparar la mezcla de reacción. OPA 1.2×10^{-3} M, NAC 1.2×10^{-3} M y AMK 3.4×10^{-5} M (relaciones molares OPA/NAC/AMK de 35/35/1).

VI.4.1.2.- Influencia del cambio de pH *a posteriori* sobre la estabilidad del derivado

Como se ha comentado previamente (apartado VI.1.2.2), en la mayoría de publicaciones se ha empleado una columna C₁₈ convencional para la determinación de AMK mediante HPLC, por lo que en el estudio cromatográfico se utilizó este tipo de fase estacionaria. Como es bien conocido, el intervalo de pH de trabajo de las fases estacionarias de sílice está comprendido aproximadamente entre 3 y 9. Una fase móvil de pH 7.5 ofrece un margen de seguridad suficiente para garantizar la integridad con el tiempo de este tipo de columnas.

Por otro lado, *a priori* es de esperar que si reaccionan los cuatro grupos amino primarios de la AMK con OPA-NAC, el derivado formado se encuentre en su forma neutra en todo el intervalo de pH de trabajo de la fase estacionaria C₁₈. En tal caso, el pH de la fase móvil no debe afectar a su retención. No obstante, hay que tener en cuenta que el objetivo de este capítulo es la determinación de AMK en muestras de plasma, matriz compleja que contiene aminoácidos endógenos que pueden reaccionar con OPA-NAC. El grupo carboxilo de los aminoácidos queda intacto en la derivatización con OPA-NAC, por tanto, es de esperar que éstos sean muy poco retenidos con una fase móvil hidroorgánica de pH 7.5, con lo cual eluirán al principio del cromatograma y la posibilidad de que interfieran con el pico del derivado OPA-NAC-AMK es menor.

Por todo lo expuesto, para la determinación de AMK en muestras de plasma se seleccionó tampón fosfato a pH 7.5 para la preparación de la fase móvil. Este pH difiere significativamente del pH seleccionado para el reactivo derivatizante; además, el derivado formado en la muestra tratada con OPA-NAC se diluirá localmente en la fase móvil tras la inyección. A fin de simular de manera aproximada el efecto que se producirá en el interior de la columna, se estudió la estabilidad del derivado OPA-NAC-AMK tras un cambio de pH de 9.5 a 7.5 una vez formado el derivado.

Para ello, se prepararon dos disoluciones, con concentraciones de OPA, NAC y AMK de 6.0×10^{-4} , 6.0×10^{-4} y 1.7×10^{-5} M, respectivamente, (relaciones molares OPA/NAC/AMK de 35/35/1) ambas en tampón bórico-borato 0.05 M a pH 9.5. Tras la formación del derivado, una de ellas se llevó a pH 7.5 con HCl 0.5 M. A continuación, se midió la absorbancia a 337 nm de las dos disoluciones, obteniéndose valores de 0.429 para la disolución a pH 9.5 y 0.431 para la disolución a pH 7.5. Puede pues afirmarse que tras la formación del derivado OPA-NAC-AMK, una modificación del pH a 7.5 no afecta a la estabilidad del derivado y, por tanto, es factible utilizar una fase móvil preparada a dicho pH.

VI.4.1.3.- Estudio cromatográfico. Composición de la fase móvil

Para alcanzar el LLOQ exigido al método ($\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$) y mejorar la selectividad, se empleó un detector FLD en la etapa cromatográfica. Por ello, en primer lugar, se registraron con un fluorímetro, los espectros de excitación y emisión de una disolución que contenía OPA y NAC, ambos en concentración $3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, y AMK en concentración $8.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (relaciones molares OPA/NAC/AMK de 35/35/1) preparada en tampón bórico-borato 0.1 M a pH 9.5. Los espectros se obtuvieron frente a un blanco de reactivos preparado en ausencia de AMK. Las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión fueron de 337 y 439 nm, respectivamente. Estos valores son concordantes con los encontrados en la bibliografía para derivados de AMK formados con OPA y otros agentes reductores, como, por ejemplo, 2-mercaptoetanol [130].

A continuación, se estudió el efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención del derivado OPA-NAC-AMK. Se prepararon diferentes fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M a pH 7.5 y ACN en proporciones variables (del 5 al 30 % en volumen). En todos los casos se inyectaron disoluciones que contenían OPA y NAC, ambos en concentración $3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ y AMK en concentración $8.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, preparadas en tampón bórico-borato 0.1 M (pH 9.5).

Se observó que pequeños cambios en la composición de la fase móvil afectaban de manera muy significativa a la retención del derivado OPA-NAC-AMK. Así, con fases móviles ricas en ACN (25 y 30 %), el derivado de OPA-NAC-AMK eluyó en el frente del cromatograma. Por el contrario, con concentraciones de ACN del 5 y 15 %, no se observó ningún pico tras 90 min de cromatograma. Con concentraciones de ACN intermedias (18 y 20 %) a las anteriores, se observaron 2 picos cromatográficos. Los t_R fueron 9.0 y 24.0 min para la fase móvil que contenía un 18 % de ACN y 4.6 y 9.2 min para la fase móvil con un 20 % de ACN (Figura VI.3).

La aparición de dos picos en el cromatograma sugiere la formación de derivados OPA-NAC-AMK de diferente estequiometría, y, por tanto, con diferentes t_R . Esta teoría fue sugerida anteriormente por Maitra y col. quienes observaron varios picos en el cromatograma de AMK derivatizada con OPA y 2-mercaptoetanol como agente reductor [366]. Por tanto, es necesario realizar una optimización de la reacción de derivatización (p.ej., composición del reactivo derivatizante y condiciones de incubación) para formar un único derivado.

A fin de reducir el tiempo de análisis, *a priori* se seleccionó para futuros estudios la fase móvil que contiene tampón fosfato 0.05 M (pH 7.5)/ACN (80:20, v/v), sin descartar la necesidad de realizar reajustes de la composición de la fase móvil debido a la complejidad de la matriz de muestras de plasma.

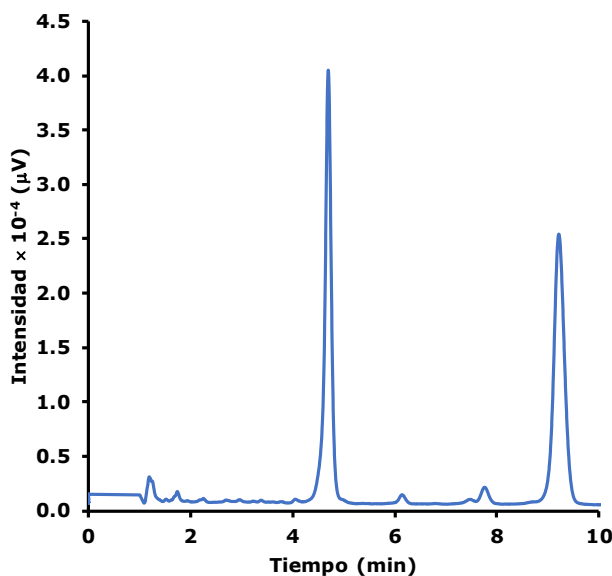


Figura VI.3.- Cromatograma obtenido para el derivado OPA-NAC-AMK. Condiciones cromatográficas: tampón fosfato 0.05 M (pH 7.5)/ACN, (80:20, v/v), el resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado VI.3.2.1. Disolución inyectada: OPA 3.0×10^{-4} M, NAC 3.0×10^{-4} M, AMK 8.5×10^{-5} M preparada en tampón bórico-borato 0.1 M (pH 9.5).

Por otro lado, al igual que en el Capítulo IV (apartado IV.1.2) se evaluó la influencia de la naturaleza de los filtros de jeringa sobre la recuperación del derivado OPA-NAC-AMK, empleando para ello disoluciones acuosas. En todos los casos se obtuvieron valores de recuperación próximos al 100 %, por lo que se utilizaron indistintamente filtros de Nylon® (0.45 μm), PTFE y PVDF (ambos de 0.22 μm).

VI.4.2.- Estudio cromatográfico. Optimización de la reacción de derivatización

En la matriz plasma existen compuestos endógenos con grupos amino primarios (ej. aminoácidos) capaces de consumir parte del reactivo OPA-NAC, por ello, se probaron relaciones molares OPA-NAC/AMK superiores a las empleadas en los estudios preliminares. Se prepararon diferentes disoluciones de AMK en matriz plasma, de manera análoga a como se describe en la preparación de las disoluciones patrón de AMK (apartado VI.3.1), se sometieron al procedimiento secuencial descrito en el apartado VI.3.2.2 y se inyectaron en el equipo de HPLC. Paralelamente, se emplearon blancos de plasma para facilitar la identificación de los picos de interés. Cada una de las disoluciones de AMK en matriz plasma se inyectó repetidamente a diferentes tiempos tras su preparación.

VI.4.2.1.- Relaciones molares OPA-NAC/AMK

En primer lugar, se emplearon concentraciones de OPA y NAC 50 veces superiores a la de AMK. Se localizaron dos picos correspondientes al derivado de AMK (con los mismos t_R , ~ 5 y 9 min, que los observados en el apartado VI.4.1.4 para las disoluciones en medio acuoso). Como ya se ha comentado anteriormente, esta observación sugiere la formación de derivados OPA-NAC-AMK con diferente estequiometría.

En los cromatogramas correspondientes a las disoluciones del blanco de plasma se observaron diferentes picos con áreas considerables, lo que confirma la presencia de compuestos endógenos con grupos amino primarios que reaccionan con OPA-NAC. No parece que exista problema de solapamiento con los picos correspondientes al derivado OPA-NAC/AMK.

Para aumentar la disponibilidad de reactivo derivatizante, forzando así la reacción completa de AMK, se repitió la experiencia anterior aumentando las relaciones molares OPA-NAC/AMK a valores de 100 y 1000. En los cromatogramas obtenidos para ambas disoluciones se observó un único pico para el derivado de AMK (el de mayor t_R , ~ 9 min), de área significativamente mayor a la del experimento anterior. Este hecho apoya la hipótesis de la formación de un único derivado OPA-NAC/AMK al aumentar la concentración de reactivo derivatizante. Sin embargo, para las dos relaciones molares OPA-NAC/AMK ensayadas se observó una notable disminución del área de pico a medida que se procesaban las muestras llegando incluso a desaparecer a las 2 h tras su preparación, lo que indica que el derivado formado es inestable.

En la bibliografía se ha descrito que el empleo de concentraciones elevadas de OPA en la reacción para la derivatización de aminoácidos podría causar una rápida descomposición del derivado formado [383]. Esto podría ser la causa de la disminución de las áreas de pico con el tiempo, sólo observada para las relaciones molares OPA-NAC/AMK más elevadas de las estudiadas.

Por otro lado, también se ha descrito que altas concentraciones de tiol producen una disminución de las cinéticas tanto de formación como de degradación del derivado de aminoácido formado [382-383]. Por tanto, se investigó la posibilidad de trabajar con relaciones molares NAC/AMK superiores a 100.

VI.4.2.2.- Relaciones molares NAC/AMK

Para estudiar el efecto de la concentración de NAC sobre la estabilidad del derivado de AMK formado, se utilizaron dos disoluciones de plasma aditivadas con AMK con relaciones molares NAC/AMK de 500 y 1000. La relación OPA/AMK se mantuvo en 100. Cada una de las disoluciones preparadas se inyectó a diferentes tiempos después de su preparación. En los cromatogramas obtenidos sólo se observó un pico para el derivado OPA-NAC/AMK. En la Figura VI.4 se muestran los resultados obtenidos.

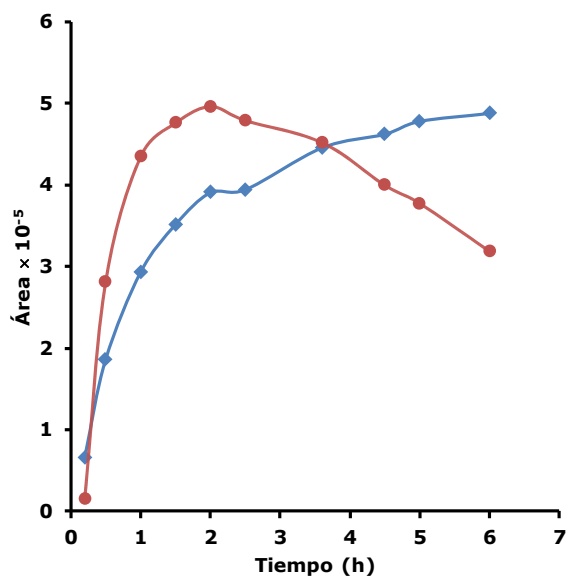


Figura VI.4.- Influencia de la concentración de NAC en la estabilidad del derivado OPA-NAC-AMK. Relaciones molares NAC/AMK: (●) 500 y (◆) 1000. Relación molar OPA/AMK de 100.

Como se observa en la Figura VI.4, el empleo de relaciones molares de NAC/AMK elevadas provoca una disminución en la cinética de degradación y, por tanto, una estabilidad mayor del derivado formado. Además, se observa una disminución en la cinética de formación. Estos efectos son más acusados cuanto mayor es el exceso de NAC. Estas observaciones están en concordancia con las observadas para derivados de aminoácidos [41, 42 del TFM].

A pesar de que hay que esperar un tiempo excesivamente largo para alcanzar la señal máxima (formación completa del derivado), en futuros estudios se utilizó una relación molar NAC/AMK de 1000 que presenta una cinética de degradación menor.

VI.4.2.3.- Condiciones de incubación

Con el fin de disminuir el tiempo de derivatización, se estudió el efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre las cinéticas tanto de formación como de degradación del derivado.

Para ello, las disoluciones de plasma con relaciones molares OPA/AMK y NAC/AMK de 100 y 1000, respectivamente, (de acuerdo a los resultados obtenidos en los apartados VI.4.2.1 y VI.4.2.2) se sometieron a diferentes condiciones de incubación (ver Figura VI.5). Tras la incubación, cada disolución se inyectó repetidamente en el sistema cromatográfico durante varias horas. Como se puede observar en la Figura VI.5, el tratamiento que implica la incubación de la muestra a 80 °C durante 5 min proporciona los mejores resultados en términos de formación rápida del derivado y buena estabilidad (al menos 4 h) por lo que esta condición fue seleccionada para futuros estudios.

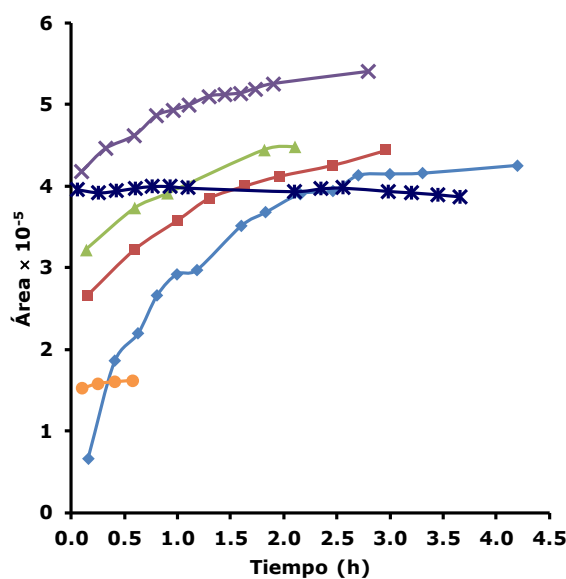


Figura VI.5.- Efecto de las condiciones de incubación sobre las cinéticas de formación y degradación del derivado OPA-NAC-AMK. Condiciones de incubación: (◆) temperatura ambiente, (■) a 50 °C durante 10 min, (▲) a 50 °C durante 20 min, (×) a 50 °C durante 30 min, (*) a 80 °C durante 5 min y (●) a 80 °C durante 20 min.

VI.4.2.4.- Condiciones óptimas

Con los experimentos anteriores es posible definir las condiciones óptimas que se deben aplicar para la reacción de derivatización de AMK con el reactivo OPA-NAC que garantizan un periodo postderivatización suficientemente amplio para llevar a cabo la separación cromatográfica. Ello resulta cómodo desde el punto de vista de la aplicación rutinaria de la metodología. En resumen, se trata del empleo de relaciones molares OPA/AMK y NAC/AMK de 100 y 1000 respectivamente, seguido de una fase de incubación a 80 °C durante 5 min. Con el objetivo de detener o fijar la reacción, se decidió que, tras el periodo de calentamiento, las muestras se enfriaran durante al menos un minuto en agua a temperatura ambiente, incluyendo este paso en el protocolo.

A modo de ejemplo, en la Figura VI.6 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos en estas condiciones. La Figura VI.6.A muestra el correspondiente a un blanco de plasma al que no se le ha adicionado AMK (sin aditivar), mientras que la Figura VI.6.B corresponde a un cromatograma de una muestra de plasma aditivada con AMK a una concentración de 60 mg L⁻¹. El pico del analito se obtiene a un t_R en torno a los 10 min. También puede observarse la aparición de picos de otros compuestos endógenos.

Dadas las características de la determinación, se decidió que los patrones de calibración se prepararan sobre blancos de plasma, mediante la adición de AMK en el intervalo 1-60 mg L⁻¹. Así, el cromatograma de la Figura VI.6.B marca la señal máxima esperable.

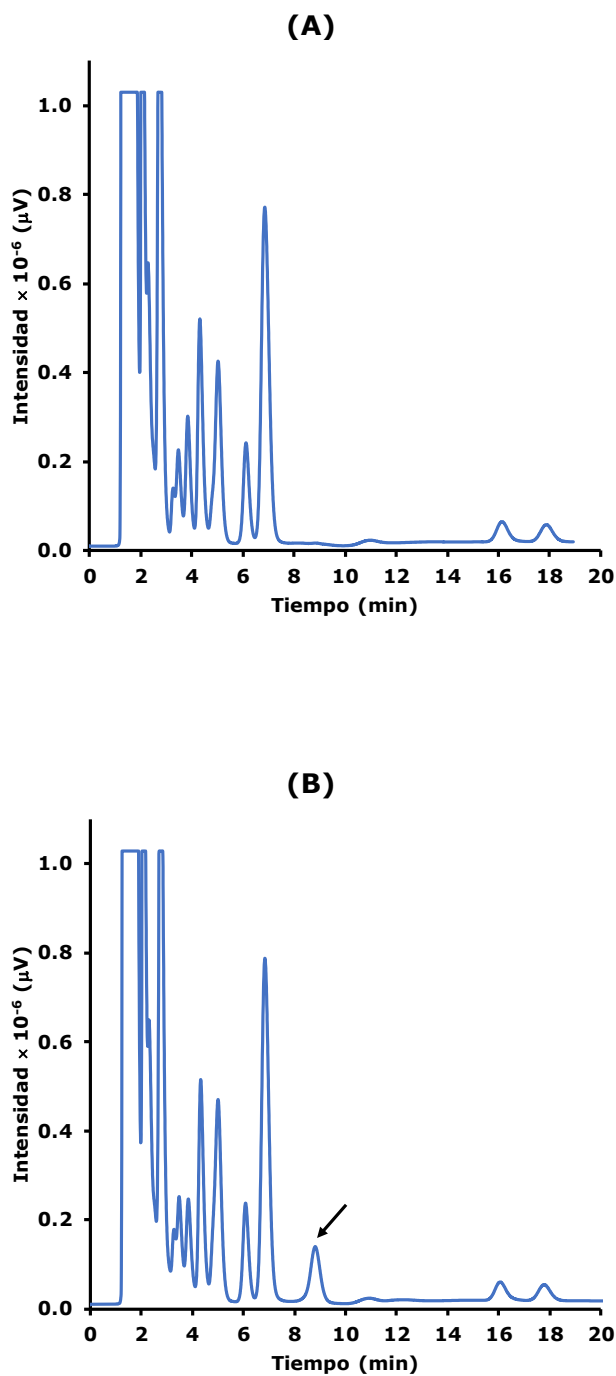


Figura VI.6.- Cromatogramas correspondientes a: **(A)** un blanco de plasma sin aditivar. **(B)** Un blanco de plasma aditivado con 60 mg L^{-1} de AMK. Relaciones molares OPA/NAC/AMK 100/1000/1 en la disolución de medida. Ver condiciones cromatográficas en el apartado VI.3.2.1. Con una flecha se identifica el pico correspondiente al derivado de AMK.

VI.4.3.- Validación preliminar del método analítico para la determinación de AMK en muestras de plasma

A diferencia del resto de capítulos de esta Tesis Doctoral, no se plantea una validación completa de todas las características analíticas conforme a los requerimientos de la EMA. En el presente capítulo se han anticipado algunas características analíticas significativas, como la linealidad, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO) y precisión en condiciones de repetibilidad (intradía) y precisión intermedia (interdía) para evaluar las prestaciones del método como posible sustituto de FPIA y para anticipar una eventual acreditación del método (ej. con el estándar de acreditación ISO 15189:2013, *Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia*).

VI.4.3.1- Linealidad

Con el fin de evaluar la linealidad y la estabilidad del proceso de calibración, durante cinco sesiones de trabajo (cinco días) se prepararon calibrados independientes y se evaluó la respuesta lineal entre la concentración de AMK y la señal analítica (área de pico). El intervalo de concentración estudiado en las muestras de plasma aditivadas fue de 1.0-60.0 mg L⁻¹ (niveles usuales en los que AMK se halla en los pacientes tratados) que corresponde a 0.17-10.0 mg L⁻¹ en la disolución de inyección. En la Tabla VI.5 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para las cinco sesiones con sus respectivos valores de R^2 .

Tabla VI.5.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en cinco sesiones de trabajo. b_0 : ordenada en el origen, b_1 : pendiente de la recta de calibrado, R^2 : coeficiente de determinación.

Sesión	b_0	b_1	R^2
1	33507	405560	0.9990
2	-28846	410905	0.9997
3	-30544	393633	0.998
4	18417	419922	0.9990
5	10009	425788	0.9996

Como se observa en la Tabla VI.5, en todos los casos los valores de R^2 son superiores a 0.995, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017 (*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración*). Se observa que hay diferencias entre días en las ordenadas y pendientes, lo que sugiere que la forma correcta de trabajo es preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de

muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente. Por otro lado, las diferencias entre los valores obtenidos para las pendientes son inferiores al 10 %, lo que se considera una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados. El LLOQ práctico, se fijó en 1 mg L⁻¹ para la muestra no tratada que es equivalente a 0.17 mg L⁻¹ en la disolución de inyección.

VI.4.3.2.- Estimación de la exactitud y precisión

La exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO) y la precisión se evaluaron simultáneamente. Para ello, se prepararon diariamente, durante 5 días, dos réplicas independientes de controles sobre matriz plasma con concentraciones de AMK de 1.20 mg L⁻¹ y 45.0 mg L⁻¹ (que corresponden a 0.2-7.5 mg L⁻¹ en la disolución de inyección). Las señales analíticas se interpolaron en la recta de calibrado correspondiente a la misma sesión de trabajo. La Tabla VI.6 muestra los valores de concentración estimados para cada uno de los controles procesados.

Tabla VI.6.- Resultados obtenidos para los controles. Ganancia de 10 en el detector. C: concentración preparada, \hat{C} : concentración encontrada.

nc (C, mg L ⁻¹)	Sesión	\hat{C} , mg L ⁻¹	
		Réplica 1	Réplica 2
QC bajo (1.2)	1	0.98	1.03
	2	1.25	1.26
	3	1.43	1.41
	4	1.07	1.21
	5	0.98	1.05
QC alto (45.0)	1	43.50	45.60
	2	46.75	44.91
	3	45.22	48.84
	4	46.79	46.11
	5	45.65	42.42

Tal y como se indica en el apartado VI.3.4, para la estimación de los estadísticos asociados a la veracidad y precisión del método, los valores de concentración estimados se organizaron en una matriz de datos de dimensión 2 × 5 (réplicas × día) y se procesaron mediante ANOVA. La Tabla VI.7 muestra los estadísticos de calidad obtenidos. Tal y como puede observarse, los valores de E_r fueron inferiores al 2 %. Por otro lado, los valores de RSD, tanto en condiciones de repetibilidad (RSD_r) como de precisión intermedia (RSD_i) fueron inferiores al 15 %. En esta tabla también se muestran los resultados del cálculo de la incertidumbre en

caso de que se den resultados con una única muestra procesada, así como los límites de control establecidos mediante la desviación estándar del proceso, en caso de que se desee su empleo en los gráficos de Shewart para el control de calidad interno de los resultados obtenidos con el método analítico desarrollado [384].

Tabla VI.7.- Estimación de la veracidad y precisión intermedia [385].

Estadísticos		Patrón de 1.2 mg L ⁻¹	Patrón de 45 mg L ⁻¹
Veracidad	<i>Media ± s</i>	1.17 ± 0.16	45.6 ± 1.2
	<i>E_r</i> (%)	-2.1	1.3
Precisión	RSD _r (%) (Repetibilidad)	4.5	3.9
	RSD _i (%) (Precisión intermedia)	14.5	3.9
Incertidumbre	<i>U</i> (<i>K</i> = 2; 1 réplica)	0.4	4
Control de calidad	S (proceso temporal)	0.19	1.9

VI.4.3.3.- Estudio comparativo entre HPLC y FPIA

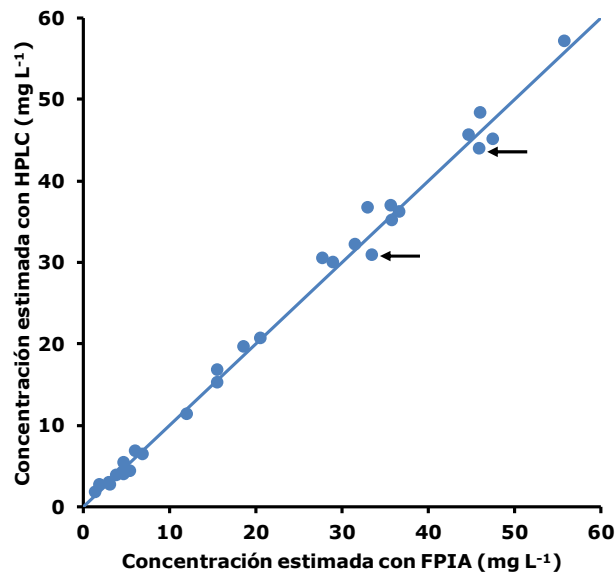
Para evaluar la verdadera aplicabilidad del método (ajuste a propósito) se decidió analizar con el método HPLC propuesto (candidato) 31 muestras de pacientes bajo tratamiento con AMK cuya concentración de analito había sido previamente determinada mediante FPIA (el método a sustituir). Para ello, y durante cuatro sesiones, se realizó un experimento similar al descrito en el apartado VI.4.3, pero sustituyendo los controles por muestras congeladas ya analizadas, permitiendo así llevar a cabo una comparación de métodos y por extensión de las técnicas HPLC y FPIA.

Para aquellas muestras cuya concentración de AMK determinada mediante FPIA superaba el ULOQ (60 mg L⁻¹), se realizó una dilución previa del plasma con agua (relación plasma/agua 1:1 (v/v), como se realizó en su día con FPIA). También, se analizaron muestras cuya concentración de AMK estimada con FPIA era inferior (0.8 mg L⁻¹) al LLOQ (provisionalmente fijado en 1 mg L⁻¹), sólo para explorar las posibilidades de disminuir el LLOQ del método HPLC.

En la Tabla VI.8 se muestran las concentraciones de AMK obtenidas tras procesar las muestras mediante el método de HPLC propuesto e interpolar las áreas de pico medidas en la recta de calibrado de la correspondiente sesión de trabajo. También se incluyen las concentraciones obtenidas mediante la técnica FPIA.

Tabla VI.8.- Concentraciones de AMK estimadas mediante FPIA y HPLC en las muestras reales. \hat{C} : concentración encontrada.

Sesión	\hat{C} FPIA (mg L ⁻¹)	\hat{C} HPLC (mg L ⁻¹)	Sesión	\hat{C} FPIA (mg L ⁻¹)	\hat{C} HPLC (mg L ⁻¹)
4	< 0.8	0.52	3	18.56	19.70
4	< 0.8	0.49	2	20.51	20.80
3	1.44	1.86	1	27.71	30.60
4	1.97	2.75	2	28.99	30.10
1	3.03	2.99	1	31.57	32.28
3	3.17	2.78	2	32.99	36.80
2	3.84	3.91	1	35.72	37.04
2	4.62	4.33	2	33.44 ^a	31.00 ^a
2	4.67	4.02	3	35.78	35.30
4	4.71	5.52	3	36.62	36.30
2	5.40	4.45	1	44.72	45.77
2	6.12	6.91	2	45.86 ^a	44.00 ^a
1	6.89	6.54	2	46.04	48.50
1	12.08	11.40	1	47.50	45.22
2	15.60	16.90	4	55.80	57.20
4	15.55	15.30			

^a Muestras diluidas con agua**Figura VI.7.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante FPIA y HPLC para las muestras reales analizadas. Con una flecha se identifican las muestras cuya concentración de AMK superaba el ULOQ (60 mg L⁻¹) y que se diluyeron con agua (relación plasma/agua, 1:1 (v/v)).

En la Figura VI.7 se representan las concentraciones de AMK obtenidas con HPLC frente a las obtenidas con FPIA. Se incluye la línea teórica con pendiente igual a 1 y ordenada en el origen 0.

Los datos de la ecuación de la recta con sus respectivos intervalos de confianza para un nivel de confianza (NC) del 95 % para b_1 y b_0 se muestran en la Tabla VI.9. Como puede observarse, los intervalos de confianza para un $NC = 95 \%$, para b_0 y b_1 , incluyen al 0 y al 1 respectivamente, lo que indica la ausencia de error sistemático (constante y proporcional) y evidencia la trazabilidad de los resultados de la metodología cromatográfica desarrollada en esta Tesis Doctoral respecto a los previamente obtenidos mediante el método FPIA. Ello sugiere que la sustitución de métodos en la rutina hospitalaria es factible.

Tabla VI.9.- Estadísticos de la ecuación de validación.

Estadístico	Valor obtenido	Intervalo de confianza (NC = 95 %)
b_0	0.1346	-0.7477; 1.0168
b_1	1.0087	0.9765; 1.0407
R^2	0.993	-

En la Figura VI.8 se representan los residuos obtenidos para la recta de validación. Como se puede observar, la distribución de los residuos es aleatoria (no se observan tendencias), lo que satisface el requisito de independencia, hecho importante considerando que el experimento ha sido realizado en cuatro sesiones de trabajo. Aunque los residuos sugieren mayores diferencias para concentraciones de AMK superiores, este comportamiento está dentro de la lógica químico-analítica.

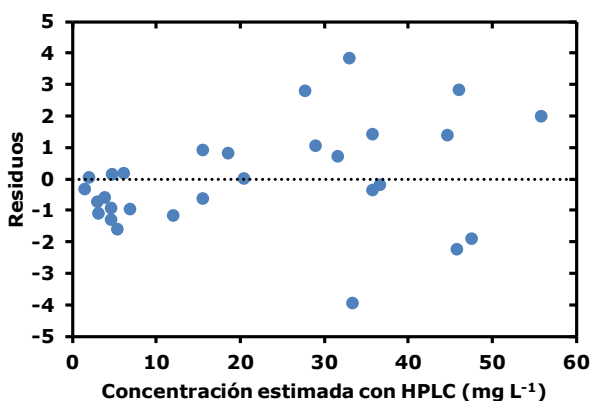


Figura VI.8.- Gráfico de residuos correspondiente a la recta de validación mostrada en la Tabla VI.9. y representada en la Figura VI.7.

VI.5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos en este capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los reactivos derivatizantes, OPA y NAC empleados, en concentraciones adecuadas (relaciones molares de OPA/NAC/AMK 100/1000/1) resultan adecuados para llevar a cabo una derivatización precolumna (80 °C, 5 min; temperatura ambiente, 1 min) de la AMK presente en muestras de plasma (tras la precipitación/separación de las proteínas plasmáticas), en las concentraciones requeridas (1-60 mg L⁻¹). Estas condiciones aseguran la formación de un único derivado, fluorescente ($\lambda_{\text{excitación}} = 337 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 439 \text{ nm}$), cuyo t_R se sitúa en torno a 10 min con una fase móvil de tampón fosfato 0.05 (pH 7.5)/ACN (80:20, v/v).
- Los calibrados (intervalo 1-60 mg L⁻¹) entre días muestran adecuada linealidad ($R^2 > 0.995$; requisito actualmente empleado en acreditación de ensayos cromatográficos). La veracidad y precisión intermedia obtenidas a dos niveles de concentración extremos del alcance del método, entre días, son satisfactorias. Todos estos resultados serían sobradamente conformes a los requisitos exigidos para una acreditación UNE-EN ISO 15189:2007, de aplicación en laboratorios de hospitales.
- La comparación del método candidato frente al actual (FPIA), analizando 31 muestras (analizadas por FPIA y conservadas), dentro y fuera de los límites de calibración, en cuatro sesiones independientes de trabajo, sugieren que la metodología HPLC propuesta es trazable al método actualmente empleado FPIA.
- El método HPLC propuesto se ajusta al propósito previsto, por tanto, puede sustituir al método actual. El tiempo total de análisis (preparación y separación/medida) por muestra es similar en ambos casos (25 y 20 min, para HPLC y FPIA, respectivamente), pero el nuevo método presenta un menor coste por muestra analizada (0.64 y 17 € estimados para HPLC y FPIA, respectivamente).

CAPÍTULO VII

ANTIFÚNGICOS I: VORICONAZOL

VII.1.- Introducción

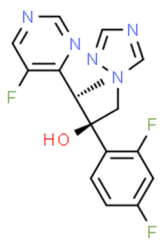
VII.1.1.- Características generales

VOR es un antifúngico perteneciente al grupo de los triazoles (ver Tabla I.3). Durante la década de 1990 se introdujeron los primeros antifúngicos triazólicos, fluconazol e itraconazol. Sin embargo, itraconazol presenta problemas relacionados con su absorción y fluconazol tiene un espectro de actividad antifúngico muy reducido y un elevado riesgo de aparición de resistencias en pacientes inmunodeprimidos sometidos a tratamientos prolongados. VOR se introdujo una década después, junto con otros antifúngicos triazólicos. VOR es un derivado de fluconazol con un espectro de actividad antifúngico más amplio. Desde su aprobación en 2002, VOR ha supuesto un cambio en el abordaje y manejo de las IFI. Tanto es así que, en la actualidad, tal y como se recoge en las guías publicadas por la *Infectious Disease Society of America*, VOR se presenta como un antifúngico de primera línea en los tratamientos de la aspergilosis invasiva y candidemia [117, 386].

VII.1.2.- Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla VII.1 se muestra la estructura y algunas propiedades fisicoquímicas de VOR. Como se puede observar, VOR es un compuesto moderadamente hidrofóbico ($\log P = 1.8$). Posee en su estructura un grupo hidroxilo y otro amino con valores de pK_a de 12.7 y 2.0 (del ácido conjugado), respectivamente; por tanto, se encuentra en su forma neutra en prácticamente toda la escala de pH.

Tabla VII.1.- Número registrado en el CAS, estructura química, $\log P$, pK_a y M_r de VOR.

Compuesto (Nº CAS)	Estructura	$\log P^a$	pK_a^a	M_r
VOR (137234-62-9)		1.8	2.0 ^b 12.7	349.3

^a Valores estimados con el programa ChemAxon disponible *on-line* en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). ^b Valores correspondientes al ácido conjugado del grupo amino.

VII.1.3.- Propiedades farmacológicas

VOR presenta varios mecanismos de acción [387]. Principalmente, actúa sobre las formas del citocromo P450 más características y específicas de los hongos, incluidas aquellas que se encuentran en levaduras. Esto provoca la inhibición de una gran parte de enzimas oxidativas, especialmente de aquellas involucradas en la síntesis de ergosterol, componente fundamental de la pared celular del hongo, a través de la 14-desmetilación del lanosterol. Dicha inhibición provoca la acumulación de esteroides 14 α -metilados a nivel intracelular y se produce una alteración en la permeabilidad de la pared celular que da lugar a un desequilibrio intracelular, manifestándose en el desarrollo y división celular del hongo. También se ha relacionado esta inhibición con la actividad fungistática de VOR.

Adicionalmente, VOR y otros agentes azólicos inhiben la biosíntesis de triglicéridos y de fosfolípidos. Por este motivo, su actividad inhibitoria puede apreciarse igualmente en células carentes de ergosterol en su pared celular [387-388]. Por otra parte, se ha visto que estos agentes alteran los mecanismos enzimáticos intracelulares para la detoxificación del peróxido de hidrógeno, lo que provoca una acumulación de éste capaz de lesionar las estructuras de las organelas a nivel intracelular [387].

VII.1.4.- Espectro antimicrobiano

En la Tabla VII.2 se muestra el espectro de actividad antifúngico de VOR [389]. También es importante destacar que, aparte de las especies que figuran en la Tabla VII.2, se ha visto que VOR presenta actividad *in vitro* frente a un elevado número de especies de los géneros *Acremonium spp.*, *Alternaria spp.*, *Curvularia spp.* y *Sporothrix spp.* [389].

Tabla VII.2.- Espectro de actividad antifúngico de VOR

Hongos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especies del género <i>Candida spp.</i> (<i>Candida krusei</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Candida glabrata</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida parapsilosis</i>), así como frente a diferentes especies resistentes a fluconazol o anfotericina B. Actividad parcial/limitada frente a <i>Candida dubliniensis</i>, <i>Candida inconspicua</i> y <i>Candida guilliermondii</i> ▪ Especies del género <i>Aspergillus spp.</i> (<i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus terreus</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Aspergillus nidulans</i>) ▪ Especies del género <i>Scedosporium spp.</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>, <i>Scediosporium prolificans</i>) y <i>Cryptococcus spp.</i> (<i>Criptococcus neoformans</i>)

VII.1.5.- Perfil farmacocinético

VOR se absorbe rápidamente durante las 2 h siguientes a la administración oral [390]. Su biodisponibilidad se estima en un 90 % y su absorción no es dependiente del pH gástrico, a diferencia de otros antifúngicos triazólicos [391]. Una vez iniciado el tratamiento oral estándar (200 mg cada 12 h), el tiempo en alcanzar concentraciones estables en sangre es de 5-7 días, con variaciones que dependen del régimen de dosificación. Este tiempo puede reducirse administrando dos dosis de carga intravenosa inicial de 6 mg kg⁻¹ durante el primer día de tratamiento [390, 392].

Los estudios a dosis múltiples han evidenciado un perfil no lineal en su farmacocinética, con aumentos en los valores de C_{máx} y de AUC no proporcionales a la dosis administrada. Esto último ocurre tanto para régimen intravenoso como oral, y se debe a una saturación del metabolismo hepático en función de la dosis administrada [393].

La unión a proteínas plasmáticas se sitúa alrededor del 58 % y es independiente de la dosis de fármaco [391]. La semivida plasmática de eliminación de VOR es de unas 6 h para régimen intravenoso y oral [394]. Este parámetro se considera independiente de la dosis debido al perfil farmacocinética no lineal de VOR, lo que supone una limitación para la predicción de su acumulación y eliminación [391]. VOR presenta un V_d alto (entre los 2 L kg⁻¹ y los 4.6 L kg⁻¹), lo que sugiere una amplia distribución a compartimentos extra e intracelular [391-392].

En cuanto a la eliminación de VOR, el 80-83 % de fármaco y de sus metabolitos se excreta por orina, y menos de un 20 % lo hace por heces [391]. Su metabolización es fundamentalmente a través de la isoenzima CYP2C19 hepática vía *N*-oxidación [395]. Ésta isoenzima presenta un polimorfismo genético, que, junto con la edad y el sexo, origina una elevada variabilidad farmacocinética interindividual de VOR [387, 396]. El Cl total se ha estimado de 13 - 16 L h⁻¹ tras una dosis de carga de 6 mg kg⁻¹ seguida de una dosis de mantenimiento de 3 mg kg⁻¹ dos veces al día durante 10 días [397].

VII.1.6.- Perfil farmacodinámico

Se ha descrito una relación de carácter no lineal tanto dosis-respuesta como exposición-respuesta [398-401]. Sin embargo, se ha encontrado una correlación entre la exposición a VOR (AUC) y la C_{mín} obtenida [402]. Así, el trabajo de Pascual y col. propone un valor de C_{mín} comprendido entre 1.5 mg L⁻¹ y 4.5 mg L⁻¹ como indicador de eficacia en el tratamiento frente a la infección [400]. En este sentido, se

considera que el tratamiento con VOR es eficaz cuando sus valores de $C_{\text{mín}}$ están por encima de 1 mg L^{-1} , y se considera que puede haber toxicidad cuando dichos valores son superiores a los 5 mg L^{-1} [398-401]. La revisión bibliográfica realizada por Karthaus y col. sobre monitorización de VOR establece un intervalo terapéutico para valores de $C_{\text{mín}}$ comprendidos entre 1.0 mg L^{-1} y 5.5 mg L^{-1} [403].

Por otro lado, aunque no existe suficiente evidencia para establecer la relación exposición-respuesta en el tratamiento profiláctico con VOR [404], algunos trabajos han establecido un valor objetivo de $C_{\text{mín}}$ no inferior a 0.25 mg L^{-1} [404-405]. Si bien debe mencionarse que el número de pacientes estudiados en estos trabajos es relativamente pequeño y, por ello, dicho valor objetivo debe ser utilizado con cautela.

VII.1.7.- Perfil de seguridad

VOR es bien tolerado y en raras ocasiones se interrumpe el tratamiento por la aparición de eventos adversos [406-409]. En la Tabla VII.3 se muestran los eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con VOR.

Tabla VII.3.- Eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con VOR.

Evento adverso
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neurológicos: alteración de la visión, alucinaciones, cefaleas, psicosis, falta de concentración, fatiga, ansiedad y pérdida de memoria ▪ Cardiovasculares: prolongación del intervalo Q-T, taquicardia ▪ Gastrointestinales ▪ Dermatológicos: erupción cutánea, carcinoma de células escamosas ▪ Eventos adversos de laboratorio: aumento de las enzimas hepáticas ▪ Hiponatremia

Aunque los eventos adversos asociados al empleo de VOR se han relacionado con valores de $C_{\text{mín}}$ superiores a los 5.5 mg L^{-1} , se han descrito reacciones adversas no dependientes de la concentración [400, 410]. También se han observado eventos adversos neurológicos o cutáneos en pacientes pediátricos inmunodeprimidos cuyos valores de $C_{\text{mín}}$ resultaron superiores a los 5.5 mg L^{-1} [411]. Actualmente, los mecanismos que explican la relación entre las concentraciones de VOR existentes en sangre y la toxicidad encontrada no se han dilucidado del todo [412-413]. El uso de VOR en mujeres embarazadas está justificado tras valoración del beneficio frente al riesgo de teratogénesis en el feto (categoría D de la FDA) [414].

VII.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral descrito en el Capítulo II, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto y validación completa conforme a los requerimientos de la EMA de un método cromatográfico para la determinación de VOR en muestras de plasma utilizando una columna C18 y detección fluorimétrica. Para la consecución de este objetivo, de modo análogo al Capítulo IV, se realiza un estudio de la optimización de la composición de la fase móvil hidroorgánica y del tratamiento de las muestras de plasma. El método debe ser rápido y sencillo para su implementación en análisis de rutina en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Implementación del método cromatográfico en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de VOR en plasma de pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos tratados en el Servicio de Oncohematología del hospital con profilaxis antifúngica y con el objetivo último de estimar el grado de exposición al fármaco para realizar un reajuste posológico, si procede.

VII.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, los procedimientos seguidos para el acondicionamiento del sistema cromatográfico, para la validación del método desarrollado según las recomendaciones de la EMA, para el aseguramiento interno de la calidad y para el análisis farmacocinético, así como los programas informáticos empleados en este capítulo, se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

VII.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles

Para la preparación de las disoluciones de VOR se empleó la especialidad farmacéutica para uso oral que se indica en la Tabla VII.4. Se prepararon semanalmente disoluciones de trabajo por disolución de la cantidad adecuada de polvo en EtOH, a las concentraciones indicadas en la Tabla VII.4. Para eliminar la mayor cantidad de excipientes no disueltos, la mezcla alcohólica se filtró a través de filtros de jeringa de Nylon® con un diámetro de poro de 0.45 µm. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

Tabla VII.4.- Especialidad farmacéutica, distribuidor comercial, concentración de las disoluciones de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior.

Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
VFEND® comprimido 200 mg Observaciones: comprimido recubierto con película	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 5000 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 0.25 (LLOQ), 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 0.25, 1, 5 y 7.5 – Selectividad: 0.25 – Integridad de dilución: 14 – Efecto memoria: 10 – Estabilidad: 1 y 7.5
VFEND® IV 200 mg Observaciones: polvo para disolución para perfusión Distribuidor: Pfizer Europe MA, EEIG (Bruselas, Bélgica)	

^a Preparación semanal

Como se puede observar en la Tabla VII.4, se prepararon siete controles para la validación de la curva de calibrado por dilución de la disolución de trabajo en plasma de sujetos sanos. Estas concentraciones son las que se utilizaron para la construcción de las rectas de calibrado. De manera similar, se prepararon los controles empleados para la validación de la precisión, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO 17025 y ISO15189), selectividad, integridad de dilución,

efecto memoria, así como para la validación de la estabilidad de VOR en las disoluciones de plasma y en el inyector automático. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la EMA indicadas en la Tabla I.5 [246].

VII.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa

Las disoluciones de VOR para perfusión intravenosa se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante de la especialidad farmacéutica VFEND® (Tabla VII.4) por disolución del contenido de los viales en una disolución para perfusión de NaCl al 0.9 % (m/v). La concentración final de VOR fue de 500 a 5000 mg L⁻¹.

VII.3.3.- Procedimientos

VII.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo

La medicación administrada a los pacientes fue VFEND® en dos presentaciones (Tabla VII.4): para perfusión y en comprimidos. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, todas las disoluciones para perfusión intravenosa se administraron inmediatamente tras su preparación.

A todos los pacientes se les administró inicialmente una perfusión intravenosa. La pauta general de dosificación en este régimen fue de 200 mg cada 12 h, en perfusiones de 30 min a una velocidad máxima de 3 mg/kg/h. Posteriormente, a todos los pacientes se les administraron los comprimidos con una pauta de dosificación de 200 mg cada 12 h.

Para la monitorización de VOR, las muestras de sangre se obtuvieron, durante el régimen oral, inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a un tiempo equivalente a la C_{min} del fármaco. La toma de muestras se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.5.

VII.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomaron 500 µL de plasma y se precipitaron las proteínas por adición de 1000 µL de ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). La mezcla resultante se agitó con un agitador vortex durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 10800 rpm durante 5 min.

VII.3.3.3.- Condiciones cromatográficas

Para la determinación de VOR se utilizó el equipo cromatográfico de módulos integrados Waters. Se empleó una columna C18 XBridge (150 × 4.6 d.i. mm, 5 μm) y una fase móvil de tampón fosfato 0.05 M (pH 7.0)/ACN, (65:35, v/v). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹ y el volumen de inyección de 10 μL. Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente. La detección fluorimétrica se efectuó a una longitud de onda de excitación de 254 nm y una longitud de onda de emisión de 372 nm.

VII.4.- Resultados y discusión

VII.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de VOR en muestras de plasma

VII.4.1.1.- Composición de la fase móvil

En primer lugar, cabe destacar que, puesto que VOR es un compuesto fluorescente, se utilizó un detector FLD para mejorar los LLOQs y, fundamentalmente, la selectividad debido a la complejidad de las muestras de plasma.

Tal y como se ha comentado en el apartado IV.4.1.1, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado RPLC. Como se ha comentado anteriormente (apartado VII.1.2), VOR es un compuesto moderadamente hidrofóbico y se encuentra en su forma neutra en todo el intervalo de pH ($\sim 3-9$) de trabajo de las fases estacionarias de sílice enlazadas.

Como se puede observar en la Tabla I.4, en la bibliografía la mayoría de los métodos cromatográficos utilizan fases estacionarias C18 y fases móviles con un contenido significativo de modificador orgánico ($\sim 45-75$ % en los que se utiliza elución isocrática). Además, en la mayoría de aplicaciones se utiliza ACN como modificador orgánico [191-195, 197-200, 202-205, 207-212, 214-215, 217-218].

Por todo lo expuesto, inicialmente se prepararon distintas fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M (pH 7.0) y ACN en proporciones variables (35-50 %, v/v). En la Figura VII.1 se muestran los cromatogramas obtenidos. Como se puede observar, con las fases móviles con un contenido de ACN del 35-50 % (v/v) se obtuvieron valores de $t_R < 9$ min, satisfactorios para análisis de rutina. A fin de reducir el tiempo de análisis y evitar el posible solapamiento de compuestos endógenos de las muestras de plasma en el frente del cromatograma, se seleccionó *a priori* para futuros estudios la fase móvil que contiene tampón fosfato 0.05 M (pH 7.0)/ACN (65:35, v/v), sin descartar la necesidad de realizar reajustes en la composición de la fase móvil debido a la complejidad de la matriz de las muestras de plasma. En las condiciones seleccionadas, se obtuvieron los siguientes parámetros cromatográficos: $t_R = 7.8$ min, $k = 6.5$ y $A/B = 0.98$.

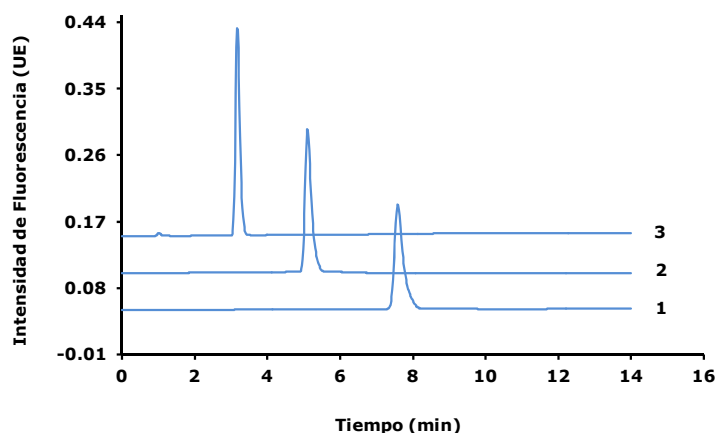


Figura VII.1.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 250 mg L⁻¹ de VOR. La composición de las fases móviles ensayadas fue: **(1)** 65:35, **(2)** 60:40 y **(3)** 50:50 tampón fosfato 0.05 M (pH 7.0)/ACN (v/v). El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado VII.3.3.3.

VII.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma

En primer lugar, al igual que en el Capítulo IV (apartado IV.1.2) se evaluó la influencia de la naturaleza de los filtros de jeringa sobre la recuperación de VOR, utilizando para ello disoluciones acuosas. Con todos los filtros ensayados (Nylon® de 0.45 μm ; PTFE y PVDF, ambos de 0.22 μm) se obtuvieron valores de recuperación próximos al 100 %, por lo que se utilizaron estos filtros indistintamente.

Como se recoge en la Tabla I.4, para la determinación cromatográfica de VOR en muestras de plasma muchos autores han empleado pretratamientos relativamente sencillos basados en la precipitación de proteínas plasmáticas mediante adición de MeOH, ACN, la mezcla de ambos o la combinación de uno de estos con un ácido (HCl, HCOOH, HClO₄) en pequeña proporción [200-201, 209] o con ZnSO₄ [214-215]. Tras esta desproteínización, en la mayoría de los métodos publicados en la literatura se ha procesado el sobrenadante directamente sin ninguna otra etapa adicional, aunque en algunas de ellas se ha propuesto la evaporación del extracto y reconstitución con fase móvil [198, 205, 207, 213] o incluso una etapa de SPE para la limpieza y preconcentración [214]. También se han utilizado alternativas a la precipitación de las proteínas como la ultrafiltración [192], LLE [193, 207-208, 212, 217-218] y SPE [216].

En esta Tesis Doctoral se ensayaron los tratamientos de precipitación de proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). Se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μ L de plasma/1000 μ L de reactivo precipitante). Los experimentos se realizaron por triplicado. En la Figura VII.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para blancos de muestras de plasma aditivados con 10 mg L⁻¹ de VOR y sin aditivar tras realizar los tratamientos indicados. Como se puede observar, si se comparan los cromatogramas de los blancos de plasma aditivados con los correspondientes a los blancos de plasma, no se observa coelución de compuestos endógenos presentes en el plasma con los analitos.

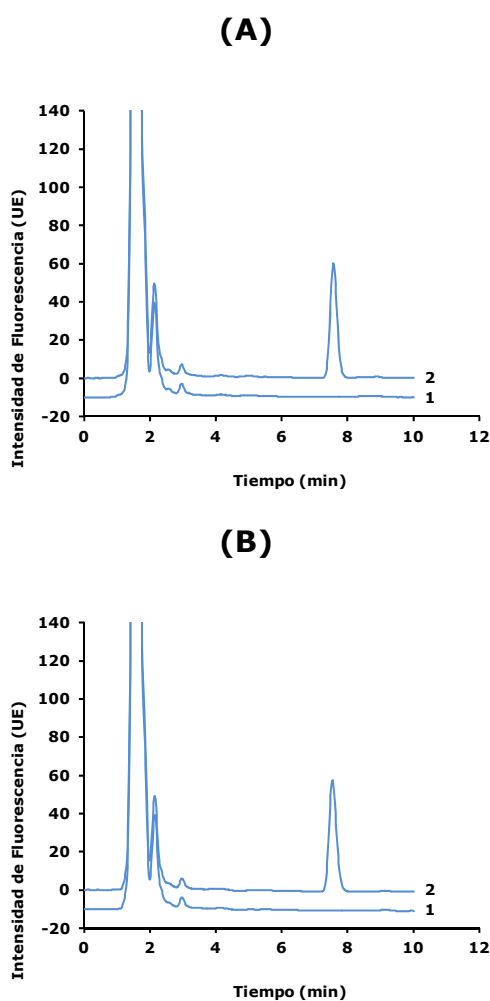


Figura VII.2.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 10 mg L⁻¹ de VOR tras los siguientes tratamientos: **(A)** precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y **(B)** con MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). Relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μ L de plasma/1000 μ L de reactivo precipitante). Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado VII.3.3.3.

En la Tabla VII.5 se muestran los valores de A/B, así como de los porcentajes de recuperación estimados a partir del cociente entre el área de pico de analito obtenida tras el tratamiento del blanco de plasma aditivado y el área de una disolución de la misma concentración de analito en agua. Como se puede observar, si bien los valores de A/B de simetría de pico son similares en todos los casos. Se seleccionó ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) como agente precipitante para futuros estudios por su mayor similitud con la fase móvil.

Tabla VII.5.- Influencia del tratamiento de las muestras de plasma sobre los valores del factor de asimetría (A/B) de los picos cromatográficos y de la recuperación de VOR.

Tratamiento	A/B	Recuperación (%) ^a
ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	1.06	103 ± 2
MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	0.92	95 ± 3

^a Media ± desviación estándar de las tres réplicas realizadas

Es interesante resaltar que, durante la ejecución de todos los ensayos realizados con el tratamiento seleccionado, la presión del sistema cromatográfico se mantuvo entre los 1400-1500 psi (con un flujo de 1 mL min⁻¹) y se observó una variación máxima de 20-30 psi tras una sesión de trabajo continuo. Lo que pone de manifiesto la compatibilidad del tratamiento realizado con el sistema cromatográfico empleado.

VII.4.2.- Validación del método desarrollado

En el apartado III.3.3 se describen los procedimientos seguidos para la validación de los métodos desarrollados según la guía de la EMA (ver Tabla I.5). En la Tabla VII.4 se muestran los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para la validación de cada una de las características analíticas de los métodos.

En el cuadro VII.1 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, los resultados obtenidos para los controles utilizados en la validación de todas las características analíticas son conformes a los criterios de aceptación de la EMA con lo que se pueden dar por validados los métodos analíticos propuestos para su implementación en análisis de rutina en laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Es importante destacar que VOR fue estable en plasma a corto y largo plazo (ver Tabla VII.10), así como en el inyector tras el tratamiento de la muestra (ver Tabla VII.11). Por este motivo, se decidió incluir en el procedimiento de trabajo el almacenamiento de todas las muestras a 4 °C o - 20 °C por un periodo máximo de 7 o 30 días desde su extracción, respectivamente. Asimismo, se fijó en 3 h el tiempo máximo de las muestras en el inyector automático a temperatura ambiente, margen suficientemente amplio para programar secuencias de trabajo que incluyan un número de muestras lo suficientemente elevado (~18 muestras) para análisis de rutina.

Cuadro VII.1.- Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado para la determinación de VOR.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN INFERIOR (LLOQ)	
CONCENTRACIÓN:	<ul style="list-style-type: none"> LLOQ práctico prefijado: 0.25 mg L⁻¹ (0.083 mg L⁻¹ en la disolución de medida)
RESULTADOS:	<ul style="list-style-type: none"> Señal (LLOQ) / Señal(blanco) > 220
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (LLOQ) ≥ 5·Señal (blanco)): SÍ ✓	

LINEALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO	
INTERVALO DINÁMICO LINEAL (LLOQ-ULOQ): 0.25 – 10.00 mg L⁻¹ (0.083 – 3.330 mg L⁻¹ en las disoluciones de medida)	

RESULTADOS:

Tabla VII.6.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en seis sesiones de trabajo.

Sesión	b_0	b_1 ^a	R^2 ^b
1	140940	1165690	0.9995
2	141103	1202569	0.9997
3	160419	1190265	0.9995
4	156893	1135896	0.9997
5	62359	1176591	0.9991
6	29936	1185230	0.9991

^a Diferencias en los valores de $b_1 < 10\%$. Considerado una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados (no es necesario realizar una calibración en cada sesión de trabajo si la correspondiente verificación es conforme). Se optó por preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente

^b $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017

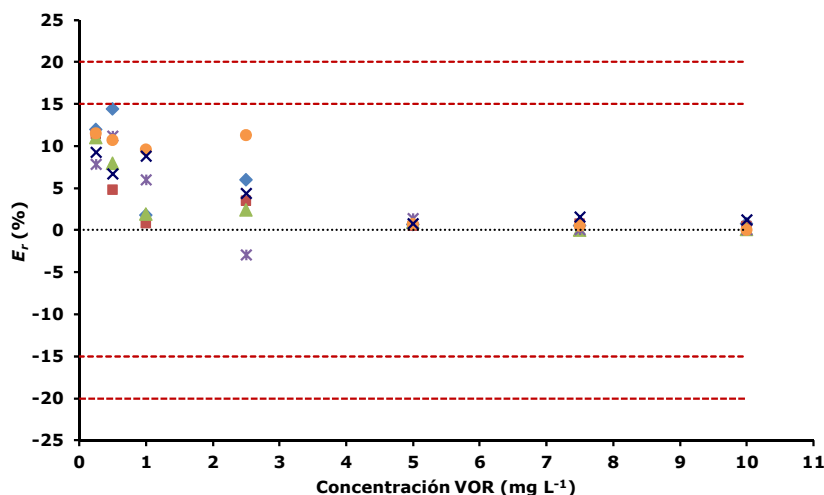


Figura VII.3.- Valores de E_r (%) obtenidos en la validación de la aceptabilidad de la curva de calibrado de VOR en cada una de las sesiones de trabajo: (♦) sesión 1, (■) sesión 2, (▲) sesión 3, (*) sesión 4, (●) sesión 5 y (×) sesión 6. (---) Límite de aceptabilidad para los controles cuya concentración es igual al LLOQ (E_r máximo = $\pm 20\%$) y para el resto de controles (E_r máximo = $\pm 15\%$) según las recomendaciones de la EMA. Los valores de concentración de los controles se indican en la Tabla VII.4.

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA ($E_r(\text{LLOQ}) \leq \pm 20\%$; $E_r(\text{resto}) \leq \pm 15\%$): SÍ ✓

Cuadro VII.1.- Cont.**EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA E INTERDÍA****RESULTADOS:**

Tabla VII.7.- Evaluación de la exactitud y precisión intradía (réplicas de los controles preparados y procesados en la misma sesión de trabajo).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹					E _r , %	RSD, %
	R1	R2	R3	R4	R5		
0.25 (LLOQ)	0.24	0.25	0.21	0.20	0.20	12.0	10.5
1.00 (QC bajo)	0.99	0.98	1.04	1.03	1.01	1.0	2.5
5.00 (QC medio)	5.16	5.15	5.37	5.28	5.11	4.2	2.1
7.50 (QC alto)	7.32	7.33	7.42	7.41	7.24	2.1	1.0

Tabla VII.8.- Evaluación de la exactitud y precisión interdía (controles preparados y procesados en cuatro días).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹				E _r , %	RSD, %
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
0.25 (LLOQ)	0.24	0.25	0.30	0.23	2.0	12.2
1.00 (QC bajo)	0.99	0.98	1.05	1.02	1.0	3.1
5.00 (QC medio)	5.16	5.15	4.96	4.95	1.1	2.3
7.50 (QC alto)	7.32	7.33	7.45	7.51	-1.3	1.3

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA:

- E_r (LLOQ) ≤ ±20% y E_r (resto QCs) ≤ ±15%: SÍ ✓
- RSD (LLOQ) ≤ 20% y RSD (resto QCs) ≤ 15%: SÍ ✓

SELECTIVIDAD**RESULTADOS:**

- Señal (blanco^a) / Señal (LLOQ) < 0.2
- ^a Muestras de 16 pacientes oncohematológicos, ninguno de ellos bajo tratamiento con VOR pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

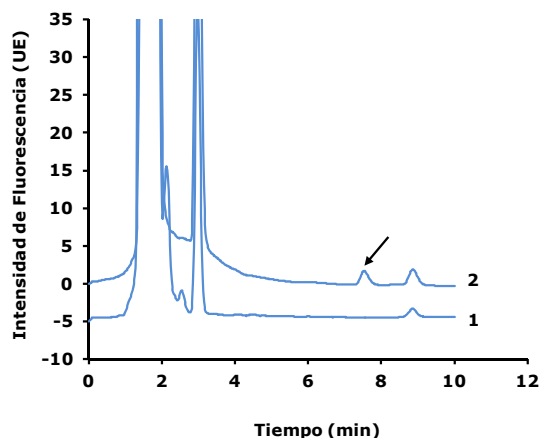


Figura VII.4.- Cromatogramas correspondientes a una disolución de **(1)** un blanco de plasma de un paciente oncohematológico y **(2)** de un blanco de plasma aditivado con 0.25 mg L⁻¹ de VOR. Con una flecha se identifica el pico correspondiente a VOR. Ver resto de condiciones experimentales en los apartados VII.3.3.2 y VII.3.3.3.

COMENTARIO: en los cromatogramas de todas las muestras de pacientes no se observó ningún pico en la zona de elución de VOR ($t_R \sim 7.8$ min) que pueda interferir en su determinación.

Cuadro VII.1.- Cont.

INTEGRIDAD DE DILUCIÓN					
RESULTADOS:					
Tabla VII.9.- Evaluación de la integridad de dilución. Dilución ensayada: disolución analito/blanco, 1:1 (v/v).					
C inicial, mg L ⁻¹ ^a	C final, mg L ⁻¹	Réplica	Ĉ final, mg L ⁻¹	E _r , %	RSD, %
14.00	7.00	1	7.15	7.1	1.6
		2	6.92		
		3	7.18		
		4	7.17		
		5	7.20		
		6	7.03		
		7	6.98		
^a Superior al ULOQ (10.00 mg L ⁻¹)					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (E _r ≤ ±15% y RSD ≤ 15%): SÍ ✓					
EFECTO MEMORIA POR ARRASTRE DE MUESTRA					
RESULTADOS:					
▪ Señal (blanco) / Señal(LLOQ) < 0.04					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓					
ESTABILIDAD					
RESULTADOS:					
Tabla VII.10.- Evaluación de la estabilidad a corto y largo plazo de VOR en plasma en diferentes condiciones de almacenamiento.					
n _c , C, mg L ⁻¹	Tiempo de almacenamiento, días	4 °C		-20 °C	
		Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _r , %	Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _r , %
QC bajo (1.00)	0	1.02 ± 0.02	2.0	1.02 ± 0.02	2.0
	1	1.10 ± 0.02	10.0	1.11 ± 0.02	11.0
	2	1.07 ± 0.02	7.0	0.98 ± 0.02	-2.0
	3	0.93 ± 0.02	-7.0	1.08 ± 0.02	8.0
	7	1.01 ± 0.01	1.0	1.01 ± 0.02	1.0
	14	-	-	0.95 ± 0.02	-5.0
	30	-	-	1.02 ± 0.02	2.0
QC alto (7.50)	0	7.5 ± 0.2	0.0	7.5 ± 0.1	0.0
	1	8.4 ± 0.2	12.0	7.6 ± 0.2	1.3
	2	7.5 ± 0.1	0.0	7.5 ± 0.2	0.0
	3	7.7 ± 0.1	2.7	7.6 ± 0.1	1.3
	7	7.6 ± 0.1	1.3	7.7 ± 0.1	2.7
	14	-	-	7.5 ± 0.2	0.0
	30	-	-	7.6 ± 0.2	1.3

Cuadro VII.1.- Cont.**ESTABILIDAD (cont.)****Tabla VII.11.-** Evaluación de la estabilidad en el inyector automático de VOR tras el tratamiento de muestra desarrollado.

nc (C, mg L ⁻¹)	Tiempo en el inyector automático, h	T ambiente	
		$\hat{C} \pm s$, mg L ⁻¹	E _r , %
QC bajo (1.00)	0	1.00 ± 0.02	0.0
	3	1.02 ± 0.02	2.0
QC alto (7.50)	0	7.5 ± 0.1	0.0
	3	7.5 ± 0.2	0.3

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (E_r ≤ ± 15 %): Sí ✓

Símbolos y acrónimos: b_0 : ordenada en el origen. b_1 : pendiente. C: concentración preparada. \hat{C} : concentración encontrada. E_r: error relativo. QC: control. R: réplica. R^2 : coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

VII.4.3.- Monitorización de VOR en pacientes tratados en el Servicio de Oncohematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Como se ha comentado en el apartado III.3.4, durante el análisis de rutina de muestras de pacientes, se realizaron actividades (verificación y control) para el aseguramiento interno de la calidad.

El método cromatográfico desarrollado y validado se aplicó a la determinación de C_{\min} (estimada como la concentración plasmática en muestras extraídas inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis) de VOR en 42 pacientes oncohematológicos bajo tratamiento profiláctico con VFEND® (ver presentaciones, pauta posológica y tiempos de muestreo en la Tabla VII.4 y el apartado VII.3.3.1). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

A modo ejemplo, en la Figura VII.5 se muestran los cromatogramas obtenidos para uno de los pacientes en estudio junto con los correspondientes controles obtenidos en la misma sesión de trabajo.

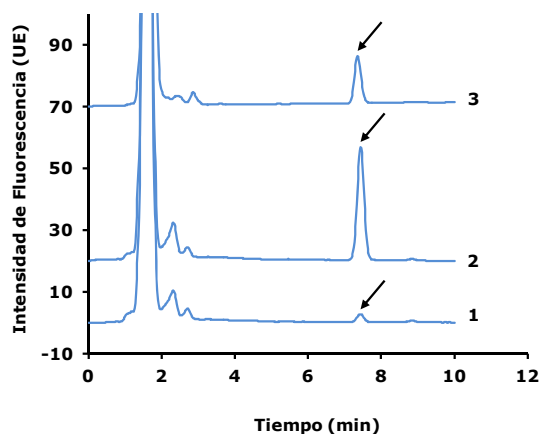


Figura VII.5.- Cromatogramas correspondientes a la determinación de VOR en los controles **(1)** QC bajo (1.00 mg L^{-1}), **(2)** QC alto (7.50 mg L^{-1}) y **(3)** del paciente V28 tratado con VOR ($C_{\min} = 3.3 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ VOR, ver Tabla VII.12). Con una flecha se identifica el pico correspondiente a VOR. El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados VII.3.3.2 y VII.3.3.3, respectivamente.

En la Tabla VII.12 se muestra, para cada paciente, los valores de C_{\min} obtenidos junto con su desviación estándar. Como se puede observar, en el caso de los pacientes V02, V03, V06 y V08, el valor de C_{\min} resultó inferior al LLOQ (0.25 mg L^{-1}).

Tabla VII.12.- Valores de C_{\min} de VOR estimados para cada uno de los pacientes oncohematológicos estudiados sometidos a un tratamiento de profilaxis con VFEND® (ver presentaciones, pauta posológica y tiempos de muestreo en la Tabla VII.4 y el apartado VII.3.3.1).

Paciente	$C_{\min} \pm s, \text{mg L}^{-1}$	Paciente	$C_{\min} \pm s, \text{mg L}^{-1}$
V01	0.330 ± 0.010^a	V23	0.380 ± 0.012^a
V02	<0.25^{a,b}	V24	0.53 ± 0.02
V03	<0.25^{a,b}	V25	1.83 ^c
V04	1.09 ± 0.06	V26	1.09 ± 0.04
V05	0.261 ± 0.011^a	V27	1.62 ^c
V06	<0.25^{a,b}	V28	3.3 ± 0.7
V07	0.820 ± 0.012	V29	3.13 ± 0.04
V08	<0.25^{a,b}	V30	2.010 ± 0.011
V09	1.242 ± 0.011	V31	0.901 ± 0.010
V10	1.591 ± 0.013	V32	0.98 ^c
V11	1.35 ^c	V33	0.26 ± 0.04^a
V12	1.183 ± 0.012	V34	0.33 ± 0.02^a
V13	1.53 ± 0.02	V35	2.13 ± 0.02
V14	1.35 ^c	V36	1.63 ± 0.02
V15	1.970 ± 0.011	V37	1.439 ± 0.011
V16	0.672 ± 0.012	V38	1.81 ± 0.12
V17	1.04 ± 0.02	V39	2.109 ± 0.011
V18	8.20 ± 0.13	V40	1.152 ± 0.010
V19	0.312 ± 0.012^a	V41	0.51 ± 0.04
V21	2.421 ± 0.010	V42	3.25 ± 0.03
V22	1.540 ± 0.013		

^a Paciente para el que no se alcanza el indicador de eficacia $C_{\min} \geq 0.50 \text{ mg L}^{-1}$. ^b $C_{\min} < \text{LLOQ}$. ^c No se pudieron realizar réplicas debido a que no se disponía de un volumen sangre suficiente.

Como se puede observar en la Tabla VII.12, para 10 de los 42 pacientes en estudio no se alcanzó el indicador de eficacia $C_{\min} \geq 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ propuesto para el tratamiento profiláctico con VOR (ver Tabla III.1, Apartado III.3.5).

Aunque ya se ha tratado con anterioridad (Apartado III.3.5), para evaluar este aspecto, y basándose en la correlación existente entre el nivel de exposición a VOR y la efectividad del tratamiento, así como en las recomendaciones publicadas por la British Society of Medical Mycology [398, 401], se consideró la consecución de valores C_{\min} de VOR en plasma no inferiores a 0.5 mg L^{-1} en la profilaxis frente a infecciones fúngicas por especies de los géneros *Aspergillus spp.* o *Candida spp.* [128, 252].

Tal y como puede observarse en la Tabla VII.12, con la pauta posológica de VOR estudiada en esta Tesis Doctoral habitualmente empleada en la práctica clínica,

un porcentaje elevado de pacientes (23.8 %) se considerarían infradosificados en la profilaxis frente a la infección fúngica y sería recomendable un ajuste de la pauta de VOR para alcanzar concentraciones potencialmente efectivas.

Este porcentaje es similar a los obtenidos en otros trabajos de investigación publicados, los cuales están comprendidos entre el 18 % y el 27 % [112, 116, 415-419]. Por otro lado hay que resaltar otros 3 trabajos publicados, cuyos porcentajes para valores de C_{\min} de VOR fuera de intervalo terapéutico, tanto para tratamiento como profilaxis frente a la infección, llegan a ser superiores al 40 % [73, 420-421].

Algunos autores sugieren que este fenómeno de infradosificación es debido a la elevada variabilidad farmacocinética de VOR encontrada, al comportamiento no lineal en su farmacocinética y a la existencia de diferentes polimorfismos del gen CYP2C19 involucrados en la metabolización de VOR [39, 128]. Debido a ello, estos autores proponen el empleo de programas orientados a la monitorización farmacocinética de VOR en la práctica clínica.

La pauta estándar de dosificación para VOR es de 4 mg kg⁻¹ vía intravenosa o de 200 mg vía oral, ambas administradas cada 12 horas. Según las especificaciones de ficha técnica aprobadas por la FDA, esta pauta debería ser suficiente para dar lugar a valores de C_{\min} adecuados para la profilaxis y el tratamiento frente a la infección fúngica [388]. Sin embargo, las guías recientemente publicadas por el Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium sugieren que esta pauta estándar de dosificación podría no ser suficiente, especialmente en pacientes considerados metabolizadores rápidos a causa de polimorfismos del gen CYP2C19 [422]. De hecho, Mangal y cols. sugieren que debería de realizarse una individualización posológica en base al genotipo clínico del paciente y al tipo de infección a tratar [423].

Por todo lo anterior, algunos autores instan a la implementación de sistemas o programas de monitorización farmacocinética de VOR ajustados a la práctica clínica, como estrategia clave para reducir el riesgo de fracaso terapéutico por infra- o sobredosificación [112, 424]. Por tanto, el desarrollo y validación de métodos analíticos rápidos (preferiblemente cromatográficos, ver apartado 1.8.2) para la monitorización de VOR en pacientes oncohematológicos (objetivo de este capítulo) es esencial para realizar un reajuste de la dosificación relativamente rápido (24 h máximo) en caso de disponer de concentraciones de fármaco inadecuadas.

VII.5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos de este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento de las muestras de plasma propuesto para la determinación cromatográfica de VOR que consiste en la precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), proporciona valores de recuperación satisfactorios (> 90%) en tiempos adecuados (5 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- Las condiciones cromatográficas (fase móvil: tampón fosfato 0.05 M (pH 7.0)/ACN (65:35, v/v); fase estacionaria: C18; detección fluorimétrica con longitud de onda de excitación/emisión de 254/372 nm; flujo: 1 mL min⁻¹) propuestas para VOR proporcionan una separación satisfactoria del resto de componentes de la muestra, con tiempos de retención satisfactorios (< 8 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- La validación completa (LLOQ, aceptabilidad de la curva de calibrado, exactitud, precisión, selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, estabilidad de VOR a corto y a largo plazo en las condiciones de almacenamiento y en el inyector automático) del método desarrollado para la determinación de VOR en muestras de plasma es conforme a los criterios de aceptación de la EMA; por tanto, es adecuado para su implementación en el laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de VOR en pacientes tratados.
- La aplicación del método desarrollado a la monitorización de VOR en plasma de 42 pacientes con trasplante hematopoyético de progenitores hematopoyéticos tratados en el Servicio de Oncohematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia reveló que no se alcanzó el objetivo prefijado para tratamiento profiláctico (C_{\min} de VOR superior a 0.5 mg L⁻¹) frente a infecciones fúngicas en 10 de ellos (23.8 %). Estos pacientes están infradosificados, lo que repercute en un peor resultado clínico aumentando el riesgo de complicaciones post-trasplante y en una mayor probabilidad de desarrollar resistencias antifúngicas. Por tanto, el método cromatográfico desarrollado y validado es muy útil para realizar un reajuste rápido de la dosificación, esencial en el caso de este tipo de pacientes.

CAPÍTULO VIII

ANTIFÚNGICOS II: CASPOFUNGINA

VIII.1.- Introducción

VIII.1.1.- Características generales

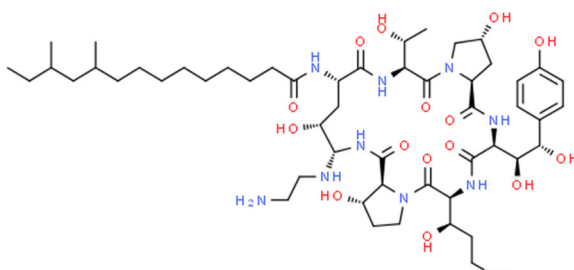
CASP es un antifúngico perteneciente al grupo de las equinocandinas (ver Tabla I.3). El desarrollo, aprobación y posterior incorporación de CASP a la terapia antimicrobiana hospitalaria en el año 2002 ha resultado de gran importancia en el tratamiento de las infecciones fúngicas en el entorno hospitalario. Las equinocandinas son un grupo de lipopéptidos semisintéticos con una estructura molecular cíclica y una masa molecular relativamente elevada (ver Tabla VIII.1). Debido a esta última característica, las equinocandinas muestran una baja absorción a nivel del tracto digestivo, por ello, se presentan únicamente como formulaciones de uso intravenoso [425].

CASP se sintetiza a partir de la neumocandina B0 por modificación de dos grupos de la región peptídica, la reducción de una amida primaria a amina y la condensación de un grupo hemiaminal con etilendiamina (ver Tabla VIII.1) [30].

VIII.1.2.- Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla VIII.1 se muestra la estructura y algunas propiedades fisicoquímicas de CASP. Como se puede observar, es un compuesto moderadamente hidrofóbico ($\log P = 1.9$). Posee en su estructura un grupo hidroxilo con un valor de pK_a de 9.8 y tres grupos amino con valores de pK_a (del ácido conjugado) de 5.0, 8.8 y 9.5; por tanto, se sólo predomina la forma neutra en un intervalo de pH muy estrecho ($9.5 \leq \text{pH} \leq 9.8$), a valores inferiores de pH menores de 9.5 se encuentra cargada positivamente y a valores de pH superiores a 9.8 presenta una carga negativa.

Tabla VIII.1.- Número registrado en el CAS, estructura química, $\log P$, pK_a y M_r de CASP.

Compuesto (Nº CAS)	Estructura	$\log P^a$	pK_a^a	M_r
CASP (162808-62-0)		1.9	5.0 ^b 8.8 ^b 9.5 ^b 9.8	1093.3

^a Valores estimados con el programa ChemAxon disponible *on-line* en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). ^b Valores correspondientes al ácido y base más fuertes, respectivamente.

VIII.1.3.- Propiedades farmacológicas

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición no competitiva de la enzima 1,3-β-D-glucano sintasa con lo que se bloquea la síntesis del 1,3-β-D-glucano, componente fundamental de la pared celular del hongo que le confiere resistencia mecánica y da forma a la célula [30]. Esta inhibición produce un efecto doble: fungistático y fungicida. El efecto fungistático bloquea la síntesis de la pared celular del hongo y reduce su crecimiento. El efecto fungicida es debido a la pérdida de integridad de la pared celular y, por tanto, de su resistencia mecánica a la presión osmótica intracelular, lo que provoca la destrucción de la pared celular con la consiguiente muerte celular.

Estudios *in vitro* también han revelado cierto efecto fungicida en las regiones terminales de la hifa fúngica, región donde se produce una mayor síntesis de pared celular y de crecimiento apical del hongo [426].

VIII.1.4.- Espectro antimicrobiano

En la Tabla VIII.2 se muestra el espectro de actividad antifúngico de CASP [427]. Como se puede observar, CASP presenta actividad fungicida frente a levaduras y hongos dimórficos como *Candida albicans*, incluidas las cepas resistentes a los antifúngicos triazoles, así como actividad fungistática frente a diferentes especies del género *Aspergillus spp.* [425, 428].

Tabla VIII.2.- Espectro de actividad antifúngico de CASP

Hongos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especies del género <i>Candida spp.</i> (<i>Candida dubliniensis</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Candida glabrata</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida parapsilosis</i>). Actividad muy limitada frente a <i>Candida krusei</i>, <i>Candida famata</i> y <i>Candida guilliermondii</i> ▪ Especies del género <i>Aspergillus spp.</i> (<i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus terreus</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Aspergillus fumigatus</i>). Actividad parcial frente a cepas resistentes a anfotericina B ▪ Especies del género <i>Scedosporium spp.</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>) ▪ <i>Blastomyces dermatitidis</i>. Actividad parcial frente a <i>Histoplasma capsulatum</i> y <i>Pneumocystis carinii</i>

VIII.1.5.- Perfil farmacocinético

Como se ha comentado anteriormente, las equinocandinas presentan una biodisponibilidad oral muy baja y, por ello, deben de ser administradas por vía intravenosa. Todas las equinocandinas presentan una buena tasa de distribución en tejidos, pero ninguna de ellas penetra bien en sistema nervioso central o a nivel

ocular, por ello, no están recomendadas como tratamiento frente a la meningitis o la endoftalmitis fúngica [386, 429].

CASP presenta una tasa de unión a proteínas plasmáticas elevada (>95 %). Aunque las equinocandinas en general no se metabolizan de manera significativa a través del citocromo P450 [256], se recomienda aumentar la dosis de CASP de 50 mg a 70 mg durante la fase de mantenimiento cuando se administra junto con inductores enzimáticos. CASP muestra una farmacocinética no lineal con aumento de la acumulación al aumentar la dosis y el tiempo en alcanzar el estado estacionario es dependiente de la dosis administrada. [430]. La metabolización de este compuesto es relativamente lenta y se basa en la rotura del anillo central y posterior hidrólisis peptídica y *N*-acilación para dar lugar a dos metabolitos inactivos a nivel hepático [431-432]. La semivida plasmática de eliminación de CASP es de 9-11 h, con una fase final adicional de 45 h de carácter no lineal y responsable de su acumulación en el tiempo. Su eliminación es baja, con valores de Cl de 10-12 mL min⁻¹. Se ha visto que un 75 % de la dosis administrada se elimina metabolizada a través de la orina (41 %) y heces (34 %) [433].

VIII.1.6.- Perfil farmacodinámico

Los ensayos *in vitro* de susceptibilidad antifúngica de CASP para especies del género *Candida spp* se han llevado a cabo con métodos de referencia estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para levaduras y hongos [434-437]. Los métodos existentes para especies del género *Aspergillus spp* presentan falta de reproducibilidad mundial por lo que todavía no existen métodos estandarizados [437]. Es importante destacar que todavía no se ha establecido una buena correlación entre los resultados de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta clínica de CASP y otras equinocandinas; además, los valores de CMI en diferentes patógenos carecen de suficiente precisión [427, 430].

Como se ha comentado anteriormente, CASP presenta una actividad fungicida frente a *Candida spp*. dependiente de la concentración [428, 438-444], incluidas también aquellas variantes susceptibles o resistentes a los antifúngicos triazólicos [443, 445]. Aunque ciertas cepas del género *Candida spp*. son más susceptibles que otras a CASP, se han visto valores de CMI inferiores a 1 mg L⁻¹ para más del 98-99% de todas las variantes aisladas de los géneros *Candida spp*. y *Aspergillus spp*. [437]. Aunque el comité EUCAST no ha establecido un valor ECOFF para especies del género *Candida spp*. frente a equinocandinas, el CLSI ha consensuado dicho valor en cifras no superiores a 2 mg L⁻¹. [256]. También hay que destacar que CASP presenta un

efecto postantibiótico *in vitro*, y que es dependiente de la concentración de fármaco empleada [446-447].

VIII.1.7.- Perfil de seguridad

En la Tabla VIII.3 se muestran los eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con CASP [448].

Tabla VIII.3.- Eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con CASP [448].

Evento adverso
<ul style="list-style-type: none">▪ Vasculares: flebitis, tromboflebitis▪ Gastrointestinales: náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea▪ Dermatológicos: erupción cutánea, rubefacción, prurito (derivados de respuesta histaminérgica)▪ Sensación de resfriado, cefalea▪ Eventos adversos de laboratorio: hipokalemia, hipoalbuminemia, aumento de niveles de enzimas hepáticas, fosfatasas alcalinas y de creatinina, aumento del valor de las proteínas en orina, hipercalcemia, leucopenia, disminución del valor de hemoglobina▪ Respiratorios: broncoespasmo▪ Anafilaxia

CASP presenta buena tolerancia en pacientes tratados [430], así la incidencia encontrada para cada uno de los eventos adversos mostrados en la Tabla VIII.3, varía entre el 0 % y el 28 % [449-454].

En cuanto a la toxicidad sobre mujeres en estado de gestación, el uso de CASP está justificado tras valoración del beneficio frente al riesgo de teratogénesis en el feto (categoría C de la FDA); aunque no se ha observado genotoxicidad o mutagenicidad, sí se ha observado toxicidad embrionaria en ratas y conejos [455].

VIII.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral descrito en el Capítulo II, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto y validación completa (aplicando criterios de conformidad de la EMA) de un método cromatográfico para la determinación de CASP en muestras de plasma utilizando una columna C18 y un detector FLD. Para la consecución de este objetivo, de modo análogo al Capítulo IV, se realiza un estudio sobre la composición de la fase móvil hidroorgánica y del tratamiento de las muestras de plasma. El método debe ser rápido y sencillo para su implementación en análisis de rutina en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Implementación del método cromatográfico en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de CASP en pacientes críticos ingresados en la UCI del hospital bajo tratamiento con este antifúngico y con el objetivo último de estimar el grado de exposición al fármaco para realizar un reajuste posológico, si procede.

VIII.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, los procedimientos seguidos para el acondicionamiento del sistema cromatográficos, para la validación del método desarrollado según las recomendaciones de la EMA, para el aseguramiento interno de la calidad y para el análisis farmacocinético, así como los programas informáticos empleados en este capítulo, se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

VIII.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles

Para la preparación de las disoluciones de CASP se empleó la especialidad farmacéutica para uso intravenoso que se indica en la Tabla VIII.4. Se prepararon diariamente disoluciones de trabajo por disolución de la cantidad adecuada de polvo en agua ultrapura, a las concentraciones indicadas en la Tabla VIII.4. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

Tabla VIII.4.- Especialidad farmacéutica, distribuidor comercial, concentración de las disoluciones de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior.

Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
Cancidas® IV 50 mg Cancidas® IV 70 mg Observaciones: Polvo para disolución concentrada para perfusión Distribuidor: Merck Sharp & Dohme B.V. (Haarlem, Países Bajos)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 5200 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 1(LLOQ), 2.5, 5, 10, 12 y 15 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 1, 2.5, 10 y 12 – Selectividad: 1 – Integridad de dilución: 20 – Efecto memoria: 15 – Estabilidad: 2.5 y 12

^a Preparación diaria

Como se puede observar en la Tabla VIII.4, se prepararon seis controles para la validación de la curva de calibrado por dilución de la disolución de trabajo en plasma de sujetos sanos. Estas concentraciones son las que se utilizaron para la construcción de las rectas de calibrado. De manera similar, se prepararon los controles empleados para la validación de la precisión, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO 17025 y ISO15189), selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, así como para la validación de la estabilidad del analito en las disoluciones de plasma y en el inyector automático. Estas concentraciones se

seleccionaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la EMA indicadas en la Tabla I.5 [246].

VIII.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa

Las especialidades farmacéuticas administradas por vía intravenosa a los pacientes en estudio se indican en la Tabla VIII.4. La disolución de CASP para perfusión intravenosa se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante por disolución del contenido de los viales en una disolución para perfusión de NaCl al 0.9 % (m/v).

VIII.3.3.- Procedimientos

VIII.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de Cancidas[®], todas las disoluciones (apartado VIII.3.2) se administraron inmediatamente tras su preparación. La pauta general de dosificación de CASP en los pacientes del estudio fue de una dosis inicial de 70 mg en las primeras 24 h, seguida de dosis posteriores de mantenimiento de 50 mg cada 24 h en pacientes de menos de 80 kg, o de 70 mg cada 24 h en pacientes de más de 80 kg. Todas las administraciones se realizaron mediante perfusiones de 60 min de duración.

Para la monitorización de CASP, una vez alcanzado el estado estacionario en la etapa de mantenimiento (día 3 desde el inicio del tratamiento), se extrajeron muestras de sangre arterial inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a las 0 h, y a las 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 24 h (C_{\min}) tras la administración de la misma. La toma de muestras se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.5.

VIII.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomaron 500 μ L de plasma y se precipitaron las proteínas por adición de 1000 μ L de ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). La mezcla resultante se agitó con un agitador vortex durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 10800 rpm durante 5 min.

VIII.3.3.3.- Condiciones cromatográficas

Para la determinación de CASP se utilizó el equipo cromatográfico de módulos integrados Waters. Se utilizó una columna C18 XBridge (150 × 4.6 d.i. mm, 5 μm) y una fase móvil compuesta por una disolución de tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (60:40, v/v). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹ y el volumen de inyección de 10 μL. Las separaciones se realizaron a temperatura ambiente. La detección fluorimétrica se efectuó a una longitud de onda de excitación de 220 nm y una longitud de onda de emisión de 304 nm.

VIII.4.- Resultados y discusión

VIII.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de CASP en muestras de plasma

VIII.4.1.1.- Composición de la fase móvil

En primer lugar, cabe destacar que, CASP presenta fluorescencia nativa, por lo que se utilizó un detector FLD para mejorar los LLOQs y, fundamentalmente, la selectividad debido a la complejidad de las muestras de plasma.

Tal y como se ha comentado en el apartado VIII.1.2, CASP es un compuesto moderadamente hidrofóbico y se encuentra en forma catiónica en todo el intervalo de pH ($\sim 3-9$) de trabajo de las fases estacionarias de sílice enlazadas. Como se puede observar en la Tabla I.4, en la bibliografía la mayoría de los métodos cromatográficos utilizan fases estacionarias C18 y fases móviles hidroorgánicas a pH ácido con ACN como modificador orgánico ($\sim 30\%$ ACN con elución isocrática) [203, 221-222, 224, 226, 230].

Por todo lo expuesto, inicialmente se prepararon distintas fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0) y ACN en proporciones variables (20-40 %, v/v). En la Figura VIII.1 se muestran los cromatogramas obtenidos.

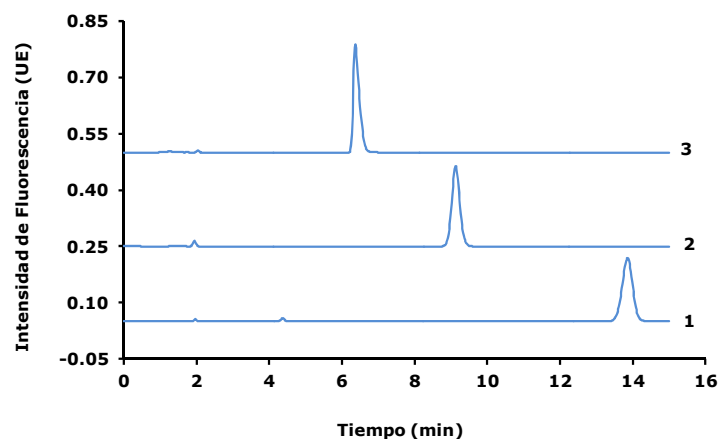


Figura VIII.1.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 50 mg L^{-1} de CASP. La composición de las fases móviles ensayadas fue: **(1)** 80:20, **(2)** 70:30 y **(3)** 60:40 tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (v/v). El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado VIII.3.3.3.

Como se puede observar en la Figura VIII.1, con las fases móviles con un contenido de ACN del 30 y 40 % (v/v) se obtuvieron valores de $t_R < 10$ min, satisfactorios para análisis de rutina. A fin de reducir el tiempo de análisis se seleccionó *a priori* para futuros estudios la fase móvil que contiene tampón fosfato 0.05 M (pH 3.0)/ACN (60:40, v/v), sin descartar la necesidad de realizar reajustes en la composición de la fase móvil debido a la complejidad de la matriz de las muestras de plasma. En las condiciones seleccionadas, se obtuvieron los siguientes parámetros cromatográficos: $t_R = 6.4$ min, $k = 2.2$ y $A/B = 1.02$.

VIII.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma

En primer lugar, se evaluó si existía retención de CASP en los filtros de jeringa. Para ello, se estudiaron filtros de diferente naturaleza (ver apartado III.1): Nylon® (0.45 μm de diámetro de poro), PTFE y PVDF (ambos de 0.22 μm de diámetro de poro). Se inyectaron disoluciones acuosas de 3.75 mg L⁻¹ de CASP antes y después de la filtración y se estimó la recuperación a partir de los valores de área de los picos cromatográficos. Los experimentos se realizaron por triplicado. En la Tabla VIII.5 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, existe una pérdida significativa de CASP en todos los filtros ensayados. Por lo que *a priori* se optó por no filtrar las muestras de plasma.

Tabla VIII.5.- Efecto de la naturaleza del filtro empleado sobre la recuperación.

Naturaleza del filtro	Recuperación (%) ^a
Nylon® (diámetro poro = 0.45 μm)	9 \pm 2
PTFE (diámetro poro = 0.22 μm)	16 \pm 3
PVDF (diámetro poro = 0.22 μm)	3.0 \pm 1.1

^a Media \pm desviación estándar de las tres réplicas realizadas

Como se indica en la Tabla I.4, de modo similar a los capítulos anteriores, para la determinación de CASP en muestras de plasma mediante RPLC para la preparación de la muestra se ha empleado fundamentalmente la precipitación de proteínas plasmáticas con MeOH, ACN, o mezclas de ACN con ácido fórmico en pequeña proporción (0.5 %, v/v) [203, 219-223, 225-226, 228-229]. En este capítulo, de modo análogo a capítulos anteriores, se ensayaron los siguientes mezclas binarias para la precipitación de proteínas: ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). Se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μL de plasma/1000 μL de reactivo precipitante). Los experimentos se realizaron por triplicado. Puesto que la disolución de inyección no se filtra se

extremaron las precauciones para tomar las alícuotas de las disoluciones sobrenadantes y evitar la inyección de partículas de precipitado.

En la Figura VIII.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para blancos de muestras de plasma sin aditivar y aditivados con 15 mg L^{-1} de CASP tras la realización de cada uno de los tratamientos indicados. Como se puede observar, si se comparan los cromatogramas de los blancos de plasma aditivados y sin aditivar, no se observa coelución de compuestos endógenos presentes en el plasma con los analitos.

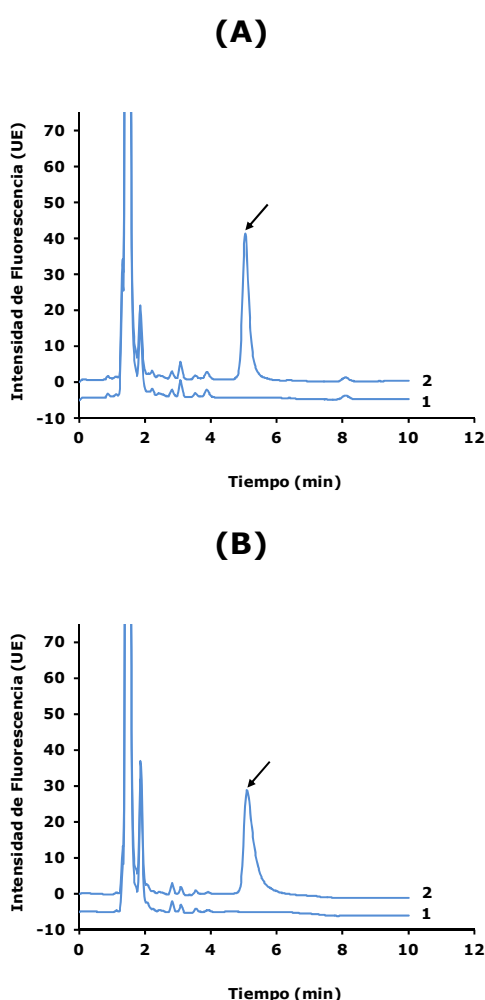


Figura VIII.2.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 15 mg L^{-1} de CASP tras los siguientes tratamientos: **(A)** precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y **(B)** con MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). Se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μL de plasma/1000 μL de reactivo precipitante). Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado VIII.3.3.3.

En la Tabla VIII.6 se muestran los valores de A/B, así como de los porcentajes de recuperación estimados a partir del cociente entre el área de pico de analito obtenida tras el tratamiento del blanco de plasma aditivado y el área de una disolución de la misma concentración de analito en agua. Como se puede observar, los valores de recuperación son similares y aceptables con ambos agentes precipitantes, si bien se obtuvieron resultados ligeramente mejores con ACN. Por otro lado, el valor de A/B obtenido con el tratamiento con MeOH es significativamente inferior a la unidad debido a la cola observada en el pico cromatográfico de CASP (ver Figura VIII.3.B). Por todo lo expuesto, se seleccionó ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) como agente precipitante.

Tabla VIII.6.- Influencia del tratamiento de las muestras de plasma sobre los valores del factor de asimetría (A/B) de los picos cromatográficos y de la recuperación de CASP.

Tratamiento	A/B	Recuperación (%) ^a
ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	0.98	98 ± 2
MeOH/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)	0.50	93.0 ± 1.5

^a Media ± desviación estándar de las tres réplicas realizadas

Durante la ejecución de todos los ensayos realizados con el tratamiento seleccionado, la presión del sistema cromatográfico se mantuvo entre los 1550-1650 psi (con un flujo de 1 mL min⁻¹) y se observó una variación máxima de 40-50 psi tras una sesión de trabajo continuo. Lo que pone de manifiesto la compatibilidad del tratamiento realizado con el sistema cromatográfico empleado.

VIII.4.2.- Validación del método desarrollado

En el apartado III.3.3 se describen los procedimientos seguidos para la validación de los métodos desarrollados según la guía de la EMA (ver Tabla I.5). En la Tabla VIII.4 se muestran los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para la validación de cada una de las características analíticas de los métodos. En el cuadro VIII.1 se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar en el cuadro VIII.1, los resultados obtenidos para los controles utilizados en la validación de todas las características analíticas son conformes a los criterios de aceptación de la EMA con lo que se pueden dar por validados los métodos analíticos propuestos para su implementación en análisis de rutina en laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Como se puede observar en la Tabla VIII.11, en el estudio de estabilidad de CASP en plasma a largo plazo, no se realizó el estudio de almacenamiento a 4 °C. Esto es debido a que en la UCI hospitalaria donde se realizaron las extracciones de las muestras no se disponía de neveras, tan sólo de congeladores. Puesto que CASP fue estable en las condiciones ensayadas, se decidió incluir en el procedimiento de trabajo el almacenamiento de todas las muestras a - 20 °C por un periodo máximo de 30 días desde su extracción. Por otro lado, puesto que CASP también fue estable en el inyector a temperatura ambiente tras el tratamiento de la muestra (ver Tabla VIII.12) se fijó en 3 h el tiempo máximo del programa de una secuencia de trabajo.

Cuadro VIII.1.- Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado para la determinación de CASP.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN INFERIOR (LLOQ)	
CONCENTRACIÓN:	<ul style="list-style-type: none"> LLOQ práctico prefijado: 1.00 mg L⁻¹ (0.33 mg L⁻¹ en la disolución de medida)
RESULTADOS:	<ul style="list-style-type: none"> Señal (LLOQ) / Señal(blanco) > 11
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (LLOQ) ≥ 5·Señal (blanco)):	SÍ ✓

LINEALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO

INTERVALO DINÁMICO LINEAL (LLOQ-ULOQ): 1.00 – 15.00 mg L⁻¹ (0.33 – 5.00 mg L⁻¹ en las disoluciones de medida)

RESULTADOS:

Tabla VIII.7.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en seis sesiones de trabajo.

Sesión	b_0	b_1 ^a	R^2 ^b
1	26390	40453	0.9991
2	6283	42169	0.9990
3	32485	41672	0.9992
4	55271	42152	0.997
5	44398	41850	0.997
6	42238	38822	0.9991

^a Diferencias en los valores de $b_1 < 10$ %. Considerado una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados (no es necesario realizar una calibración en cada sesión de trabajo si la correspondiente verificación es conforme). Se optó por preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente

^b $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017

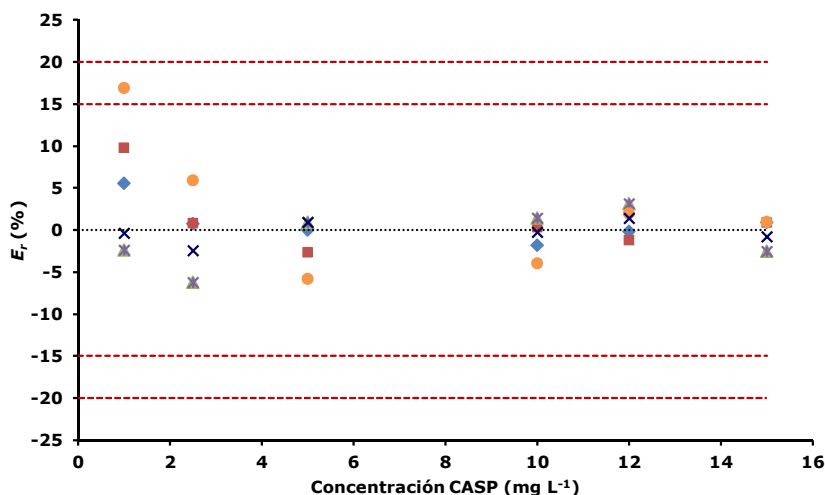


Figura VIII.3.- Valores de E_r (%) obtenidos en la validación de la aceptabilidad de la curva de calibrado para CASP en cada una de las sesiones de trabajo: (◆) sesión 1, (■) sesión 2, (▲) sesión 3, (*) sesión 4, (●) sesión 5 y (×) sesión 6. (---) Límite de aceptabilidad para los controles cuya concentración es igual al LLOQ (E_r máximo = ± 20%) y para el resto de controles (E_r máximo = ± 15%) según las recomendaciones de la EMA. Los valores de concentración de los controles se indican en la Tabla VIII.4.

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA ($E_r(\text{LLOQ}) \leq \pm 20\%$; $E_r(\text{resto}) \leq \pm 15\%$): SÍ ✓

Cuadro VIII.1.- Cont.

EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA E INTERDÍA

RESULTADOS:

Tabla VIII.8.- Evaluación de la exactitud y precisión intradía (réplicas de los controles preparados y procesados en la misma sesión de trabajo).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹					E _r , %	RSD, %
	R1	R2	R3	R4	R5		
1.00 (LLOQ)	0.98	0.97	1.10	0.97	0.91	-1.4	7.1
2.50 (QC bajo)	2.48	2.42	2.56	2.47	2.37	-1.6	2.9
10.00 (QC medio)	10.05	10.12	10.79	10.55	9.94	2.9	3.5
12.00 (QC alto)	12.06	12.46	13.09	12.46	11.90	3.3	3.7

Tabla VIII.9.- Evaluación de la exactitud y precisión interdía (controles preparados y procesados en cuatro días).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹				E _r , %	RSD, %
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
1.00 (LLOQ)	0.91	1.04	1.32	0.97	6.0	17.1
2.50 (QC bajo)	2.37	2.46	2.54	2.47	-1.6	2.8
10.00 (QC medio)	9.94	9.87	2.54	2.47	0.1	3.8
12.00 (QC alto)	11.90	12.08	12.45	12.46	1.9	2.3

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA:

- E_r (LLOQ) ≤ ±20% y E_r (resto QCs) ≤ ±15%: SÍ ✓
- RSD (LLOQ) ≤ 20% y RSD (resto QCs) ≤ 15%: SÍ ✓

SELECTIVIDAD

RESULTADOS:

- Señal (blanco^a) / Señal (LLOQ) < 0.1
- ^a Muestras de 14 pacientes hospitalizados en la UCI, ninguno de ellos bajo tratamiento con CASP pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

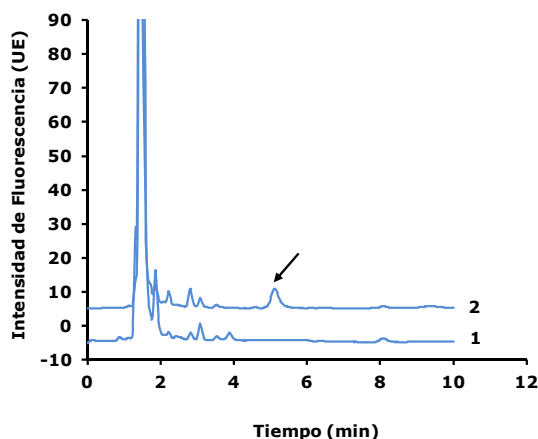


Figura VIII.4.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** un blanco de plasma de un paciente ingresado en la UCI y **(2)** de un blanco de plasma aditivado con 1.00 mg L⁻¹ de CASP. Con una flecha se identifica el pico correspondiente al analito. Ver resto de condiciones experimentales en los apartados VIII.3.3.2 y VIII.3.3.3.

COMENTARIO: en los cromatogramas de todas las muestras de pacientes no se observó ningún pico en la zona de elución de CASP ($t_R \sim 5.2$ min) que pueda interferir en su determinación.

Cuadro VIII.1.- Cont.

INTEGRIDAD DE DILUCIÓN					
RESULTADOS:					
Tabla VIII.10.- Evaluación de la integridad de dilución. Dilución ensayada: disolución analito/blanco, 1:1 (v/v).					
C inicial, mg L ⁻¹ ^a	C final, mg L ⁻¹	Réplica	Ĉ final, mg L ⁻¹	E _{rr} , %	RSD, %
20.00	10.00	1	10.03	10.4	2.9
		2	10.72		
		3	10.61		
		4	10.54		
		5	10.60		
		6	10.12		
		7	10.05		
^a Superior al ULOQ (15.00 mg L ⁻¹)					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$ y $RSD \leq 15\%$): SÍ ✓					
EFECTO MEMORIA POR ARRASTRE DE MUESTRA					
RESULTADOS:					
▪ Señal (blanco) / Señal(LLOQ) < 0.08					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓					
ESTABILIDAD					
RESULTADOS:					
Tabla VIII.11.- Evaluación de la estabilidad a largo plazo de CASP en plasma en diferentes condiciones de almacenamiento.					
nc (C, mg L ⁻¹)	Tiempo de almacenamiento, días	-20 °C			
		Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _{rr} , %		
QC bajo (2.50)	0	2.51 ± 0.07	0.4		
	30	2.44 ± 0.07	-2.4		
QC alto (12.00)	0	12.10 ± 0.10	0.8		
	30	12.09 ± 0.12	0.8		
Tabla VIII.12.- Evaluación de la estabilidad en el inyector automático de CASP tras el tratamiento de muestra desarrollado.					
nc (C, mg L ⁻¹)	Tiempo en el inyector automático, h	T ambiente			
		Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _{rr} , %		
QC bajo (2.50)	0	2.51 ± 0.08	0.4		
	3	2.56 ± 0.07	2.4		
QC alto (12.00)	0	12.3 ± 0.4	2.5		
	3	12.4 ± 0.3	3.3		
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$): SÍ ✓					

Símbolos y acrónimos: b_0 : ordenada en el origen. b_1 : pendiente. C: concentración preparada. Ĉ: concentración encontrada. E_r : error relativo. QC: control. R: réplica. R^2 : coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

VIII.4.3.- Monitorización de CASP en pacientes críticos hospitalizados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental

Tal y como se ha comentado en los capítulos anteriores, durante el análisis de muestras de plasma de pacientes críticos se realizaron actividades (verificación y control) para el aseguramiento interno de la calidad (ver apartado III.3.4).

El método cromatográfico desarrollado y validado se aplicó a la determinación de las concentraciones plasmáticas de CASP en 12 pacientes críticos ingresados en la UCI bajo tratamiento con Cancidas® (ver presentaciones, pauta posológica y tiempos de muestreo en la Tabla VIII.4 y el apartado VIII.3.3.1). No se pudieron realizar réplicas debido al escaso volumen de muestra extraído de cada paciente.

A modo ejemplo, en la Figura VIII.5 se muestran los cromatogramas obtenidos para un paciente bajo tratamiento con Cancidas® (CASP) junto con sus correspondientes controles obtenidos en la misma sesión de trabajo.

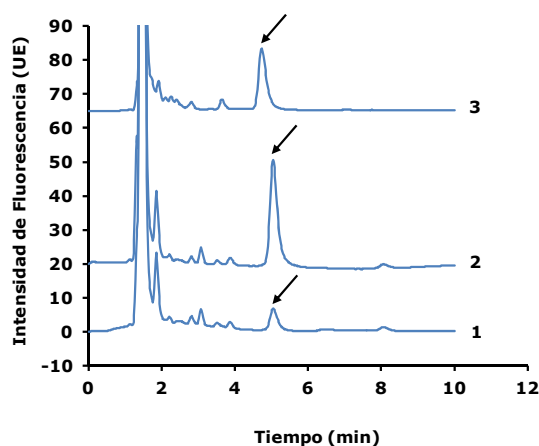


Figura VIII.5.- Cromatogramas correspondientes a la determinación de CASP en los controles **(1)** QC bajo (2.50 mg L^{-1}), **(2)** QC alto (12.00 mg L^{-1}) y **(3)** de paciente crítico (C07) ingresado en la UCI bajo tratamiento con CASP ($C_{1h} = 6.12 \text{ mg L}^{-1}$ CASP, ver Tabla VIII.13). Con una flecha se identifica el pico correspondiente a CASP. El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados VIII.3.3.2 y VIII.3.3.3, respectivamente.

En la Tabla VIII.13 se muestra, para cada paciente, la dosis administrada y los valores de concentración plasmática obtenidos para CASP.

Tabla VIII.13.- Valores de concentración plasmática de CASP obtenidos para cada uno de los pacientes en estudio bajo tratamiento con Cancidas® a distintos tiempos de muestreo (ver presentaciones, pauta posológica y tiempos de muestreo en la Tabla VIII.4 y el apartado VIII.3.3.1).

Paciente	Peso (kg)	C, mg L ⁻¹								
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h ^a
C01	65 ^b	3.09	10.85	9.34	8.55	7.51	6.38	5.63	5.00	3.47
C02	65 ^b	2.12	6.96	6.19	5.75	5.47	4.49	3.96	3.40	2.30
C03	60 ^b	2.94	8.50	8.23	7.05	6.91	6.13	5.63	5.22	3.10
C04	75 ^b	1.01	4.38	2.80	- ^d	2.43	2.12	- ^d	1.99	1.34^e
C05	75 ^b	1.50	4.59	4.44	4.41	3.85	3.77	3.04	2.80	1.59^e
C06	86 ^c	3.04	9.86	9.11	8.24	7.37	6.54	5.84	4.71	2.47
C07	75 ^b	2.10	7.09	6.12	5.27	4.96	4.13	3.54	3.10	1.63^e
C08	80 ^b	2.93	8.23	7.23	6.04	5.88	5.66	5.33	4.45	2.73
C09	88 ^c	2.18	7.81	6.69	6.03	5.72	5.32	4.55	4.49	2.27
C10	79 ^b	3.16	11.17	9.91	8.42	7.74	6.94	6.4	5.61	2.88
C11	60 ^b	2.69	10.24	8.88	8.39	7.92	6.62	6.31	6.00	4.00
C12	75 ^b	2.62	7.02	5.78	5.09	4.61	3.94	3.60	3.27	1.85^e

^a Valor utilizado como estimación de C_{mín}. Dosis inicial-mantenimiento: ^b 70-50 mg/24 h; ^c 70-70 mg/24 h. ^d No pudo extraerse la muestra. ^e Paciente para el que no se alcanza el indicador de eficacia C_{mín} ≥ CMI (CMI = 2 mg L⁻¹ para *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* [258]).

Para la estimación de la exposición al fármaco, se emplearon dos criterios propuestos en la bibliografía:

- i.- La comparación de los valores de C_{mín} obtenidos frente al valor de CMI no inferior a 2 mg L⁻¹ publicado para la utilización de equinocandinas en el tratamiento de infecciones por *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* [256].
- ii.- El criterio basado en valor del cociente AUC/CMI, ya que se considera un antimicrobiano con actividad concentración- y tiempo-dependiente [253-256].

Para aplicar el **criterio basado en la comparación C_{mín} – CMI**, se utilizó el valor de concentración plasmática obtenido a las 24 h tras la administración de una dosis en la etapa de mantenimiento (C_{mín}) (ver Tabla VIII.13). Como se puede observar en la Tabla VIII.13, para 4 (C04, C05, C07 y C12) de los 12 pacientes en

estudio mostraron valores de C_{\min} inferiores a valor objetivo de CMI de 2 mg L⁻¹ publicado para *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, [256]. Por tanto un 33 % de los pacientes críticos monitorizados bajo tratamiento con CASP, podrían estar infradosificados.

Para aplicar el **criterio basado en el cociente AUC/CMI**, los valores de AUC se estimaron a partir del análisis farmacocinético no compartimental de CASP (ver apartado III.3.5 y III.4) utilizando los valores de concentraciones plasmática indicados en la Tabla VIII.13 y los criterios descritos en el apartado III.4. Los valores objetivo de AUC/CMI se tomaron de la bibliografía para un modelo murino de candidiasis invasiva [257]. En este modelo se observó una correlación adecuada entre eficacia (efecto antifúngico equivalente a la reducción del número de colonias en 1 logaritmo) y un AUC/CMI igual o superior a 865, 450 y 1185 para *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*, respectivamente [257]. Estas especies son las de mayor relevancia por ser las responsables de la mayoría de infecciones hospitalarias en pacientes críticos. Así, en los estudios epidemiológicos multicéntricos FUNGEMYCA y CANDIPOP realizados en España recientemente se vió que del total de casos de candidemia registrados, *Candida albicans* fue la especie más frecuentemente aislada (44-45 %), seguida de *Candida parapsilosis* (24-27 %) y de *Candida glabrata* (11-13 %). [456-457].

En la Tabla VIII.14 se muestran los valores de AUC/CMI obtenidos. Para este cálculo se utilizó un valor conservador de CMI de 0.1 mg L⁻¹ [256]. Este valor de CMI es adecuado para la valoración de infecciones fúngicas por *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*. Por otro lado, la presencia de cepas de *Candida parapsilosis* o *Candida krusei*, con valores de CMI superiores, se asociaría a peores resultados clínicos. Teniendo en cuenta esto último, y que en la práctica clínica se administra de manera empírica el tratamiento antifúngico ya que es frecuente desconocer el agente infeccioso, se hace recomendable reducir la incertidumbre en el resultado mediante la utilización de pautas de dosificación adecuadas. En la Tabla VIII.14 también se indica la consecución de los valores AUC/CMI objetivo arriba indicados para cada uno de los pacientes.

Tabla VIII.14.- Valores de AUC, AUC/CMI obtenidos mediante análisis farmacocinético no compartimental y consecución cociente AUC/CMI objetivo para *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* en cada uno de los pacientes monitorizados.

Paciente	AUC (mg h L ⁻¹)	AUC/CMI ^a	Consecución AUC/CMI objetivo		
			865 (<i>Candida albicans</i>)	450 (<i>Candida glabrata</i>)	1185 (<i>Candida parapsilosis</i>)
C01	140	1400	SÍ	SÍ	SÍ
C02	88	880	SÍ	SÍ	NO
C03	124	1240	SÍ	SÍ	SÍ
C04	65	650	NO	SÍ	NO
C05	68	680	NO	SÍ	NO
C06	102	1020	SÍ	SÍ	NO
C07	66	660	NO	SÍ	NO
C08	100	1000	SÍ	SÍ	NO
C09	102	1020	SÍ	SÍ	NO
C10	121	1210	SÍ	SÍ	SÍ
C11	190	1900	SÍ	SÍ	SÍ
C12	60	600	NO	SÍ	NO

^a Valor CMI de 0.1 mg L⁻¹, tomado de Chen y cols. [256].

El análisis de los resultados mostrados en la Tabla VIII.14 revela que 8 de los 12 pacientes en estudio alcanzan concentraciones adecuadas de CASP para el tratamiento de la infección fúngica por *Candida albicans* (67 % de los pacientes monitorizados presentan un valor AUC/CMI superior a 865). Por otro lado, únicamente 4 los pacientes monitorizados presentarían concentraciones de CASP adecuadas para el tratamiento de la infección por *Candida parapsilosis* (33 % de pacientes monitorizados presentan un valor AUC/CMI superior a 1185). En el caso de infección por *Candida glabrata*, todos los pacientes en estudio presentarían concentraciones de fármaco adecuadas para su tratamiento (100 % de pacientes monitorizados presentan un valor AUC/CMI superior a 450).

Los resultados obtenidos en este apartado ponen de manifiesto que el empleo de la pauta de dosificación estándar que figura en la ficha técnica de Cancidas® podría dar lugar a una infradosificación en pacientes críticos cuando se emplean los criterios mencionados. Estos resultados son consistentes con otros estudios encontrados en la bibliografía [114, 458-462].

Muchos autores explican que el motivo de esta infradosificación podría ser la elevada variabilidad farmacocinética interindividual de CASP encontrada en este tipo de pacientes [114, 460-461], causada por una fisiopatología caracterizada por la disfunción y/o alteración de la actividad de diferentes órganos [463]. El efecto derivado de una exposición insuficiente a CASP, tiene como consecuencia una reducción de la mejoría clínica por fracaso terapéutico en el tratamiento de la

infección fúngica en pacientes críticos [257, 464-465]. También existe suficiente evidencia que muestra una relación entre la infradosificación y la aparición de resistencias a los antifúngicos empleados [466-468].

En este sentido, algunos autores han sugerido el empleo de dosis superiores a la dosis estándar, especialmente en aquellos tratamientos antifúngicos dirigidos frente a infecciones por *Candida spp.* con valores de CMI más altos y, por tanto, menos sensibles [469]. Así, estos autores inciden en la consecución una mayor exposición al fármaco, cuando se emplea una dosis de carga inicial de CASP de 100 mg cada 24 h. Martsön y col. proponen una dosis alternativa consistente en una carga inicial de CASP de 2 mg kg⁻¹ seguida de una dosis de mantenimiento de 1.25 mg kg⁻¹ que podría dar lugar a concentraciones adecuadas de CASP en un 95 % de pacientes [459]. Por otro lado, el estudio CASPOLOAD publicado recientemente recomienda la administración de una dosis de carga inicial de CASP de 140 mg cada 24 h [470]. Los autores de este estudio justifican el empleo de esta dosis de carga inicial en la consecución rápida de concentraciones adecuadas de fármaco, capaces de cubrir hasta un 90 % de las cepas de *Candida spp.*, y reduciendo la mortalidad por sepsis o choque séptico. Una de las conclusiones recogidas en el *Infectious Diseases Self-Assessment Program*, publicada por Robert y col., se fundamenta en que el empleo de una única dosificación estándar basada en la estrategia *one-dose-fits-all* (una dosis válida para todos los pacientes) podría no ser acertada por dar lugar a fenómenos de infradosificación y fracaso terapéutico en el tratamiento de la infección fúngica en pacientes críticos [41].

Por todo lo anteriormente expuesto, y en ausencia de datos de predicción clínica que permitan una optimización en la dosificación de CASP, una estrategia adecuada se basaría en la implementación de un programa de prescripción o ajuste de dosis mediante la monitorización de CASP en el paciente crítico, tal y como recomiendan numerosos autores [114, 458-460, 471], y en el estudio DALI [34].

VIII.5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos de este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento de las muestras de plasma propuesto para la determinación cromatográfica de CASP que consiste en la precipitación de las proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), y procesado sin filtrar del sobrenadante obtenido, proporciona valores de recuperación satisfactorios (> 90%) en tiempos adecuados (5 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- Las condiciones cromatográficas (fase móvil: tampón fosfato 0.05 M (pH = 3.0)/ACN (60:40, v/v); fase estacionaria: C18; detección fluorimétrica con longitud de onda de excitación/emisión de 220/304 nm; flujo: 1 mL min⁻¹) propuestas para CASP proporcionan tiempos de retención adecuados (< 6 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- La validación completa (LLOQ, aceptabilidad de la curva de calibrado, exactitud, precisión, selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, estabilidad del analito a corto y a largo plazo en las condiciones de almacenamiento y en el inyector automático) del método cromatográfico desarrollado para la determinación de CASP en muestras de plasma de pacientes críticos es conforme a los criterios de aceptación de la EMA; por tanto, es adecuado para su implementación en el laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la monitorización de CASP en pacientes críticos.
- El método desarrollado se aplicó a la monitorización de CASP en plasma de pacientes críticos ingresados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La estimación de la exposición a CASP mediante los criterios actualmente empleados en la bibliografía, comparación C_{min} – CMI y cociente AUC/CMI obtenido mediante análisis farmacocinético no compartimental, ha evidenciado un posible fenómeno de infradosificación para los pacientes que siguen la pauta de dosificación estándar de Cancidas® (CASP) empleada para el tratamiento de las infecciones fúngicas más habituales del entorno hospitalario.

CAPÍTULO IX

ANTIFÚNGICOS III: ANIDULAFUNGINA

IX.1.- Introducción

IX.1.1.- Características generales

ANI es un antifúngico perteneciente al grupo de las equinocandinas (ver Tabla I.3). Es un compuesto de origen semisintético en cuya estructura química se ha sustituido la cadena lateral de ácido linoleico, presente en la equinocandina B originaria, por una cadena lateral altamente apolar [472], basada en una estructura alcoxi-trifenílica, que permite su intercalación en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular (ver Tabla IX.1) [256, 473]. Dicha modificación estructural confiere a esta molécula un mayor V_d , una mayor actividad farmacológica y un espectro de actividad antifúngica más amplio en comparación con otras equinocandinas empleadas a nivel clínico [474].

El mecanismo de acción de ANI es el mismo que el comentado para la equinocandina CASP y otras equinocandinas en el apartado VIII.1.3 [475].

IX.1.2.- Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla IX.1 se muestra la estructura y algunas propiedades fisicoquímicas de ANI. Como se puede observar, es un compuesto moderadamente hidrofóbico ($\log P = 1.9$) y posee en su estructura un grupo hidroxilo con un valor de pK_a de 9.5, por tanto, a valores de pH inferiores a 9.5 predomina su forma neutra.

Tabla IX.1.- Número registrado en el CAS, estructura química, $\log P$, pK_a y M_r de ANI.

Compuesto (Nº CAS)	Estructura	$\log P^a$	pK_a^b	M_r
ANI (166663-25-8)		1.9	9.5	1140.2

^a Valor estimado con el programa ALOGPS 2.1 disponible on-line en <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>. ^b Valor estimado con el programa ChemAxon disponible on-line en la base de datos ChemSpider (<http://www.chemspider.com>).

IX.1.3.- Espectro antimicrobiano

En la Tabla IX.2 se muestra el espectro de actividad antifúngico de ANI [439].

Tabla IX.2.- Espectro de actividad antifúngico de ANI

Hongos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especies del género <i>Candida spp.</i> (<i>Candida dubliniensis</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Candida glabrata</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida krusei</i>). Actividad parcial frente a <i>Candida parapsilosis</i> o <i>Candida guilliermondii</i> ▪ <i>Aspergillus fumigatus</i> ▪ <i>Pneumocystis jirovecii</i>

IX.1.4.- Perfil farmacocinético

ANI presenta un perfil farmacocinético lineal para un intervalo amplio de dosis (15-130 mg cada 24 h), así como una baja variabilidad interindividual. Tras una dosis de carga inicial de 70 mg durante las primeras 24 h se alcanza el estado estacionario durante el primer día de tratamiento. Este fármaco sufre un proceso de biotransformación lento que da lugar a un derivado peptídico inactivo que se excreta a través de la bilis [476]. Desde el punto de vista clínico es importante resaltar que ANI no interacciona con las isoenzimas del citocromo P450 [476].

El perfil farmacocinético de ANI está caracterizado por una semivida de distribución rápida (0.5-1 h), y un V_d equivalente al volumen total de fluidos corporales (30-50 L). Aunque se sabe que la tasa de unión de este fármaco a las proteínas plasmáticas es alta (superior al 99 %), todavía no se han realizado estudios sobre la distribución de ANI en diferentes tejidos por lo que no existen datos sobre su penetración en fluido cerebroespinal o de difusión a través de la barrera hematoencefálica [477]. Se ha estimado el Cl de ANI en 1 L h^{-1} , con una semivida plasmática de eliminación de 24 h como fase inicial seguida de una fase terminal de unas 40–50 h. El valor medio de $C_{\text{máx}}$ y $C_{\text{mín}}$, tras una dosis estándar (una dosis de carga inicial de 200 mg cada 24 h, seguida de una dosis de mantenimiento de 100 mg cada 24 h) es de 7 mg L^{-1} y 3 mg L^{-1} , respectivamente. Aproximadamente el 30 % de la dosis administrada se elimina por heces, y de ese porcentaje un 10 % lo hace de forma inalterada. Menos del 1 % se excreta por orina, indicando un Cl renal prácticamente insignificante.

Al igual que el resto de equinocandinas, ANI presenta una baja biodisponibilidad oral (2-7 %). Por ello, su administración debe realizarse exclusivamente por vía intravenosa [474].

IX.1.5.- Perfil farmacodinámico

Al igual que con el resto de equinocandinas, y para un intervalo amplio de concentraciones, ANI presenta un efecto antifúngico dependiente de la concentración frente a muchas especies del género *Candida spp.*. Se ha observado que la eficacia antifúngica está principal y directamente correlacionada con la relación $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$, aunque también y en menor medida con AUC/CMI [255, 478-479]. ANI, al igual que en otras equinocandinas, presenta un marcado efecto postantifúngico caracterizado por un mantenimiento de la actividad farmacológica aun cuando las concentraciones de fármaco en sangre son bajas. Este efecto es directamente proporcional a la concentración plasmática de fármaco alcanzada previamente [480-481]. Teniendo en cuenta esta característica, es interesante valorar el empleo de intervalos de dosificación extendida como opción para administrar ANI [482-484].

Aunque la incidencia en la aparición de resistencias hacia los antifúngicos es por lo general poco habitual, varios autores han tratado sobre su potencial aparición en equinocandinas [485-489]. En este sentido, cobra especial importancia la mutación de los genes *FKS1* y *CDR1P*, que se han asociado a una reducción significativa de la susceptibilidad a equinocandinas así como la aparición de sistemas o bombas de expulsión de fármaco insertados en la pared celular del hongo que contribuyen a neutralizar la acción antifúngica [256, 485, 490-492].

IX.1.6.- Perfil de seguridad

Los eventos adversos encontrados en pacientes que han recibido ANI son poco frecuentes [493]. En la Tabla IX.3 se muestran los más frecuentes [493].

Tabla IX.3.- Eventos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con ANI [493].

Evento adverso
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipotensión ▪ Gastrointestinales: náuseas, vómitos y diarrea ▪ Eventos adversos de laboratorio: hipocalcemia, aumento de niveles de γ-glutamyl transferasas, aspartato aminotransferasas, fosfatasas alcalinas y de bilirrubina ▪ Respiratorios: disnea ▪ Mucosidad y mareos (durante la perfusión intravenosa)

Por lo general, se ha visto que la frecuencia en la aparición de eventos adversos es similar para todas las equinocandinas [493].

IX.2.- Objetivos

En este capítulo, para la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de un método cromatográfico para la determinación de ANI en muestras de plasma utilizando una columna C18 y detección espectrofotométrica en el UV-Vis. Para la consecución de este objetivo, de modo similar al resto de capítulos, se realiza un estudio para la selección de la composición de la fase móvil hidroorgánica y del tratamiento de las muestras de plasma. El método debe estar validado (conforme a los requerimientos de la EMA), ser rápido y sencillo para su implementación en análisis de rutina en la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Evaluación del impacto de la ECMO en la farmacocinética de ANI. Para la consecución de este objetivo se realiza un estudio del perfil farmacocinético de ANI (mediante análisis farmacocinético no compartimental) en un paciente crítico ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia bajo tratamiento con este antifúngico y sometido a ECMO.

IX.3.- Experimental

La instrumentación, los reactivos, la preparación de las disoluciones utilizadas para la preparación de las fases móviles, los procedimientos seguidos para el acondicionamiento del sistema cromatográfico, para la validación del método desarrollado según las recomendaciones de la EMA, para el aseguramiento interno de la calidad y para el análisis farmacocinético, así como los programas informáticos empleados en este capítulo, se muestran en el Capítulo III. A continuación, se muestran los detalles no descritos en dicho capítulo.

IX.3.1.- Preparación de patrones de calibración y controles

Para la preparación de las disoluciones de ANI se empleó la especialidad farmacéutica para uso intravenoso que se indica en la Tabla IX.4. Se prepararon diariamente disoluciones de trabajo por disolución de la cantidad adecuada de polvo en agua ultrapura, en las concentraciones indicadas en la Tabla IX.4. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

Tabla IX.4.- Especialidad farmacéutica, distribuidor comercial, concentración de las disoluciones de trabajo y de los controles para la validación del método. LLOQ: límite de cuantificación inferior. ULOQ: límite de cuantificación superior.

Especialidad farmacéutica	Concentración (mg L ⁻¹)
Ecalta® IV 100 mg Observaciones: polvo para disolución concentrada para perfusión Distribuidor: Pfizer Europe MA, EEIG (Bruselas, Bélgica)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disolución de trabajo: 3000 ^a ▪ Controles para la validación: <ul style="list-style-type: none"> – Curva de calibrado: 0.5(LLOQ), 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 (ULOQ) – Exactitud y precisión: 0.5, 1.5, 6 y 10 – Selectividad: 0.5 – Integridad de dilución: 13.5 – Efecto memoria: 12 – Estabilidad: 1.5 y 10

^a Preparación semanal

Como se puede observar en la Tabla IX.4, se prepararon ocho controles para la validación de la curva de calibrado por dilución de la disolución de trabajo en plasma de sujetos sanos. Estas concentraciones son las que se utilizaron para la construcción de las rectas de calibrado. De manera similar, se prepararon los controles empleados para la validación de la precisión, exactitud (veracidad en el contexto de las normas ISO 17025 y ISO15189), selectividad, integridad de dilución, efecto memoria, así como para la validación de la estabilidad del analito en las disoluciones de plasma y en el inyector automático. Estas concentraciones se

seleccionaron teniendo en cuenta las recomendaciones de la EMA indicadas en la Tabla I.5 [246].

IX.3.2.- Preparación de las disoluciones para perfusión intravenosa

La especialidad farmacéutica administrada por vía intravenosa al paciente es Ecalta® IV 100 mg (ver Tabla IX.4). Las disoluciones de ANI para perfusión intravenosa se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante por disolución del contenido de los viales en una disolución para perfusión de NaCl al 0.9 % (m/v) o dextrosa al 5 % (m/v). La concentración final de ANI fue de 770 mg L⁻¹.

IX.3.3.- Procedimientos

IX.3.3.1.- Dosificación de pacientes y tiempos de muestreo

En este capítulo se estudia un paciente (de 69 años) crítico ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia sometido a una ECMO que emplea una membrana de ventilación de polimetilpenteno (Novalung iLA Active™) a flujos de sangre y de gas de 4.5 L min⁻¹ y 4 L min⁻¹, respectivamente.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante de Ecalta®, todas las disoluciones (apartado IX.3.2) se administraron inmediatamente tras su preparación. La pauta general de dosificación de ANI en el paciente del estudio fue de una dosis de inicio de 200 mg en las primeras 24 h, seguida de dosis posteriores de mantenimiento de 100 mg cada 24 h. La administración de la medicación se realizó mediante perfusiones intravenosas de 60 min de duración.

Para la monitorización de ANI en el paciente en estudio, una vez alcanzado el estado estacionario en la etapa de mantenimiento (día 7 desde el inicio del tratamiento), se extrajeron muestras de sangre arterial previamente a la ECMO y muestras de sangre venosa posteriormente a la ECMO. Estas muestras se extrajeron inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis, es decir, a las 0 h, y a las 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 24.0 h (C_{\min}) tras la administración de la misma. La toma de muestras se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.5.

IX.3.3.2.- Tratamiento de las disoluciones de plasma

Las disoluciones de plasma (controles, blancos y muestras) se sometieron al siguiente tratamiento: en primer lugar, se tomaron 500 μL de plasma y se precipitaron las proteínas por adición de 1000 μL de ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). La mezcla resultante se agitó con un agitador vorticial durante 20 s y a continuación, se centrifugó a 10800 rpm durante 5 min.

IX.3.3.3.- Condiciones cromatográficas

Para la determinación de ANI se utilizó el equipo cromatográfico de módulos integrados Waters. Se utilizó una columna C18 XBridge (150 \times 4.6 d.i. mm, 5 μm) y una fase móvil compuesta por una disolución tampón fosfato 0.05 M (pH 3)/ACN (40:60, v/v). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL min^{-1} y el volumen de inyección de 10 μL . Las separaciones se realizaron a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. La detección espectrofotométrica se efectuó en el UV-vis a 299 nm.

IX.4.- Resultados y discusión

IX.4.1.- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de ANI en muestras de plasma

IX.4.1.1.- Composición de la fase móvil

ANI es un compuesto moderadamente hidrofóbico y se encuentra en forma no ionizada en todo el intervalo de pH de trabajo de las fases estacionarias de sílice enlazadas ($\text{pH} \sim 3\text{-}9$, ver apartado IX.1.2). Como se puede observar en la Tabla I.4, en la mayoría de los métodos cromatográficos publicados en la bibliografía para la determinación de ANI en muestras de plasma, se utilizan fases estacionarias C18 y fases móviles hidroorgánicas a valores de pH ácido con ACN como modificador orgánico [221, 224, 226, 232-234, 237, 239-241, 245].

Por todo lo expuesto, se estudió la retención y la simetría de los picos en fases móviles que contenían tampón fosfato 0.05 M ($\text{pH} 3.0$) y ACN en proporciones variables (40-60 %, v/v). En la Figura IX.1 se muestran los cromatogramas obtenidos. Como se puede observar, con todas las fases móviles ensayadas se obtuvieron valores de $t_R < 10$ min, satisfactorios para análisis de rutina. Para reducir el tiempo de análisis, se seleccionó para futuros estudios *a priori* la fase móvil que contiene tampón fosfato ($\text{pH} 3.0$)/ACN (40:60, v/v), sin descartar la necesidad de realizar reajustes en su composición debido a la complejidad de la matriz de las muestras de plasma. En las condiciones seleccionadas se obtuvieron los siguientes parámetros cromatográficos: $t_R = 6.3$ min, $k = 2.3$ y $A/B = 1.01$

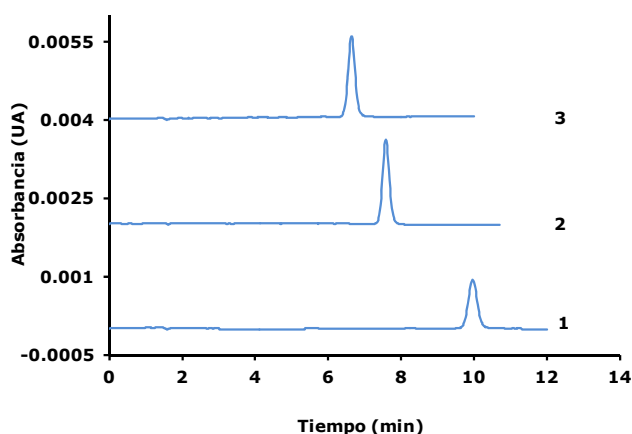


Figura IX.1.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución acuosa de 1 mg L^{-1} de ANI. La composición de las fases móviles ensayadas fue: **(1)** 60:40, **(2)** 50:50 y **(3)** 40:60 tampón fosfato 0.05 M ($\text{pH} 3.0$)/ACN (v/v). El resto de condiciones cromatográficas se indican en el apartado IX.3.3.3.

IX.4.1.2.- Tratamiento de las muestras de plasma

Antes de investigar el tratamiento de las muestras de plasma, se evaluó la posible retención de ANI en los filtros de jeringa. De modo análogo a los capítulos anteriores, se estudiaron filtros de diferente naturaleza (ver apartado III.1): Nylon® (0.45 μm de diámetro de poro), PTFE y PVDF (ambos con 0.22 μm de diámetro de poro). Se inyectaron disoluciones acuosas de 10.00 mg L⁻¹ de CASP antes y después de la filtración y se estimó la recuperación a partir de los valores de área de los picos cromatográficos. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. En la Tabla IX.5 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, existe una pérdida significativa de ANI en todos los filtros ensayados. Por lo que *a priori* se optó por no filtrar las muestras de plasma al igual que para la equinocandina CASP (ver apartado VIII.4.1.2.).

Tabla IX.5.- Efecto de la naturaleza del filtro empleado sobre la recuperación.

Naturaleza del filtro	Recuperación (%) ^a
Nylon® (diámetro poro = 0.45 μm)	40 \pm 3
PTFE (diámetro poro = 0.22 μm)	22 \pm 4
PVDF (diámetro poro = 0.22 μm)	83 \pm 6

^a Media \pm desviación estándar de las tres réplicas realizadas

Como se muestra en la Tabla I.4, de modo similar a los capítulos anteriores, en la mayoría de métodos publicados en la bibliografía para la determinación cromatográfica de ANI en muestras de plasma, para la preparación de la muestra se ha empleado fundamentalmente la precipitación de proteínas plasmáticas con ACN [225, 232, 237, 239, 241], MeOH [238, 243-245], o mezclas de uno de ellos o ambos con ácido fórmico en pequeña proporción (0.5 %, v/v) [221, 226, 233, 235, 240]. Por este motivo y teniendo esto en cuenta los buenos resultados obtenidos en capítulos anteriores con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), en el presente capítulo se ensayó también esta mezcla binaria como reactivo precipitante de proteínas plasmáticas. También de modo análogo a otros capítulos se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μL de plasma/1000 μL de reactivo precipitante). Los experimentos se realizaron por triplicado. Puesto que la disolución de inyección no se filtra, se extremaron las precauciones para tomar las alícuotas de las disoluciones sobrenadantes y evitar la inyección de partículas de precipitado.

En la Figura VIII.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para blancos de muestras de plasma sin aditivar y aditivados con 5 mg L⁻¹ de ANI tras la realización del tratamiento indicado. Como se puede observar, si se comparan los

cromatogramas de los blancos de plasma aditivados y sin aditivar, no se observa coelución de compuestos endógenos presentes en el plasma con ANI.

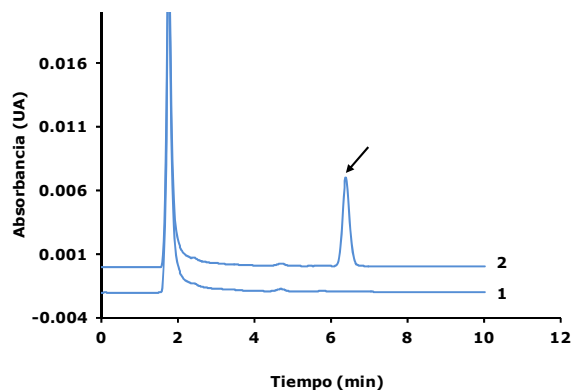


Figura IX.2.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de **(1)** blanco de plasma y **(2)** de blanco de plasma aditivado con 5 mg L⁻¹ de ANI tras la precipitación de las proteínas plasmáticas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v). Se empleó una relación muestra/reactivo 1:2 (v/v) (500 μL de plasma/1000 μL de reactivo precipitante). Las condiciones cromatográficas se indican en el apartado IX.3.3.3.

Con el tratamiento de muestra consistente en la precipitación de las proteínas plasmáticas se obtuvieron resultados satisfactorios:

- Recuperación (media ± desviación estándar de tres réplicas) = (98.2 ± 1.1)%
- A/B = 1.01

Durante la realización de todos los ensayos de este apartado, la presión del sistema cromatográfico se mantuvo ~ 1800 (con un flujo de 1 mL min⁻¹), lo que pone de manifiesto la compatibilidad del tratamiento realizado con el sistema cromatográfico empleado.

IX.4.2.- Validación del método desarrollado

En el apartado III.3.3 se describen los procedimientos seguidos para la validación de los métodos desarrollados según la guía de la EMA (ver Tabla I.5). En la Tabla IX.4 se muestran los valores de concentración de cada uno de los controles utilizados para la validación de cada una de las características analíticas de los métodos. En el cuadro IX.1 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, los resultados obtenidos para los controles utilizados en la validación de todas las características analíticas son conformes a los criterios de aceptación de la EMA con lo que se puede dar por validado el método analítico propuesto para su implementación en análisis de rutina en laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Es importante destacar que ANI fue estable en plasma hasta 7 y 30 días de almacenamiento a 4 °C y -20 °C, respectivamente (Tabla IX.10). Sin embargo, el valor de E_r obtenido a 4 °C a los 7 días fue de -14.0 %. Por todo lo expuesto, se decidió incluir en el procedimiento de trabajo el almacenamiento de las muestras extraídas a -20 °C un máximo de 30 días o a 4 °C máximo un día.

En algunos procedimientos cromatográficos publicados en la bibliografía para la determinación de ANI en muestras de plasma en los que se realiza una precipitación de las proteínas con un disolvente orgánico (ej., MeOH, EtOH o ACN), emplean sistemas automáticos de inyección con termostatación y recomiendan mantener una temperatura de 10 °C en el inyector durante un periodo máximo de 24 h. En estas condiciones se observa una degradación de ANI inferior al 10 % [221, 243]. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral, puesto que no se dispone de un inyector automático con sistema termostatación, para llevar a cabo el estudio de estabilidad de ANI en las disoluciones de la muestra tratadas, se siguió el siguiente procedimiento: se preparó una disolución a 10 mg L⁻¹ de ANI en matriz plasma y se sometió al tratamiento seleccionado. A continuación, se tomaron dos alícuotas del sobrenadante, una de ellas se almacenó a 4 °C mientras que la otra se mantuvo en el inyector automático a temperatura ambiente durante los tiempos indicados en la Tabla IX.11. Las muestras conservadas a 4 °C se mantuvieron a temperatura ambiente máximo 10 min antes de su inyección.

Como se puede observar en la Tabla IX.11, para todas las muestras almacenadas a 4 °C se obtuvieron valores de $E_r \leq \pm 1.0$ %, por tanto, éstas son estables según el criterio de conformidad de la EMA. Por el contrario, se obtuvieron valores de E_r próximos y superiores a -15 % a las 2 y 4 h, respectivamente, de almacenamiento en el inyector automático a temperatura ambiente. Por este motivo, se decidió almacenar a 4 °C las muestras tratadas por un tiempo máximo de 4 h.

Cuadro IX.1.- Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado para la determinación de ANI.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN INFERIOR (LLOQ)	
CONCENTRACIÓN:	▪ LLOQ práctico prefijado: 0.50 mg L ⁻¹ (0.17 mg L ⁻¹ en la disolución de medida)
RESULTADOS:	▪ Señal (LLOQ) / Señal(blanco) > 9
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (LLOQ) ≥ 5·Señal (blanco)): SÍ ✓	

LINEALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO

INTERVALO DINÁMICO LINEAL (LLOQ-ULOQ): 0.50 – 12.00 mg L⁻¹ (0.17 – 4.00 mg L⁻¹ en las disoluciones de medida)

RESULTADOS:

Tabla IX.6.- Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas en seis sesiones de trabajo.

Sesión	b_0	b_1 ^a	R^2 ^b
1	1682	9037	0.9994
2	952	9299	0.9997
3	959	8996	0.9996
4	1291	8879	0.9998
5	1323	8751	0.997
6	1030	8767	0.997

^a Diferencias en los valores de $b_1 < 10$ %. Considerado una indicación de una estabilidad satisfactoria por algunos laboratorios acreditados (no es necesario realizar una calibración en cada sesión de trabajo si la correspondiente verificación es conforme). Se optó por preparar calibrados en cada sesión e interpolar las señales de muestras (o controles) en la recta de la sesión correspondiente

^b $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017

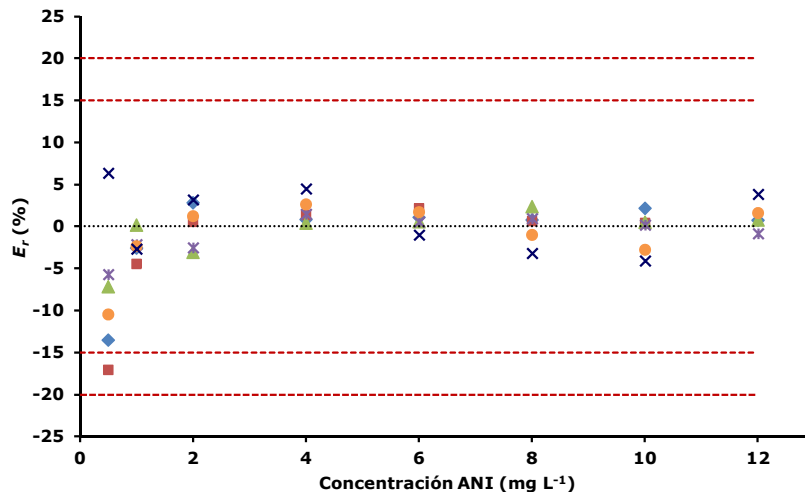


Figura IX.3.- Valores de E_r (%) obtenidos en la validación de la aceptabilidad de la curva de calibrado para ANI en cada una de las sesiones de trabajo: (♦) sesión 1, (■) sesión 2, (▲) sesión 3, (*) sesión 4, (●) sesión 5 y (×) sesión 6. (---) Límite de aceptabilidad para los controles cuya concentración es igual al LLOQ (E_r máximo = ± 20%) y para el resto de controles (E_r máximo = ± 15%) según las recomendaciones de la EMA. Los valores de concentración de los controles se indican en la Tabla IX.4.

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA ($E_r(\text{LLOQ}) \leq \pm 20\%$; $E_r(\text{resto}) \leq \pm 15\%$): SÍ ✓

Cuadro IX.1.- Cont.

EXACTITUD Y PRECISIÓN INTRADÍA E INTERDÍA

RESULTADOS:

Tabla IX.7.- Evaluación de la exactitud y precisión intradía (réplicas de los controles preparados y procesados en la misma sesión de trabajo).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹					E _r , %	RSD, %
	R1	R2	R3	R4	R5		
0.50 (LLOQ)	0.45	0.45	0.43	0.45	0.43	-11.6	2.5
1.50 (QC bajo)	1.49	1.47	1.48	1.54	1.47	-0.7	2.0
6.00 (QC medio)	6.17	6.12	6.09	6.09	6.02	1.6	0.9
10.00 (QC alto)	10.01	9.90	9.97	9.89	9.86	-0.7	0.6

Tabla IX.8.- Evaluación de la exactitud y precisión interdía (controles preparados y procesados en cuatro días).

C, mg L ⁻¹ (QC)	\hat{C} , mg L ⁻¹				E _r , %	RSD, %
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		
0.50 (LLOQ)	0.45	0.49	0.42	0.45	-9.5	6.4
1.50 (QC bajo)	1.46	1.54	1.40	1.49	-1.8	4.0
6.00 (QC medio)	6.15	6.13	6.04	6.17	2.0	0.9
10.00 (QC alto)	10.09	10.11	10.04	10.01	0.6	0.5

CONFORMIDAD CRITERIOS ACEPTACIÓN EMA:

- E_r (LLOQ) ≤ ±20% y E_r (resto QCs) ≤ ±15%: SÍ ✓
- RSD (LLOQ) ≤ 20% y RSD (resto QCs) ≤ 15%: SÍ ✓

SELECTIVIDAD

RESULTADOS:

- Señal (blanco^a) / Señal (LLOQ) < 0.12
- ^a Muestras de 17 pacientes hospitalizados en la UCI, ninguno de ellos bajo tratamiento con ANI pero que estaban recibiendo otros tratamientos concomitantes

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓

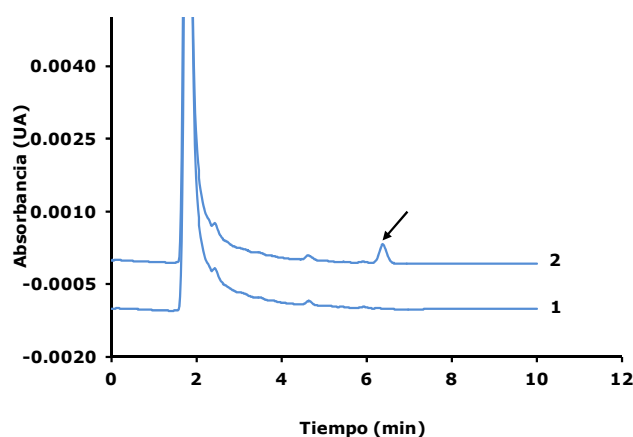


Figura IX.4.- Cromatogramas correspondientes a la inyección de una disolución de (1) un blanco de plasma de un paciente ingresado en la unidad de cuidados intensivos y (2) de blanco de plasma aditivado con 0.50 mg L⁻¹ de ANI. Con una flecha se identifica el pico correspondiente al analito. Ver resto de condiciones experimentales en los apartados IX.3.3.2 y IX.3.3.3.

COMENTARIO: en los cromatogramas de todas las muestras de pacientes no se observó ningún pico en la zona de elución de ANI (t_R ~ 6.3 min) que pueda interferir en su determinación.

Cuadro IX.1.- Cont.

INTEGRIDAD DE DILUCIÓN					
RESULTADOS:					
Tabla IX.9.- Evaluación de la integridad de dilución. Dilución ensayada: disolución analito/blanco, 1:1 (v/v).					
C inicial, mg L ⁻¹ ^a	C final, mg L ⁻¹	Réplica	Ĉ final, mg L ⁻¹	E _{rr} , %	RSD, %
13.50	6.75	1	6.78	1.0	0.5
		2	6.81		
		3	6.80		
		4	6.81		
		5	6.89		
		6	6.81		
		7	6.80		
^a Superior al ULOQ (12.00 mg L ⁻¹)					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$ y $RSD \leq 15\%$): SÍ ✓					
EFECTO MEMORIA POR ARRASTRE DE MUESTRA					
RESULTADOS:					
▪ Señal (blanco) / Señal(LLOQ) < 0.1					
CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA (Señal (blanco) ≤ 0.2·Señal (LLOQ)): SÍ ✓					
ESTABILIDAD					
RESULTADOS:					
Tabla IX.10.- Evaluación de la estabilidad a corto y largo plazo de ANI en plasma en diferentes condiciones de almacenamiento.					
n _c , C, mg L ⁻¹	Tiempo de almacenamiento, días	4 °C		-20 °C	
		Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _{rr} , %	Ĉ ± s, mg L ⁻¹	E _{rr} , %
QC bajo (1.50)	0	1.44 ± 0.08	-4.0	1.44 ± 0.08	-4.0
	1	1.37 ± 0.05	-8.7	1.38 ± 0.07	-8.0
	4	1.31 ± 0.05	-12.7	1.36 ± 0.06	-9.3
	7	1.29 ± 0.05	-14.0	1.39 ± 0.03	-7.3
	14	-	-	1.38 ± 0.04	-8.0
	30	-	-	1.39 ± 0.03	-7.3
QC alto (10.00)	0	9.9 ± 0.1	-1.0	9.90 ± 0.10	-1.0
	1	9.9 ± 0.1	-1.0	10.0 ± 0.3	0.4
	4	9.91 ± 0.07	-0.9	10 ± 0.3	-0.4
	7	9.8 ± 0.3	-2.0	9.9 ± 0.4	-1.5
	14	-	-	10 ± 0.4	-0.5
	30	-	-	10.2 ± 0.4	1.6

Cuadro IX.1.- Cont.

ESTABILIDAD (cont.)					
n_c , C, mg L ⁻¹	Tiempo de almacenamiento, h	T ambiente		4 °C ^c	
		$\hat{C} \pm s$, mg L ⁻¹	E_r , %	$\hat{C} \pm s$, mg L ⁻¹	E_r , %
QC alto ^a (10.00)	0.0	10.10 ± 0.10	-1.0	10.10 ± 0.10	1.0
	0.5	9.8 ± 0.2	-2.0	9.90 ± 0.10	-1.0
	1.0	9.3 ± 0.09	-7.0	10.10 ± 0.10	1.0
	2.0	8.70 ± 0.10	-13.0	10.10 ± 0.10	1.0
	4.0	6.2 ± 0.2	-38.0 ^b	10.0 ± 0.2	0.0

^a No se pudieron realizar los experimentos con QC bajo debido a problemas de disponibilidad
^b Valor no conforme al criterio de aceptación de la EMA ($E_r \leq \pm 15\%$)
^c Después del tratamiento de las muestras, las disoluciones se almacenaron a 4 °C a los tiempos indicados y se mantuvieron a temperatura ambiente máximo 10 min antes de su inyección

CONFORMIDAD CRITERIO ACEPTACIÓN EMA ($E_r \leq \pm 15\%$): en inyector 4 h a temperatura ambiente: NO ❌; Resto de condiciones: SÍ ✅

Símbolos y acrónimos: b_0 : ordenada en el origen. b_1 : pendiente. C: concentración preparada. \hat{C} : concentración encontrada. E_r : error relativo. QC: control. R: réplica. R^2 : coeficiente de determinación. RSD: desviación estándar relativa. ULOQ: límite de cuantificación superior.

IX.4.3.- Monitorización de ANI en un paciente crítico hospitalizado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Análisis farmacocinético no compartimental

De modo análogo a otros capítulos de esta Tesis Doctoral, simultáneamente al análisis de muestras de plasma del paciente en estudio se realizaron actividades (verificación y control) para el aseguramiento interno de la calidad de los resultados obtenidos (ver apartado III.3.4).

El método cromatográfico desarrollado y validado se aplicó a la monitorización de las concentraciones plasmáticas de ANI en un paciente crítico ingresado en la UCI sometido a una ECMO bajo tratamiento con la especialidad farmacéutica Ecalta® (ver detalles sobre la especialidad, pauta posológica y tiempos de muestreo en la Tabla IX.4 y el apartado IX.3.3.1).

En la Figura IX.5 se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido para una de las muestras del paciente bajo tratamiento con Ecalta® junto con los cromatogramas correspondientes a los controles de ANI obtenidos en la misma sesión de trabajo.

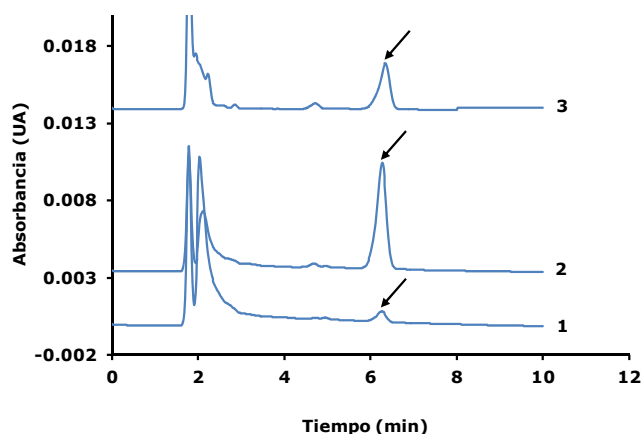


Figura IX.5.- Cromatogramas correspondientes a la determinación de ANI en los controles **(1)** QC bajo (1 mg L^{-1}), **(2)** QC alto (10 mg L^{-1}) y **(3)** de sangre arterial extraída a las 1.5 h tras la administración de Ecalta[®] al paciente crítico ingresado en la UCI en estudio ($C_{1.5 \text{ h}} = 5.6 \text{ mg L}^{-1}$ ANI, ver Tabla IX.12). Con una flecha se identifica el pico correspondiente a ANI. El tratamiento de las disoluciones de plasma y las condiciones cromatográficas se indican en los apartados IX.3.3.2 y IX.3.3.3, respectivamente.

En la Tabla IX.12 se muestra, para cada tiempo de muestreo, los valores de concentración plasmática estimados para ANI, tanto para muestras de sangre arterial y venosa. Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre los resultados correspondientes a muestras de sangre arterial y venosa extraídas al mismo tiempo tras la administración de la dosis de Ecalta[®].

Tabla IX.12.- Valor medio junto con su desviación estándar de las concentraciones plasmáticas arteriales y venosas de ANI estimadas a los distintos tiempos de muestreo para el paciente crítico en estudio sometido a ECMO.

Tiempo de muestreo, h	$C \pm s, \text{ mg L}^{-1}$	
	Arterial	Venosa
0.0	2.43 ± 0.09	2.431 ± 0.011
0.5	7.31 ± 0.12	7.44 ± 0.09
1.0	6.47 ± 0.04	6.41 ± 0.04
1.5	5.62 ± 0.11	5.70 ± 0.12
2.0	5.1^a	5.30 ± 0.09
4.0	4.32 ± 0.08	4.40 ± 0.11
6.0	4.05 ± 0.04	4.0^a
8.0	3.85 ± 0.08	3.97 ± 0.02
24.0	2.46 ± 0.09	2.19 ± 0.08

^a No se pudieron realizar réplicas debido a que no se disponía de un volumen sangre suficiente.

Se realizó un análisis farmacocinético no compartimental a partir de las concentraciones plasmáticas de ANI mostradas en la Tabla IX.12 (ver apartado III.3.5 y III.4). Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{i}n}$ se estimaron directamente del perfil concentración plasmática-tiempo (ver Figura IX.6). Los valores de AUC, Cl, semivida plasmática de eliminación y V_d (ver Tabla IX.12) se estimaron utilizando los criterios descritos en el apartado III.4. No se observaron diferencias entre los valores de AUC de sangre arterial y venosa (107 vs. 111 mg h L^{-1} , respectivamente), ni entre sus respectivas concentraciones plasmáticas (Figura IX.6). Debido a la similitud en los valores de concentración de ANI correspondientes a muestras de sangre arterial y venosa anteriormente comentada (ver Tabla IX.12 y Figura IX.6), en la Tabla IX.13 sólo se han incluido las estimaciones realizadas a partir de los datos arteriales.

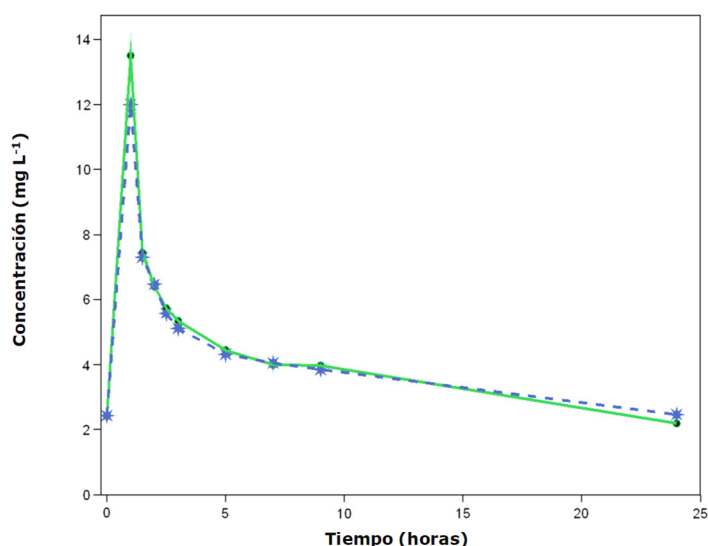


Figura IX.6.- Perfiles concentración plasmática-tiempo obtenido tras el análisis farmacocinético no compartimental de ANI: (---*---) arterial, (—) venoso.

Tabla IX.13.- Parámetros farmacocinéticos estimados tras el análisis farmacocinético no compartimental de ANI en sangre arterial en el paciente crítico monitorizado y sometido a ECMO.

V_d (L)	Cl (L h ⁻¹)	$C_{m\acute{a}x}$ (mg L ⁻¹)	$C_{m\acute{i}n}$ (mg L ⁻¹)	Semivida plasmática (h)
18.9	0.93	13.50	2.19	24

Los parámetros farmacocinéticos estimados (Tabla IX.13) son similares a los publicados en la bibliografía en pacientes críticos sometidos o no a otros tipos de técnicas de depuración extracorpórea [494]. Con respecto al empleo de terapia antimicrobiana en pacientes críticos sometidos a técnicas ECMO, existen numerosos

estudios realizados en población neonatal y/o pediátrica bajo tratamiento con antibacterianos o antifúngicos [63, 495], así como en adultos tratados con antituberculosos y antivirales [496]. Hasta la fecha, no se ha encontrado información sobre la farmacocinética de ANI en el paciente crítico adulto sometido a ECMO. En cualquier caso, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral evidencian que dada la similitud encontrada entre las concentraciones arteriales y venosas de ANI, la técnica ECMO no influye de forma significativa sobre su farmacocinética, por lo que en esta situación no sería necesario el ajuste de la pauta de dosificación estándar de Ecalta® establecida en ficha técnica. Esta conclusión es similar a la obtenida en otros trabajos de investigación con pacientes críticos sometidos a RRT en donde se ha visto que esta técnica no influye de manera significativa sobre la farmacocinética de ANI, siendo pues innecesaria la modificación de la dosis [494, 497-498]. Sin embargo, estos resultados deberían confirmarse en futuros trabajos de investigación o ensayos clínicos con un tamaño muestral suficiente.

IX.5.- Conclusiones

De los resultados obtenidos de este capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El tratamiento de las muestras de plasma propuesto para la determinación cromatográfica de ANI que consiste en la precipitación de las proteínas con ACN/ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), proporciona valores de recuperación satisfactorios ($98.2 \pm 1.1\%$) en tiempos adecuados (5 min) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- Las condiciones cromatográficas (fase móvil: tampón fosfato 0.05 M (pH = 3.0)/ACN (40:60, v/v); fase estacionaria: C18; detección UV-Vis: 299 nm; flujo: 1 mL min^{-1}) propuestas para ANI proporciona tiempos de retención adecuados ($< 7 \text{ min}$) para su implementación en análisis de rutina de un laboratorio hospitalario.
- La validación de todas las características analíticas del método cromatográfico desarrollado para la determinación de ANI en muestras de plasma es conforme a los criterios de aceptación de la EMA; por tanto, es adecuado para su implementación en el laboratorio de la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- La aplicación del método desarrollado a la monitorización de las concentraciones plasmáticas de ANI en un paciente crítico sometido a la técnica ECMO ingresado en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia y el análisis farmacocinético no compartimental de los resultados obtenidos reveló que dicho soporte extracorpóreo no influye de manera significativa sobre la farmacocinética de ANI, resultando innecesaria la modificación de la pauta de dosificación estándar de Ecalta® establecida en ficha técnica. Hasta nuestro conocimiento esta es la primera evidencia sobre el efecto de la ECMO sobre la farmacocinética de ANI. No obstante, este resultado debería confirmarse en futuros estudios.

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- Los métodos bioanalíticos desarrollados y validados para la monitorización de MER, PIP, CEF/TAZ, AMK, VOR, CASP y ANI en muestras de plasma cumplen con los requerimientos para su implementación en cualquier laboratorio del entorno clínico. Así, son sencillos, precisan de equipamiento y reactivos relativamente económicos y disponibles o al alcance de cualquier laboratorio, son rápidos (< 15 min) y presentan características analíticas ampliamente satisfactorias para su propósito.
- La aplicación de los métodos cromatográficos desarrollados para la monitorización clínica de MER, PIP, VOR y CASP en plasma de pacientes críticos ingresados en las UCI o oncohematológicos evidencia una infradosificación cuando se sigue la pauta de dosificación estándar para estos fármacos, lo que repercute en un peor resultado clínico y en una mayor probabilidad de desarrollar resistencias a los antimicrobianos. Por tanto, los métodos cromatográficos desarrollados y validados en esta Tesis Doctoral resultan muy útiles para realizar un reajuste rápido de la dosificación, esencial en el caso de este tipo de pacientes.
- Los métodos cromatográficos desarrollados para la monitorización de CEF combinado con TAZ y ANI en plasma son de utilidad para investigar la influencia de diferentes técnicas de depuración extracorpóreas sobre el perfil farmacocinético de estos fármacos. Los resultados obtenidos para CEF combinado con TAZ evidencian una notable pérdida de ambos fármacos cuando se emplea RRT, lo que justifica la modificación de la pauta de dosificación estándar. En cambio, no se han observado pérdidas significativas de ANI durante el empleo de ECMO, por lo que en este caso es innecesaria la modificación de la pauta de dosificación. Estos resultados son de carácter preliminar y deberían de confirmarse en futuros trabajos de investigación o ensayos clínicos con un tamaño muestral suficiente.

CAPÍTULO XI

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Thomson P.D., Smith D.J. What is infection? *Am. J. Surg.* 167 (1994), 7S-10S; discussion 10S-11S.
- [2] Bone R.C., Grodzin C.J., Balk R.A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112 (1997), 235-243.
- [3] Rangel-Fausto S., P.D. Costigan M, Hwang T, Davis C, Wenzel R. The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *JAMA* 273 (1996), 117-123.
- [4] Young. Síndrome de Sepsis. En Mandell, Tratado de Infectología. Panamericana 973-987 (2000).
- [5] Muckart D.J., Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit. Care Med.* 25 (1997), 1789-1795.
- [6] Edward R., Sherwood M. Current Concept of The Inflammatory response. *The American Society of Anesthesiologists.* 30. (2002), 169-184.
- [7] Vincent JI, S.Y. Singer M, et al. EPIC III Investigators: Prevalence and outcomes of infection among patients in intensive care units in 2017. *JAMA* 232 (2020), 1478-1487.
- [8] Raja-Danasekaran G., Annadurai K. Prevention of healthcare-associated infections: protecting patients, saving lives. *Int. J. Community Med. Public Health* 1 (2014), 67-68.
- [9] Zarb P., Coignard B., Griskeviciene J., Muller A., Vankerckhoven V., Weist K., Goossens M., Vaerenberg S., Hopkins S., Catry B. et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro. Surveill.* 17 (2012).
- [10] Allegranzi B. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Geneva: WHO;.(2011). Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [11] Sydnor E.R., Perl T.M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (2011), 141-173.
- [12] Bagheri Nejad S., Allegranzi B., Syed S.B., Ellis B., Pittet D. Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 89 (2011), 757-765.
- [13] Zimlichman E., Henderson D., Tamir O., Franz C., Song P., Yamin C.K., Keohane C., Denham C.R., Bates D.W. Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern. Med.* 173 (2013), 2039-2046.
- [14] Magill S.S., O'leary E., Janelle S.J., Thompson D.L., Dumyati G., Nadle J., Wilson L.E., Kainer M.A., Lynfield R., Greissman S. et al. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. *N. Engl. J. Med.* 379 (2018), 1732-1744.

- [15] Micek S.T., Schramm G., Morrow L., Frazee E., Personett H., Doherty J.A., Hampton N., Hoban A., Lieu A., McKenzie M. et al. Clostridium difficile infection: a multicenter study of epidemiology and outcomes in mechanically ventilated patients. *Crit. Care Med.* 41 (2013), 1968-1975.
- [16] Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302 (2009), 2323-2329.
- [17] Vincent J.L., Bihari D.J., Suter P.M., Bruining H.A., White J., Nicolas-Chanoin M.H., Wolff M., Spencer R.C., Hemmer M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274 (1995), 639-644.
- [18] Edwardson S., Cairns C. Nosocomial infections in the ICU. *Anaesth. Intensive Care Med.* 20 (2019), 14-18.
- [19] Garcia-Vidal C., Upton A., Kirby K.A., Marr K.A. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 47 (2008), 1041-1050.
- [20] Girmenia C., Ferretti A., Barberi W. Epidemiology and risk factors for invasive fungal diseases in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 21 (2014), 459-465.
- [21] Girmenia C., Raiola A.M., Piciocchi A., Algarotti A., Stanzani M., Cudillo L., Pecoraro C., Guidi S., Iori A.P., Montante B. et al. Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20 (2014), 872-880.
- [22] Duarte R.F., Sánchez-Ortega I., Sheppard D.C. Antifungal Prophylaxis. In *Infection Management in Hematology*. Springer Cham. (2021), 23-26.
- [23] Donnelly JP, Cordonnier C. Cuenca-Estrella M. et al. A European prospective invasive mould disease audit. In *Twenty-fourth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10-13 May 2014, Barcelona, Spain. Abstract p0028a.
- [24] Jayanthi A. Most common healthcare-associated infections: 25 bacteria, viruses causing HAIs, Becker's hospital review. (2014). Disponible en: <https://www.beckershospitalreview.com/quality/most-common-healthcare-associated-infections-25-bacteria-viruses-causing-hais.html> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [25] World Health Organization (WHO). (2002). *Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide* / editors: Ducl G., Fabry J. and Nicolle L., 2nd. ed. World Health Organization. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67350> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).

- [26] Centers For Disease Control and Prevention (CDC). (2019). Diseases and organisms in healthcare settings. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [27] Willems R.P.J., Van Dijk K., Ket J.C.F., Vandenbroucke-Grauls C. Evaluation of the Association Between Gastric Acid Suppression and Risk of Intestinal Colonization With Multidrug-Resistant Microorganisms: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 180 (2020), 561-571.
- [28] Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., Ren R., Leung K.S.M., Lau E.H.Y., Wong J.Y. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 382 (2020), 1199-1207.
- [29] Arabi Y.M., Balkhy H.H., Hayden F.G., Bouchama A., Luke T., Baillie J.K., Al-Omari A., Hajeer A.H., Senga M., Denison M.R. et al. Middle East Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 376 (2017), 584-594.
- [30] Florez J. *Farmacología Humana*. 5ª ed. Elsevier-Masson. España. 2008.
- [31] Salido F.P. Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: farmacia y sociedad* 23 (2004), 116-124.
- [32] Versporten A., Zarb P., Caniaux I., Gros M.F., Drapier N., Miller M., Jarlier V., Nathwani D., Goossens H. Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an internet-based global point prevalence survey. *Lancet Glob. Health* 6 (2018), e619-e629.
- [33] Gross B.N., Steib-Bauert M., Kern W.V., Knoth H., Borde J.P., Krebs S., Hug M.J., Rothe U., Maier L., De with K. Hospital use of systemic antifungal drugs: a multi-center surveillance update from Germany. *Infection* 43 (2015), 423-429.
- [34] Roberts J.A., Paul S.K., Akova M., Bassetti M., De Waele J.J., Dimopoulos G., Kaukonen K.M., Koulenti D., Martin C., Montravers P. et al. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current beta-lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? *Clin. Infect. Dis.* 58 (2014), 1072-1083.
- [35] You H., Dong Y., Zou Y., Zhang T., Lei J., Chen L., Wang X., Wang T. Voriconazole therapeutic drug monitoring: Factors associated with suprathereapeutic and subtherapeutic voriconazole concentrations. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 56 (2018), 239-246.
- [36] Hamada Y., Seto Y., Yago K. Kuroyama M. Investigation and threshold of optimum blood concentration of voriconazole: a descriptive statistical meta-analysis. *J. Infect. Chemother.* 18 (2012), 501-507.
- [37] Suzuki Y., Tokimatsu I., Sato Y., Kawasaki K., Goto T., Hashinaga K., Itoh H., Hiramatsu K., Kadota J. Association of sustained high plasma trough concentration of voriconazole with the incidence of hepatotoxicity. *Clin. Chim. Acta* 424 (2013), 119-122.

- [38] Matsumoto K., Ikawa K., Abematsu K., Fukunaga N., Nishida K., Fukamizu T., Shimodozono Y., Morikawa N., Takeda Y., Yamada K. Correlation between voriconazole trough plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34 (2009), 91-94.
- [39] Bruggemann R.J., Donnelly J.P., Aarnoutse R.E., Warris A., Blijlevens N.M., Mouton J.W., Verweij P.E., Burger D.M. Therapeutic drug monitoring of voriconazole. *Ther. Drug Monit.* 30 (2008), 403-411.
- [40] Roberts J.A., Abdul-Aziz M.H., Lipman J., Mouton J.W., Vinks A.A., Felton T.W., Hope W.W., Farkas A., Neely M.N., Schentag J.J. et al. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. *Lancet Infect. Dis.* 14 (2014), 498-509.
- [41] Abdul-Aziz M.H., Roberts J. PK/PD in Critical Illness. *IDSAP Book 1; ACCP: Lenexa, KS, USA.* 2009.
- [42] Taccone F.S., Laterre P.F., Dugernier T., Spapen H., Delattre I., Wittebole X., De Backer D., Layeux B., Wallemacq P., Vincent J.L. et al. Insufficient beta-lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care* 14 (2010), R126.
- [43] Goncalves-Pereira J., Pova P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of beta-lactams. *Crit. Care* 15 (2011), R206.
- [44] Chai M.G., Cotta M.O., Abdul-Aziz M.H., Roberts J.A. What Are the Current Approaches to Optimising Antimicrobial Dosing in the Intensive Care Unit?. *Pharmaceutics* 12 (2020).
- [45] Khanina A., Urbancic K.F., Haeusler G.M., Kong D.C.M., Douglas A.P., Tio S.Y., Worth L.J., Slavin M.A., Thursky K.A. Establishing essential metrics for antifungal stewardship in hospitals: the results of an international Delphi survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (2021), 253-262.
- [46] Ocampos-Martinez E., Penaccini L., Scolletta S., Abdelhadii A., Devigili A., Cianferoni S., De Backer D., Jacobs F., Cotton F., Vincent J.L. et al. Determinants of early inadequate vancomycin concentrations during continuous infusion in septic patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39 (2012), 332-337.
- [47] Hites M., Dell'anna A.M., Scolletta S., Taccone F.S. The challenges of multiple organ dysfunction syndrome and extra-corporeal circuits for drug delivery in critically ill patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 77 (2014), 12-21.
- [48] Triginer C., Fernandez R., Izquierdo I., Rello J., Benito S. Gentamicin pharmacokinetic changes related to mechanical ventilation. *DICP* 23 (1989), 923-924.
- [49] Adnan S., Li J.X., Wallis S.C., Rudd M., Jarrett P., Paterson D.L., Lipman J., Udy A.A., Roberts J.A. Pharmacokinetics of meropenem and piperacillin in critically ill patients with indwelling surgical drains. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42 (2013), 90-93.
- [50] Enokiya T., Muraki Y., Iwamoto T., Okuda M. Changes in the pharmacokinetics of teicoplanin in patients with hyperglycaemic hypoalbuminaemia: Impact of albumin glycosylation on the binding of teicoplanin to albumin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46 (2015), 164-168.

- [51] Schleibinger M., Steinbach C.L., Topper C., Kratzer A., Liebchen U., Kees F., Salzberger B., Kees M.G. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in intensive care unit patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 80 (2015), 525-533.
- [52] Falcone M., Russo A., Venditti M., Novelli A., Pai M.P. Considerations for higher doses of daptomycin in critically ill patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 57 (2013), 1568-1576.
- [53] Ulldemolins M., Roberts J.A., Wallis S.C., Rello J., Lipman J. Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010), 1771-1778.
- [54] Carrie C., Petit L., D'houvain N., Sauvage N., Cottenceau V., Lafitte M., Foumenteze C., Hisz Q., Menu D., Legeron R. et al. Association between augmented renal clearance, antibiotic exposure and clinical outcome in critically ill septic patients receiving high doses of beta-lactams administered by continuous infusion: a prospective observational study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51 (2018), 443-449.
- [55] Huttner A., Von Dach E., Renzoni A., Huttner B.D., Affaticati M., Pagani L., Daali Y., Pugin J., Karmime A., Fathi M. et al. Augmented renal clearance, low beta-lactam concentrations and clinical outcomes in the critically ill: an observational prospective cohort study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45 (2015), 385-392.
- [56] Bakke V., Sporseem H., Von Der Lippe E., Nordoy I., Lao Y., Nyrerod H.C., Sandvik L., Harvig K.R., Bugge J.F., Helset E. Vancomycin levels are frequently subtherapeutic in critically ill patients: a prospective observational study. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 61 (2017), 627-635.
- [57] Hirai K., Ihara S., Kinase A., Ikegaya K., Suzuki M., Hirano K., Itoh K. Augmented Renal Clearance in Pediatric Patients With Febrile Neutropenia Associated With Vancomycin Clearance. *Ther. Drug. Monit.* 38 (2016), 393-397.
- [58] Redl-Wenzl E.M., Armbruster C., Edelmann G., Fischl E., Kolacny M., Wechsler-Fordos A., Sporn P. The effects of norepinephrine on hemodynamics and renal function in severe septic shock states. *Intensive Care Med.* 19 (1993), 151-154.
- [59] Hoste E.A., Bagshaw S.M., Bellomo R., Cely C.M., Colman R., Cruz D.N., Edipidis K., Forni L.G., Gomersall C.D., Govil D. et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med.* 41 (2015), 1411-1423.
- [60] Jamal J.A., Udy A.A., Lipman J., Roberts J.A. The impact of variation in renal replacement therapy settings on piperacillin, meropenem, and vancomycin drug clearance in the critically ill: an analysis of published literature and dosing regimens. *Crit. Care Med.* 42 (2014), 1640-1650.
- [61] Jamal J.A., Mueller B.A., Choi G.Y., Lipman J., Roberts J.A. How can we ensure effective antibiotic dosing in critically ill patients receiving different types of renal replacement therapy? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 82 (2015), 92-103.

- [62] Cheng V., Abdul-Aziz M.H., Roberts J.A., Shekar K. Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J. Thorac. Dis.* 10 (2018), S629-S641.
- [63] Sherwin J., Heath T., Watt K. Pharmacokinetics and Dosing of Anti-infective Drugs in Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Review of the Current Literature. *Clin. Ther.* 38 (2016), 1976-1994.
- [64] Kuhn D., Metz C., Seiler F., Wehrfritz H., Roth S., Alqudrah M., Becker A., Bracht H., Wagenpfeil S., Hoffmann M. et al. Antibiotic therapeutic drug monitoring in intensive care patients treated with different modalities of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and renal replacement therapy: a prospective, observational single-center study. *Crit. Care* 24 (2020), 664.
- [65] Peterson E.L., Chittick P.J., Richardson C.L. Decreasing voriconazole requirement in a patient after extracorporeal membrane oxygenation discontinuation: A case report. *Transpl. Infect. Dis.* 23 (2021), e13545.
- [66] Roberts J.A., Kruger P., Paterson D.L., Lipman J. Antibiotic resistance--what's dosing got to do with it? *Crit. Care Med.* 36 (2008), 2433-2440.
- [67] Stamey T.A., Bragonje J. Resistance to nalidixic acid. A misconception due to underdosage. *JAMA* 236 (1976), 1857-1860.
- [68] Fantin B., Farinotti R., Thabaut A., Carbon C. Conditions for the emergence of resistance to cefpirome and ceftazidime in experimental endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33 (1994), 563-569.
- [69] Gugel J., Dos Santos Pereira A., Pignatari A.C., Gales A.C. beta-Lactam MICs correlate poorly with mutant prevention concentrations for clinical isolates of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 2276-2277.
- [70] Cassini A., Hogberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S., Colomb-Cotinat M., Kretzschmar M.E., Devleeschauwer B., Cecchini M. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19 (2019), 56-66.
- [71] Grundmann H., Glasner C., Albiger B., Aanensen D.M., Tomlinson C.T., Andrasevic A.T., Canton R., Carmeli Y., Friedrich A.W., Giske C.G. et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect. Dis.* 17 (2017), 153-163.
- [72] Luong M.L., Al-Dabbagh M., Groll A.H., Racil Z., Nannya Y., Mitsani D., Husain S. Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring: a meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016), 1786-1799.

- [73] Mitsani D., Nguyen M.H., Shields R.K., Toyoda Y., Kwak E.J., Silveira F.P., Pilewski J.M., Crespo M.M., Bermudez C., Bhamra J.K. et al. Prospective, observational study of voriconazole therapeutic drug monitoring among lung transplant recipients receiving prophylaxis: factors impacting levels of and associations between serum troughs, efficacy, and toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012), 2371-2377.
- [74] Scholz I., Oberwittler H., Riedel K.D., Burhenne J., Weiss J., Haefeli W.E. Mikus, G. Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68 (2009), 906-915.
- [75] Shi H.Y., Yan J., Zhu W.H., Yang G.P., Tan Z.R., Wu W.H., Zhou G., Chen X.P., Ouyang D.S. Effects of erythromycin on voriconazole pharmacokinetics and association with CYP2C19 polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66 (2010), 1131-1136.
- [76] Rogers T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int. J. Antimicrob. Agents* 27 Suppl 1 (2006), 7-11.
- [77] Singh G., Xess I. Antifungal Resistance: Current Concepts. *Antimicrobial Resistance* (2020), 151-163.
- [78] Eyre D.W., Sheppard A.E., Madder H., Moir I., Moroney R., Quan T.P., Griffiths D., George S., Butcher L., Morgan M. et al. A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. *N. Engl. J. Med.* 379 (2018), 1322-1331.
- [79] Spivak E.S., Hanson K.E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 56 (2018).
- [80] García-Rey C. El papel de la industria farmacéutica. ¿Por qué no se comercializan nuevos antibióticos? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 28 (2010), 45-49.
- [81] Martínez-Martínez L., Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 28 (2010), 4-9.
- [82] World Health Organization (WHO). (2001). WHO Strategy for containment of antimicrobial resistance. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66860/WHO_CDS_CSR_D_RS_2001.2.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [83] Commission for the European Communities. (2001). Proposal for a Council recommendation on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine. Disponible en: https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-06/amr_projects_3rd-report-councilrecprudent_1_0.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [84] Rhomberg P.R., Fritsche T.R., Sader H.S., Jones R.N. Antimicrobial susceptibility pattern comparisons among intensive care unit and general ward Gram-negative isolates from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program (USA). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56 (2006), 57-62.

- [85] Samtani M.N., Flamm R., Kaniga K., Nandy P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic-model-guided doripenem dosing in critically ill patients. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54 (2010), 2360-2364.
- [86] Guilhaumou R., Benaboud S., Bennis Y., Dahyot-Fizelier C., Dailly E., Gandia P., Goutelle S., Lefeuvre S., Mongardon N., Roger C. et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients-guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Societe Francaise de Pharmacologie et Therapeutique-SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Societe Francaise d'Anesthesie et Reanimation-SFAR). *Crit. Care* 23 (2019), 104.
- [87] Craig, W.A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26 (1998), 1-10; quiz 11-12.
- [88] Rhodes A., Evans L.E., Alhazzani W., Levy M.M., Antonelli M., Ferrer R., Kumar A., Sevransky J.E., Sprung C.L., Nunnally M.E. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 43 (2017), 304-377.
- [89] Phe K., Heil E.L., Tam V.H. Optimizing Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Antimicrobial Management in Patients with Sepsis: A Review. *J. Infect. Dis.* 222 (2020), S132-S141.
- [90] Wysocki M., Delatour F., Faurisson F., Rauss A., Pean Y., Misset B., Thomas F., Timsit J.F., Similowski T., Mentec H. et al. Continuous versus intermittent infusion of vancomycin in severe Staphylococcal infections: prospective multicenter randomized study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001), 2460-2467.
- [91] Abdul-Aziz M.H., Lipman J., Akova M., Bassetti M., De Waele J.J., Dimopoulos G., Dulhunty J., Kaukonen K.M., Koulenti D., Martin C. et al. Is prolonged infusion of piperacillin/tazobactam and meropenem in critically ill patients associated with improved pharmacokinetic/pharmacodynamic and patient outcomes? An observation from the Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients (DALI) cohort. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016), 196-207.
- [92] Lipman J., Brett S.J., De Waele J.J., Cotta M.O., Davis J.S., Finfer S., Glass P., Knowles S., McGuinness S., Myburgh J. et al. A protocol for a phase 3 multicentre randomised controlled trial of continuous versus intermittent beta-lactam antibiotic infusion in critically ill patients with sepsis: BLING III. *Crit. Care Resusc.* 21 (2019), 63-68.
- [93] Calvo M., García M., Martínez J., Fernández M.M., Cap. 2.12. Farmacocinética clínica. en *Farmacia Hospitalaria*. SEFH. España. 2007.
- [94] Marquet P. Le suivi thérapeutique: aspects analytiques, pharmacocinétiques et cliniques. *Acta clinica belgica, Supplementum* (1999), 2-12.
- [95] Buffington D.E., Lampasona V., Chandler M.H. Computers in pharmacokinetics. Choosing software for clinical decision making. *Clin. Pharmacokinet.* 25 (1993), 205-216.
- [96] Walton R., Dovey S., Harvey E., Freemantle N. Computer support for determining drug dose: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 318 (1999), 984-990.

- [97] Schuts E.C., Hulscher M., Mouton J.W., Verduin C.M., Stuart J., Overdiek H., Van Der Linden P.D., Natsch S., Hertogh C., Wolfs T.F.W. et al. Current evidence on hospital antimicrobial stewardship objectives: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 16 (2016), 847-856.
- [98] De Waele J.J., Carrette S., Carlier M., Stove V., Boelens J., Claeys G., Leroux-Roels I., Hoste E., Depuydt P., Decruyenaere J. et al. Therapeutic drug monitoring-based dose optimisation of piperacillin and meropenem: a randomised controlled trial. *Intensive Care Med.* 40 (2014), 380-387.
- [99] Fournier A., Eggimann P., Pagani J.L., Revelly J.P., Decosterd L.A., Marchetti O., Pannatier A., Voirol P., Que Y.A. Impact of the introduction of real-time therapeutic drug monitoring on empirical doses of carbapenems in critically ill burn patients. *Burns* 41 (2015), 956-968.
- [100] Machado A.S., Oliveira M.S., Sanches C., Silva Junior C.V.D., Gomez D.S., Gemperli R., Santos S., Levin A.S. Clinical Outcome and Antimicrobial Therapeutic Drug Monitoring for the Treatment of Infections in Acute Burn Patients. *Clin. Ther.* 39 (2017), 1649-1657 e1643.
- [101] Hayashi Y., Lipman J., Udy A.A., Ng M., Mcwhinney B., Ungerer J., Lust K., Roberts J.A. beta-Lactam therapeutic drug monitoring in the critically ill: optimising drug exposure in patients with fluctuating renal function and hypoalbuminaemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41 (2013), 162-166.
- [102] Veiga R.P., Paiva J.A. Pharmacokinetics-pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients. *Crit. Care* 22 (2018), 233.
- [103] Wenk M. Concepts for aminoglycoside serum level monitoring. *J. Antimicrob. Chemother.* 9 (1982), 168-169.
- [104] Reeves D., Lovering A., Thomson A. Therapeutic drug monitoring in the past 40 years of the *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016), 3330-3332.
- [105] Whelton A. Therapeutic initiatives for the avoidance of aminoglycoside toxicity. *J. Clin. Pharmacol.* 25 (1985), 67-81.
- [106] Nicolau D.P., Freeman C.D., Belliveau P.P., Nightingale C.H., Ross J.W., Quintiliani R. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995), 650-655.
- [107] Ariano R.E., Zelenitsky S.A., Nyhlen A., Sitar D.S. An evaluation of an optimal sampling strategy for meropenem in febrile neutropenics. *J. Clin. Pharmacol.* 45 (2005), 832-835.
- [108] Heil E.L., Nicolau D.P., Farkas A., Roberts J.A., Thom K.A. Pharmacodynamic Target Attainment for Cefepime, Meropenem, and Piperacillin-Tazobactam Using a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic-Based Dosing Calculator in Critically Ill Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018).
- [109] Wang H., Zhang B., Ni Y., Kuti J.L., Chen B., Chen M., Nicolau D.P. Pharmacodynamic target attainment of seven antimicrobials against Gram-negative bacteria collected from China in 2003 and 2004. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007), 452-457.

- [110] Vena A., Munoz P., Mateos M., Guinea J., Galar A., Pea F., Alvarez-Uria A., Escribano P., Bouza E. Therapeutic Drug Monitoring of Antifungal Drugs: Another Tool to Improve Patient Outcome? *Infect. Dis. Ther.* 9 (2020), 137-149.
- [111] Neoh C.F., Snell G.I., Kotsimbos T., Levvey B., Morrissey C.O., Slavin M.A., Stewart K., Kong D.C. Antifungal prophylaxis in lung transplantation--a worldwide survey. *Am. J. Transplant.* 11 (2011), 361-366.
- [112] Park W.B., Kim N.H., Kim K.H., Lee S.H., Nam W.S., Yoon S.H., Song K.H., Choe P.G., Kim N.J., Jang I.J. et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 55 (2012), 1080-1087.
- [113] Muilwijk E.W., Lempers V.J., Burger D.M., Warris A., Pickkers P., Aarnoutse R.E., Bruggemann R.J. Impact of special patient populations on the pharmacokinetics of echinocandins. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 13 (2015), 799-815.
- [114] Sinnollareddy M.G., Roberts J.A., Lipman J., Akova M., Bassetti M., De Waele J.J., Kaukonen K.M., Koulenti D., Martin C., Montravers P. et al. Pharmacokinetic variability and exposures of fluconazole, anidulafungin, and caspofungin in intensive care unit patients: Data from multinational Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit (DALI) patients Study. *Crit. Care* 19 (2015), 33.
- [115] Ray J., Campbell L., Rudham S., Nguyen Q., Marriott D. Posaconazole plasma concentrations in critically ill patients. *Ther. Drug Monit.* 33 (2011), 387-392.
- [116] Yi W.M., Schoeppler K.E., Jaeger J., Mueller S.W., Maclaren R., Fish D.N., Kiser T.H. Voriconazole and posaconazole therapeutic drug monitoring: a retrospective study. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16 (2017), 60.
- [117] Patterson T.F., Thompson G.R., Denning, D.W., Fishman, J.A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Nguyen, M.H. et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 63 (2016), e1-e60.
- [118] Boletín Oficial del estado (2007). Orden de 1 de Febrero de 1977 (BOE 19 de febrero de 1977), por la que se regulan los Servicios Farmacéuticos de Hospitales.
- [119] Boletín Oficial del estado (1990). Ley del Medicamento 25/1990, de 20 de Diciembre (BOE número 306, 22 de Diciembre de 1990).
- [120] Fernandez De Gatta M.D., Calvo M.V., Hernandez J.M., Caballero D., San Miguel J.F., Dominguez-Gil A. Cost-effectiveness analysis of serum vancomycin concentration monitoring in patients with hematologic malignancies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60 (1996), 332-340.
- [121] Mabilat C., Gros M.F., Nicolau D., Mouton J.W., Textoris J., Roberts J.A., Cotta M.O., Van Belkum A., Caniaux I. Diagnostic and medical needs for therapeutic drug monitoring of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39 (2020), 791-797.

- [122] Pauter K., Szultka-Mlynska M., Buszewski B. Determination and Identification of Antibiotic Drugs and Bacterial Strains in Biological Samples. *Molecules* 25 (2020).
- [123] Barqueros N.M. Capítulo 3: Aplicación de técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo primarias en Técnicas de Inmunodiagnóstico. Editorial Síntesis. España. 2018.
- [124] Stead D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747 (2000), 69-93.
- [125] Wild D. *The Immunoassay Handbook*, E., Editorial Stockton, New York, USA. 1994.
- [126] Barco S., Castagnola E., Gennai I., Barbagallo L., Loy A., Tripodi G., Cangemi G. 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.* 28 (2016), 395-402.
- [127] Tsoi V., Bhayana V., Bombassaro A.M., Tirona R.G., Kittanakom S. Falsely Elevated Vancomycin Concentrations in a Patient Not Receiving Vancomycin. *Pharmacotherapy* 39 (2019), 778-782.
- [128] Ashbee H.R., Barne, R.A., Johnson E.M., Richardson M.D., Gorton R., Hope W.W. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014), 1162-1176.
- [129] Uribe B., Gonzalez O., Ba B.B., Gaudin K., Alonso R.M. Chromatographic methods for echinocandin antifungal drugs determination in bioanalysis. *Bioanalysis* 11 (2019), 1217-1228.
- [130] Isoherranen N., Soback S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. AOAC Int.* 82 (1999), 1017-1045.
- [131] Marzo A., Dal Bo L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *J. Chromatogr. A* 812 (1998), 17-34.
- [132] Ferrari D., Ripa M., Premaschi S., Banfi G., Castagna A., Locatelli M. LC-MS/MS method for simultaneous determination of linezolid, meropenem, piperacillin and teicoplanin in human plasma samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 169 (2019), 11-18.
- [133] Magreault S., Leroux S., Touati J., Storme T., Jacqz-Aigrain E. UPLC/MS/MS assay for the simultaneous determination of seven antibiotics in human serum-Application to pediatric studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174 (2019), 256-262.
- [134] Neugebauer S., Wichmann C., Bremer-Streck S., Hagel S., Kiehntopf M. Simultaneous Quantification of Nine Antimicrobials by LC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring in Critically Ill Patients. *Ther. Drug Monit.* 41 (2019), 29-37.

- [135] Cherkashina K., Lebedinets S., Pochivalov A., Lezov A., Vakh C., Bulatov A. Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: A novel approach for sample pretreatment. *Anal. Chim. Acta* 1074 (2019), 117-122.
- [136] Zou L., Meng F., Hu L., Huang Q., Liu M., Yin T. A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of imipenem and meropenem in human plasma and its application in TDM. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 169 (2019), 142-150.
- [137] Paal M., Zoller M., Schuster C., Vogeser M., Schutze G. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC-MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 152 (2018), 102-110.
- [138] D'cunha R., Bach T., Young B.A., Li P., Nalbant D., Zhang J., Winokur P., An G. Quantification of Cefepime, Meropenem, Piperacillin, and Tazobactam in Human Plasma Using a Sensitive and Robust Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method, Part 1: Assay Development and Validation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018).
- [139] Popowicz N.D., O'halloran S.J., Fitzgerald D., Lee Y.C.G., Joyce D.A. A rapid, LC-MS/MS assay for quantification of piperacillin and tazobactam in human plasma and pleural fluid; application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 1081-1082 (2018), 58-66.
- [140] Verhoven S.M., Groszek J.J., Fissell W.H., Seegmiller A., Colby J., Patel P., Verstraete A., Shotwell M. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens. *Clin. Chim. Acta* 482 (2018), 60-64.
- [141] Naicker S., Guerra Valero Y.C., Ordenez Meija J.L., Lipman J., Roberts J.A., Wallis S.C., Parker S.L. A UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in plasma (total and unbound), urine and renal replacement therapy effluent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018), 324-333.
- [142] Abdulla A., Bahmany S., Wijma R.A., Van Der Nagel B.C.H., Koch B.C.P. Simultaneous determination of nine beta-lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1060 (2017), 138-143.
- [143] Chen F., Hu Z.Y., Laizure S.C., Hudson J.Q. Simultaneous assay of multiple antibiotics in human plasma by LC-MS/MS: importance of optimizing formic acid concentration. *Bioanalysis* 9 (2017), 469-483.
- [144] El-Najjar N., Hosl J., Holzmann T., Jantsch J., Gessner A. UPLC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of 10 antibiotics used in intensive care units. *Drug Test Anal.* 10 (2018), 584-591.
- [145] Lefeuvre S., Bois-Maublanc J., Hocqueloux L., Bret L., Francia T., Eleout-Da Violante C., Billaud E.M., Barbier F., Got L. A simple ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of 15 antibiotics in plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1065-1066 (2017), 50-58.

- [146] Rigo-Bonnin R., Ribera A., Arbiol-Roca A., Cobo-Sacristan S., Padulles A., Murillo O., Shaw E., Granada R., Perez-Fernandez X.L., Tubau F. et al. Development and validation of a measurement procedure based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of beta-lactam antibiotic concentration in human plasma. *Clin. Chim. Acta* 468 (2017), 215-224.
- [147] Martens-Lobenhoffer J., Bode-Boger S.M. Quantification of meropenem in human plasma by HILIC - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1046 (2017), 13-17.
- [148] Pinder N., Brenner T., Swoboda S., Weigand M.A., Hoppe-Tichy T. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics - Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 143 (2017), 86-93.
- [149] Roth T., Fiedler S., Mihai S., Parsch H. Determination of meropenem levels in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017).
- [150] Veillette J.J., Winans S.A., Forland S.C., Maskiewicz V.K. A simple and rapid RP-HPLC method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131 (2016), 80-86.
- [151] Legrand T., Vodovar D., Tournier N., Khoudour N., Hulin A. Simultaneous Determination of Eight beta-Lactam Antibiotics, Amoxicillin, Cefazolin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Cloxacillin, Oxacillin, and Piperacillin, in Human Plasma by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016), 4734-4742.
- [152] Carlier M., Stove V., De Waele J.J., Verstraete A.G. Ultrafast quantification of beta-lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 978-979 (2015), 89-94.
- [153] Barco S., Bandettini R., Maffia A., Tripodi G., Castagnola E., Cangemi G. Quantification of piperacillin, tazobactam, meropenem, ceftazidime, and linezolid in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chemother.* 27 (2015), 343-347.
- [154] Zander J., Maier B., Suhr A., Zoller M., Frey L., Teupser D., Vogeser M. Quantification of piperacillin, tazobactam, cefepime, meropenem, ciprofloxacin and linezolid in serum using an isotope dilution UHPLC-MS/MS method with semi-automated sample preparation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 53 (2015), 781-791.
- [155] Rigo-Bonnin R., Juvany-Roig R., Leiva-Badosa E., Sabater-Riera J., Perez-Fernandez X.L., Cardenas-Campos P., Sospedra-Martinez E., Colom H., Alia P. Measurement of meropenem concentration in different human biological fluids by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014), 4997-5007.
- [156] Casals G., Hernandez C., Hidalgo S., Morales B., Lopez-Pua Y., Castro P., Fortuna V., Martinez J.A., Brunet M. Development and validation of a UHPLC diode array detector method for meropenem quantification in human plasma. *Clin. Biochem.* 47 (2014), 223-227.

- [157] Sime F.B., Roberts M.S., Roberts J.A., Robertson T.A. Simultaneous determination of seven beta-lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 960 (2014), 134-144.
- [158] Cazorla-Reyes R., Romero-Gonzalez R., Frenich A.G., Rodriguez Maresca M.A., Martinez Vidal J.L. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014), 203-212.
- [159] Sturm A.W., Allen N., Rafferty K.D., Fish D.N., Toschlog E., Newell M., Waibel B. Pharmacokinetic analysis of piperacillin administered with tazobactam in critically ill, morbidly obese surgical patients. *Pharmacotherapy* 34 (2014), 28-35.
- [160] Wolff F., Deprez G., Seyler L., Taccone F., Hites M., Gulbis B., Vincent J.L., Jacobs F., Cotton F. Rapid quantification of six beta-lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. *Talanta* 103 (2013), 153-160.
- [161] Chaurasia B.K., Singh T.P., Varshney B., Sharma P., Iyer S.S., Khuroo A.H., Monif T. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantification of meropenem in rat plasma and its application in a preclinical dose proportionality study. *Drug Res. (Stuttg)* 64 (2014), 321-329.
- [162] Colin P., De Bock L., T'jollyn H., Boussey K., Van Bocxlaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify beta-lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* 103 (2013), 285-293.
- [163] Briscoe S.E., Mcwhinney B.C., Lipman J., Roberts J.A., Ungerer J.P. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 907 (2012), 178-184.
- [164] Carlier M., Stove V., Roberts J.A., Van De Velde E., De Waele J.J., Verstraete A.G. Quantification of seven beta-lactam antibiotics and two beta-lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40 (2012), 416-422.
- [165] Li Z., Li Q., Wang Y., Cao D., Chen C. Determination of free and total piperacillin-tazobactam in plasma by HPLC-MS-MS: an adapted method for neonates. *Chromatographia* 75 (2012), 533-539.
- [166] Dailly E., Bouquie R., Deslandes G., Jolliet P., Le Floch R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011), 1137-1142.
- [167] Verdier M.C., Tribut O., Tattevin P., Le Tulzo Y., Michelet C., Bentue-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011), 4873-4879.

- [168] Ohmori T., Suzuki A., Niwa T., Ushikoshi H., Shirai K., Yoshida S., Ogura S., Itoh Y. Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011), 1038-1042.
- [169] Cohen-Wolkowicz M., White N.R., Bridges A., Benjamin D.K., Jr. Kashuba A.D. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of six antimicrobials in plasma for pharmacokinetic studies in premature infants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011), 3497-3506.
- [170] Mcwhinney B.C., Wallis S.C., Hillister T., Roberts J.A., Lipman J., Ungerer J.P. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010), 2039-2043.
- [171] Di Giovamberardino G., Ferrannini M., Testore G.P., Federici G., Pastore A. High performance liquid chromatographic determination of plasma free and total tazobactam and piperacillin. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009), 86-88.
- [172] Kurihara Y., Kizu J., Hori S. Simple and rapid determination of serum carbapenem concentrations by high-performance liquid chromatography. *J. Infect. Chemother.* 14 (2008), 30-34.
- [173] Legrand T., Chhun S., Rey E., Blanchet B., Zahar J.R., Lanternier F., Pons G., Jullien V. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 875 (2008), 551-556.
- [174] Martens-Lobenhoffer J., Hinderhofer M., Troger U., Bode-Boger S.M. Stability of ceftolozane in human plasma and dried blood spots: Implications for transport and storage. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 103 (2020), 106692.
- [175] Putnam W.C., Kallem R.R., Edpuganti V., Subramaniyan I., Hall R.G. Development and validation of a quantitative LC-MS/MS method for the simultaneous determination of ceftolozane and tazobactam in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1159 (2020), 122354.
- [176] Rigo-Bonin R., Gomez-Junyent J., Garcia-Tejada L., Benavent E., Soldevila L., Tubau F., Murillo O. Measurement of ceftolozane and tazobactam concentrations in plasma by UHPLC-MS/MS. Clinical application in the management of difficult-to-treat osteoarticular infections. *Clin. Chim. Acta* 488 (2019), 50-60.
- [177] Kratzer A., Schiesser S., Matzneller P., Wulkersdorfer B., Zeitlinger M., Schlossmann J., Kees F., Dorn C. Determination of total and free ceftolozane and tazobactam in human plasma and interstitial fluid by HPLC-UV. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 163 (2019), 34-38.
- [178] Yu B., Adedoyin A., Hershberger E., Caro L., Xiao A., Rhee E.G., Huntington J.A. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of 3 g of Ceftolozane/Tazobactam in Healthy Adults: A Randomized, Placebo-Controlled, Multiple-Dose Study. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 7 (2018), 382-391.

- [179] Sutherland C.A., Nicolau D.P. Development of an HPLC Method for the Determination of Ceftolozane/Tazobactam in Biological and Aqueous Matrixes. *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016), 1037-1040.
- [180] Baietto L., D'avolio A., De Rosa F.G., Garazzino S., Michelazzo M., Ventimiglia G., Siccardi M., Simiele M., Sciandra M., Di Perri G. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010), 791-798.
- [181] Chang X.J., Peng J.D., Liu S.P. A Simple and Rapid High Performance Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Estimation of Amikacin in Plasma-Application to Preclinical Pharmacokinetics. *Journal of the Chinese Chemical Society* 57 (2010), 34-39.
- [182] Al-Majed A.A. A new LC method for determination of some aminoglycoside antibiotics in dosage forms and human plasma using 7-fluoro-4-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole as a fluorogenic pre-column label. *Chromatographia* 68 (2008), 927-934.
- [183] Lu C.Y., Feng C.H. Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and nanospray tandem mass spectrometry with column switching. *J. Chromatogr. A.* 1156 (2007), 249-253.
- [184] Oertel R., Neumeister V., Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004), 197-201.
- [185] Serrano J.M., Silva M. Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 843 (2006), 20-24.
- [186] Feng C., Lin S., Wu H., Chen S. Trace analysis of amikacin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 53 (2001), S213-S217.
- [187] Dijkstra J.A., Sturkenboom M.G., Hateren K., Koster R.A., Greijdanus B., Alffenaar J.W. Quantification of amikacin and kanamycin in serum using a simple and validated LC-MS/MS method. *Bioanalysis* 6 (2014), 2125-2133.
- [188] Bijleveld Y., De Haan T., Toersche J., Jorjani S., Van Der Lee J., Groenendaal F., Dijk P., Van Heijst A., Gavilanes A.W., De Jonge R. et al. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 951-952 (2014), 110-118.
- [189] Chauhan B., Jalalpure S. Analysis of amikacin in human serum by UHPLC with fluorescence detector using chloro-formate reagent with glycine. *Pharmaceutical Methods* 7 (2016), 99-103.
- [190] Maheshwari M.L., Memon N., Memon A.A., Khuhawar M.Y., Memon A.H. A rapid HPLC-DAD method for quantification of amikacin in pharmaceuticals and biological samples using pre-column derivatization with Hantzsch reagent. *Journal of the Iranian Chemical Society* 18 (2021), 611-620.

- [191] Xu R.A., Lin Q., Qiu X., Chen J., Shao Y., Hu G., Lin G. UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of imatinib, voriconazole and their metabolites concentrations in rat plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal* 166 (2019), 6-12.
- [192] Li J., Ma J., Wagar E.A., Liang D., Meng Q.H. A rapid ultra-performance LC-MS/MS assay for determination of serum unbound fraction of voriconazole in cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 486 (2018), 36-41.
- [193] Al-Ghobashy M.A., Kamal S.M., El-Sayed G.M., Attia A.K., Nagy M., Elzeiny A., Elrakaiby M.T., Nooh M.M., Abbassi M., Aziz R.K. Determination of voriconazole and co-administered drugs in plasma of pediatric cancer patients using UPLC-MS/MS: A key step towards personalized therapeutics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1092 (2018), 489-498.
- [194] Ter Avest M. Method for Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole and its Primary Metabolite Voriconazole-N-oxide in Human Serum using LC-MS/MS. *Journal of Applied Bioanalysis* 4 (2018), 114-123.
- [195] Gómez-López A., Alcazar-Fuoli L., Bernal-Martínez L. Simultaneous quantification of systemic azoles and their major metabolites in human serum by HPLC/PDA: role of azole metabolic rate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92 (2018), 78-83.
- [196] Jenkins N., Black M., Schneider H.G. Simultaneous determination of voriconazole, posaconazole, itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LCMS/MS. *Clin. Biochem.* 53 (2018), 110-115.
- [197] Muller C., Gehlen D., Blaich C., Prozeller D., Liss B., Streichert T., Wiesen M.H.J. Reliable and Easy-To-Use Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Analysis of Fluconazole, Isavuconazole, Itraconazole, Hydroxy-Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole in Human Plasma and Serum. *Ther. Drug. Monit.* 39 (2017), 505-513.
- [198] Prommas S., Puangpetch A., Jenjirattithigarn N., Chuwongwattana S., Jantararoungtong T., Koomdee N., Santon S., Chamnanphon M., Sukasem C. Development and Validation of Voriconazole Concentration by LC-MS-MS: Applied in Clinical Implementation. *J. Clin. Lab. Anal.* 31 (2017).
- [199] Wang Z., Huang C.K., Sun W., Xiao C., Wang Z.S. UPLC-MS/MS determination of voriconazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015), 188-193.
- [200] Mcshane A.J., Wang S. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantitation of 5 azole antifungals and 1 active metabolite. *Clin. Chim. Acta* 474 (2017), 8-13.
- [201] Basu S.S., Petrides A., Mason D.S., Jarolim P. A rapid UPLC-MS/MS assay for the simultaneous measurement of fluconazole, voriconazole, posaconazole, itraconazole, and hydroxyitraconazole concentrations in serum. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (2017), 836-844.

- [202] Fatiguso G., Favata F., Zedda I., De Nicolo A., Cusato J., Avataneo V., Di Perri G., D'avolio A. A simple high performance liquid chromatography-mass spectrometry method for Therapeutic Drug Monitoring of isavuconazole and four other antifungal drugs in human plasma samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145 (2017), 718-724.
- [203] Toussaint B., Lanternier F., Woloch C., Fournier D., Launay M., Billaud E., Dannaoui E., Lortholary O., Jullien V. An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1046 (2017), 26-33.
- [204] Tang P.H. Drug Monitoring and Toxicology: Quantification of Antifungal Drug Voriconazole in Human Plasma and Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Global Journals Inc.(USA)* 17 (2017), 1-10.
- [205] Siopi M., Neroutsos E., Zisaki K., Gamaletsou M., Pirounaki M., Tsirigotis P., Sipsas N., Dokoumetzidis A., Goussetis E., Zerva L. et al. Bioassay for Determining Voriconazole Serum Levels in Patients Receiving Combination Therapy with Echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016), 632-636.
- [206] Mak J., Sujishi K.K., French D. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay to quantify serum voriconazole. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 986-987 (2015), 94-99.
- [207] Mistretta V., Dubois N., Denooz R., Charlier C. Simultaneous determination of seven azole antifungal drugs in serum by ultra-high pressure liquid chromatography and diode array detection. *Acta Clin. Belg.* 69 (2014), 53-61.
- [208] Xiong X., Zhai S., Duan J. Validation of a fast and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with atmospheric pressure chemical ionization method for simultaneous quantitation of voriconazole, itraconazole and its active metabolite hydroxyitraconazole in human plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013), 339-346.
- [209] Jourdil J.F., Tonini J., Stanke-Labesque F. Simultaneous quantitation of azole antifungals, antibiotics, imatinib, and raltegravir in human plasma by two-dimensional high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 919-920 (2013), 1-9.
- [210] Lin D., Li G., Chen L. Determination of voriconazole in human plasma by HPLC-ESI-MS and application to pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013), 485-489.
- [211] Cendejas-Bueno E., Rodriguez-Tudela J.L., Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A. Development and validation of a fast HPLC/photodiode array detection method for the measurement of voriconazole in human serum samples. A reference laboratory experience. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31 (2013), 23-28.

- [212] Wissen C.P., Burger D.M., Verweij P.E., Aarnoutse R.E., Bruggemann R.J. Simultaneous determination of the azoles voriconazole, posaconazole, isavuconazole, itraconazole and its metabolite hydroxy-itraconazole in human plasma by reversed phase ultra-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 887-888 (2012), 79-84.
- [213] Yamada T., Mino Y., Yagi T., Naito T., Kawakami J. Rapid simultaneous determination of voriconazole and its N-oxide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography method and its clinical application. *Clin. Biochem.* 45 (2012), 134-138.
- [214] Beste K.Y., Burkhardt O., Kaever V. Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma. *Clin. Chim. Acta* 413 (2012), 240-245.
- [215] Pauwels S., Vermeersch P., Van Eldere J., Desmet K. Fast and simple LC-MS/MS method for quantifying plasma voriconazole. *Clin. Chim. Acta* 413 (2012), 740-743.
- [216] Couchman L., Buckner S.L., Morgan P.E., Ceesay M.M., Pagliuca A., Flanagan R.J. An automated method for the simultaneous measurement of azole antifungal drugs in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012), 513-523.
- [217] Baietto L., D'avolio A., Marra C., Simiele M., Cusato J., Pace S., Ariaudo A., De Rosa F.G., Di Perri G. Development and validation of a new method to simultaneously quantify triazoles in plasma spotted on dry sample spot devices and analysed by HPLC-MS. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012), 2645-2649.
- [218] Michael C., Teichert J., Preiss R. Determination of voriconazole in human plasma and saliva using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 865 (2008), 74-80.
- [219] Cheng X., Liu K., Liu Y., Wang M., Ma Y. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of caspofungin in dried blood spots. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018), 1068-1074.
- [220] Hosl J., Gessner A., El-Najjar N. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of moxifloxacin, ciprofloxacin, daptomycin, caspofungin, and isavuconazole in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 157 (2018), 92-99.
- [221] Ventura M., Michelini R., Decembrino N., Molinaro M., Zecca M., De Gregori S. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of caspofungin, anidulafungin and micafungin in human plasma for feasible applications in pediatric haematology/oncology. *Chromatographia* 80 (2017), 1035-1045.
- [222] Soda M., Shibata Y., Yasue M., Fujimura M., Takahashi H., Nakamura S. Simple HPLC method for the determination of caspofungin in human plasma. *Clin. Pharmacol. Biopharm.* 4 (2015), 2.

- [223] Yang Q., Wang T., Xie J., Chen L., Wang Y., Cheng X., Dong H., Dong W., Wei Y., Wang X. A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for monitoring the caspofungin trough plasma concentration and its association with caspofungin efficacy in intensive-care-unit patients. *Rsc. Advances* 5 (2015), 104806-104814.
- [224] Arendrup M.C., Perlin D.S., Jensen R.H., Howard S.J., Goodwin J., Hope W. Differential in vivo activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without FKS resistance mutations. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56 (2012), 2435-2442.
- [225] Farowski F., Cornely O.A., Vehreschild J.J., Hartmann P., Bauer T., Steinbach A., Ruping M.J., Muller C. Quantitation of azoles and echinocandins in compartments of peripheral blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54 (2010), 1815-1819.
- [226] Decosterd L.A., Rochat B., Pesse B., Mercier T., Tissot F., Widmer N., Bille J., Calandra T., Zanolari B., Marchetti O. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide, anidulafungin, and caspofungin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54 (2010), 5303-5315.
- [227] Goldblum D., Fausch K., Frueh B.E., Theurillat R., Thormann W., Zimmerli S. Ocular penetration of caspofungin in a rabbit uveitis model. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245 (2007), 825-833.
- [228] Rochat B., Bolay S., Pascual A., Calandra T., Marchetti O. Liquid chromatography-mass spectrometry method for quantification of caspofungin in clinical plasma samples. *J. Mass. Spectrom.* 42 (2007), 440-449.
- [229] Traummüller F., Steiner I., Zeitlinger M., Joukhadar C. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of caspofungin with amperometric detection and its application to in vitro microdialysis experiments. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 843 (2006), 142-146.
- [230] Bi S., Schwartz M., Desai R., Miller A., Matuszewski B. A semi-automated procedure for the determination of caspofungin in human plasma using solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection using secondary ionic interactions to obtain a highly purified extract. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 28 (2005), 2895-2908.
- [231] Egle H., Trittler R., Kummerer K. An advanced double column-switching technique (LC-LC) for liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry for fully automated analysis of caspofungin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004), 2871-2877.
- [232] Welte R., Eller P., Lorenz I., Joannidis M., Bellmann R. Anidulafungin Pharmacokinetics in Ascites Fluid and Pleural Effusion of Critically Ill Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018).
- [233] Wasmann R.E., Ter Heine R., Van Dongen E.P., Burger D.M., Lempers V.J., Knibbe C.A., Bruggemann R.J. Pharmacokinetics of Anidulafungin in Obese and Normal-Weight Adults. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 62 (2018).

- [234] Kolbinger P., Gruber M., Roth G., Graf B.M., Ittner K.P. Filter Adsorption of Anidulafungin to a Polysulfone-Based Hemofilter During CVVHD In Vitro. *Artif. Organs* 42 (2018), 200-207.
- [235] Dupont H., Massias L., Jung B., Ammenouche N., Montravers P. Pharmacokinetic study of anidulafungin in ICU patients with intra-abdominal candidiasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (2017), 1429-1432.
- [236] Dowell J.A., Stogniew M., Krause D., Damle B. Anidulafungin does not require dosage adjustment in subjects with varying degrees of hepatic or renal impairment. *J. Clin. Pharmacol.* 47 (2007), 461-470.
- [237] Livermore J.L., Felton T.W., Abbott J., Sharp A., Goodwin J., Gregson L., Warn P.A., Howard S.J., Hope W.W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anidulafungin for experimental *Candida endophthalmitis*: insights into the utility of echinocandins for treatment of a potentially sight-threatening infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 281-288.
- [238] Alebic-Kolbah T., Modesitt M.S. Anidulafungin--challenges in development and validation of an LC-MS/MS bioanalytical method validated for regulated clinical studies. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012), 2043-2055.
- [239] Jeans A.R., Howard S.J., Al-Nakeeb Z., Goodwin J., Gregson L., Warn P.A., Hope W.W. Combination of voriconazole and anidulafungin for treatment of triazole-resistant *aspergillus fumigatus* in an in vitro model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012), 5180-5185.
- [240] Henry H., Sobhi H.R., Scheibner O., Bromirski M., Nimkar S.B., Rochat B. Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (2012), 499-509.
- [241] Martens-Lobenhoffer J., Rupprecht V., Bode-Böger S.M. Determination of micafungin and anidulafungin in human plasma: UV-or mass spectrometric quantification? *Journal of Chromatography B* 879 (2011), 2051-2056.
- [242] Burhenne H., Kielstein J.T., Burkhardt O., Kaefer V. Quantitative analysis of the antifungal drug anidulafungin by LC-online SPE-MS/MS in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012), 681-683.
- [243] Sutherland C.A., Nicolau D.P., Kuti J.L. Development of an HPLC method for the determination of anidulafungin in human plasma and saline. *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011), 397-400.
- [244] Leitner J.M., Meyer B., Fuhrmann V., Saria K., Zuba C., Jager W., Bohmdorfer M., Thalhammer F. Multiple-dose pharmacokinetics of anidulafungin during continuous venovenous haemofiltration. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011), 880-884.
- [245] Crandon J.L., Banevicius M.A., Fang A.F., Crownover P.H., Knauff R.F., Pope J.S., Russomanno J.H., Shore E., Nicolau D.P., Kuti J.L. Bronchopulmonary disposition of intravenous voriconazole and anidulafungin given in combination to healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009), 5102-5107.

- [246] European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2011). Guideline on Bioanalytical Method Validation. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [247] Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and/or Center for Veterinary Medicine (CVM). (2013). Guidance for industry: bioanalytical method validation. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [248] Cockcroft D.W., Gault M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16 (1976), 31-41.
- [249] Zaera S., Hermida J., Tutor J.C. Effect of analytical inaccuracy on dose adjustment for vancomycin, amikacin, and tobramycin using the Abbottbase Pharmacokinetic Systems. *Ther. Drug Monit.* 24 (2002), 696-700.
- [250] Abdul-Aziz M.H., Dulhunty J.M., Bellomo R., Lipman J., Roberts J.A. Continuous beta-lactam infusion in critically ill patients: the clinical evidence. *Ann. Intensive Care* 2 (2012), 37.
- [251] Pilmis B., Jullien V., Tabah A., Zahar J.R., Brun-Buisson C. Piperacillin-tazobactam as alternative to carbapenems for ICU patients. *Ann. Intensive Care* 7 (2017), 113.
- [252] Mellinshoff S.C., Panse J., Alakel N., Behre G., Buchheidt D., Christopeit M., Hasenkamp J., Kiehl M., Koldehoff M., Krause S.W. et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann. Hematol.* 97 (2018), 197-207.
- [253] Andes D., Diekema D.J., Pfaller M.A., Bohrmuller J., Marchillo K., Lepak A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010), 2497-2506.
- [254] Theuretzbacher U. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of echinocandins. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23 (2004), 805-812.
- [255] Pound M.W., Townsend M.L., Drew R.H. Echinocandin pharmacodynamics: review and clinical implications. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010), 1108-1118.
- [256] Chen S.C., Slavin M.A., Sorrell T.C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 71 (2011), 11-41.
- [257] Andes D., Ambrose P.G., Hammel J.P., Van Wart S.A., Iyer V., Reynolds D.K., Buell D.N., Kovanda L.L., Bhavnani S.M. Use of pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses to optimize therapy with the systemic antifungal micafungin for invasive candidiasis or candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011), 2113-2121.

- [258] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2021). Eucast Rationale Documents. Disponible en: https://www.eucast.org/publications_and_documents/consultations (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [259] Albers-Schoenberg G., Arison B.H., Hensens O.D., Hirshfield J., Hoogsteen K., Kaczka E.A., Rhodes R.E., Kahan J.S., Kahan F.M. Structure and absolute configuration of thienamycin. *Journal of the American Chemical Society* 100 (1978), 6491-6499.
- [260] Kahan J.S., Kahan F.M., Goegelman R., Currie S.A., Jackson M., Stapley E.O., Miller T.W., Miller A.K., Hendlin D., Mochales S. et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* 32 (1979), 1-12.
- [261] Leanza W.J., Wildonger K.J., Miller T.W., Christensen B.G. N-Acetimidoyl- and N-formimidoylthienamycin derivatives: antipseudomonal beta-lactam antibiotics. *J. Med. Chem.* 22 (1979), 1435-1436.
- [262] Barry A.L., Jones R.N., Thornsberry C., Ayers L.W., Kundargi R. Imipenem (N-formimidoyl thienamycin): in vitro antimicrobial activity and beta-lactamase stability. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 3 (1985), 93-104.
- [263] Kahan F.M., Kropp H., Sundelof J.G., Birnbaum J. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. D (1983), 1-35.
- [264] Kropp H., Gerckens L., Sundelof J.G., Kahan F.M. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Rev. Infect. Dis.* 7 Suppl. 3 (1985), S389-410.
- [265] Sunagawa M., Matsumura H., Inoue T., Fukasawa M., Kato M. A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. *J. Antibiot. (Tokyo)* 43 (1990), 519-532.
- [266] Fukasawa M., Sumita Y., Harabe E.T., Tanio T., Nouda H., Kohzuki T., Okuda T., Matsumura H., Sunagawa M. Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (1992), 1577-1579.
- [267] Gómez J., García-Vázquez E., Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev. Esp. Quimioter.* 28 (2015), 1-9.
- [268] Samaha-Kfoury J.N., Araj G.F. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ* 327 (2003), 1209-1213.
- [269] Wilke M.S., Lovering A.L., Strynadka N.C. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2005), 525-533.
- [270] Essack S.Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm. Res.* 18 (2001), 1391-1399.
- [271] Edwards J.R. Meropenem: a microbiological overview. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 Suppl. A (1995), 1-17.
- [272] Garcia-Rodriguez J.A., Garcia Sanchez E., Fresnadillo Martinez M.J. [Meropenem: microbiologic perspective]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 15 Suppl. 1 (1997), 2-7.

- [273] Perry C.M., Markham A. Piperacillin/tazobactam: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 57 (1999), 805-843.
- [274] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica de Piperacilina/Tazobactam Kabi (EFG). Disponible en: <https://cima.aemps.es> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [275] Bax R.P., Bastain W., Featherstone A., Wilkinson D.M., Hutchison M., Haworth S.J. The pharmacokinetics of meropenem in volunteers. *J Antimicrob Chemother* 24 Suppl A (1989), 311-320.
- [276] Drusano G.L., Hutchison M. The pharmacokinetics of meropenem. *Scand J Infect Dis Suppl* 96 (1995), 11-16.
- [277] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica de Meropenem Kabi (EFG). Disponible en: <https://cima.aemps.es> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [278] Wiseman L.R., Wagstaff A.J., Brogden R.N., Bryson H.M. Meropenem. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 50 (1995), 73-101.
- [279] Hutchison M., Faulkner K.L., Turner P.J., Haworth S.J., Sheikh W., Nadler H., Pitkin D.H. A compilation of meropenem tissue distribution data. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 Suppl. A (1995), 43-56.
- [280] Blumer J.L. Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. *Int. J. Antimicrob. Agents* 8 (1997), 73-92.
- [281] Fish D.N., Singletary T.J. Meropenem, a new carbapenem antibiotic. *Pharmacotherapy* 17 (1997), 644-669.
- [282] Hurst M., Lamb H.M. Meropenem: a review of its use in patients in intensive care. *Drugs* 59 (2000), 653-680.
- [283] Roberts J.A., Roberts M.S., Robertson T.A., Dalley A.J., Lipman J. Piperacillin penetration into tissue of critically ill patients with sepsis--bolus versus continuous administration? *Crit. Care Med.* 37 (2009), 926-933.
- [284] Roberts J.A., Kirkpatrick C.M., Roberts M.S., Dalley A.J., Lipman J. First-dose and steady-state population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin by continuous or intermittent dosing in critically ill patients with sepsis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35 (2010), 156-163.
- [285] Li C., Kuti J.L., Nightingale C.H., Mansfield D.L., Dana A., Nicolau D.P. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin/tazobactam in patients with complicated intra-abdominal infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005), 388-395.
- [286] Kim M.K., Xuan D., Quintiliani R., Nightingale C.H., Nicolau D.P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of high dose extended interval piperacillin-tazobactam. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001), 259-267.
- [287] Vinks A.A., Den Hollander J.G., Overbeek S.E., Jelliffe R.W., Mouton J.W. Population pharmacokinetic analysis of nonlinear behavior of piperacillin during intermittent or continuous infusion in patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003), 541-547.

- [288] Sorgel F., Kinzig M. The chemistry, pharmacokinetics and tissue distribution of piperacillin/tazobactam. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 Suppl. A (1993), 39-60.
- [289] Kinzig M., Sorgel F., Brismar B., Nord C.E. Pharmacokinetics and tissue penetration of tazobactam and piperacillin in patients undergoing colorectal surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (1992), 1997-2004.
- [290] Incavo S.J., Ronchetti P.J., Choi J.H., Wu H., Kinzig M., Sorgel F. Penetration of piperacillin-tazobactam into cancellous and cortical bone tissues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994), 905-907.
- [291] Nau R., Kinzig-Schippers M., Sorgel F., Schinschke S., Rossing R., Muller C., Kolenda H., Prange H.W. Kinetics of piperacillin and tazobactam in ventricular cerebrospinal fluid of hydrocephalic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997), 987-991.
- [292] Wise R., Logan M., Cooper M., Andrews J.M. Pharmacokinetics and tissue penetration of tazobactam administered alone and with piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother* 35 (1991), 1081-1084.
- [293] Westphal J.F., Brogard J.M., Caro-Sampara F., Adloff M., Blickle J.F., Monteil H., Jehl F. Assessment of biliary excretion of piperacillin-tazobactam in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997), 1636-1640.
- [294] Mckinnon P.S., Paladino J.A., Schentag J.J. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31 (2008), 345-351.
- [295] Roberts J.A., Lipman J. Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis. *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006), 755-773.
- [296] Lodise T.P., Jr. Lomaestro B., Drusano G.L. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin. Infect. Dis.* 44 (2007), 357-363.
- [297] Roberts J.A., Uildemolins M., Roberts M.S., Mcwhinney B., Ungerer J., Paterson D.L., Lipman J. Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36 (2010), 332-339.
- [298] De Waele J.J., De Neve N. Aminoglycosides for life-threatening infections: a plea for an individualized approach using intensive therapeutic drug monitoring. *Minerva Anesthesiol.* 80 (2014), 1135-1142.
- [299] Felton T.W., Mccalman K., Malagon I., Isalska B., Whalley S., Goodwin J., Bentley A.M., Hope W.W. Pulmonary penetration of piperacillin and tazobactam in critically ill patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96 (2014), 438-448.
- [300] Ariano R.E., Nyhlen A., Donnelly J.P., Sitar D.S., Harding G.K., Zelenitsky S.A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in febrile neutropenic patients with bacteremia. *Ann. Pharmacother.* 39 (2005), 32-38.

- [301] Buijk S.L., Gyssens I.C., Mouton J.W., Van Vliet A., Verbrugh H.A., Bruining H.A. Pharmacokinetics of ceftazidime in serum and peritoneal exudate during continuous versus intermittent administration to patients with severe intra-abdominal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (2002), 121-128.
- [302] Jaruratanasirikul S., Sriwiriyan S., Ingviya N. Continuous infusion versus intermittent administration of cefepime in patients with Gram-negative bacilli bacteraemia. *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002), 1693-1696.
- [303] Sinnollareddy M.G., Roberts M.S., Lipman J., Roberts J.A. beta-lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and strategies for dose optimization: a structured review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39 (2012), 489-496.
- [304] Rea-Neto A., Niederman M., Lobo S.M., Schroeder E., Lee M., Kaniga K., Ketter N., Prokocimer P., Friedland I. Efficacy and safety of doripenem versus piperacillin/tazobactam in nosocomial pneumonia: a randomized, open-label, multicenter study. *Curr. Med. Res. Opin.* 24 (2008), 2113-2126.
- [305] Solomkin J.S., Yellin A.E., Rotstein O.D., Christou N.V., Dellinger E.P., Tellado J.M., Malafaia O., Fernandez A., Choe K.A., Carides A. et al. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam in the treatment of complicated intraabdominal infections: results of a double-blind, randomized comparative phase III trial. *Ann. Surg.* 237 (2003), 235-245.
- [306] Lipsky B.A., Armstrong D.G., Citron D.M., Tice A.D., Morgenstern D.E., Abramson M.A. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, double-blinded, multicentre trial. *Lancet* 366 (2005), 1695-1703.
- [307] Linden P. Safety profile of meropenem: an updated review of over 6,000 patients treated with meropenem. *Drug Saf.* 30 (2007), 657-668.
- [308] Eng R.H., Munsif A.N., Yangco B.G., Smith S.M., Chmel H. Seizure propensity with imipenem. *Arch. Intern. Med.* 149 (1989), 1881-1883.
- [309] Wong V.K., Wright H.T., Jr. Ross L.A., Mason W.H., Inderlied C.B., Kim K.S. Imipenem/cilastatin treatment of bacterial meningitis in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10 (1991), 122-125.
- [310] Alvarez C., Ramos J.M., San Juan R., Lumbreras C., Aguado J.M. [Risk of superinfection related to antibiotic use. Are all antibiotics the same?]. *Rev. Esp. Quimioter.* 18 (2005), 39-44.
- [311] Prescott W.A., Jr. Kusmierski K.A. Clinical importance of carbapenem hypersensitivity in patients with self-reported and documented penicillin allergy. *Pharmacotherapy* 27 (2007), 137-142.
- [312] Harter C., Schulze B., Goldschmidt H., Benner A., Geiss H.K., Hoppe-Tichy T., Ho A.D., Egerer G. Piperacillin/tazobactam vs ceftazidime in the treatment of neutropenic fever in patients with acute leukemia or following autologous peripheral blood stem cell transplantation: a prospective randomized trial. *Bone Marrow Transplant.* 37 (2006), 373-379.

- [313] Lonsdale D.O., Kipper K., Baker E.H., Barker C.I.S., Oldfield I., Philips B.J., Johnston A., Rhodes A., Sharland M., Standing J.F. beta-Lactam antimicrobial pharmacokinetics and target attainment in critically ill patients aged 1 day to 90 years: the ABDose study. *J. Antimicrob. Chemother.* 75 (2020), 3625-3634.
- [314] Delattre I.K., Taccone F.S., Jacobs F., Hites M., Dugernier T., Spapen H., Laterre P.F., Wallemacq P.E., Van Bambeke F., Tulkens P.M. Optimizing beta-lactams treatment in critically-ill patients using pharmacokinetics/pharmacodynamics targets: are first conventional doses effective? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 15 (2017), 677-688.
- [315] Tam V.H., Schilling A.N., Neshat S., Poole K., Melnick D.A., Coyle E.A. Optimization of meropenem minimum concentration/MIC ratio to suppress in vitro resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49 (2005), 4920-4927.
- [316] Macdougall C., Penicillins, Cephalosporins, and Other-Lactam Antibiotics. en *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13ª Edición. Editorial McGraw-Hill Education New York. NY. USA. 2017.
- [317] Livermore D.M., Mushtaq S., Ge Y. Chequerboard titration of cephalosporin CXA-101 (FR264205) and tazobactam versus beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010), 1972-1974.
- [318] Sader H.S., Rhomberg P.R., Farrell D.J., Jones R.N. Antimicrobial activity of CXA-101, a novel cephalosporin tested in combination with tazobactam against Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* strains having various resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011), 2390-2394.
- [319] Goo K.S., Sim T.S. Designing new beta-lactams: implications from their targets, resistance factors and synthesizing enzymes. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7 (2011), 53-80.
- [320] Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008), 234-258.
- [321] Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008), 361-385.
- [322] Giacobbe D.R., Bassetti M., De Rosa F.G., Del Bono V., Grossi P.A., Menichetti F., Pea F., Rossolini G.M., Tumbarello M., Viale P. et al. Ceftolozane/tazobactam: place in therapy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 16 (2018), 307-320.
- [323] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica de Meropenem Kabi (EFG). Disponible en: <https://cima.aemps.es> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [324] European Medicines Agency (EMA). Zerbaxa® European Public Assessment Report (EPAR). Annex I. Summary of product characteristics. 2015. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information_en.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).

- [325] Merck & Co., Inc. Zerbaxa® [Package Insert]. 2018. Disponible en: https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/z/zerbaxa/zerbaxa_pi.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [326] U.S. National Library of Medicine. 2018. Safety and efficacy study of ceftolozane/tazobactam to treat ventilated nosocomial pneumonia (MK-7625A-008) (ASPECT-NP). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02070757> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [327] Zhanel G.G., Chung P., Adam H., Zelenitsky S., Denisuik A., Schweizer F., Lagace-Wiens P.R., Rubinstein E., Gin A.S., Walkty A. et al. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs* 74 (2014), 31-51.
- [328] Cho J.C., Fiorenza M.A., Estrada S.J. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/beta-Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy* 35 (2015), 701-715.
- [329] Sucher A.J., Chahine E.B., Cogan P., Fete M. Ceftolozane/Tazobactam: A New Cephalosporin and beta-Lactamase Inhibitor Combination. *Ann. Pharmacother.* 49 (2015), 1046-1056.
- [330] Wooley M., Miller B., Krishna G., Hershberger E., Chandorkar G. Impact of renal function on the pharmacokinetics and safety of ceftolozane-tazobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014), 2249-2255.
- [331] Craig W.A., Andes D.R. In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum beta-lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 1577-1582.
- [332] Macgowan A.P., Noel A.R., Tomaselli S.G., Nicholls D., Bowker K.E. Pharmacodynamics of Ceftolozane plus Tazobactam Studied in an In Vitro Pharmacokinetic Model of Infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 60 (2016), 515-521.
- [333] Melchers M.J., Mavridou E., Van Mil A.C., Lagarde C., Mouton J.W. Pharmacodynamics of Ceftolozane Combined with Tazobactam against Enterobacteriaceae in a Neutropenic Mouse Thigh Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016), 7272-7279.
- [334] Vanscoy B., Mendes R.E., Mccauley J., Bhavnani S.M., Bulik C.C., Okusanya O.O., Forrest A., Jones R.N., Friedrich L.V., Steenbergen J.N. et al. Pharmacological basis of beta-lactamase inhibitor therapeutics: tazobactam in combination with Ceftolozane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 5924-5930.
- [335] Vanscoy B., Mendes R.E., Nicasio A.M., Castanheira M., Bulik C.C., Okusanya O.O., Bhavnani S.M., Forrest A., Jones R.N., Friedrich L.V. et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of tazobactam in combination with ceftolozane in an in vitro infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 2809-2814.

- [336] Solomkin J., Hershberger E., Miller B., Popejoy M., Friedland I., Steenbergen J., Yoon M., Collins S., Yuan G., Barie P.S. et al. Ceftolozane/Tazobactam Plus Metronidazole for Complicated Intra-abdominal Infections in an Era of Multidrug Resistance: Results From a Randomized, Double-Blind, Phase 3 Trial (ASPECT-cIAI). *Clin. Infect. Dis.* 60 (2015), 1462-1471.
- [337] Wagenlehner F.M., Umeh O., Steenbergen J., Yuan G., Darouiche R.O. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *Lancet* 385 (2015), 1949-1956.
- [338] Van Der Auwera P., Santella P.J. Pharmacokinetics of cefepime: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 32 Suppl. B (1993), 103-115.
- [339] Strayer A.H., Gilbert D.H., Pivarnik P., Medeiros A.A., Zinner S.H., Dudley M.N. Pharmacodynamics of piperacillin alone and in combination with tazobactam against piperacillin-resistant and -susceptible organisms in an in vitro model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994), 2351-2356.
- [340] Kuti J.L., Ghazi I.M., Quintiliani R., Jr. Shore E., Nicolau D.P. Treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with ceftolozane/tazobactam in a critically ill patient receiving continuous venovenous haemodiafiltration. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48 (2016), 342-343.
- [341] Bremmer D.N., Nicolau D.P., Burcham P., Chunduri A., Shidham G., Bauer K.A. Ceftolozane/Tazobactam Pharmacokinetics in a Critically Ill Adult Receiving Continuous Renal Replacement Therapy. *Pharmacotherapy* 36 (2016), e30-e33.
- [342] Bassetti M., Castaldo N., Cattelan A., Mussini C., Righi E., Tascini C., Menichetti F., Mastroianni C.M., Tumbarello M., Grossi P. et al. Ceftolozane/tazobactam for the treatment of serious *Pseudomonas aeruginosa* infections: a multicentre nationwide clinical experience. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53 (2019), 408-415.
- [343] Gatti M., Giannella M., Raschi E., Viale P., De Ponti F. Ceftolozane/tazobactam exposure in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy: a PK/PD approach to tailor dosing. *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (2021), 199-205.
- [344] Sweetman S. *Martindale, the complete drug reference*. 33^a Edición. Editorial Pharmaceutical Press. 2002.
- [345] Brunton L., Lazo J., Parker K. Capítulo 45 en Goodman, Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11^a Edición. Editorial McGraw-Hill. 2005.
- [346] Turnidge J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am* 17 (2003), 503-528, v.
- [347] García B., Aldaz A., Aumente M., Calvo M., Farré R., Ferriols-Lisart R. *Manual de rotación del residente por la Unidad de Farmacocinética Clínica*. Grupo Español de Farmacocinética y Farmacología de la SEFH. 1^a Edición. Madrid. 2011.

- [348] Murphy JE. Clinical pharmacokinetics pocket reference. American Society of Health-System Pharmacists. 4^a Edición. Bethesda, Estados Unidos. 2008.
- [349] Edson R.S., Terrell C.L. The aminoglycosides. *Mayo Clin. Proc.* 74 (1999), 519-528.
- [350] Rougier F., Claude D., Maurin M., Sedoglavic A., Ducher M., Corvaisier S., Jelliffe R., Maire P. Aminoglycoside nephrotoxicity: modeling, simulation, and control. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (2003), 1010-1016.
- [351] Mingeot-Leclercq M.-P., Tulkens P.M. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43 (1999), 1003-1012.
- [352] Brummett R.E., Fox K.E. Aminoglycoside-induced hearing loss in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (1989), 797-800.
- [353] Nakashima T., Teranishi M., Hibi T., Kobayashi M., Umemura M. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides-a review. *Acta oto-laryngologica* 120 (2000), 904-911.
- [354] Schentag J.J., Cerra F.B., Plaut M.E. Clinical and pharmacokinetic characteristics of aminoglycoside nephrotoxicity in 201 critically ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21 (1982), 721-726.
- [355] Soltes L. Aminoglycoside antibiotics--two decades of their HPLC bioanalysis. *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999), 3-10.
- [356] Baranowska I., Markowski P., Baranowski J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Analytica chimica acta* 570 (2006), 46-58.
- [357] Nicoli S., Santi P. Assay of amikacin in the skin by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal* 41 (2006), 994-997.
- [358] Sar F., Leroy P., Nicolas A., Archimbault P., Ambroggi G. Determination of amikacin in dog plasma by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography with post-column derivatization. *Analytical letters* 25 (1992), 1235-1250.
- [359] McGlinchey T.A., Rafter P.A., Regan F., McMahon G.P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal. Chim. Acta.* 624 (2008), 1-15.
- [360] Chen Y., Chen Q., He L., Shang B., Zhang L. Enzyme immunoassay and liquid chromatography-fluorescence detection for amikacin in raw milk. *Food Chem.* 135 (2012), 380-385.
- [361] Tao Y., Chen D., Yu H., Huang L., Liu Z., Cao X., Yan C., Pan Y., Yuan Z. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food. Chem.* 135 (2012), 676-683.
- [362] Morovján G., Csokan P., Nemeth-Konda L. HPLC determination of colistin and aminoglycoside antibiotics in feeds by post-column derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* 48 (1998), 32-36.

- [363] Serrano J.M., Silva M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* 1117 (2006), 176-183.
- [364] Li D., He S., Deng Y., Ding G., Ni H., Cao Y. Development and validation of an HPLC method for determination of Amikacin in water samples by solid phase extraction and pre-column derivatization. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93 (2014), 47-52.
- [365] Sanchez-Martinez M.L., Aguilar-Caballos M.P., Gomez-Hens A. Long-wavelength homogeneous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples. *Talanta* 78 (2009), 305-309.
- [366] Maitra S.K., Yoshikawa T.T., Steyn C.M., Guze L.B., Schotz M.C. Amikacin assay in serum by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 14 (1978), 880-885.
- [367] Koeda T., Umemura K., Yokota M. in: Umezawa H., Hooper I.R., *Aminoglycoside Antibiotics*, Editorial Springer-Verlag. Berlin. 1982.
- [368] Wei T.Q., Chu V.P., Craig A.R., Duffy J.E., Obzansky D.M., Kilgore D., Masulli I.S., Sanders C.M., Thompson, J.C. Automated homogeneous immunoassay for gentamicin on the dimension clinical chemistry system. *Clin. Chem.* 45 (1999), 388-393.
- [369] Zaske D.E., in *Applied Pharmacokinetics, Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. Evans W.E., Schentag J.J., Jusko W.J., & Relling M.V.. Editorial Edwards Brothers. 3ª Edición. Ann Arbor. 1992.
- [370] Hart S.K., Barrett J.G., Brown J.A., Papich M.G., Powers B.E., Sullins K.E. Elution of antimicrobials from a cross-linked dextran gel: In vivo quantification. *Equine Vet. J.* 45 (2013), 148-153.
- [371] Usmani M., Ahmed S., Sheraz M., Ahmad I. Analytical Methods for the Determination of Amikacin in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids: A Review. *Biquarterly Iranian Journal of Analytical Chemistry* 5 (2018), 39-55.
- [372] Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J. Development and validation of capillary electrophoresis method for tobramycin with precapillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis* 23 (2002), 1695-1701.
- [373] Tawa R., Matsunaga H., Fujimoto T. High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. Chromatogr. A* 812 (1998), 141-150.
- [374] Anhalt J.P., Brown S.D. High-performance liquid-chromatographic assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Clin. Chem.* 24 (1978), 1940-1947.
- [375] Barends D.M., Blauw J.S., Smits M.H., Hulshoff A. Determination of amikacin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 276 (1983), 385-394.
- [376] Wong L.T., Beaubien A.R., Pakuts A.P. Determination of amikacin in microlitre quantities of biological fluids by high-performance liquid chromatography using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene derivatization. *J. Chromatogr.* 231 (1982), 145-154.

- [377] Lung K.R., Kassal K.R., Green J.S., Hovsepian P.K. Catalytic precolumn derivatization of amikacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998), 905-910.
- [378] Gambardella P., Punziano R., Gionti M., Guadalupi C., Mancini G., Mangia A. Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 348 (1985), 229-240.
- [379] Feng C.-H., Lin S.-J., Wu H.-L., Chen* S.-H. Trace analysis of amikacin in commercial preparation by derivatization and HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 24 (2001), 381-392.
- [380] Korany M.A., Haggag R.S., Ragab M.A., Elmallah O.A. Liquid chromatographic determination of amikacin sulphate after pre-column derivatization. *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014), 837-847.
- [381] Ovalles J.F., Brunetto Mdel R., Gallignani M. A new method for the analysis of amikacin using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatization and high-performance liquid chromatography with UV-detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005), 294-298.
- [382] García Álvarez-Coque M.C., Medina Hernández M.J., Villanueva Camanas R.M., Mongay Fernández C. Studies on the formation and stability of isoindoles derived from amino acids, o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Anal. Biochem.* 180 (1989), 172-176.
- [383] García Álvarez-Coque M.C., Medina Hernández M.J., Villanueva Camanas R.M., Mongay Fernández C. Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids. *Anal. Biochem.* 178 (1989), 1-7.
- [384] Tsuji K., Goetz J.F., Vanmeter W., Gusciora K.A. Normal-phase high-performance liquid chromatographic determination of neomycin sulfate derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *J. Chromatogr.* 175 (1979), 141-152.
- [385] Bonet-Domingo E., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Sagrado S. Uncertainty-based internal quality control. Harmonization considerations. *Anal. Chem.* 78 (2006), 8113-8120.
- [386] Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A.C., Schuster M.G., Vazquez J.A., Walsh T.J. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 62 (2016), e1-50.
- [387] Johnson L.B., Kauffman C.A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 36 (2003), 630-637.
- [388] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica de VFEND. Disponible en: <https://cima.aemps.es> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [389] Kofla G., Ruhnke M. Voriconazole: review of a broad spectrum triazole antifungal agent. *Expert Opin. Pharmacother.* 6 (2005), 1215-1229.
- [390] Purkins L., Wood N., Greenhalgh K., Allen M.J., Oliver S.D. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56 Suppl 1 (2003), 10-16.

- [391] Pfizer, Inc. VFEND® [Package Insert]. 2022. Disponible en: <https://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=618> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [392] Purkins L., Wood N., Greenhalgh K., Eve M.D., Oliver S.D., Nichols D. The pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole - a novel wide-spectrum antifungal agent. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56 Suppl. 1 (2003), 2-9.
- [393] Purkins L., Wood N., Ghahramani P., Greenhalgh K., Allen M.J., Kleinermans D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46 (2002), 2546-2553.
- [394] Jeu L., Piacenti F.J., Lyakhovetskiy A.G., Fung H.B. Voriconazole. *Clin. Ther.* 25 (2003), 1321-1381.
- [395] Hyland R., Jones B.C., Smith D.A. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug. Metab. Dispos.* 31 (2003), 540-547.
- [396] Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994), 414-423.
- [397] Robatel C., Rusca M., Padoin C., Marchetti O., Liaudet L., Buclin T. Disposition of voriconazole during continuous veno-venous haemodiafiltration (CVVHDF) in a single patient. *J. Antimicrob. Chemother.* 54 (2004), 269-270.
- [398] Troke P.F., Hockey H.P., Hope W.W. Observational study of the clinical efficacy of voriconazole and its relationship to plasma concentrations in patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011), 4782-4788.
- [399] Pascual A., Calandra T., Bolay S., Buclin T., Bille J., Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 46 (2008), 201-211.
- [400] Pascual A., Csajka C., Buclin T., Bolay S., Bille J., Calandra T., Marchetti O. Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55 (2012), 381-390.
- [401] Dolton M.J., Ray J.E., Chen S.C., Ng K., Pont L.G., Mclachlan A.J. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012), 4793-4799.
- [402] Andes D., Marchillo K., Stamstad T., Conklin R. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003), 3165-3169.
- [403] Karthaus M., Lehrnbecher T., Lipp H.P., Kluge S., Buchheidt D. Therapeutic drug monitoring in the treatment of invasive aspergillosis with voriconazole in cancer patients--an evidence-based approach. *Ann. Hematol.* 94 (2015), 547-556.

- [404] Dolton M.J., Mclachlan A.J. Voriconazole pharmacokinetics and exposure-response relationships: assessing the links between exposure, efficacy and toxicity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44 (2014), 183-193.
- [405] Dolton M.J., Mclachlan A.J. Optimizing azole antifungal therapy in the prophylaxis and treatment of fungal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27 (2014), 493-500.
- [406] Peman J., Salavert M., Canton E., Jarque I., Roma E., Zaragoza R., Viudes A., Gobernado M. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2 (2006), 129-158.
- [407] Food and Drug Administration (FDA). VFEND®: Highlights and Prescribing Information. 2016. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021266s032lbl.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [408] Michael C., Bierbach U., Frenzel K., Lange T., Basara N., Niederwieser D., Mauz-Korholz C., Preiss R. Voriconazole pharmacokinetics and safety in immunocompromised children compared to adult patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010), 3225-3232.
- [409] European Medicines Agency (EMA). VFEND ® European Public Assessment Report (EPAR). Annex I. Summary of product characteristics. 2016. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vfend-epar-product-information_en.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [410] Howard A., Hoffman J., Sheth A. Clinical application of voriconazole concentrations in the treatment of invasive aspergillosis. *Ann. Pharmacother.* 42 (2008), 1859-1864.
- [411] Soler-Palacin P., Frick M.A., Martin-Nalda A., Lanasa M., Pou L., Rosello E., De Heredia C.D., Figueras C. Voriconazole drug monitoring in the management of invasive fungal infection in immunocompromised children: a prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012), 700-706.
- [412] Theuretzbacher U., Ihle F., Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin. Pharmacokinet.* 45 (2006), 649-663.
- [413] Zonios D., Yamazaki H., Murayama N., Natarajan V., Palmore T., Childs R., Skinner J., Bennett J.E. Voriconazole metabolism, toxicity, and the effect of cytochrome P450 2C19 genotype. *J. Infect. Dis.* 209 (2014), 1941-1948.
- [414] Pearson M.M., Rogers P.D., Cleary J.D., Chapman S.W. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Ann. Pharmacother.* 37 (2003), 420-432.
- [415] Cabral-Galeano E., Ruiz-Camps I., Len-Abad O., Pou-Clave L., Sorde-Masip R., Meije-Castillo Y., Blanco-Grau A., Barba-Sunol P., Monforte-Torres V., Roman-Broto A. et al. Clinical usefulness of therapeutic drug monitoring of voriconazole in a university hospital. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 33 (2015), 298-302.
- [416] Van Wanrooy M.J., Rodgers M.G., Span L.F., Zijlstra J.G., Uges D.R., Kosterink J.G., Van Der Werf T.S., Alffenaar J.W. Voriconazole Therapeutic Drug Monitoring Practices in Intensive Care. *Ther. Drug Monit.* 38 (2016), 313-318.

- [417] Guinea J., Escribano P., Marcos-Zambrano L.J., Pelaez T., Kestler M., Munoz P., Vena A., Lopez-Fabal F., Bouza E. Therapeutic drug monitoring of voriconazole helps to decrease the percentage of patients with off-target trough serum levels. *Med. Mycol.* 54 (2016), 353-360.
- [418] Franz C.E., Lyons M.J., O'brien R., Panizzon M.S., Kim K., Bhat R., Grant M.D., Toomey R., Eisen S., Xian H. et al. A 35-year longitudinal assessment of cognition and midlife depression symptoms: the Vietnam Era Twin Study of Aging. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 19 (2011), 559-570.
- [419] Kim S.H., Lee D.G., Kwon J.C., Lee H.J., Cho S.Y., Park C., Kwon E.Y., Park S.H., Choi S.M., Choi J.H. et al. Clinical Impact of Cytochrome P450 2C19 Genotype on the Treatment of Invasive Aspergillosis under Routine Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in a Korean Population. *Infect. Chemother.* 45 (2013), 406-414.
- [420] Chu H.Y., Jain R., Xie H., Pottinger P., Fredricks D.N. Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events. *BMC Infect. Dis.* 13 (2013), 105.
- [421] Miyakis S., Van Hal S.J., Solvag C.J., Ray J., Marriott D. Clinician ordering practices for voriconazole therapeutic drug monitoring: experiences of a referral laboratory. *Ther. Drug Monit.* 32 (2010), 661-664.
- [422] Moriyama B., Obeng A.O., Barbarino J., Penzak S.R., Henning S.A., Scott S.A., Agundez J., Wingard J.R., Mcleod H.L., Klein T.E. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 102 (2017), 45-51.
- [423] Mangal N., Hamadeh I.S., Arwood M.J., Cavallari L.H., Samant T.S., Klinker K.P., Bulitta J., Schmidt S. Optimization of Voriconazole Therapy for the Treatment of Invasive Fungal Infections in Adults. *Clin. Pharmacol. Ther.* 104 (2018), 957-965.
- [424] Moriyama B., Kadri S., Henning S.A., Danner R.L., Walsh T.J., Penzak S.R. Therapeutic Drug Monitoring and Genotypic Screening in the Clinical Use of Voriconazole. *Curr. Fungal. Infect. Rep.* 9 (2015), 74-87.
- [425] Ghannoum M.A., Perfect J.R. *Antifungal Therapy*. Editorial CRC Press. 2ª Edición. Florida. 2019.
- [426] Kurtz M.B., Heath I.B., Marrinan J., Dreikorn S., Onishi J., Douglas C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994), 1480-1489.
- [427] Letscher-Bru V., Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003), 513-521.
- [428] Ernst E.J., Klepser M.E., Ernst M.E., Messer S.A., Pfaller M.A. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (1999), 75-80.
- [429] Gauthier G.M., Nork T.M., Prince R., Andes D. Subtherapeutic ocular penetration of caspofungin and associated treatment failure in *Candida albicans* endophthalmitis. *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005), e27-28.

- [430] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica de Cancidas. Disponible en: <https://cima.aemps.es> (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [431] Stone J.A., Holland S.D., Wickersham P.J., Sterrett A., Schwartz M., Bonfiglio C., Hesney M., Winchell G.A., Deutsch P.J., Greenberg H. et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002), 739-745.
- [432] Walsh T.J., Adamson P.C., Seibel N.L., Flynn P.M., Neely M.N., Schwartz C., Shad A., Kaplan S.L., Roden M.M., Stone J.A. et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of caspofungin in children and adolescents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005), 4536-4545.
- [433] European Medicines Agency (EMA). Cancidas ® European Public Assessment Report (EPAR). Annex I. Summary of product characteristics. 2009. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cancidas-epar-product-information_en.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [434] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard (NCCLS document M27-A [ISBN 1-56238-328-0]). Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- [435] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – second edition (NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]). Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [436] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard (NCCLS document M38-A [ISBN 1-56238-470-8]). Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [437] Pfaller M., Messer S., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R., Diekema D. Further standardization of broth microdilution methodology for in vitro susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3,000 clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 42 (2004), 3117-3119.
- [438] Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D.J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004), 3142-3146.
- [439] Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H., Pappas P.G., Hamill R.J., Larsen R.A., Horowitz H.W., Powderly W.G., Hyslop N., Kauffman C.A., Cleary J. et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003), 3149-3154.
- [440] Espinel-Ingroff A., Pfaller M., Messer S.A., Knapp C.C., Holliday N., Killian S.B. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004), 718-721.

- [441] Bartizal K., Gill C.J., Abruzzo G.K., Flattery A.M., Kong L., Scott P.M., Smith J.G., Leighton C.E., Bouffard A., Dropinski J.F. et al. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997), 2326-2332.
- [442] Barchiesi F., Schimizzi A.M., Fothergill A.W., Scalise G., Rinaldi M.G. In vitro activity of the new echinocandin antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18 (1999), 302-304.
- [443] Vazquez J.A., Lynch M., Boikov D., Sobel J.D. In vitro activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997), 1612-1614.
- [444] Johnson E., Goldstein B., Davey K., Fraser M. Comparison of the in vitro activity of anidulafungin with amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole against a panel of 780 yeasts obtained from five European centres. In 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004. 1-4.
- [445] Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R.J., Diekema D.J. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003), 5729-5731.
- [446] Manavathu E.K., Ramesh M.S., Baskaran I., Ganesan L.T., Chandrasekar P.H. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2004), 386-389.
- [447] Ernst E.J., Klepser M.E., Pfaller M.A. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000), 1108-1111.
- [448] McCormack P.L., Perry C.M. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 65 (2005), 2049-2068.
- [449] Walsh T.J., Teppler H., Donowitz G.R., Maertens J.A., Baden L.R., Dmoszynska A., Cornely O.A., Bourque M.R., Lupinacci R.J., Sable C.A. et al. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004), 1391-1402.
- [450] Villanueva A., Gotuzzo E., Arathoon E.G., Noriega L.M., Kartsonis N.A., Lupinacci R.J., Smietana J.M., Dinubile M.J., Sable C.A. A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *Am. J. Med.* 113 (2002), 294-299.
- [451] Arathoon E.G., Gotuzzo E., Noriega L.M., Berman R.S., Dinubile M.J., Sable C.A. Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002), 451-457.
- [452] Mora-Duarte J., Betts R., Rotstein C., Colombo A.L., Thompson-Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Perfect J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 347 (2002), 2020-2029.

- [453] Maertens J., Raad I., Petrikos G., Boogaerts M., Selleslag D., Petersen F.B., Sable C.A., Kartsonis N.A., Ngai A., Taylor A. et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* 39 (2004), 1563-1571.
- [454] Kartsonis N.A., Saah A.J., Joy Lipka C., Taylor A.F., Sable C.A. Salvage therapy with caspofungin for invasive aspergillosis: results from the caspofungin compassionate use study. *J. Infect.* 50 (2005), 196-205.
- [455] Deresinski S.C., Stevens D.A. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.* 36 (2003), 1445-1457.
- [456] Peman J., Canton E., Minana J.J., Florez J.A., Echeverria J., Ortega D.N., Alarcon J.M., Fontanals D., Sard B.G., Moreno B.B. et al. [Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study]. *Rev. Iberoam. Micol.* 28 (2011), 91-99.
- [457] Guinea J., Zaragoza O., Escribano P., Martin-Mazuelos E., Peman J., Sanchez-Reus F., Cuenca-Estrella M. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 58 (2014), 1529-1537.
- [458] Van Der Elst K.C., Veringa A., Zijlstra J.G., Beishuizen A., Klont R., Brummelhuis-Visser P., Uges D.R., Touw D.J., Kosterink J.G., Van Der Werf T.S. et al. Low Caspofungin Exposure in Patients in Intensive Care Units. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017).
- [459] Martson A.G., Van Der Elst K.C.M., Veringa A., Zijlstra J.G., Beishuizen A., Van Der Werf T.S., Kosterink J.G.W., Neely M., Alffenaar J.W. Caspofungin Weight-Based Dosing Supported by a Population Pharmacokinetic Model in Critically Ill Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64 (2020).
- [460] Adembri C., Villa G., Rosi E., Tofani L., Fallani S., De Gaudio A.R., Novelli A. Caspofungin PK in critically ill patients after the first and fourth doses: suggestions for therapeutic drug monitoring? *J. Chemother.* 32 (2020), 124-131.
- [461] Muilwijk E.W., Schouten J.A., Van Leeuwen H.J., Van Zanten A.R., De Lange D.W., Colbers A., Verweij P.E., Burger D.M., Pickkers P., Bruggemann R.J. Pharmacokinetics of caspofungin in ICU patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014), 3294-3299.
- [462] Nguyen T.H., Hoppe-Tichy T., Geiss H.K., Rastall A.C., Swoboda S., Schmidt J., Weigand M.A. Factors influencing caspofungin plasma concentrations in patients of a surgical intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 60 (2007), 100-106.
- [463] Berthoin K., Ampe E., Tulkens P.M., Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34 (2009), 555-560.

- [464] Zilberberg M.D., Kollef M.H., Arnold H., Labelle A., Micek S.T., Kothari S., Shorr A.F. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* 10 (2010), 150.
- [465] Labelle A.J., Micek S.T., Roubinian N., Kollef M.H. Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. *Crit. Care Med.* 36 (2008), 2967-2972.
- [466] Tumbarello M., Sanguinetti M., Trecarichi E.M., La Sorda M., Rossi M., De Carolis E., De Gaetano Donati K., Fadda G., Cauda R., Posteraro B. Fungaemia caused by *Candida glabrata* with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression: risk factors, antifungal treatment and outcome. *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008), 1379-1385.
- [467] Adembri C., Novelli A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of antimicrobials: potential for providing dosing regimens that are less vulnerable to resistance. *Clin. Pharmacokinet.* 48 (2009), 517-528.
- [468] Shah D.N., Yau R., Lasco T.M., Weston J., Salazar M., Palmer H.R., Garey K.W. Impact of prior inappropriate fluconazole dosing on isolation of fluconazole-nonsusceptible *Candida* species in hospitalized patients with candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012), 3239-3243.
- [469] Perez-Pitarch A., Ferriols-Lisart R., Aguilar G., Ezquer-Garin C., Belda F.J., Guglieri-Lopez B. Dosing of caspofungin based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic index for the treatment of invasive fungal infections in critically ill patients on continuous venovenous haemodiafiltration. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51 (2018), 115-121.
- [470] Bailly S., Gautier-Veyret E., Le M.P., Bouadma L., Andremont O., Neuville M., Mourvillier B., Sonnevile R., Magalhaes E., Lebut J. et al. Impact of Loading Dose of Caspofungin in Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Target Attainment for Severe Candidiasis Infections in Patients in Intensive Care Units: the CASPOLOAD Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64 (2020).
- [471] Roberts J.A., Norris R., Paterson D.L., Martin J.H. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73 (2012), 27-36.
- [472] Debono M., Turner W.W., Lagrandeur L., Burkhardt F.J., Nissen J.S., Nichols K.K., Rodriguez M.J., Zweifel M.J., Zeckner D.J., Gordee R.S. et al. Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB. *J. Med. Chem.* 38 (1995), 3271-3281.
- [473] Cappelletty D., Eiselstein-Mckitrick K. The echinocandins. *Pharmacotherapy* 27 (2007), 369-388.
- [474] Denning D.W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362 (2003), 1142-1151.
- [475] Debono M., Abbott B.J., Turner J.R., Howard L.C., Gordee R.S., Hunt A.S., Barnhart M., Molloy R.M., Willard K.E., Fukuda D. et al. Synthesis and evaluation of LY121019, a member of a series of semisynthetic analogues of the antifungal lipopeptide echinocandin B. *Ann. N Y Acad. Sci.* 544 (1988), 152-167.

- [476] European Medicines Agency (EMA). Ecalta ® European Public Assessment Report (EPAR). Annex I. Summary of product characteristics. 2009. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ecalta-epar-product-information_en.pdf (último acceso: 15 de diciembre de 2022).
- [477] Damle B., Stogniew M., Dowell J. Pharmacokinetics and tissue distribution of anidulafungin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008), 2673-2676.
- [478] Louie A., Deziel M., Liu W., Drusano M.F., Gumbo T., Drusano G.L. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005), 5058-5068.
- [479] Petraitiene R., Petraitis V., Groll A.H., Candelario M., Sein T., Bell A., Lyman C.A., Mcmillian C.L., Bacher J., Walsh T.J. Antifungal activity of LY303366, a novel echinocandin B, in experimental disseminated candidiasis in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999), 2148-2155.
- [480] Nguyen K.T., Ta P., Hoang B.T., Cheng S., Hao B., Nguyen M.H., Clancy C.J. Anidulafungin is fungicidal and exerts a variety of postantifungal effects against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009), 3347-3352.
- [481] Cota J., Carden M., Graybill J.R., Najvar L.K., Burgess D.S., Wiederhold N.P. In vitro pharmacodynamics of anidulafungin and caspofungin against *Candida glabrata* isolates, including strains with decreased caspofungin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 3926-3928.
- [482] Gumbo T. Impact of pharmacodynamics and pharmacokinetics on echinocandin dosing strategies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20 (2007), 587-591.
- [483] Gumbo T., Drusano G.L., Liu W., Kulawy R.W., Fregeau C., Hsu V., Louie A. Once-weekly micafungin therapy is as effective as daily therapy for disseminated candidiasis in mice with persistent neutropenia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007), 968-974.
- [484] Gumbo T., Drusano G.L., Liu W., Ma L., Deziel M.R., Drusano M.F., Louie A. Anidulafungin pharmacokinetics and microbial response in neutropenic mice with disseminated candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 3695-3700.
- [485] Miller C.D., Lomaestro B.W., Park S., Perlin D.S. Progressive esophagitis caused by *Candida albicans* with reduced susceptibility to caspofungin. *Pharmacotherapy* 26 (2006), 877-880.
- [486] Laverdiere M., Lalonde R.G., Baril J.G., Sheppard D.C., Park S., Perlin D.S. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006), 705-708.
- [487] Hernandez S., Lopez-Ribot J.L., Najvar L.K., McCarthy D.I., Bocanegra R., Graybill J.R. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004), 1382-1383.

- [488] Moudgal V., Little T., Boikov D., Vazquez J.A. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005), 767-769.
- [489] Hakki M., Staab J.F., Marr K.A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 2522-2524.
- [490] Balashov S.V., Park S., Perlin D.S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), 2058-2063.
- [491] Kahn J.N., Garcia-Effron G., Hsu M.J., Park S., Marr K.A., Perlin D.S. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007), 1876-1878.
- [492] Schuetzler-Muehlbauer M., Willinger B., Krapf G., Enzinger S., Presterl E., Kuchler K. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol. Microbiol.* 48 (2003), 225-235.
- [493] Vazquez J.A. The safety of anidulafungin. *Expert Opin. Drug. Saf.* 5 (2006), 751-758.
- [494] Liu P., Ruhnke M., Meersseman W., Paiva J.A., Kantecki M., Damle B. Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 1672-1676.
- [495] Cohen-Wolkowicz M., Benjamin D.K., Jr. Piper L., Cheifetz I.M., Moran C., Liu P., Aram J., Kashuba A.D., Capparelli E., Walsh T.J. et al. Safety and pharmacokinetics of multiple-dose anidulafungin in infants and neonates. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (2011), 702-707.
- [496] Hahn J., Choi J.H., Chang M.J. Pharmacokinetic changes of antibiotic, antiviral, antituberculosis and antifungal agents during extracorporeal membrane oxygenation in critically ill adult patients. *J. Clin. Pharm. Ther.* 42 (2017), 661-671.
- [497] Van Wanrooy M.J., Rodgers M.G., Uges D.R., Arends J.P., Zijlstra J.G., Van Der Werf T.S., Kosterink J.G., Alffenaar J.W. Low but sufficient anidulafungin exposure in critically ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014), 304-308.
- [498] Liu P. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of anidulafungin in adult patients with fungal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013), 466-474.

CAPÍTULO XII

ANEXOS

XII.1.- Anexo I: Nomenclatura

XII.1.1.- Abreviaturas

2-PrOH	2-propanol
Ac	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
AD	Detección amperométrica
Ag	Antígeno
AGs	Aminoglucósidos
AMK	Amikacina
ANI	Anidulafungina
ANOVA	Análisis de la varianza
BEH	Columna con tecnología híbrida por puentes etileno
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BLING	<i>Betalactam infusion group</i>
C18	Octadecilsilano
C4	Butilsilano
C6	Hexilsilano
C8	Octilsilano
CAS	Chemical abstract service
CASP	Casposfungina
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> . Electroforesis capilar
CEF	Ceftolozano
CEFE	Cefepima
CLD	<i>Chemiluminescence detection</i> . Detector de quimioluminiscencia.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CME	Concentración mínima efectiva
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CN	Ciano
CRRT	<i>Continuous renal replacement therapies</i> . Terapias de reemplazo renal continuas
CVVHDF	<i>Continuous venovenous hemodiafiltration</i> . Hemodiafiltración venovenosa continua
DAD	<i>Diode array detection</i> . Detector ultravioleta de fila de diodos
DAI	Dosis con ampliación del intervalo de administración
DEA	Dietilamina

DHP-1	Dehidropeptidasa-1
DMD	Dosis múltiples diarias
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygenation</i> . Terapia de oxigenación mediante membranas extracorpóreas
ECOFF	Eucast Epidemiological Cut-OFF
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i> . Enzimoinmunoensayo
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoassay</i> . Ensayo de inmunosorbente unido a una enzima
EMA	<i>European Medicines Agency</i> . Agencia Europea del Medicamento
EMIT	<i>Enzyme multiplied immunoassay technique</i> . Técnica de enzimoinmunoensayo homogéneo.
EPIC	<i>European Prevalence of Infection in Intensive Care – Extended Study on Prevalence of Infection in Intensive Care</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> . Ionización por electronebulización.
EtOH	Etanol
EUCAST	<i>European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> . Comité Europeo del Antibiograma
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionaria
FIA	<i>Fluoroimmunoassay</i> . Fluoroinmunoanálisis heterogéneo
FLD	<i>Fluorescence detection</i> . Detección fluorescente
FM	Fase móvil
FMC	9-fluorenilmetil cloroformato
FNBD	7-fluoro-4-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol
FPIA	<i>Fluorescence polarization immunoassay</i> . Inmunoensayo de fluorescencia de luz polarizada
GC	<i>Gas chromatography</i> . Cromatografía gaseosa
GHP	<i>GH Polypro</i> . Polipropileno
GLC	<i>Gas-liquid chromatography</i> . Cromatografía gas-líquido
HAcO	Ácido acético
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HFPA	Ácido heptafluoropentanoico
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> . Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic balance</i> . Balance hidrofílico-lipofílico

HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> . Cromatografía de líquidos de alta resolución
HTLC	<i>High-temperature liquid chromatography</i> . Cromatografía de líquidos de alta temperatura
IDA	1-metoxicarbonil indolicina-3,5-dicarbaldehído
IFI	Infecciones fúngicas invasivas
i-PrOH	Isopropanol
K ₂ EDTA	Etilendiaminotetraacetato dipotásico
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> . Extracción líquido-líquido
MCX	<i>Mixed-mode cation exchange</i> . Intercambio catiónico
MeOH	Metanol
MER	Meropenem
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
MOPS	Ácido 3-morfolino 1-propanosulfónico
MS	<i>Mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas
MS-MS	Espectrometría de masas en tándem
MTBE	Éter metil tert-butílico
NaAcO	Acetato de sodio
NAC	<i>N</i> -acetil-L-cisteína
NaH ₄ AcO	Acetato de amonio
NC	Nivel de confianza
ND	No disponible
NITC	1-naftil isotiocianato
ODS	Objetivos para el Desarrollo Sostenible
OPA	<i>o</i> -ftalaldehído
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i> . Proteínas de unión a penicilina
PES	Polietersulfona
PFP	Columna con tecnología pentafluorofenilo
PI	Patrón interno
PIP	Piperacilina
PTFE	Politetrafluoruro de etileno
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> . Fluoruro de polivinilideno
QC	Control
RIA	<i>Radioimmunoassay</i> . Radioinmunoensayo
RPLC	<i>Reversed phase liquid chromatography</i> . Cromatografía Líquida de fase inversa

RRT	<i>Renal replacement therapies</i> . Terapias de reemplazo renal
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SAX	<i>Strong anion exchanger</i> . Intercambio aniónico fuerte
SCX	<i>Strong cation exchanger</i> . Intercambio catiónico fuerte
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> . Dodecilsulfato de sodio
SPE	<i>Solid phase extraction</i> . Extracción en fase sólida
TAZ	Tazobactam
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> . Ácido tricloroacético
TDM	<i>Therapeutic drug monitoring</i> . Monitorización terapéutica de fármacos
TEA	Trietilamina
TF	Tampón fosfato
TFA	Ácido trifluoroacético
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UHPLC	<i>Ultra high-performance liquid chromatography</i> . Cromatografía líquida de ultra alta resolución
UV-Vis	Detección Ultravioleta/Visible
VOR	Voriconazol

XII.1.2.- Símbolos de parámetros farmacocinéticos, fisicoquímicos, cromatográficos y estadísticos

$\% f_T$	Fracción porcentual de tiempo del intervalo de dosificación
$\% f_{T > CMI}$	$\% f_T$ durante la cual la concentración de antimicrobiano permanece por encima de la CMI
σ^2_{Ci}	Varianza residual de las concentraciones de fármaco observadas
σ^2_{Pi}	Varianza interindividual de los parámetros en la población
A/B	Factor de asimetría, donde A y B son las semianchuras izquierda y derecha, respectivamente, al 10% de la altura del pico cromatográfico
AUC	<i>Area under curve</i> . Área bajo la curva concentración plasmática-tiempo
b_0	Ordenada en el origen de la recta de calibrado
b_1	Pendiente de la recta de calibrado
C	Concentración preparada
\hat{C}	Concentración encontrada
Cl	Aclaramiento
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
$C_{m\acute{i}n}$	Concentración mínima
$E_r(\%)$	Error relativo (%)

k	Factor de retención cromatográfico
K	Factor de cobertura
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i> . Limite inferior de cuantificación
$\log P$	Logaritmo de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua
LOD	<i>Limit of detection</i> . Límite de detección
LOQ	<i>Limit of quantification</i> . Límite de cuantificación
M_r	Masa molecular relativa
MS_r	Cuadrado medio residual
MS_{run}	Cuadrado medio entre días
N_{rs}	Número de réplicas realizadas
P_i	Valor farmacocinético poblacional medio
P_j	Parámetro farmacocinético estimado en el individuo
P_m	Parámetro farmacocinético a estimar
pK_a	Menos logaritmo de la constante de acidez
R^2	Coefficiente de determinación
RSD	<i>Relative standard deviation</i> . Desviación estándar relativa
RSD_i	<i>Intermediate relative standard deviation</i> . Precisión intermedia
RSD_r	Repetibilidad
s	Desviación estándar
S_i	Precisión intermedia
S_{mean}^2	Precisión de la media
S_r	Desviación estándar de repetibilidad
S_{run}	Desviación estándar entre días
SS	Suma de cuadrados
t_M	Tiempo total básico de retención cromatográfico
t_p	Tiempo de perfusión
t_R	Tiempo total de retención cromatográfico del analito
u	Incertidumbre estándar
u_{ref}	Incertidumbre asociada al valor aceptado como verdadero
U	Incertidumbre expandida
ULOQ	<i>Upper limit of quantification</i> . Limite superior de cuantificación
V_d	Volumen de distribución
V_{dss}	Volumen de distribución en el estado estacionario
W_i	Factor de ponderación para la incertidumbre de los datos obtenidos experimentalmente

XII.2.- Anexo II: Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículo 1. Ezquer-Garin C., Escuder-Gilabert L., Martín-Biosca Y., Ferriols-Lisart R., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. Fit-for-purpose chromatographic method for the determination of amikacin in human plasma for the dosage control of patients. *Talanta* 150 (2016), 510-515.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.057>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2016: 4.132

Categoría y posición: Analytical Chemistry, 9/76 (Q1)

Número de citas: 11 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 2. Aguilar-Aguilar G., Ferriols-Lisart R., Carbonell J.A., Ezquer-Garin C., Alonso J.M., Villena A., Puig J., Navarro D., Alós-Almiñana M. Pharmacokinetics of Anidulafungin during venovenous extracorporeal membrane oxygenation. *Critical Care* 20 (2016), 325.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1501-4>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2016: 5.358

Categoría y posición: Critical Care Medicine, 6/33 (Q1)

Número de citas: 13 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 3. Aguilar-Aguilar G., Ferriols-Lisart R., Lozano A., Ezquer-Garin C., Carbonell J.A., Jurado A., Carrizo J., Serralta F., Puig J., Navarro D., Alós-Almiñana M., Belda J. Optimal doses of Caspofungin during continuous venovenous hemodiafiltration in critically ill patients. *Critical Care* 21 (2017), 17.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1594-9>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2017: 6.425

Categoría y posición: Critical Care Medicine, 6/33 (Q1)

Número de citas: 15 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 4. Ezquer-Garin C., Ferriols-Lisart R., Alós-Almiñana M., Aguilar-Aguilar G., Belda-Nacher J.F., Carbonell J.A. Validated HPLC-UV detection method for the simultaneous determination of ceftolozane and tazobactam in human plasma. *Bioanalysis* 10 (7) (2018), 461-473.

DOI: <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0257>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR) 2018: 2.321

Categoría y posición: Analytical Chemistry, 37/84 (Q2)

Número de citas: 10 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 5. Aguilar G., Ferriols R., Martínez Castro S., Ezquer Garin C., Pastor E., Carbonell J.A., Alós M., Navarro D. Optimizing ceftolozane-tazobactam dosage in critically ill patients during continuous venovenous haemodiafiltration. *Critical Care* 23 (2019), 145.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2434-5>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2019: 6.959

Categoría y posición: *Critical Care Medicine*, 6/33 (Q1)

Número de citas: 20 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 6. Pérez-Pitarch A., Guglieri-López B., Ferriols-Lisart R., Pérez A., Ezquer-Garin C., Hernández-Boluda J.C., Navarro D., Alós-Almiñana M. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of voriconazole against *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* in allogeneic stem cell transplant recipients. *Ther. Drug Monit.* 41 (76) (2019), 740-747.

DOI: <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000657>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2019: 2.073

Categoría y posición: *Toxicology*, 69/92 (Q3), *Pharmacology & Pharmacy*, 190/271 (Q3), *Medical Laboratory Technology*, 15/29 (Q3).

Número de citas: 7 (consultado en diciembre de 2022)

Otras publicaciones derivadas de los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis Doctoral son:

Artículo 7. Ferriols-Lisart R., Aguilar-Aguilar G., Pérez-Pitarch A., Puig J., Ezquer-Garin C., Puig J., Alós-Almiñana M. Plasma concentrations of caspofungin in a critically ill patient with morbid obesity. *Critical Care* 21 (2017), 200.

<https://doi.org/10.1186/s13054-017-1774-2>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2017: 6.425

Categoría y posición: *Critical Care Medicine*, 6/33 (Q1)

Número de citas: 7 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 8. Pérez-Pitarch A., Ferriols-Lisart R., Aguilar-Aguilar G., Ezquer-Garin C., Belda J., Guglieri-López B. Dosing of caspofungin based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic index for the treatment of invasive fungal infections in critically ill patients on continuous venovenous haemodiafiltration. *Int. Journ. of Antimicrob. Agents.* 51 (2018) 115-121.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.013>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2018: 4.615

Categoría y posición: *Pharmacology & pharmacy*, 32/267 (Q1)

Número de citas: 13 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 9. Carbonell N., Aguilar-Aguilar G., Ferriols-Lisart R., Huerta R., Ferreres J., Calabuig M., Juan-Mar M., Ezquer-Garin C., Colomina J., Blasco M.L. Ceftolozane pharmacokinetics in a septic critically ill patient under different extracorporeal replacement therapies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20 (64) (2019) e01782.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01782-19>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2019: 4.904

Categoría y posición: Pharmacology & pharmacy, 28/271 (Q1)

Número de citas: 8 (consultado en diciembre de 2022)

Artículo 10. Aguilar-Aguilar G., Ferriols-Lisart R., Martínez-Castro S., Ezquer-Garin C., Pastor E., Carbonell JA., Alós-Almiñana M., Navarro D. Optimizing ceftolozane-tazobactam dosage during continuous renal replacement therapy: some nuances. *Critical Care* 24 (2020), 11.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2724-y>

Factor de impacto en Journal Citation Reports (JCR), 2020: 9.097

Categoría y posición: Critical Care Medicine, 5/36 (Q1)

Número de citas: 4 (consultado en diciembre de 2022)

XII.3.- Anexo III: Documentos del Comité Ético de Investigación Clínica

Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

Dr. Gerardo Aguilar
Servicio de Anestesiología y Reanimación

Valencia, 12 de diciembre de 2018

Estimado Dr. Aguilar,

El motivo de la presente es informarle que en la pasada reunión del Comité de fecha 29 de noviembre de 2018, se evaluó su comunicación del siguiente caso clínico, "Análisis Farmacocinética de Ceftolozano-tazobactam y Tedizolid En paciente crítico con terapia continua de reemplazo renal"

Tras la evaluación se su solicitud para analizar las muestras y comunicar el comportamiento farmacocinético de estos fármacos, y entendiendo que el análisis sería de gran interés para la comunidad científica y el tratamiento de futuros pacientes, que se ha informado a la familia, facilitando una Hoja de información al Representante Legal mediante la cual ha consentido a realizar las determinaciones, acuerda informar favorablemente.

En caso de requerir información adicional, no dude en ponerse en contacto conmigo.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Dra. Cristina Gomis gozalbo
Vicepresidenta del Comité Ético de Investigación Clínica con Medicamentos
Hospital Clínic Universitario de Valencia



CONSELLERIA DE SANITAT
Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris



NºRef: DGFPS/SGFPS/SAFD/CAVIME/ol

Fundación Investigación Clínico Valencia
INCLIVA
A/A D. Rafael Carmena Rodríguez
Av. Blasco Ibáñez 17
46010 Valencia

Adjunto remito resolución de autorización de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios para la realización del estudio titulado "Estudio observacional del modelo farmacocinético poblacional de Voriconazol en pacientes con transplante alogénico de células madre hematopoyéticas", con código protocolo CSV-VOR-2014-01.

Valencia, 18 de noviembre de 2014
**LA SUBDIRECTORA GENERAL DE POSICIONAMIENTO
TERAPÉUTICO Y FARMACOECONOMÍA**

Fdo.: Ruth Usó Talamantes



CONSELLERIA DE SANITAT
Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE ESTUDIO POSTAUTORIZACIÓN OBSERVACIONAL PROSPECTIVO

DESTINATARIO: D. RAFAEL CARMENA RODRÍGUEZ. FUNDACIÓN HOSPITAL CLÍNICO VALENCIA. INCLIVA

Vista la solicitud formulada por D. Rafael Carmena Rodríguez, en representación de la Fundación Hospital Clínico Valencia INCLIVA, con domicilio a efectos de notificación Av. Blasco Ibáñez nº 17, 46010 Valencia.

ANTECEDENTES

1º- Con fecha de entrada en la Conselleria de Sanitat 14 de octubre de 2014, D. Rafael Carmena Rodríguez, en representación de la Fundación Hospital Clínico Valencia INCLIVA solicita la autorización para la realización del estudio postautorización observacional titulado "Estudio observacional del modelo farmacocinético poblacional de Voriconazol en pacientes con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas", con código protocolo CSV-VOR-2014-01.

2º-El Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales de Medicamentos y Productos Sanitarios (CAEPO), evaluó el citado estudio y emitió informe favorable al Director General de Farmacia y Productos Sanitarios por no contravenir las directrices establecidas en el artículo 24 del RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y el artículo 8 de la Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

- 1º- La Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios es competente para autorizar la realización de los estudios postautorización de acuerdo a lo dispuesto en el Decreto 4/2014, de 3 de enero, del Consell, por el que se aprueba el Reglamento Orgánico y Funcional de la Conselleria de Sanidad.
- 2º- RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad , Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano, establece en su artículo 24 que los estudios postautorización deberán tener como finalidad complementar la información obtenida durante el desarrollo clínico de los medicamentos previo a su autorización y queda prohibida la planificación realización o financiación de estudios postautorización con la finalidad de promover la prescripción de los medicamentos.
- 3º- La Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios postautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.
- 4º- Decreto 73/2009, de 5 de junio, del Consell, por el que se regula la gestión de ensayos clínicos y estudios postautorización observacionales con medicamentos y productos sanitarios.



CONSELLERIA DE SANITAT
Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

5º- Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana

De conformidad con ello, la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios

RESUELVE

1º- **AUTORIZAR** la realización del estudio:

Título: Estudio observacional del modelo farmacocinético poblacional de Voriconazol en pacientes con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Protocolo versión 1.1 de 20 mayo de 2014. HIP/CI versión 1.1 de 20 mayo de 2014.

Código protocolo: CSV-VOR-2014-01.

en el centro sanitario propuesto en la solicitud:

CENTROS	INVESTIGADORES
Hospital Clínico de Valencia	Dr. Carlos Solano Vercet

2º- La realización de este estudio en el centro está condicionada a que:

- en el CRD no aparezcan datos que puedan identificar al paciente
- el Gerente del Departamento dé el visto bueno para su realización y firme el correspondiente contrato con el promotor.

3º- El promotor deberá comunicar a esta Dirección General la fecha efectiva de comienzo del estudio en el centro sanitario. Asimismo, enviará el informe de seguimiento anual y deberá comunicar cualquier incidencia relevante de forma inmediata. Tras la finalización del estudio, entre los 3 y 6 meses siguientes, presentará el informe final del estudio.

Contra esta Resolución, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponerse Recurso de Alzada ante la Secretaría Autonómica de Sanidad en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente al de la recepción de la presente notificación.

Valencia, 18 de noviembre de 2014
**EL DIRECTOR GENERAL DE FARMACIA
Y PRODUCTOS SANITARIOS**

Fdo.: José Luis Trillo Mata



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitario de Valencia

CERTIFICA

Código de protocolo del promotor: MER-CAS-2013-01

Versión/fecha del protocolo: Versión 1.1 de 11 de noviembre de 2014

Hoja de información al paciente/sujeto (versión/fecha): Versión 1.1 de 11 de noviembre de 2014

Título: Farmacocinética de caspofungina en pacientes sometidos a hemodiafiltración.

Promotor: Dr. Gerardo Aguilar

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitario de Valencia en su reunión de fecha 27 de noviembre de 2014, acta nº 298, tras la evaluación realizada de la propuesta del promotor relativa al estudio especificado, y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

1. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del investigador y de sus colaboradores
2. Cuestiones relacionadas con la idoneidad de las instalaciones.
3. Cuestiones relacionadas con las cantidades y, en su caso, previsiones de remuneración o compensación para los investigadores y sujetos del estudio y los aspectos relevantes de cualquier acuerdo entre el promotor y el centro, que han de constar en el contrato firmado.
4. Consideraciones generales del estudio.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización de dicho estudio este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Servicio de Anestesia y Reanimación, por el **Dr. Aguilar Aguilar** como investigador principal.

* Este dictamen queda condicionado a la aprobación del Estudio por la Conselleria de Sanidad

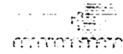
Lo que firmo en Valencia a 27 de noviembre de 2014.

Fdo.: Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético

F-CE-GEva -14 Dictamen estudio



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

Dr. D. Gerardo Aguilar
Servicio de Anestesiología y Reanimación
Hospital Clínic Universitario de Valencia

Valencia, 2 de noviembre de 2016

Estimado Dr. Aguilar,

El motivo de la presente es informarle que en la pasada reunión de fecha 27 de octubre de 2016, se evaluaron los protocolos remitidos de los dos casos clínicos "Análisis Farmacocinético de Tedizold durante la terapia de reemplazo renal" y "Análisis Farmacocinético de Anidulafungina durante la oxigenación con membrana extracorpórea".

Tras su evaluación, se acordó informar favorablemente, al análisis y posterior comunicación de los resultados farmacocinéticos de las muestras obtenidas.

En caso de requerir información adicional, no dude en ponerse en contacto conmigo.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.


Antonio Peláez
Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica
Hospital Clínic Universitario de Valencia

