



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Hidrogeología y Química Analítica

Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y
Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTIMICROBIANOS EN FLUIDOS
BIOLÓGICOS TRAS SU APLICACIÓN A PACIENTES



Autor:

Yolanda Maturana Navarrete

Tutores:

Antonia Garrido Frenich

Roberto Romero González

Julio 2011

TRABAJO FIN DE MASTER

El presente trabajo ha sido presentado por Yolanda Maturana Navarrete correspondiente al Master: Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental.



Fdo. Yolanda Maturana Navarrete

Tutores:

Fdo. Antonia Garrido Frenich



Fdo. Roberto Romero González



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTIMICROBIANOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS
TRAS SU APLICACIÓN A PACIENTES.**

I. DOCENCIA	4
II. MEMORIA CIENTÍFICA	8
1. OBJETIVO.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1. Antimicrobianos en fluidos biológicos humanos	8
2.2. Técnicas de análisis	17
2.3. Tratamiento y manipulación de la muestra	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Productos químicos y reactivos.....	19
3.2. Instrumentación.....	20
3.3. Método de análisis por UHPLC-MS/MS.....	21
3.4. Método de extracción.....	24
3.5. Recogida de muestra.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Resultados.....	25
4.2. Correlacion de resultados.....	38
5. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS DE TRABAJO FUTURAS.....	41
6. REFERENCIAS.....	43

I. DOCENCIA

El presente Máster *“Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”*, curso 2010-2011, consta de 60 créditos ECTS y está estructurado en 5 módulos. Los tres primeros módulos son de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y un quinto correspondiente al Trabajo Fin de Máster.

A continuación se describen, los aspectos más relevantes de los mismos:

Módulo 1. Plaguicidas (12 ECTS)

Módulo 2. Contaminantes (9 ECTS)

Módulo 3. Gestión de laboratorios (9 ECTS)

Módulo 4. Experimentación en Técnicas Cromatográficas (15 ECTS)

Módulo 5. Proyecto Fin de Master (15 ECTS)

MÓDULO I – PLAGUICIDAS

Se desarrollan las siguientes asignaturas:

1. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos, cursada).
2. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada).
3. Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada).
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada).

Con este módulo se han adquirido las bases para una política alimentaria efectiva, determinando cuales son los riesgos tanto potenciales como reales para la salud de los consumidores derivados de los alimentos, tanto a nivel de la producción como de su procesado, estableciendo medidas de carácter legislativo en el marco nacional y supranacional y sistemas de control eficaces que aseguren la correcta aplicación de esta normativa.

Se han definido y clasificado los plaguicidas, establecido las cualidades exigibles por la industria agroquímica y los procedimientos de registro, así como los procedimientos y normas establecidos

por la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Unión Europea (UE).

Además se han abordado aspectos sobre tipos, aplicaciones y formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, considerando tanto la eficacia como su impacto en el medioambiente.

MÓDULO II – CONTAMINANTES

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada).
2. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada).
3. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, cursada).

Se introducen los conceptos básicos en seguridad alimentaria, revisando los principios generales y tomando como referencia tanto las definiciones del Codex Alimentarius como las que dan los reglamentos básicos en legislación alimentaria. Seguidamente se definen los conceptos de trazabilidad, el plan plurianual de control oficial y la organización de controles oficiales, fijando históricamente su aparición y explicando la legislación que los define y desarrolla.

Se ha proporcionado una visión sobre los contaminantes más relevantes en el suelo y los diferentes métodos y técnicas para la prevención, así como para la remediación de suelos contaminados.

Finalmente se han abordado aspectos de toxicología general, alimentaria y ambiental, destacando la clasificación de sustancias tóxicas, el fenómeno tóxico y las fases de la acción tóxica.

MÓDULO III – GESTIÓN DE LABORATORIOS

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos, cursada).
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, cursada).
3. Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos, cursada).

En este módulo se hace referencia a los requisitos básicos del muestreo y los distintos tipos de métodos de muestreo. Se estudia como diseñar un plan de muestreo, los errores asociados al mismo y la legislación relacionada. Por otro lado, se estudian los distintos procedimientos de la preparación de muestra, así como una clasificación de las técnicas de extracción.

Se han expuesto los tipos de tratamientos de datos analíticos, control de calidad y la validación de métodos analíticos cualitativos y cuantitativos.

Además se incide en los sistemas de calidad, comentándose las normas de calidad y gestión ambiental habituales en laboratorios aplicadas a la gestión de la calidad en los laboratorios de ensayo y la elaboración de documentos relacionados con el manual de calidad. Se estudian las normas de gestión y de acreditación de laboratorios, además de conocer las buenas prácticas de laboratorio.

MODULO IV – EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Consta de las siguientes asignaturas:

1. Espectrometría de masas (3 créditos, cursada).
2. Exposición a plaguicidas (3 créditos, cursada).
3. Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada).

En este módulo se han adquirido conocimientos sobre los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas, y los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores y modos de operación.

Se ha evaluado la aplicación de la espectrometría de masas a la identificación de productos de transformación y rutas de degradación de plaguicidas en el campo agroalimentario y ambiental.

Además se estudiaron metodologías analíticas para la evaluación de riesgos de exposición humana a plaguicidas, como consecuencia de su aplicación en cultivos intensivos.

La última materia (Experimentación en técnicas cromatográficas) ha sido fundamentalmente de carácter experimental. Así se han realizado trabajos de laboratorio donde se evaluaron las técnicas cromatográficas, tanto de líquidos como de gases acopladas a detectores convencionales (p. ej. fluorescencia) y avanzados (espectrometría de masas), estudiando la influencia en la determinación de contaminantes orgánicos tanto de los parámetros cromatográficos como del sistema de detección.

MÓDULO V – TRABAJO FIN DE MÁSTER (15 CRÉDITOS)

El trabajo fin de Máster titulado: *“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTIMICROBIANOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS TRAS SU APLICACIÓN A PACIENTES”* se encuadra en la línea de investigación titulada “Métodos analíticos para residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas”.

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han adquirido habilidades y conocimientos para:

- 1- El tratamiento y análisis de datos experimentales.
- 2- Búsqueda de información relacionada con el trabajo científico desarrollado.

Cabe mencionar finalmente, que la realización de las asignaturas cursadas en el Máster, así como el desarrollo del Trabajo de Fin Master, me han permitido adquirir determinadas competencias, entre las que se pueden mencionar capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia, siendo éstas fundamentales tanto para la consolidación de la formación científica como para el desarrollo profesional.

II. MEMORIA CIENTÍFICA

1.OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la evaluación de las concentraciones de antimicrobianos (aminoglucósidos, macrólidos, β -lactámicos, quinolonas, penicilinas, cefalosporinas, carbapenes, glicopéptidos y polipéptidos) en distintos fluidos biológicos, (orina, suero, esputo y líquido cefalorraquídeo),

obtenidos mediante un método de cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC) acoplado a un analizador de triple cuádruplo (MS/MS).

2.INTRODUCCIÓN

2.1. Antimicrobianos en fluidos biológicos humanos

Los antimicrobianos son sustancias químicas que actúan impidiendo o disminuyendo la propagación de las bacterias en su medio ambiente. Dependiendo del origen de la sustancia, se pueden dividir en antibióticos, cuando son sustancias producidas de forma natural o semi-sintética por los microorganismos y quimioterápicos cuando tienen un origen sintético [1].

Hace un cuarto de siglo expertos en enfermedades infecciosas manifestaron que la lucha contra las infecciones había sido ganada, al parecer, gracias a los avances sanitarios, el incremento del consumo de agua potable y las mejores condiciones de vida existentes, unido a los programas de vacunación, el desarrollo de los antimicrobianos y, quizás, al hecho de haberse erradicado la viruela en el mundo [1].

Pero si hoy se analiza nuevamente la situación podrá comprobarse que el panorama es bien distinto.

Después de 70 años de tratamiento con antimicrobianos, los procesos infecciosos son aún la causa principal de las muertes que se producen en el mundo.

Entre los factores que han influido en el progreso hacia la situación actual, sobresalen [1,2]:

- ❖ la aparición de nuevos microorganismos
- ❖ el resurgimiento de viejos agentes patógenos
- ❖ las resistencias bacterianas
- ❖ las migraciones
- ❖ el cambio climático

Aquellos microorganismos que no se ven afectados por la presencia de los antimicrobianos en su hábitat son considerados resistentes. Esto es debido a que la utilización de los antimicrobianos produce el efecto indeseado de seleccionar cepas bacterianas resistentes a los mismos, ya sean o no patógenas.

Este fenómeno se puede producir sobre bacterias resistentes que de forma natural se encuentren en el medio antes de que se produzca el tratamiento antimicrobiano o bien porque se generan durante el proceso infeccioso y su tratamiento.

Las bacterias responden ante la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos de forma que en el nuevo ambiente sólo sobreviven los microorganismos más aptos en sentido evolutivo, es decir los más resistentes [3]. Así pues, la resistencia antimicrobiana es una inevitable respuesta evolutiva al empleo de antimicrobianos [4].

Al principio la industria farmacéutica fue capaz de proporcionar una corriente de nuevos antimicrobianos eficaces contra bacterias resistentes, pero pocos agentes nuevos han sido desarrollados en las dos décadas pasadas. En consecuencia muchos microorganismos aislados son ahora resistentes a la terapia convencional y a casi todos los agentes disponibles, lo que ha conducido a algunos observadores a especular sobre el final de la era del antimicrobiano [5-7].

Por ello durante varias décadas pasadas, el campo de dirección antimicrobiana ha sido conducido hacia dos desafíos significativos. Primero la dramática reducción de la velocidad de desarrollo y número de nuevas clases de antimicrobianos disponibles y, segundo, la subida inexorable de

resistencias antimicrobianas, tanto entre bacterias gram positivas como gram negativas, que puede conducir a infecciones intratables por agentes antimicrobianos.

Las infecciones causadas por estos microorganismos y el uso excesivo de antimicrobianos aumentan el porcentaje de morbilidad y mortalidad de los pacientes. Además, en el caso de bacterias resistentes, la permanencia en el hospital debería ser más larga y los pacientes deberían ser tratados con medicamentos más costosos y a veces más tóxicos [8,9]. De esta forma, los principales gastos adicionales de los hospitales son aquellos asociados con la permanencia prolongada [10], así como, el asociado a la asistencia médica unida con los organismos multiresistentes, como resultado del control de la infección. Por lo tanto, los hospitales tienen que identificar y aislar a pacientes infectados por las bacterias resistentes para impedir su extensión a otros [11].

Inicialmente el objetivo de monitorizar las concentraciones plasmáticas de antimicrobianos obedecía al intento de evitar toxicidad por sobredosificación o ineficacia por infradosificación [12]. Actualmente se han propuesto diferentes relaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que se han asociado con efectividad y con prevención de la multiresistencia [13-18]. Estos aspectos son especialmente importantes en pacientes críticos, en los que es necesario optimizar precozmente las concentraciones de antimicrobianos en el lugar de la infección y en los que, por otra parte, existen múltiples situaciones que modifican las concentraciones esperadas con la administración de las dosis establecidas como alteraciones del metabolismo y/o excreción, cambios en el volumen de distribución e interacciones farmacológicas [19,20].

También la medicina terapéutica supervisada (TDM) es considerada un instrumento importante en ajustes clínicos, sobre todo, en pacientes con infecciones serias que sufren tratamiento a largo plazo, ya que, permite y corrige el mantenimiento relativo de la concentración de los medicamentos, supervisándolos en la corriente sanguínea [21].

Entre los principales antimicrobianos que se pueden administrar a los pacientes se encuentran los recogidos en la **Tabla 1**, la cual muestra una clasificación de los mismos [1,22,23], indicando algunas de las características principales de estos compuestos.

Tabla 1: Clasificación de los antimicrobianos por su estructura química, origen y mecanismo de acción

Mecanismo de Acción	Clase de antimicrobiano	Subclase antimicrobiano		Antimicrobiano	Efecto		
Actúan a nivel de la pared bacteriana	Fosfomicinas	Fosfomicinas		Fosfomicinas	Bactericida		
	Cicloserina	Cicloserina		Cicloserina			
	Bacitracina	Bacitracina		Bacitracina			
	β-Lactámicos	Penicilinas	Naturales			Penicilina G	
						Penicilina V	
				Semisintéticas		Penicilinas Resistente	Metecilina
							Cloxacilina
							Dicloxacilina
							Oxacilina
			Amplio espectro			Amoxicilina	
						Ampicilina	
						Bacampicilina	
			Cefalosporinas	1ª Generación		Ticarcilina	
						Piperacilina	
						Cefazolin	
						Cefalexina	
		2ª Generación		Cefalotina			
				Cefuroxima			
				Cefotetan			
		3ª Generación		Cefoxitina			
				Cefaperazona			
				Cefotaxina			
			Ceftiofur				
		4ª Generación	Ceftazidina				
			Ceftriazone				
			Cefepima				
		Cefpiroma					
		Monobactams		Aztreonam			
		Carbapenems		Imipenen			
				Meropenem			
Inhibidores β-lactamasas	Naturales		Ac. Clavulámico				
	Sintéticos		Sulbactam				
Glicopéptidos	Uso clínico		Tazobactam				
			Vancomicina				
			Teicoplanin				
	Promotor de crecimiento		Daptomicina				
			Avoparcina				
Actúan a nivel de la membrana celular bacteriana	Polimixinas	Polimixinas		Polimixina B			
				Colistina			
	Ionóforos	Ionóforos		Valinomicina			
				Granamicina			

Mecanismo de Acción	Clase de antimicrobiano	Subclase antimicrobiano	Antimicrobiano	Efecto
Actúan a nivel de la síntesis de proteínas	Aminoglucósidos y Aminociclitolos	Se aisló de Micromonospora spp.	Gentamicina	Bactericida
		Se aisló de Streptomyces spp.	Estreptomina	
			Apramicina	
			Noemicina	
			Kanamicina	
			Tobramicina	
		Amikacina		
	Se aisló de Streptomyces spectabilis	Espectinomina		
	Macrólidos	Naturales	Eritromicina	Bacteriostático
			Espiromicina	
			Josamicina	
			Tilmicosina	
			Tilosina	
	Semisintéticos	Claritromicina	Bactericida (estreptococos)	
	Lincosamidas	Lincosamidas	Lincomicina	Bacteriostático
			Clindamicina	
			Pirlimicina	
	Streptogramidas	Grupo A	Dalfopristina	Bacteriostático (VRE)
		Grupo B	Quinupristina	Bactericida (MRSA)
	Tetraciclinas	Corta duración	Tetraciclina	Bacteriostático
		Oxitetraciclina		
Duración Intermedia		Metaciclina		
	Larga duración	Doxiciclina		
Fenicoles	Fenicoles	Cloranfenicol	Bacteriostático	
		Florfenicol		
Fusidanos	Fusidanos	Ácido Fusídico		
Oxazelidonas	Sintéticos	Linezolid		
Actúan a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas	Primera generación (quinolonas)	Ácido Nalidixico	Bactericida
			Ácido Oxolínico	
			Flumequina	
		Segunda generación (Fluoroquinolonas)	Ciprofloxacina	
			Norfloxacina	
		Tercera generación (Fluoroquinolonas)	Levofloxacino	
	Enrofloxacina			
	Cuarta generación (Fluoroquinolonas)	Moxifloxacino		
	Novobiocina	Novobiocina	Noocinavobi	Bactericida/Bacteriostático
	Rifampicina	Naturales	Rifampicina B	Bactericida
Semisintéticas		Rifampicina		
Sulfamidas	Sulfamidas	Sulfafurazol	Bacteriostático	

Actúan como Antimetabolitos

* Los antimicrobianos marcados en negrita son los incluidos en el estudio

A continuación se comentan las características de algunos de los antimicrobianos más significativos de las distintas familias estudiadas.

Amoxicilina y **ampicilina** son antimicrobianos β -lactámicos que pertenecen al grupo de las penicilinas y que han sido extensamente usadas durante más de 80 años y todavía son considerados como uno de los grupos más importantes de antimicrobianos. Son de amplio espectro y han sido clínicamente empleados contra bacterias gram positivas y gram negativas. La amoxicilina es una β -amino-substituida, antimicrobiano β -lactámico muy usado, debido a su amplio espectro y bajo precio. Tiene una acción bactericida e inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana, atacando a las enzimas que generan las proteínas de dicha pared celular. Dos metabolitos principales de la amoxicilina son el ácido amoxiciloico y amoxicilina (5R) piperazina-2',5'-diona o amoxicilina (5S) piperazina-2',5'-diona. Estos metabolitos han perdido la actividad antibacteriana del precursor y el ácido amoxiciloico podría tener propiedades potencialmente alérgicas.

Ampicilina es muy eficaz contra bacterias gram negativas y gram positivas. Es usado en el tratamiento de infecciones del intestino, urinarias y extensiones respiratorias. Muestra una actividad antimicrobiana inferior que la amoxicilina debido a su peor efecto antimicrobiano contra estreptococos hemolítico activo y neumococo.

Piperacilina es un antimicrobiano β -lactámico de amplio espectro de la familia de las ureidopenicilinas. Es usada extensamente en conjunción con tazobactam, un inhibidor de β -lactamasas [25].

Ceftriaxona es una cefalosporina de amplio espectro contra bacterias gram positivas y la mayor parte de bacterias gram negativas. A causa de su perfil farmacocinético es el agente antimicrobiano con más frecuencia prescrito [26].

Cefepime (hidrocloruro), que fue aprobado para el empleo clínico el 16 de mayo de 1997, es una cefalosporina, antimicrobiano de amplio espectro extensamente usado por clínicos y cirujanos. Se suele emplear para combatir determinadas enfermedades como: pulmonía, terapia empírica febril, infecciones urinarias de extensión sencillas y complicadas, infecciones de piel sencillas y complicadas, así como, infecciones intra-abdominales complicadas [27].

Imipenem es el primer miembro de una nueva clase de antimicrobianos β -lactámicos, los carbapenemes que tienen una actividad de amplio espectro contra bacterias aerobias y bacterias anaerobias. Es hidrolizado a nivel renal al unirse con la enzima deshidropeptidasa-I (DHP-I).

Daptomicina es un antimicrobiano lipopéptido cíclico autorizado en Europa para el tratamiento de tejido complicado de la piel y suaves infecciones en adultos. La estructura única de la daptomicina aparece un modo completamente nuevo de acción, implicando su inserción en la membrana citoplasmática de bacterias gram positivas, la formación secundaria de poros y la subsiguiente muerte de la célula, causada por la despolarización de la membrana [28].

Tobramicina es un antimicrobiano aminoglucósido extensamente usado contra infecciones de bacterias gram negativas. Es usado con regularidad en combinación con polimixina E y anfotericina B, para uso local en la cavidad bucal y estómago como parte de la descontaminación selectiva de la vía digestiva (SDD). Se acerca a objetivos de erradicar la colonización de microorganismos aerobios potencialmente patógenos del estómago.

En pacientes con SDD en tratamiento en la unidad de cuidados intensivos (UCI) se ha mostrado que se reducen el número de infecciones fugaces por gram negativos, disminuyendo la estancia en UCI así como la mortalidad de hospital.

Amikacina es un antimicrobiano bactericida del grupo de los aminoglucósidos usado en el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas. Actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la lectura del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y conduciendo a la bacteria a la imposibilidad de sintetizar proteínas necesarias para su crecimiento y desarrollo.

Claritromicina (6-o-metileritromicina A) es un macrólido de amplio espectro de actividad antimicrobiana. En orina se han identificado algunos de sus metabolitos principales como 14 (R)-hidroxi-6-O-metileritromicina y (14 (R)-hidroxiclaritromicina. Como medicamento parenteral, ha mostrado tener actividad antimicrobiana.

Linezolid es el único miembro autorizado del nuevo grupo de antimicrobianos sintéticos dentro de la clase oxazolidinonas que tiene actividad contra las bacterias gram positivas y micobacterias. Ha tenido un empleo extendido durante 10 años, por lo que, los datos clínicos y farmacocinéticos acumulados durante todo este tiempo son considerables [29].

Así ha sido extensamente usado en el tratamiento de infecciones por gram positivas, siendo el único entre los antimicrobianos activos contra la multiplicación de bacterias resistentes gram positivas, para la cual, hay una preparación oral con el 100 % de biodisponibilidad y un extenso volumen de distribución. Ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de una amplia gama de estas infecciones [30]. A pesar de ser un agente bacteriostático, los informes de los resultados de la monoterapia son buenos en pacientes con infecciones difíciles de tratar [31].

Levofloxacino es un antimicrobiano del grupo de las quinolonas, en concreto una fluoroquinolona. Es un enantiómero activo del ofloxacino con casi el doble de la potencia de este compuesto, pero con una menor toxicidad. Al igual que otras quinolonas actúa al inhibir el enzima ADN girasa encargada del empaquetamiento de ácido desoxirribunocleico (ADN).

El levofloxacino es efectivo contra un buen número de bacterias gram positivas y negativas por lo que se considera un antimicrobiano de amplio espectro.

Moxifloxacino es uno de los medicamentos más prometedores del grupo de las fluoroquinolonas por su alta actividad in vitro y en vivo y por su buena tolerancia. Es un agente antibacteriano de amplio espectro y es usado de forma particular, para infecciones de vías respiratorias [32], destacando como la molécula de elección entre las fluoroquinolonas a causa de su buena actividad frente a la tuberculosis [25,33,34].

Vancomicina es un glicopéptido de estructura compleja que se sintetiza de modo natural por *Nocardia orientalis*. Su efecto bactericida se ejerce inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana ya que posee una gran afinidad a los precursores de esta estructura. Su modo de acción se basa en alterar la acción de la transpeptidasa por impedimento estérico.

Es sumamente efectivo frente a bacterias como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *Cl. difficile* y en general con bacterias gram positivas, no así con gram negativas, dado que el gran volumen de la molécula le impide atravesar la primera de las membranas de éstas.

Teicoplanina es eficaz contra organismos aerobios gram positivo y organismos anaerobios. La teicoplanina es un grupo de glicopéptidos constituido por seis especies moleculares estrechamente relacionadas y otros componentes menores. Las actividades antimicrobianas de estos componentes contra algunas especies microbianas son diferentes. La supervisión de teicoplanina en el líquido cefalorraquídeo puede ser provechoso para ciertos grupos de pacientes, para asegurar que se mantienen las concentraciones terapéuticas [35].

Finalmente es importante destacar que más recientemente agentes antimicrobianos como cefepime, cuarta generación de cefalosporinas, imipenem, antimicrobiano β -lactámico de amplio espectro y vancomicina, antimicrobiano glicopéptido, a menudo prescrito contra bacterias gram positiva, son usados comúnmente en la sepsis de pacientes de la unidad de cuidados intensivos de grandes quemados.

2.2. Técnicas de análisis

En los últimos 20 años se han producido avances en las técnicas analíticas que han permitido la determinación de niveles de fármacos y sus metabolitos en distintos fluidos biológicos. Dichas metodologías proporcionan una determinación fiable de este tipo de compuestos, y así un mejor conocimiento de su “movilidad” en el organismo y poder individualizar la dosis, teniendo presente la variabilidad farmacocinética comentada con anterioridad [36].

Por ello, el disponer de la metodología adecuada para una rápida extracción, determinación y cuantificación de antimicrobianos en matrices biológicas implica una mejora en los resultados clínicos, pudiendo ajustar las dosis y eficacias de los tratamientos.

Para la determinación de antimicrobianos en fluidos biológicos, existen una gran cantidad de métodos, tales como, ensayos microbiológicos [37,38] y ensayos inmunológicos, por ejemplo el

inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) [39] y el ensayo inmunoenzimático (EMIT) [40].

Sin embargo, en los últimos años estos métodos se han visto sustituidos por el uso de la cromatografía de líquidos (LC).

Así, hay métodos analíticos para la cuantificación en plasma humano de amikacina [41-45], gentamicina [46-48], rifampicina [49-52] y ciclosporina A [53], empleando distintos detectores convencionales, como ultravioleta (UV) para la determinación de rifampicina [54] y sulfadoxina [55], fluorescencia para la determinación de vancomicina [56] y macrólidos [57] y no convencionales como la espectrometría de masas (MS) para rifampicina [58].

Sin embargo, es interesante el desarrollo de métodos analíticos, que permitan la cuantificación simultánea, en distintos fluidos biológicos de diferentes tipos de antimicrobianos, debido a que la terapia de combinación de antimicrobianos es ampliamente utilizada incluyendo la necesidad de una actividad de amplio espectro y el posible desarrollo reducido de resistencias. Por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado que la daptomicina en coadministración con aminoglucósidos, como gentamicina o amikacina, maximiza la actividad sinérgica y bactericida contra la bacterias gram positivas y reducen al mínimo la toxicidad, debido a su acumulación en los lisosomas de células renales [59,60].

Es por ello por lo que se han ido desarrollando distintos métodos de detección simultánea para la cuantificación de antimicrobianos. Así, se han detectado conjuntamente cefepime, vancomicina e imipemen en plasma humano por LC-UV [61], linezolid, rifampicina, levofloxacino y moxifloxacino en plasma humano por LC-UV [62] y daptomicina, amikacina, gentamicina y rifampicina en plasma humano por LC-MS [63]. En general, la mayoría de estos métodos destacan por la cuantificación conjunta de una o dos familias, como máximo, en un tiempo relativamente corto.

Sin embargo, para cubrir un amplio espectro de actuación y reducir resistencias, se suelen combinar antimicrobianos de familias diferentes [64-66], por lo que son preferibles las metodologías de análisis multifamilia, ya que hacen la estrategia analítica mucho más simple, más barata y permiten el control de analitos de diferentes clases, en una sola muestra.

En los últimos años se han desarrollado metodologías analíticas que permiten dicho análisis [67], reduciéndose considerablemente el tiempo de análisis debido a la utilización de columnas con un tamaño de partícula de la fase estacionaria inferior a 2 μm , originando lo que se denomina la cromatografía de líquidos de ultra presión (UHPLC) [68], que permite trabajar a altas presiones, reduciendo el tiempo de análisis en un factor entre 10-20 comparado a la LC convencional, manteniendo una buena resolución cromatográfica [69].

2.3. Tratamiento y manipulación de la muestra

Antes de la etapa de determinación de los compuestos es necesario incluir una etapa de tratamiento previo de la muestra. Así, la aplicación de métodos de inmunoensayo, como (FPIA) y (EMIT) en sangre, requieren como paso inicial un pretratamiento de muestra manual, consistente en la precipitación de eritrocitos y proteínas con metanol y posterior centrifugación, seguido de un segundo paso inmunoenzimático realizado en el equipo [70-72]. Este pretratamiento manual implica calibraciones frecuentes, debido a la poca estabilidad del reactivo usado en el inmunoensayo [73], por lo que son largos y laboriosos.

Por otro lado, los métodos cromatográficos cuando se utilizan con matrices complejas como fluidos biológicos, también requieren pretatamientos de muestra, para lo que se suelen aplicar distintas técnicas de extracción, como extracción en fase sólida (SPE) [74-77], extracción líquido-líquido (LLE) usando como disolvente diclorometano o acetato de etilo [78-80] y la dispersión en matriz de fase dispersiva (MSPD) [81,82].

Sin embargo, cuando se emplea como sistema de detección la espectrometría de masas, dichos métodos suelen ser más selectivos que los de inmunoensayo, por lo que, el tratamiento de muestra suele ser más rápido y sencillo [83,84].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Productos químicos y reactivos

Amoxicilina, levofloxacino, amikacina, ceftriaxona, vancomicina, ampicilina, tobramicina, tazobactam, piperacilina, ceftazidina y linezolid fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Imipemen, sulbactam, cefepime, moxifloxacino, teicoplanina fueron adquiridos en la Farmacopea Europea (Estrasburgo, Francia). Moxifloxacino y el ácido clavulánico se obtuvieron de Fluka (Steinheim, Alemania). Meropenen fue suministrado por LGC Stantandars (Barcelona, España) y tigeciclina de Wyeth (Madrid, España). Daptomicina y claritromicina fueron suministrados por Novartis (Barcelona, España) y Doctor Esteve (Barcelona, España), respectivamente.

Se prepararon disoluciones patrón de cada uno de los compuestos (concentraciones entre 200 y 300 mg/L) mediante la pesada exacta del antimicrobiano y disolución en 50 mL de metanol (grado HPLC, Sigma), almacenándose a -20 °C en oscuridad. A continuación se preparó una disolución intermedia, con una concentración de 10 mg/L de cada compuesto, a partir de las diluciones apropiadas de las disoluciones patrón con metanol y almacenadas a - 20 °C en oscuridad. Esta disolución era estable durante tres semanas, periodo tras el cual era sustituida por una nueva disolución.

Acetonitrilo (grado HPLC) fue suministrado por Sigma. El ácido fórmico y el formiato amónico fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El agua bidestilada fue obtenida a partir de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.). La disolución de DL-dithiothreitol (DTT) fue obtenida de Sigma-Aldrich y se preparó en agua bidestilada (1 %, m/v).

3.2. Instrumentación

Los análisis cromatográficos fueron realizados usando el sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA,EE.UU.), y las separaciones fueron llevadas a cabo usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm el tamaño de partícula) de Waters. El análisis de espectrometría de masas fue realizado usando un analizador de triple cuadrupolo TQD (Waters, Manchester, Reino

Unido). El tipo de ionización empleada fue la electronebulización (ESI) tanto en modo positivo como negativo. La adquisición de datos fue realizada usando el software MassLynx 4.0 (Waters).

Las centrifugaciones fueron realizadas en una centrifuga de gran volumen de Centronic (Barcelona, España).

3.3. Método de análisis por UHPLC-MS/MS.

La separación cromatográfica fue realizada con una fase móvil formada por metanol (eluyente A) y una solución acuosa de ácido fórmico, (0.01 %, v/v) (eluyente B), a un flujo de 0.3 mL/min.

Cada muestra fue inyectada dos veces: una en modo ESI positivo para la detección de la mayoría de los compuestos y otra en modo ESI negativo para la detección de ácido clavulánico y sulbactam. Para la elución de los compuestos detectados en ESI positivo se usó el gradiente mostrado en la **Tabla 2.**

Tabla 2. Gradiente de elución empleado para la separación de los compuestos detectados en ESI positivo.

Tiempo (min.)	%A	%B
0.0	20	80
3.5	100	0
4.5	100	0
5.0	20	80

Se puede observar que el tiempo total de análisis cromatográfico, incluyendo un paso de re-equilibrado, era de 5 minutos.

Para la elución de los compuestos monitorizados en ESI negativo se empleó el gradiente mostrado en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Gradiente de elución empleado para la separación de los compuestos detectados en ESI negativo.

Tiempo (min.)	%A	%B
0.0	10	90
3.0	100	0
4.0	100	0
4.3	10	90
5.5	10	90

En todos los casos (tanto en ESI positivo y ESI negativo), el volumen de inyección era 5 μ L y la temperatura de la columna de 30 °C.

Para la detección MS/MS, los parámetros de la fuente de ionización en el modo ESI positivo y negativo eran los mismos. El voltaje del capilar y el voltaje del extractor eran 3.0 kV y 2 V, respectivamente. La temperatura de la fuente era 120 °C y la temperatura de desolvatación 350 °C. El gas de cono (nitrógeno) y el gas de desolvatación (también nitrógeno) se fijaron a unos caudales de 80 L/h y 600 L/h, respectivamente, y la disociación inducida por colisión fue realizada usando argón como gas de colisión en una presión de 4×10^{-3} mbar en la celda de colisión.

En la **Tabla 4** se muestran los parámetros de MS/MS específicos para cada antimicrobiano.

Tabla 4. Parámetros MS/MS específicos para cada antimicrobiano.

Antimicrobiano	ESI	Tiempo de retención (min)	Voltage de cono (V)	Transición de cuantificación	Transición de confirmación
Tobramicina	+	0.61-0.65	30	468.7>324.4 (15)	468.7>145.2 (20)
Amikacina	+	0.64-0.68	55	586.7>163.2 (30)	586.7>264.4 (25)
Vancomicina	+	0.70-0.73	30	725.6>144.2 (15)	725.6>100.1 (20)
Imipenen	+	0.82-0.95	30	300.3>142.0 (25)	300.3>126.2 (20)
Cefepime	+	0.93-1.02	25	481.4>396.3 (15)	481.4>324.3 (17)
Amoxicilina	+	0.94-1.23	20	366.2>349.4 (10)	366.2>114.1 (20)
Tigecilina	+	0.96-1.13	20	586.6>569.8 (20)	586.6>513.6 (22)
Tazobactam	+	0.99-1.23	35	301.4>168.2 (12)	301.4>92.1 (25)
Ácido clavulánico	-	1.05-1.35	20	198.1>136.2 (5)	198.1>101.1 (10)
Meropenen	+	1.09-1.29	50	406.4>317.4 (20)	406.4>276.3 (20)
Ceftazidina	+	1.15-1.50	30	547.3>468.5 (10)	547.3>167.2 (25)
Sulbactam	-	1.26-1.32	25	232.1>140.2 (12)	232.1>188.3 (10)
Levofloxacino	+	1.57-1.88	20	362.3>318.6 (20)	362.3>221.3 (35)
Ceftriaxona	+	1.59-1.72	30	555.5>396.4 (10)	555.5>167.2 (25)
Ampicilina	+	1.60-1.89	30	350.2>106.1 (15)	350.2>114.1 (30)
Moxifloxacino	+	2.18-2.39	45	402.5>384.6 (20)	402.5>364.6 (25)
Linezolid	+	2.56-2.65	40	338.2>296.5 (20)	338.2>235.4 (20)
Teicoplanina	+	2.57-2.68	30	941.2>316.5 (15)	941.2>204.2 (20)
Piperacilina	+	2.72-2.99	70	540.4>398.5 (20)	540.4>182.1 (25)
Claritromicina	+	3.31-3.48	40	749.1>158.2 (30)	749.1>590.7 (20)
Daptomicina	+	3.64-3.82	35	811.2>159.2 (40)	811.2>341.6 (25)

3.4. Método de extracción

Los procedimientos optimizados para la extracción de antimicrobianos de las diferentes matrices fueron:

a) **Orina:** 0.5 mL de orina fueron tomados y diluidos con 1 mL de fase móvil. La mezcla era agitada vigorosamente antes del análisis por UHPLC-MS/MS.

b) **Suero:** 1 mL de suero fue mezclado con 1 mL de acetonitrilo. Después se agitó durante un minuto y las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm (4136 g) durante 5 minutos. Finalmente se tomaron 250 μ L del sobrenadante y se diluyeron con 750 μ L de fase móvil antes del análisis cromatográfico.

c) **Líquido ceforraquídeo (LCR):** Para el tratamiento de las muestras de LCR, se adicionaron 800 μ L de fase móvil a 200 μ L de LCR (1:4, v/v) y la mezcla se agitó durante un minuto, antes de proceder a su análisis cromatográfico.

d) **Espuito:** Por cada gramo de muestra se añadieron 4 mL de una solución acuosa de DTT (1 %, m/v). A continuación, las muestras fueran agitadas vigorosamente y centrifugadas a 5000 rpm (4136 g) durante 5 minutos. Finalmente se tomó 1 mL del sobrenadante antes de proceder al análisis cromatográfico.

3.5. Recogida de muestra

La orina, suero, LCR y espuito fueron recogidos de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) en un hospital de Almería (España). Estos pacientes estaban medicados con diversos antimicrobianos para el tratamiento de sus enfermedades. Las muestras fueron recogidas en contenedores estériles e inmediatamente fueron congelados a -20 °C, con el objetivo de evitar la degradación del antimicrobiano durante el transporte. Las muestras fueron analizadas dentro de las 24 h siguientes a su adquisición y antes del análisis, fueron descongeladas a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Como se ha comentado previamente, los datos analizados fueron recogidos de pacientes ingresados en la (UCI) de un hospital.

En concreto, en el presente estudio participaron 135 pacientes, de los que se tomaron un total de 351 muestras de 4 matrices, orina, suero, esputo o LCR, analizándose un total de 21 antimicrobianos en las mismas.

Los métodos utilizados para el análisis de estos compuestos, han sido previamente desarrollados y validados en el laboratorio del grupo de investigación en el que se realiza el estudio.

Es importante indicar que para cálculos posteriores, en este estudio solamente se han tenido en cuenta aquellos antimicrobianos que han sido detectados en una concentración igual o superior a los límites de cuantificación establecidos para las distintas matrices (**Tabla 5**).

Tabla 5. Límites de cuantificación (LOQ) de los antimicrobianos en las distintas matrices.

Compuesto	LOQ - Orina	LOQ - Suero	LOQ - Esputo	LOQ - LCF
Ácido clavulánico	0.50	0.10	0.20	0.13
Sulbactam	0.50	0.10	0.20	0.10
Tobramicina	1.00	0.10	0.10	0.10
Amikacina	1.00	0.10	0.15	1.00
Vancomicina	1.00	0.50	0.40	0.30
Tigecilina	1.00	0.17	1.0	0.29
Imipenen	0.50	0.10	0.20	0.10
Cefepime	0.50	0.10	0.20	0.47
Amoxicilina	0.50	0.10	0.20	0.10
Tazobactan	1.00	0.10	1.00	1.00
Meropenen	0.50	0.50	0.50	0.5
Ceftazidina	0.50	0.67	0.10	0.10
Levofloxacino	0.50	0.10	0.03	0.06
Ceftriaxona	0.50	0.66	1.00	0.21
Ampicilina	0.50	0.50	0.10	0.10
Moxifloxacino	0.50	0.10	0.10	0.10
Linezolid	0.50	0.67	0.25	0.10
Teicoplanina	0.50	0.13	0.10	1.00
Piperacilina	0.50	0.10	0.15	0.10
Claritromicina	0.50	0.10	0.04	0.10
Daptomicina	0.50	0.10	0.50	0.10

Los datos obtenidos del análisis de muestras se plasmaron en una hoja de Excel, creándose una base de datos donde se recogían como se ha mencionado anteriormente, los 135 pacientes incluidos en el estudio, los 21 antimicrobianos analizados y las 351 muestras tomadas a estos pacientes en cuatro matrices distintas, orina, suero, esputo y LCR.

Para cada una de estas matrices evaluadas, el número de muestras analizadas fueron las que se recogen en la **Figura 1**.

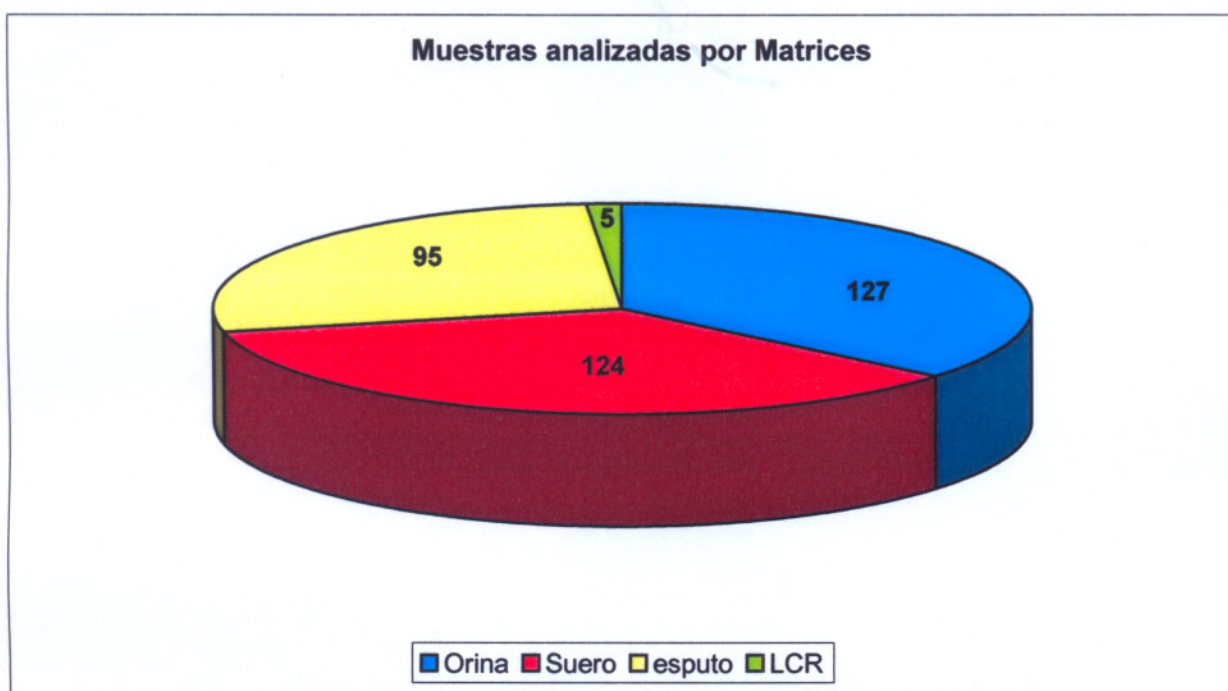


Figura 1. Distribución de las muestras analizadas en función de la matriz evaluada.

En la misma se observa que el número de muestras tomadas en orina y suero son similares (superior a 120), en esputo un poco menor (inferior 100) y en LCR son prácticamente insignificantes, representando menos del 1% del total.

Si se evalúan cada una de las matrices, según el número de veces que ha sido cuantificado cada antimicrobiano en la misma, se puede destacar que en la matriz orina, los antimicrobianos que en mayor porcentaje han sido cuantificados son la vancomicina y el meropenen con un 19% y 15%, seguidos de la amikacina, levofloxacino y la tobramicina con un 12%, 10% y 8% respectivamente como se detalla en la **Figura 2**.

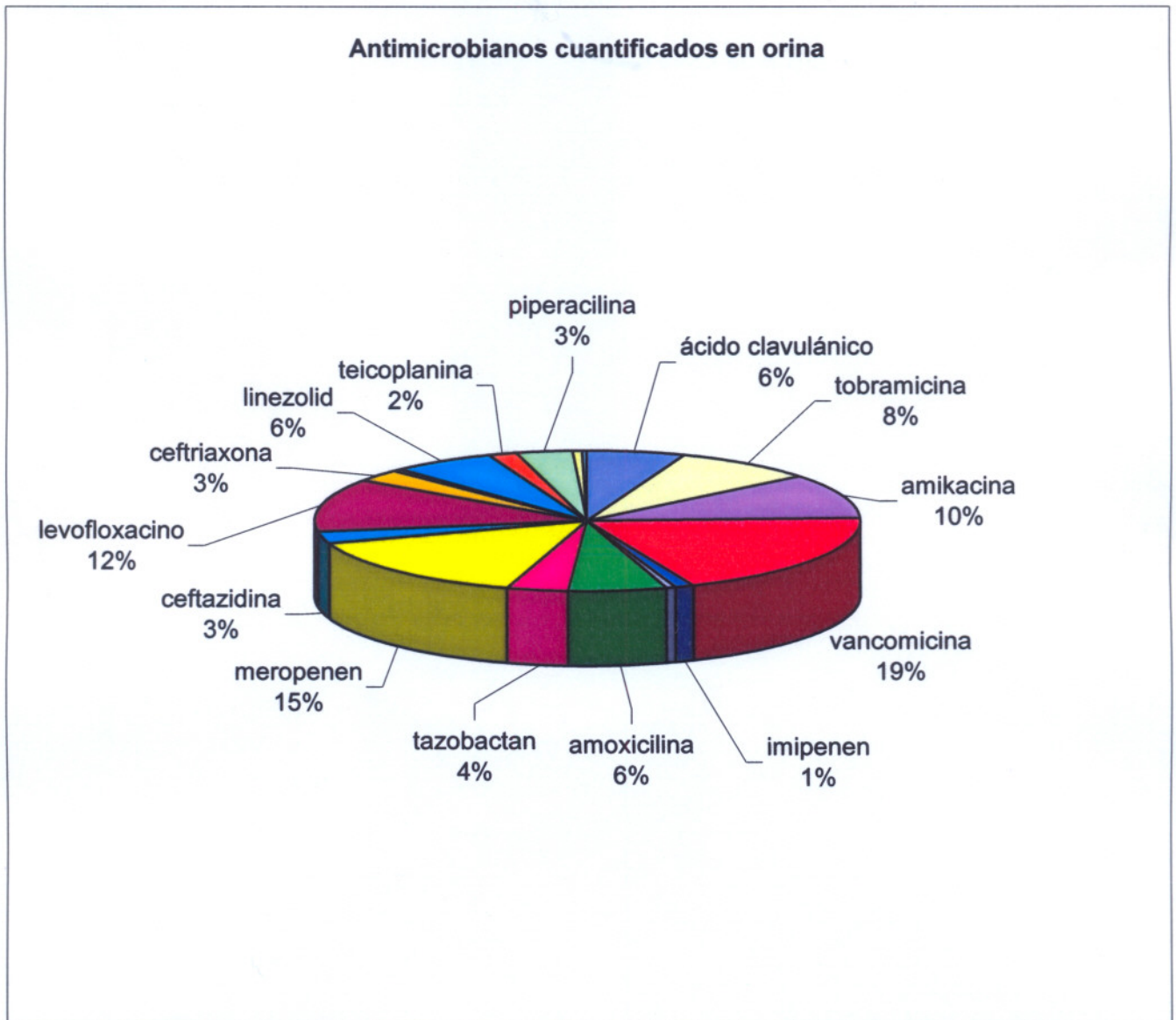


Figura 2. Representación porcentual de la presencia de cada antimicrobiano en orina.

Coincidiendo con la matriz orina, la vancomicina y el meropenen siguen siendo los dos antimicrobianos que en mayor numero de muestras aparecen en la matriz suero, con un porcentaje del 19% y 15 %. Le siguen el levofloxacino con un 12%, la tobramicina y la amoxicilina con un 8% y el linezolid junto con la amikacina con 7%, mostrándose estos porcentajes en la **Figura 3**.

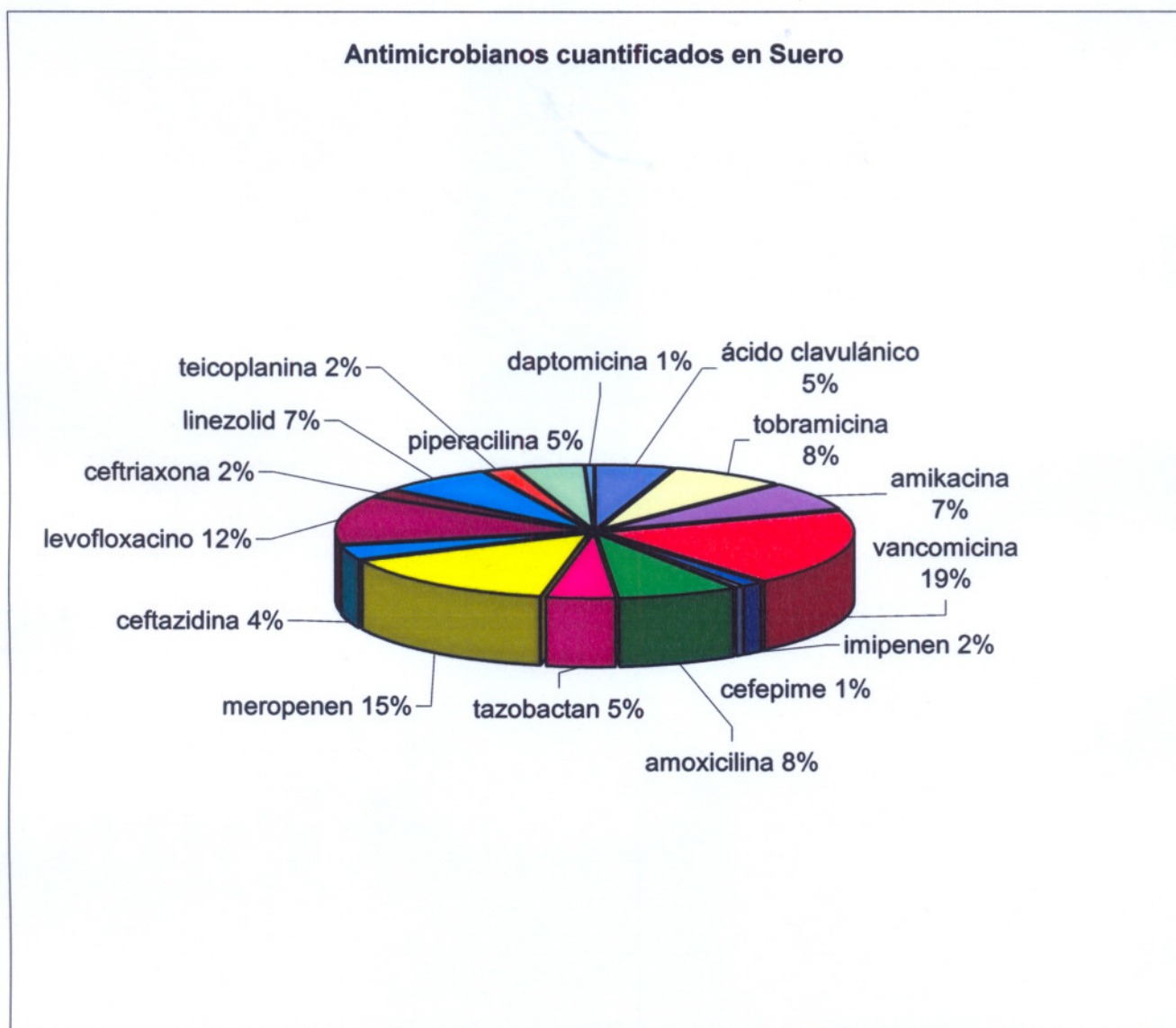


Figura 3. Representación porcentual de la presencia de cada antimicrobiano en suero.

Cuando se evalúan los resultados obtenidos en el esputo, la vancomicina sigue siendo el antimicrobiano que en mayor número de muestras aparece con un 17%, al igual que en las otras dos matrices, seguido del levofloxacino con un 16%, la amikacina con un 12%, el meropenen con un 10% y la tobramicina con un 9%, mostrándose los resultados obtenidos en la **Figura 4**.

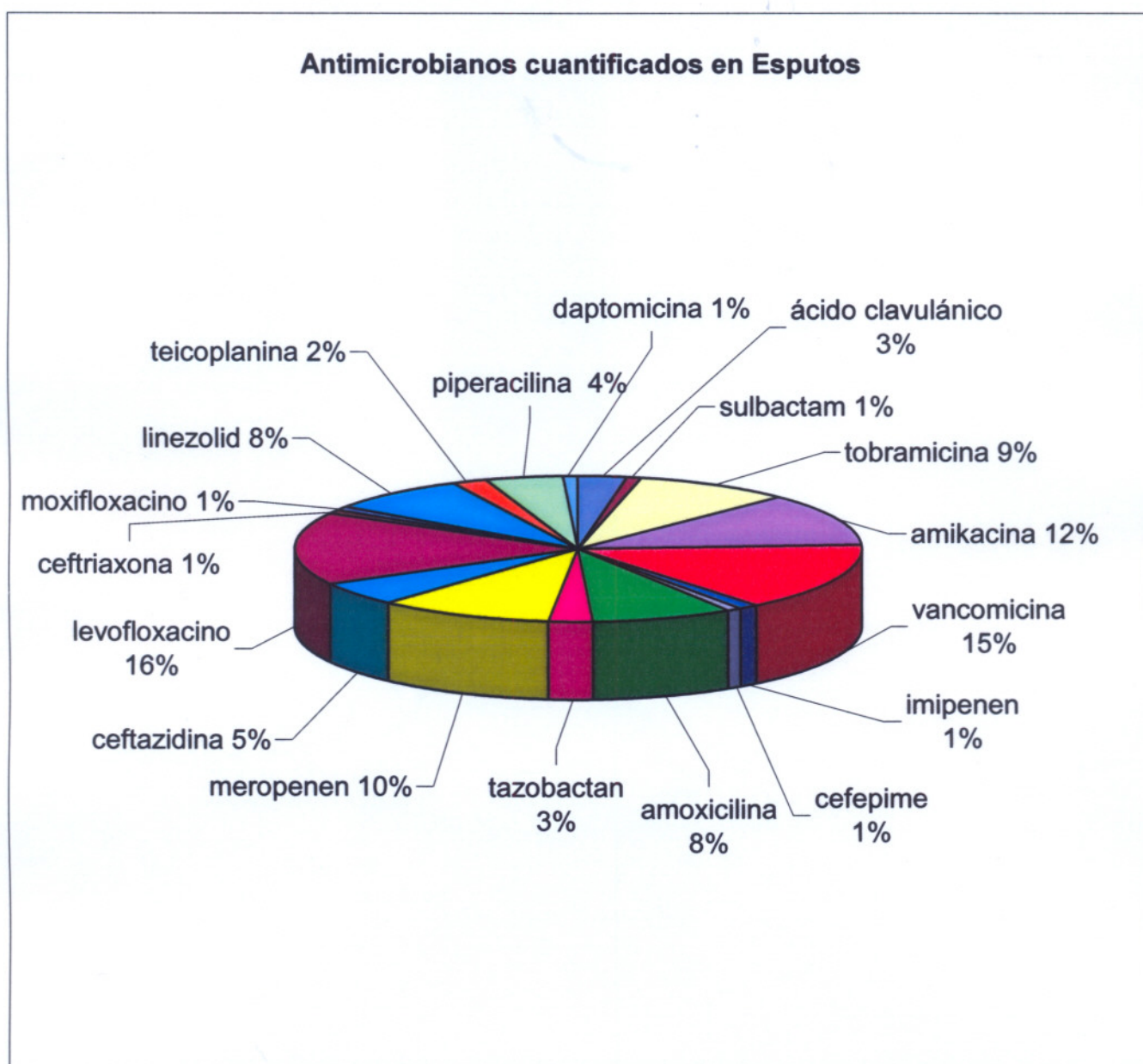


Figura 4. Representación porcentual de la presencia de cada antimicrobiano en esputo.

Solo cuatro antimicrobianos, ácido clavulánico, tobramicina, amoxicilina y linezolid han sido encontrados en la matriz LCR. Dos de ellos (amoxicilina y ácido clavulánico) en una misma muestra, y los otros cada uno en una muestra diferente. En consecuencia en dos de las muestras analizadas no se detectó ninguno de los compuestos en estudio.

La **Figura 5** muestra, de forma comparativa entre las distintas matrices, el número de muestras en las que se han detectado cada uno de los antimicrobianos. En general puede observarse que la matriz en la que se detectan más antimicrobianos es la orina, seguida de suero y por último esputo. Los datos de la matriz LCR son poco relevantes debido al escaso número de muestras.

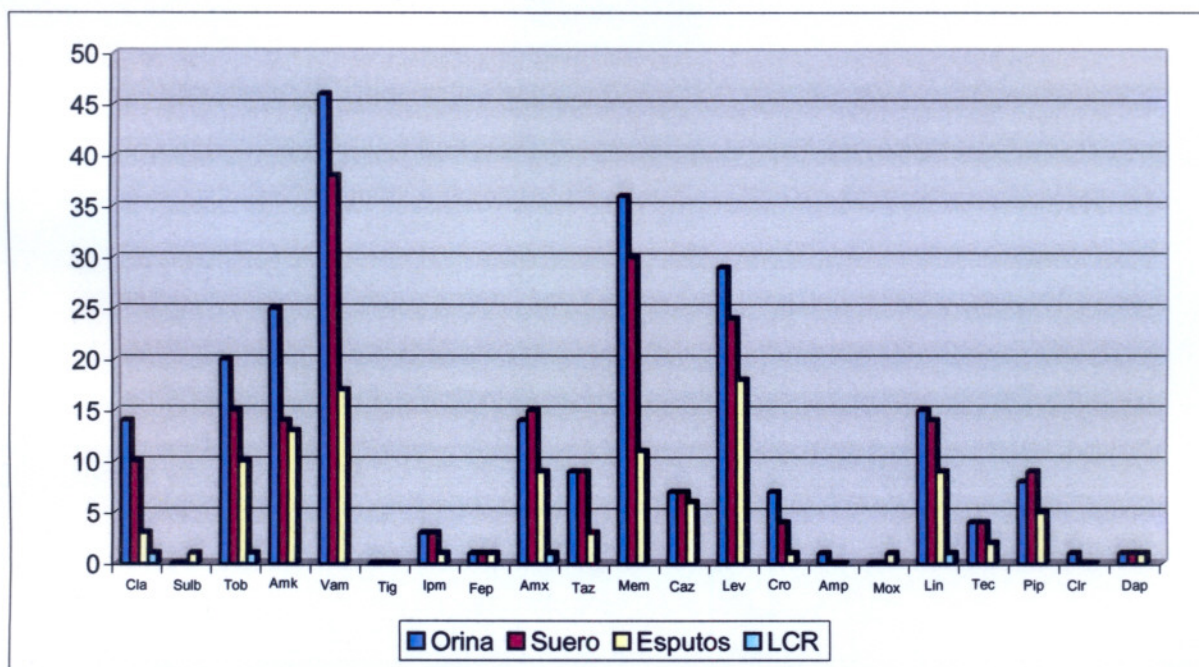


Figura 5. Representación comparativa del número del número de muestras en las que se han encontrado los antimicrobianos en cada una de las matrices.

Abreviaturas antimicrobianos: Ácido Clavulánico (Cla), Sulbactam (Sulb), Tobramicina (Tob), Amikacina (Amk), Vancomicina (Vam), Tigecilina (Tig), Imipenen (Ipm), Cefepine (Fep), Amoxicilina (Amx), Tazobactan (Taz), Meropenen (Mem), Ceftacidina (Caz), Levofloxacino (Lev), Ceftriaxona (Cro), Ampicilina (Amp), Moxifloxacino (Mox), Linezolid (Lin), Teicoplanina (Tec), Piperacilina (Pip), Claritromicina (Clr), Daptomicina (Dap).

Como se ha mencionado anteriormente, los antimicrobianos vancomicina, tobramicina, levofloxacino, meropenem y amikacina, son los que con mayor frecuencia se han encontrado en todas las matrices, excepto en el LCR. En la **Figura 6** se muestra el número de veces que cada antimicrobiano ha sido cuantificado en cada matriz.

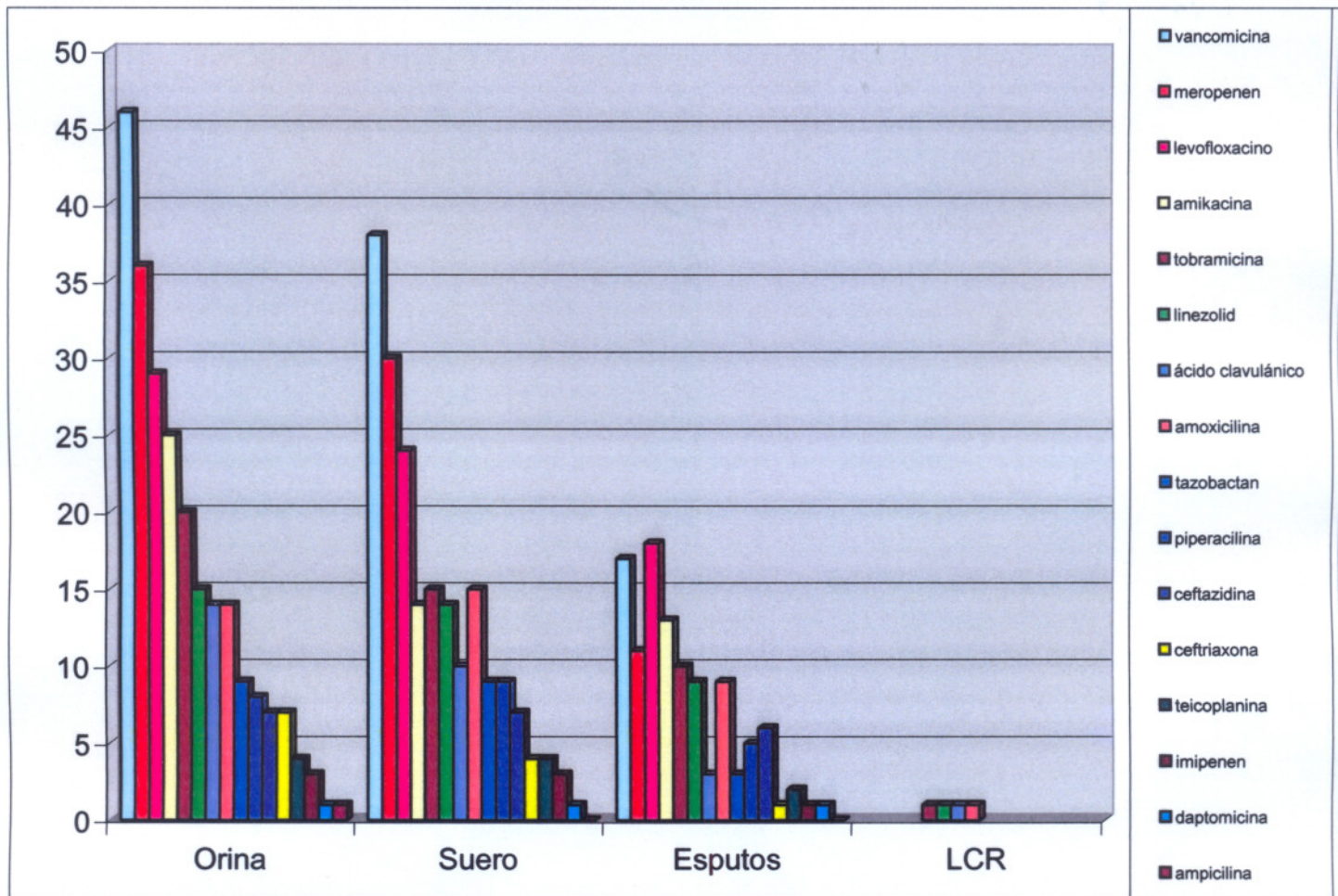


Figura 6. Número de veces que cada antimicrobiano ha sido detectado en cada una de las matrices evaluada.

En relación a las concentraciones detectadas de los distintos antimicrobianos en las cuatro matrices evaluadas, en la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos para la orina, señalándose tanto la concentración mínima y máxima detectada, valor medio, desviación estándar y el número de muestras detectadas de forma positiva para ese antimicrobiano. Puede observarse que en las 127 muestras de orina, se han cuantificado 18 antimicrobianos de los 21 en estudio, no detectándose, tigecilina y moxifloxacino. De estos 18 antimicrobianos cuatro han sido cuantificados una sola vez, por lo que su aparición no es relevante.

Se puede destacar la gran diferencia existente entre las concentraciones máximas y mínimas de alguno de estos antimicrobianos. Por ejemplo, la ceftacidina presenta una concentración máxima de 1578.88 mg/L, mientras que su concentración mínima es de 1.69 mg/L. Lo mismo se puede observar para ceftriaxona, piperacilina, amoxicilina y amikacina. Este hecho se puede corroborar si observamos las altas desviaciones estándar de estos cinco antimicrobianos, por ejemplo 618.27 mg/L para ceftacidina, 212.52 mg/L para ceftriaxona, 178.64 mg/L para piperacilina, 162.49 mg/L para amoxicilina y 131.11 mg/L para amikacina.

A diferencia de las muestras de orina las concentraciones de los antimicrobianos en suero son significativamente menores. Se ha cuantificado 16 antimicrobianos en las 124 muestras analizadas, no detectándose sulbactam, tigecilina, ampicilina, moxifloxacino y claritromicina. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**. De los 16 antimicrobianos cuantificados, dos han sido cuantificados una sola vez, por lo que su aparición no es relevante.

Las concentraciones máximas y mínimas en suero no presentan grandes diferencias, salvo en algunos casos como para el meropenen, cuya concentración máxima es 146.62 mg/L, mientras que su concentración mínima es de 0.88 mg/L. Lo mismo se ha observado para, ceftacidina y piperacilina. A diferencia de las muestras de orina, la desviación estándar de las concentraciones de los antimicrobianos en suero son significativamente menores, siendo de 42.3 mg/L para ceftazidina de 26.6 mg/L para meropenen.

Tabla 7: Concentraciones (mg/L) de los antimicrobianos en la matriz orina ^a.

Orina: Número de muestras = 127

Compuesto	Mínima	Máxima	Media	SD	N
Ácido clavulánico	0.68	152.39	34.56	47.34	14
Tobramicina	1.36	33.53	9.04	8.98	20
Amikacina	1.00	376.74	67.10	131.11	25
Vancomicina	1.17	348.00	59.82	65.04	46
Imipenen	7.89	65.19	34.20	23.63	3
Cefepime	216.11	216.11	216.11	-	1
Amoxicilina	4.64	542.15	200.39	162.49	14
Tazobactan	1.11	168.40	45.31	52.74	9
Meropenen	0.68	555.35	86.05	111.66	36
Ceftazidina	1.69	1578.88	777.87	618.27	7
Levofloxacino	3.07	374.69	69.12	80.87	29
Ceftriaxona	2.23	626.01	108.71	212.52	7
Ampicilina	15.2	15.2	15.2	-	1
Linezolid	2.47	154.80	41.71	48.33	15
Teicoplanina	4.10	177.89	65.45	70.22	4
Piperacilina	75.91	640.12	345.72	178.64	8
Claritromicina	4.20	4.20	4.20	-	1
Daptomicina	10.15	10.15	10.15	-	1

^a **Abreviaturas:**

N: Número de muestras en las que se cuantifica el antimicrobiano

SD: Desviación estándar

Tabla 8 Concentraciones (mg/L) de los antimicrobianos en la matriz suero^a.

Suero. Numero de muestras = 124

Compuesto	Mínima	Máxima	Media	SD	N
Ácido clavulánico	0.15	8.00	1.66	2.29	10
Tobramicina	0.15	3.42	0.99	0.81	15
Amikacina	0.48	13.35	2.74	3.47	14
Vancomicina	0.60	24.08	6.68	5.84	38
Imipenen	0.18	3.66	2.26	1.50	3
Cefepime	7.89	7.89	7.89	-	1
Amoxicilina	0.44	28.93	10.12	10.33	15
Tazobactan	0.19	6.94	3.96	2.85	9
Meropenen	0.88	146.62	14.03	26.59	30
Ceftazidina	9.21	132.94	49.18	42.30	7
Levofloxacino	0.10	72.00	8.11	16.64	26
Ceftriaxona	1.03	4.42	2.42	1.40	4
Linezolid	0.7	14.19	5.36	4.54	14
Teicoplanina	1.35	5.11	3.36	1.53	4
Piperacilina	3.30	120.91	31.47	35.62	9
Daptomicina	3.59	3.59	3.59	-	1

^a **Abreviaturas: N: Número de muestras en las que se cuantifica el antimicrobiano; SD: Desviación estándar**

Los resultados obtenidos en esputo se muestra en la **Tabla 9**. Se puede observar que las concentraciones de los antimicrobianos son significativamente menores que en suero y bastante menores que en orina.

Tabla 9 Concentraciones (mg/Kg) de los antimicrobianos en la matriz esputo ^a.

Esputo: Numero de muestras = 95

Compuesto	Mínima	Máxima	Media	SD	N
Ácido clavulánico	0.22	1.56	1.04	0.59	3
Sulbactam	3.43	3.43	3.43	-	1
Tobramicina	0.17	2.85	1.17	0-91	10
Amikacina	0.15	4.69	0.98	1.18	13
Vancomicina	0.19	9.71	2.27	2.63	17
Imipenen	0.33	0.33	0.33	-	1
Cefepime	0.87	0.87	0.87	-	1
Amoxicilina	0.13	11.15	1.80	3.36	9
Tazobactan	2.32	5.91	3.97	1.48	3
Meropenen	0.68	6.23	2.25	1.54	11
Ceftazidina	0.88	9.36	3.71	2.86	6
Levofloxacino	0.10	12.63	1.64	2.88	18
Ceftriaxona	2.10	2.10	2.10	-	1
Moxifloxacino	2.35	2.35	2.35	-	1
Linezolid	0.75	17.58	4.84	5.04	9
Teicoplanina	1.03	2.09	1.56	0.53	2
Piperacilina	2.96	16.22	6.85	4.87	5
Daptomicina	3.35	3.35	3.36	-	1

^a Abreviaturas: N: Número de muestras en las que se cuantifica el antimicrobiano; SD: Desviación estándar

Puede observarse la presencia de 18 antimicrobianos en las 95 muestras analizadas, no siendo detectados tigecilina, ampicilina y claritromicina. De estos 18 antimicrobianos seis han sido detectados en una sola muestra.

La desviación estándar de las concentraciones de los antimicrobianos en esputo son bastante más bajas que en suero y orina, siendo de 5.0 mg/L para linezolid, 4.9 mg/L para piperacilina y 3.4 mg/L para amoxicilina.

Finalmente conviene indicar que para el LCR, de los 21 antimicrobianos analizados sólo se han cuantificado 4, en las 5 muestras analizadas. De estas cinco muestras en dos no aparecían antimicrobianos y de las tres restantes una contenía tobramicina 0.44 mg/L, la segunda Linezolid 5.20 mg/L y una tercera con amoxicilina 0.52 mg/L y ácido clavulánico 1.49 mg/L..

4.2. Correlación de resultados

Como se ha podido observar las concentraciones de todos los antimicrobianos son superiores en orina, seguidas del suero, y por último los niveles de concentración más bajos se han detectado en esputo. Una razón que explicaría estas diferencias en las concentraciones encontradas es que la vía de eliminación de estos fármacos es predominantemente la vía renal.

Los antimicrobianos **vancomicina, tobramicina, amikacina, levofloxocino y meropenen** son los compuestos más frecuentemente encontrados en todas las matrices, excepto en LCR, de lo que se deduce, que son los más usados en terapia clínica y algunos de ellos como la vancomicina y el levofloxocino, también son usados en profilaxis antimicrobiana en cirugía de los pacientes de la UCI. Las causas de esta utilización pueden ser, por presentar un amplio espectro de acción, su especificidad y su poco nivel de resistencia.

Los valores de las concentraciones de un mismo antimicrobiano son muy dispares, detectándose valores muy altos, que contrastan con valores muy bajos. Estas diferencias quedan claramente reflejadas en las altas desviaciones estándar de las concentraciones de algunos de estos antimicrobianos en las muestras de orina. En este sentido se desconoce, ya que no están incluidos estos datos en el estudio, el tiempo transcurrido entre la aplicación del fármaco y la toma de la muestra y tampoco se conocen, las pautas de administración de los antimicrobianos, que como norma general, pueden provocar modificaciones en las concentraciones. Así los aminoglucósidos, por ejemplo, se administran según “régimen convencional” (varias administraciones diarias), o “en ampliación del intervalo”, en una única administración. A su vez, la vancomicina puede administrarse en infusión continua.

La falta de monitorización en pacientes críticos o la falta de una medicina terapéutica supervisada, en pacientes con infecciones serias y con tratamientos prolongados, puede provocar altas concentraciones de antimicrobianos en orina. Al igual ocurre, si tras la administración a la dosis recomendada, se encuentran niveles terapéuticos en otros órganos distintos del órgano diana, que pueden originar concentraciones significativas en orina.

Además, algunos de estos antimicrobianos pueden transformarse en metabolitos activos, que no son valorados habitualmente, aunque estén presentes.

Por otro lado, la **tobramicina**, que aparece en las matrices orina, suero y esputo, se encuentra entre los cinco antimicrobianos con mayor número de casos cuantificados. Se observa que la desviación estándar en las tres matrices es de las más bajas, siendo en orina y suero la más baja. Esto puede indicar que el tratamiento ha sido monitorizado o que la terapia ha sido supervisada, como suele suceder en los tratamientos de una enfermedad pulmonar crónica. Destaca su presencia en LCR, siendo uno de los cuatro antimicrobianos presentes en dicha matriz.

La **amikacina** es otro de los cinco antimicrobianos con mayor número de casos cuantificados. Los máximos y mínimos de las concentraciones en la matriz suero y esputo no presentan grandes diferencias, pero sin embargo en orina, está entre los cinco antimicrobianos con desviación estándar más alta. Esto puede deberse, a que su vía de administración sea preferentemente la vía parenteral. Si el paciente presenta previamente factores que incrementan su volumen de distribución (quemaduras, peritonitis, etc...), puede requerir más dosis de antimicrobiano para alcanzar los niveles terapéuticos y por tanto, mayor concentración en orina.

Los otros tres antimicrobianos más comúnmente detectados, **Vancomicina**, **levofloxocino** y **meropenem**, presentan una desviación estándar muy elevada en orina, siendo en suero un poco menor y considerablemente más baja en esputo. Los niveles altos de concentración tanto en suero como orina puede ser consecuencia de una respuesta farmacológica incrementada por determinadas situaciones clínicas, bioquímicas o terapia coadyuvante.

Por otro lado conviene indicar que en pacientes con infecciones graves sería aconsejable medir la concentración de antimicrobianos en los líquidos o tejidos a los que se tenga acceso, coincidiendo con la extracción de la muestra de sangre. Esta muestra puede ayudar a decidir una modificación de la dosis, aun cuando las concentraciones observadas en suero se hayan considerado adecuadas. Por ejemplo, vancomicina y aminoglucósidos (tobramicina) tienen especial dificultad para llegar al pulmón, al sistema nervioso central y a los órganos con barreras. Por ello, cualquier información suplementaria ayudará a mejorar la posología.

Además, si entre las situaciones clínicas destacan alteraciones renales, que ralentizan la eliminación del antimicrobiano, propiciando su acumulación en otros órganos y su posterior eliminación, daría lugar a altas concentraciones en suero y en orina.

Si previo al tratamiento, el paciente presenta un aclaramiento renal bajo, indicativo de una disminución de la función renal, con una velocidad de eliminación más lenta, la semivida de eliminación del fármaco se verá aumentada, junto con su concentración en orina y suero.

Finalmente, los niveles óptimos para cada tipo de infección, son también decisivos. Los aminoglucósidos son fármacos que dependen de la concentración. A valores de concentración más elevados, mayor efecto bactericida y mayor probabilidad de éxito terapéutico. En función de este concepto, en los últimos años se ha promovido la dosificación en regímenes con ampliación del intervalo, en una única administración, donde la disponibilidad en el número de muestras por paciente se ve favorecida, al no tener que ajustarse la toma de muestra a varias dosificaciones diarias del régimen convencional.

5. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS DE TRABAJO FUTURAS

Las principales conclusiones que se pueden obtener del presente estudio, son:

- ✓ La metodología UHPLC-MS/MS permite la determinación de una gran variedad de antimicrobianos de manera simultánea y en un amplio rango de matrices.
- ✓ De forma general, la concentración detectada de los antimicrobianos objeto de estudio, es superior en orina que en el resto de matrices.
- ✓ Los antimicrobianos vancomicina, tobramicina, amikacina, levofloxocino y meropenen son los más utilizados en terapia clínica.
- ✓ De todos los antimicrobianos la tobramicina, destaca por presentar los niveles de concentración más estables en todas las matrices.
- ✓ Hay una gran variabilidad en los resultados obtenidos debido a que no se conocen ni las dosis suministradas a los pacientes, ni el tiempo transcurrido desde que se suministra el antimicrobiano y se realiza la toma de muestra.

Por lo tanto, al no saber los tratamientos de los pacientes no podemos relacionar los antimicrobianos más encontrados en las distintas matrices con los más utilizados.

Igualmente al desconocer cuando se inició el tratamiento y cuando se tomaron las muestras a los pacientes, tampoco se puede establecer una relación clara, entre las concentraciones máximas y las concentraciones mínimas de los distintos antimicrobianos.

Por ello, se propone como continuación de este trabajo de máster, la inclusión de los tratamientos de los pacientes, el tiempo transcurrido entre la aplicación del fármaco y la toma de la muestra, así como, las pautas de dosificación y las vías de administración, para permitir la prolongación de este estudio.

Además el presente estudio puede ampliarse a otro tipo de antimicrobianos, como por ejemplo, los más utilizados en atención primaria, así como al control de la potencial presencia de metabolitos de los compuestos en los diferentes fluidos biológicos.

6. REFERENCIAS

- [1] J.D.C. Yao, R.C. Moellering. *Antimicrobial Agents*. ASM Press ed. Manual of Clinical Microbiology 7th Edition, Section VIII. Antibacterial Agents and Susceptibility Test Methods. Washington DC, (1999), 1474-1504.
- [2] J.A. Torres, C.O. Reguiferos, C. del Pozo. M. Fong. *Antimicrobianos*. Medisan 5, (2001), 76- 88.
- [3] R. Quintiliani, D.F. Sahm, P. Courvalin. *Mecanismos of Resistance to Antibacterial Agents*. En: ASM Press ed. Manual of Clinical Microbiology 7th Edition, Section VIII. Antibacterial Agents and Susceptibility Test Methods. Washington DC, (1999), 1505-1525.
- [4] M. Finland, W.F. Jones, M.W. Barnes. *Occurrence of serious bacterial infections since introduction of antibacterial agents*. Journal of the American Medical Association 170, (1999), 2188–2197.
- [5] M.L. Cohen. *Epidemiology of drug resistance implications for a post-antimicrobial*. Science 257, (1992), 1050–1055.
- [6] H.C. Neu. *The crisis in antibiotic resistance*. Science 257, (1992), 1064– 1072.
- [7] C.M. Kunin. *Resistance to antimicrobial drugs a worldwide calamity*. Ann. International Medical 118, (1993), 557– 561.
- [8] G.L. French. *Clinical impact and relevance of antibiotic resistance*. Advanced Drug Delivery Reviews 57, (2005), 1514-1527.
- [9] P. Rattanaumpawan, P. Sutha, V. Thamlikikul. *Effectiveness of drug use evaluation and antibiotic authorization on patients' clinical outcomes, antibiotic consumption, and antibiotic expenditures American*. Journal of Infection Control 38, (2010), 38-43.
- [10] R. Plowman, N. Graves, M.. Griffin, J.A. Roberts, A.V. Swan, B.D. Cookson, L. Taylor. *The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed*. Journal of Hospital Infection 47, (2001), 198-209.
- [11] R.A. Cox, C. Conquest, C. Mallaghan, R.R. Marples. *A major outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus caused by a new phage-type (EMRSA-16)*. Journal of Hospital Infection 29, (1995), 87– 106.
- [12] G.R. Bailie, A. Mathews. *Quantitative assessment of serum concentration monitoring and dosage adjustment of aminoglycosides*. Therapeutic Drug Monitoring 10, (1988), 292-295.

- [13] V.S. Hilhet, A. Forrest, C.H. Ballow, J.J. Schentag. *Antibiotic dosing issues in lower respiratory tract infection: population-derived area under inhibitory curve is predictive of efficacy*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43, (1999) Suppl A:53-63.
- [14] J.M. Blondeau, G. Hansen, K. Metzle, P. Hedlin. *The role of PK/PD parameters to avoid and increase of resistance: mutant prevention concentration*. Journal of Chemotherapy 16, (2004), Suppl 3:1-19.
- [15] J.K. Thomas, A. Forrest, S.M. Bhavnani, J.M. Hyatt, A. Cheng, C.H. Ballow. *Pharmacodynamic evaluation of factors associated with development of bacteria resistance in acutely ill patients during therapy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, (1998), 521-527.
- [16] S.L. Preston, G.L. Drusano, A.L. Berman, C.L. Fowler, A.T. Chow, B. Dornseif, *Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trial*. Journal of the American Medical 279, (1998), 159-160.
- [17] B.A. Boucher, G.C. Word, J.M. Swanson. *Pharmacokinetic changes in critical illness*. Critical Care Clinics 22, (2006), 255-271.
- [18] F. Pea, M. Furlanut. *Pharmacokinetic aspects of treating infections in the intensive care unit: focus on drug interactions*. Clinical Pharmacokinetic 40, (2001), 833-868.
- [19] R. Van Dalen, T.B. Vree. *Pharmacokinetics of antibiotics in critically ill patients*. Intensive Care Medical 16, (1990), Suppl 3:S235-S238.
- [21] E.J. Begg, M.L. Barclay, C.M.J. Kirkpatrick. *The therapeutic monitoring of antimicrobial agents*. Clinical Pharmacokinetic 52, (2001), 35S-43S.
- [22] L.C. Jackson, L.A.M. Reyes, M.L. Hamilton. *Principios generales de la terapéutica antimicrobiana*. Acta Médica 1, (1998), 13-27.
- [23] J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walter. *Antimicrobial Drug Selection and Use*. En Iowa State University Press/Ames. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Third Edition (2000).
- [24] G. Moscato, E. Galdi, J. Scibilia, A. Dellabianca, P. Omodeo, G. Vittadini, G.P. Biscaldi. *Occupational asthma, rhinitis and urticaria due to piperacillin sodium in a pharmaceutical worker*. European Respiratory Journal 8, (1995), 467-469.
- [25] N. Mochizuki, K. Ohno, T. Shimamura, H. Furukawa, S. Todo, S. Kishino. *Quantitative determination of individual teicoplanin components in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical*. Journal of Chromatography B 847, (2007), 78-81.
- [26] C. Kalil. *Is cefepime safe for clinical use? A Bayesian viewpoint* Andre. Journal of Antimicrobial Chemother 66, (2011), 1207-1209.

- [27] J.A. Silverman, N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro. *Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, (2003), 2538–2544 .
- [28] S. Matthew, J. Dryden. *Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, (2011), iv7–iv15.
- [29] M.H. Wilcox. *Efficacy of linezolid versus comparator therapies in gram positive infections*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, (2003), ii27–35.
- [30] P.I. Rafailidis, V.D. Kouranos, C. Christodou. *Linezolid for patients with neutropenia: are bacteriostatic agents appropriate?*. *Expert Review of Antiinfective Therapy* 7, (2009), 415–422.
- [31] Z.M. Yalin Kilic, S.A. Köksal, B. Akal. *Moxifloxacin plus amoxicillin and ranitidine bismuth citrate or esomeprazole triple therapies for Helicobacter pylori infection*. *Digestive Diseases Sciences* 53, (2008), 3133–7.
- [32] S.H. Gillespie, O. Billington. *Activity of moxifloxacin against mycobacteria*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44, (1999), 393–395.
- [33] J.C. Rodríguez, M. Ruiz, M. López, G. Royo. *In vitro activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 20, (2002), 464–467.
- [34] E. Tortoli, D. Dionisio, C. Fabbri. *Evaluation of moxifloxacin activity in vitro against Mycobacterium tuberculosis, including resistant and multidrugresistant strain*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 16, (2004), 334–336.
- [35] M. Farré, P. Salvá. *Monitorización de niveles plasmáticos de fármacos*. *Medicine* 6, (1995), 145-157.
- [36] H.R.N. Salgado, C.C.G.O. Lopes, M.B.B. Lucchesi. *Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, (2006), 443–446.
- [37] W.E. Rose, M.J. Rybak, G.W. Kaatz. *Evaluation of daptomycin treatment of staphylococcus aureus bacterial endocarditis: an in vitro and in vivo simulation using historical and current dosing strategies*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, (2007), 334–340.
- [38] D. Farin, G.A. Piva, I. Gozlan, R. Kitzes-Cohen. *A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX)*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18, (1998), 367–372.

- [39] M. Stettin, G. Halwachs-Baumann, B. Genser, F. Frühwirth, W. Marz, G. Ali Khoschorur. *Determination of cyclosporine A in whole blood: Comparison of a chromatographic method with three different immunological methods*. *Talanta* 69, (2006), 1100–1105.
- [40] E.A. Papp, C.A. Knupp, R.H. Barbhैया. *High-performance liquid chromatographic assays for the quantification of amikacin in human plasma and urine*. *Journal Chromatography B* 574, (1992), 93–99.
- [41] S. Nicoli, P. Santi. *Assay of amikacin in the skin by highperformance liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, (2006), 994– 997.
- [42] J.M. Serrano, M. Silva. *Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection*. *Journal Chromatography B* 843, (2006), 20–24.
- [43] B. Wichert, H. Schreier, H. Derendorf. *Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 9, (1991), 251–254.
- [44] L.T. Wong, A.R. Beaubien, A.P. Pakuts. *Determination of amikacin in microlitre quantities of biological fluids by highperformance liquid chromatography using 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene derivatization*. *Journal Chromatography B* 31, (1982), 145–154.
- [45] N. Isoherranen, S. Soback. *Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC*. *Clinical Chemical* 46, (2000), 837– 842.
- [46] C. Lecaroz, M.A. Campanero, C. Gamazo, M.J. Blanco-Prieto. *Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, (2006), 557–563.
- [47] A. Yusuf, S. Al-Rawithi, D. Raines, H. Frayha, T.A. Toonsi, I. Al-Mohsen. *Simplified high-performance liquid chromatographic method for the determination of gentamicin sulfate in a microsample of plasma: comparison with fluorescence polarization immunoassay*. *Therapeutic Drug Monitoring* 21,(1999), 647–652.
- [48] A.L. Allanson, M.M. Cotton, J.N. Tettey, A.C. Boyter. *Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: a potential method for therapeutic drug monitoring*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, (2007), 963–969.
- [49] M. Boffito, J. Tija, H.E. Reynolds, P.G. Hoggard, S. Bonora, G. Di Perri, DJ Back. *Simultaneous determination of rifampicin and efavirenz in plasma*. *Therapeutic Drug Monitoring* 24, (2002), 670–674.

- [50] R.C. Hartkoorn, S. Khoo, D.J. Back, J.F. Tjia, C.J. Waitt. *A rapid and sensitive HPLC-MS method for the detection of plasma and cellular rifampicin*. *Journal of Chromatography B* 857, (2007), 76–82.
- [51] H.M. Ziglam, D.R. Baldwin, I. Daniels, J.M. Andrew, R.G. Finch. *Rifampicin concentrations in bronchial mucosa, epithelial lining fluid, alveolar macrophages and serum following a single 600 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, (2002), 1011–1015.
- [52] J. Ronald, J. Sawchuk. *Liquid-Chromatographic Determination of Cyclosporin A in Blood and plasma*. *Clinical Chemistry* 54, (2008), 2076–2077.
- [53] A.L. Allanson, M.M. Cotton, J.N.A. Tettey, A.C. Boyter. *Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, (2007), 963–969.
- [54] S.I. Bhoir, C. Indravadan Bhoir, A.M. Bhagwat, M. Sundaresan. *Determination of sulfadoxine in human blood plasma using packed-column supercritical fluid chromatograph*. *Journal of Chromatography B* 757, (2001), 39–47.
- [55] P. Favetta, J. Guitton, N. Bleyzac, C. Dufresnee, J. Bureau. *New sensitive assay of vancomycin in human plasma using highperformance liquid chromatography and electrochemical detection*. *Journal of Chromatography B* 751, (2001), 377–382.
- [56] F. Kees, S. Spangler, M. Wellenhoef. *Determination of macrolides in biological matrices by highperformance liquid chromatography with electrochemical detection*. *Journal of Chromatography A* 812, (1998), 287–293.
- [57] R.C. Hartkoorn, S. Khoo, D. J. Back, J.F. Tjia, C.J. Waitt, M. Chavonda, G. Davies, A. Ardrey, S. Ashleigh, A. Stephen. *A rapid and sensitive HPLC–MS method for the detection of plasma and cellular rifampicin*. *Journal of Chromatography B* 857, (2007), 76–82.
- [58] K. Credito, G. Lin, P.C. Appelbaum. *Activity of daptomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against Staphylococcus aureus assessed by time-kill methodology*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, (2007), 1504–1507.
- [59] D. Carrier, M. Bou Khalil, A. Kealey. *Modulation of phospholipase A2 activity by aminoglycosides and daptomycin: a Fourier transform infrared spectroscopic study*. *Biochemistry* 37, (1998), 7589–7597.
- [60] K.J. Vera López, D. Faria Bertoluci, K.M. Vicente, A.M. Dell’Aquila, S.R.C. Jorge Santos. *Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn*

patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 860, (2007), 241–245.

[61] L. Baietto, A. D’Avolio, F. Giuseppe De Rosa, S. Garazzino, S. Patanella, M. Siccardi, M. Sciandra, and G. Di Perri. *Simultaneous Quantification of Linezolid, Rifampicin, Levofloxacin, and Moxifloxacin in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography With UV*. *Therapeutic Drug Monitoring* 31, (2009), 104–109.

[62] L. Baietto, A. D’Avolio, F. Giuseppe De Rosa, S. Garazzino, M. Michelazzo, G. Ventimiglia, M. Siccardi, M. Simiele, M. Sciandra, G. Di Perri. *Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma*. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 396, (2010), 791–798.

[63] H. Mentec, H.J.M. Vallois, A. Bure, A. Saleh-Mghir, F. Jehl, C. Carbon. *Piperacillin, tazobactam, and gentamicin alone or combined in an endocarditis model of infection by a TEM-3-producing strain of Klebsiella pneumoniae or its susceptible variant*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, (1992), 1883-1889.

[64] A. Pefanis, C. Thauvin-Eliopoulos, M. Eliopoulos, R.C. Moellering. *Activity of ampicillin-sulbactam and oxacillin in experimental endocarditis caused by β -lactamase-hyperproducing Staphylococcus aureus Pefanis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, (1993), 507- 511.

[65] C.E. Smith, B.S. Tillman, A.W. Howell, R.N. Longfield, J.H. Jorgensen. *Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to Klebsiella pneumoniae producing an extended-spectrum β -lactamase*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34 ,(1990), 1290-1293.

[66] D. Remane, M.R. Meye, F.T. Peters, D.K. Wissenbach, H.H. Maure. *Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification method in human blood plasma*. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397, (2010), 2303–2314.

[67] D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthe. *Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry*. *Trends in Analytical Chemistry* 29, (2010), 15-27.

[68] D. Guillarme, D. T.-T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey. *Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66, (2007), 475–482.

[69] D.W. Holt, A. Johnston, B.D. Kahan. *New Approaches to cyclosporine Monitoring Raise Further Concerns about Analytical Techniques*. *Clinical Chemistry* 46, (2000), 872-874.

- [70] B. Gulbis, J. Van der Heijden, H. Van As. *Whole blood cyclosporin monitoring in liver and heart transplant patients: evaluation of the specificity of a fluorescence polarization immunoassay and an enzyme-multiplied immunoassay technique*. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 15, (1997), 957-959.
- [71] .P Philip, A. Wang, E.Simpson, V. Meucci, M. Morrison, S. Lunetta, M. Zajac and R. Boeckx. *Cyclosporine monitoring by fluorescence polarization immunoassay*. *Clinical Biochemistry* 24, (1991), 55-58.
- [72] E. Huet, K. Morand, B. Blanchet, A. Astier, and A. Hulin. *Evaluation of the New Heterogeneous ACMA Immunoassay for the Determination of Whole-Blood Cyclosporine Concentrations in Bone Marrow, Kidney, Heart, and Liver*. *Transplantation Proceedings* 36, (2004), 1317–1320.
- [73] R. Denooz, C. Charlier. *Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. *Journal of chromatography B* 864, (2008), 161-167.
- [74] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis. *Development of a validated HPLC method for the determination of four penicillin antibiotics in pharmaceuticals and human biological*. *Journal of Separation Science* 29, (2006), 1550–1560.
- [75] D.G. Musson, K. L. Birk, A. M. Cairns, A. K. Majumdar, J.D. Rogers. *High-performance liquid chromatographic methods for the determination of a new carbapenem*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 720, (1998), 99-106.
- [76] T. Eldem, N. Arican-Cellat. *Determination of amphotericin B in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25, (2001), 53-64.
- [77] M.S. Balbão, C. Bertucci, M.M. Bergamaschi, R.H.C. Queiroz, W. R. Malfará, S.A.C. Dreossi, L.P. Mello and M.E.C. Queiroz. *Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, (2010), 1078-1083.
- [78] H.J. Mascher. *Determination of minocycline in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection after liquid-liquid extraction*. *Journal of Chromatography A* 812, (1998), 339-342.
- [79] R.G. Mundkowski, J. Majcher-Peszynska, O. Burkhardt, T. Welte, B. Drewelow. *A new simple HPLC assay for the quantification of ertapenem in human plasma, lung tissue, and broncho-alveolar*

lavage fluid. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 832, (2006), 231-235.

[80] P. Egger, R. Bellmann and C.J. Wiedermann. *Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 760, (2001), 307-313.

[81] D. Borreya, E. Meyerb, W. Lamberta, C. Van Peteghema, A.P. De Leenheer. *Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography– mass spectrometry*. Journal of Chromatography B 765, (2001),187–197.

[82] N. Ansermot, M. Fathi, JL. Veuthey, J. Desmeules, S. Rudaz, D. Hochstrasser. *Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography–electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique*. Clinical Biochemistry 41, (2008), 910–913.

[83] D.H. Vua, R.A. Kosterb, J.W.C. Alffenaarb, J.R.B.J .Brouwersa, D.R.A .Ugesb. *Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC–MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume*. Journal of Chromatography B 3, (2011), 1063-1070.

[84] V Barrett, P Bořek-Dohalský, S Fejt, J Vaingátová B Huclová, I Němec Jelínek. *Validated HPLC–MS–MS method for determination of azithromycin in human plasma* B. Analytical and Bioanalytical Chemistry 383, (2005), 210–217.