



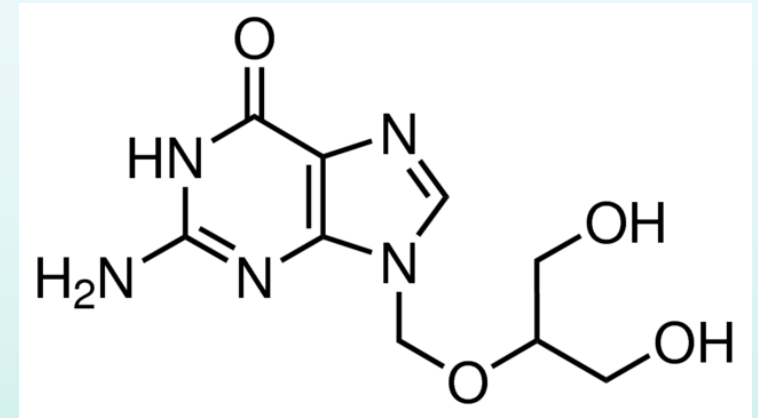
Stanovení gancikloviru v séru

E. Klapková, K. Dunovská, J. Petrus

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol

Ganciklovir

Syntetický analog 2'-deoxyguanosinu inhibující replikaci herpetických virů



Antivirotikum – léčba a prevence nákazy herpes viry

- herpes simplex typu 1 a 2
- virus Epstein-Baarové
- virus varicella zoster
- **lidský cytomegalovirus**

Léčba - imunodeficientní pacienti (onkologičtí p., HIV p.)
imunosuprimovaní pacienti
děti s vrozenou či postnatálně získanou CMV infekcí

Mechanismus účinku

GCV fosforylace působením virové proteinové kinázy

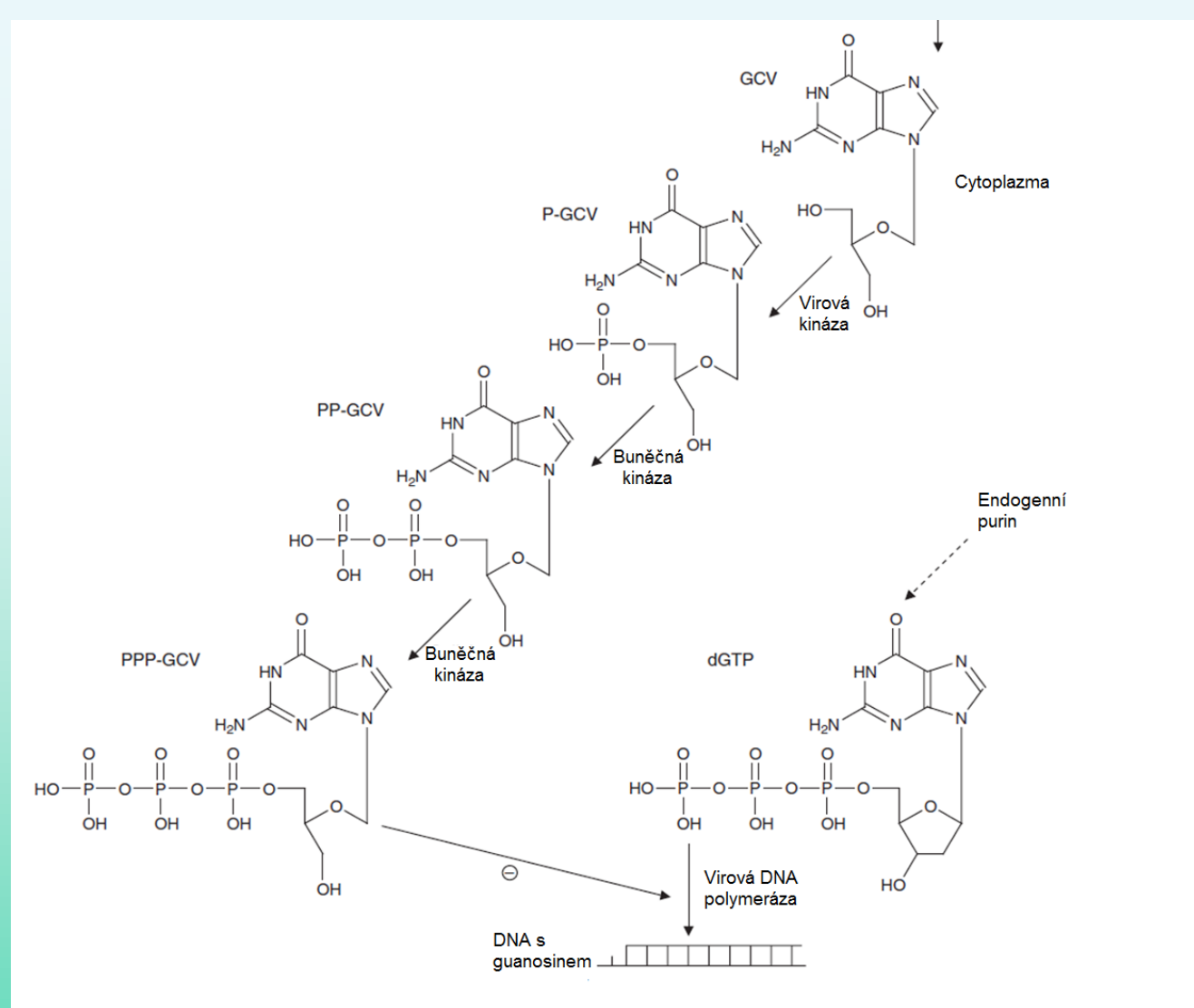
GCV monofosfát

fosforylace buněčnými kinázami

GCV trifosfát



Inhibice syntézy virové DNA



Farmakokinetika

- podáván většinou intravenózně, dospělí 5 mg/kg/12 h, novorozenci 6 mg/kg/12 h
- rapidní distribuční fáze (0,23 h)
- vazba na bílkoviny 1 -2 %
- eliminován především renálně
- biologický poločas v séru 2 – 4 h

Velikost dávky v klinické praxi dle hmotnosti, funkce ledvin a klinické indikace

odlišný přístup v jednotlivých institucích
různé metody výpočtu funkce ledvin
vysoká inter- a intra-individuální variabilita

TDM doporučováno u vybraných skupin pacientů

Nežádoucí účinky

Vysoké hladiny

- myelosuprese
 - neutropenie
 - trombocytopenie
 - anémie
 - selhání kostní dřeně
- neurotoxicita
- infekce
- gastrointestinální poruchy
- poruchy funkce ledvin
- psychiatrické problémy

Nízké hladiny

- vznik rezistence
- selhání léčby

HPLC

Kolona: Intersil ODS-3V 4,6 x 150 mm, 5 μ m GL Sciences Inc.

MF: 25 mM NaH_2PO_4 , pH 2,5, 10 ml ACN:MetOH

IS: 5-fluoro-2'-deoxyuridin (50 μ g/ml)

Příprava vzorku

100 μ l séra + 10 μ l IS + 50 μ l 1% TCA

promíchání

10 min centrifugace

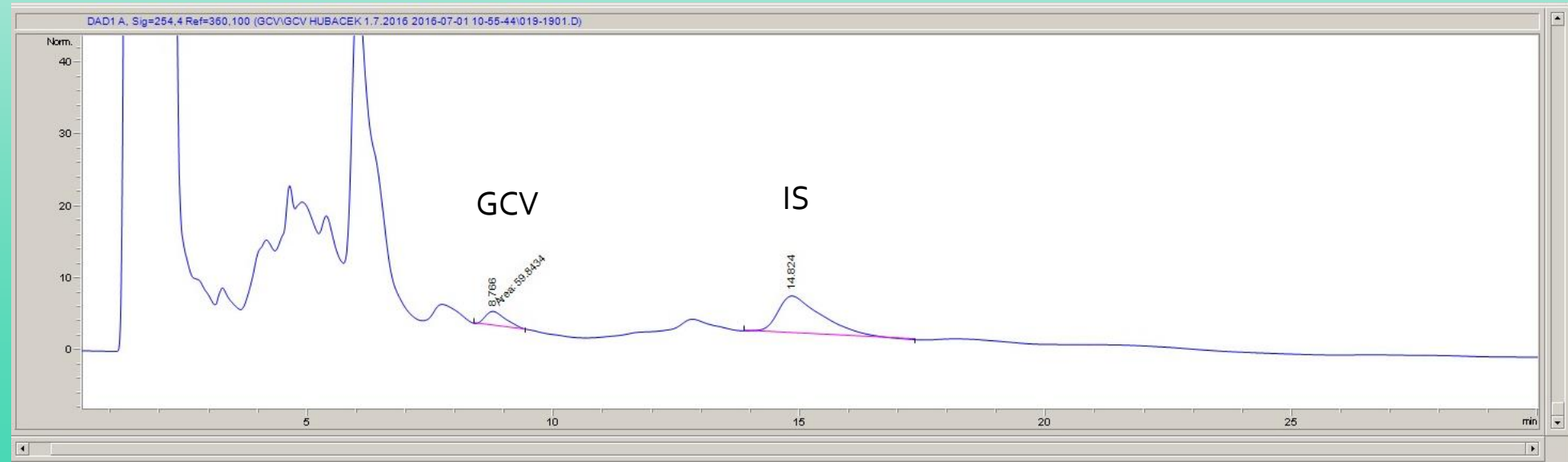
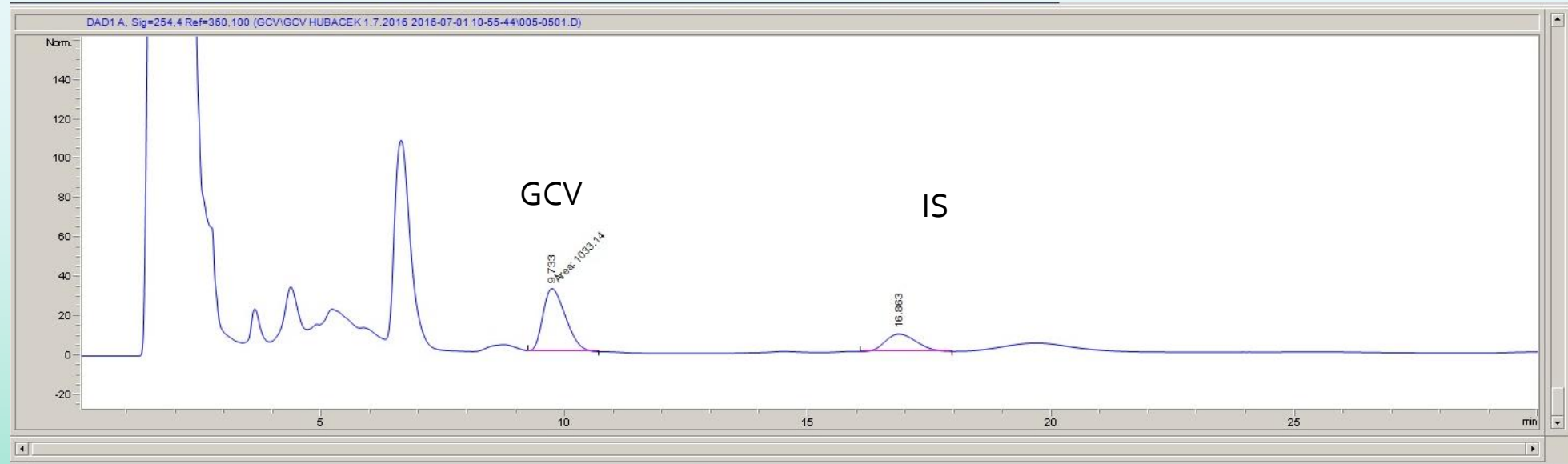
100 μ l supernatantu + 20 μ l 0,1 M NaOH



Agilent 1260
Agilent Technologies

Analýza pacientského vzorku

Po 10 analýzách nutná
kondicionace
fosfátovým
pufrem s ACN/MetOH



LC - MS/MS parametry

Kolona: Eclipse Plus-C18,
1,8 μm , 3,0 x 50 mm

Teplota kolony: 35 °C

Objem nástřiku: 5 μl

Teplota autosampleru: 4 °C

MF: A: voda + 5 % pufr
B: ACN + 5 % NH_4F

IS: ganciklovir – d5

Agilent 6470 MS/MS

Způsob ionizace: Agilent Jet Stream (AJS)
ESI+

lontový zdroj:

Drying gas temperature:	250°C
Drying gas flow:	8 l/min
Nebulizer pressure:	45 psi
Sheath gas temperature:	350°C
Sheath gas flow:	11 l/min
Capillary voltage:	3000 V
Nozzle voltage:	0 V

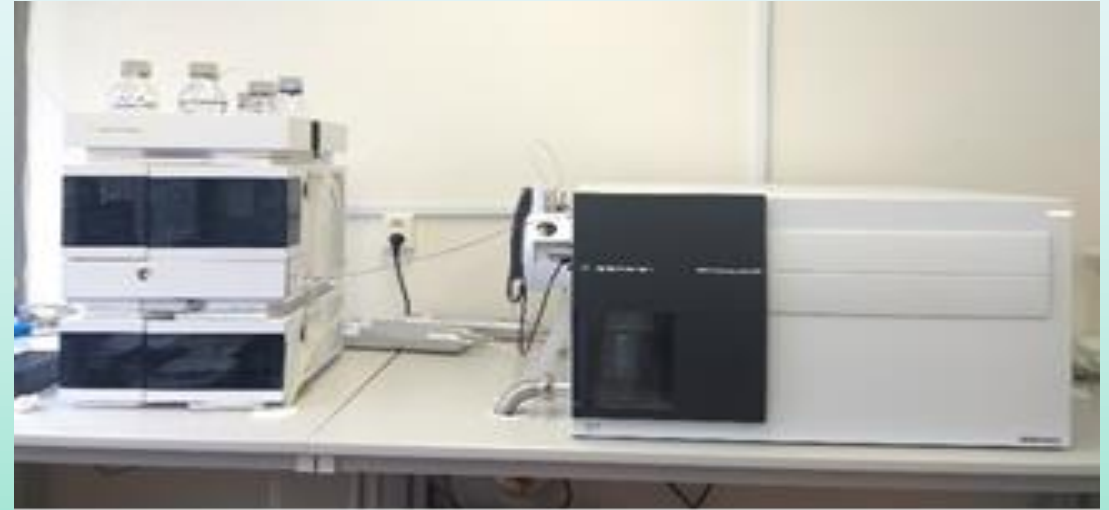
Příprava vzorku

10 μ l vzorku + 500 μ l IS (GCV-d5)

vortex 30 s

centrifugace 10 min

50 μ l supernatantu + 950 μ l 5 % TCA

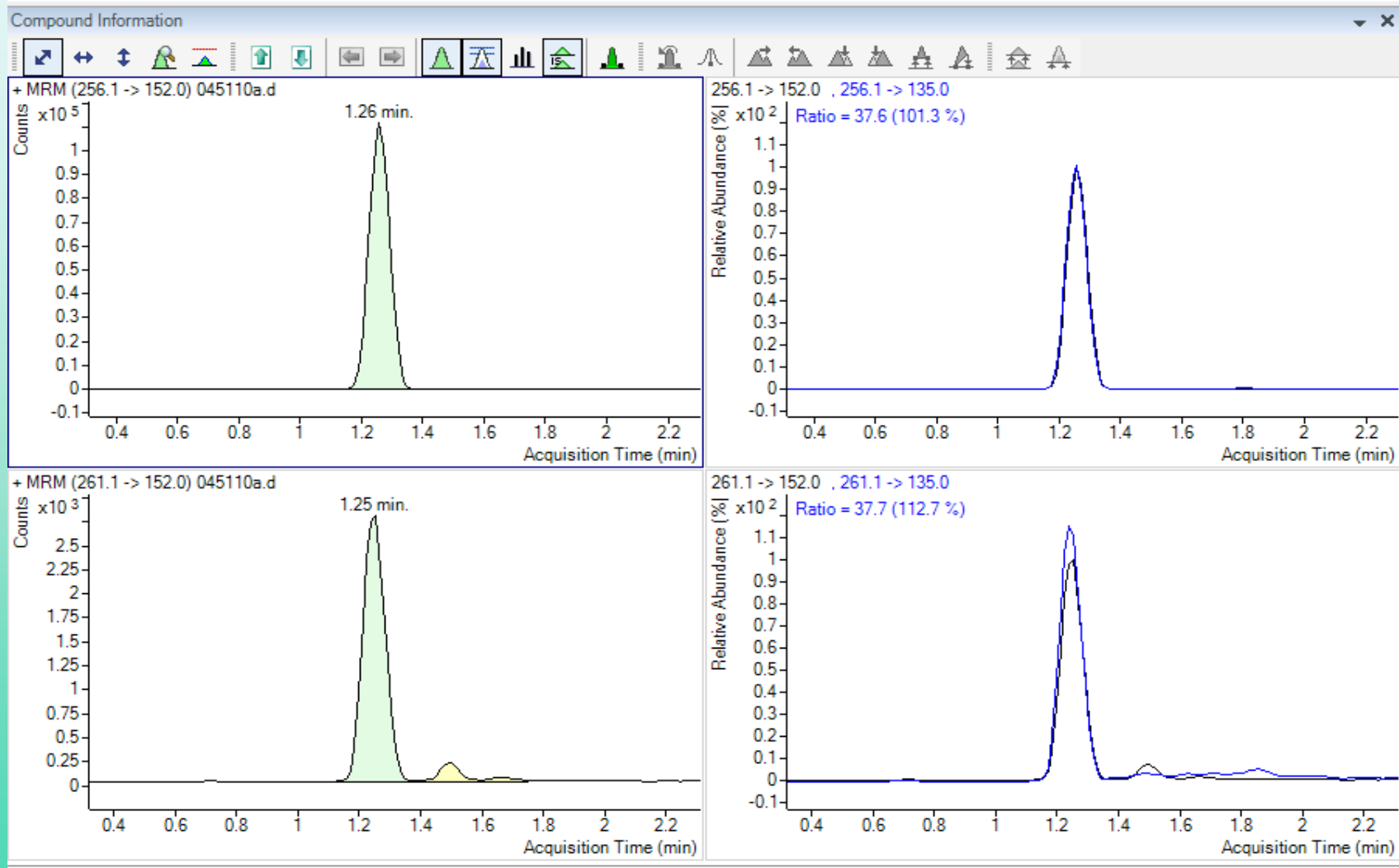


Analýza patientského vzorku

256,1 → 152,0

256,1 → 135,0

261,1 → 152,0



Validace metody

Kontroly (mg/l)	Opakovatelnost			Reprodukovatelnost		
	Průměr ± SD (mg/l)	CV (%)	BIAS (%)	Průměr ± SD (mg/l)	CV (%)	BIAS (%)
K1 (0,25)	0,25 ± 0,01	5,1	8,7	0,26 ± 0,01	5,3	7,8
K2 (2,00)	2,01 ± 0,08	4,8	5,6	2,07 ± 0,10	4,9	5,7
K3 (8,00)	8,05 ± 0,39	4,2	5,3	8,21 ± 0,42	5,1	4,8

- **Mez detekce (LOD):** 0,01 mg/l
- **Mez kvantifikace (LOQ):** 0,1 mg/l

Stabilita vzorku

- **4 různé teploty:**
 - **RT** – stabilní min. **14 dní** (max. pokles hladin o 7 %)
 - **Lednice** – stabilní min. **14 dní** (max. pokles hladin o 6 %)
 - **Mrazák** – stabilní min. **3 měsíce** (max. pokles hladin o 8 %)
 - **Hlubokomrazicí box** – stabilní min. **6 měsíců** (max. pokles hladin o 7 %)
- **Opakované rozmrazování**
 - u 5x rozmrazeného vzorku došlo k max. poklesu hladin o 6 %
- **Připravený vzorek v chlazeném autosampleru**
 - po dobu 14 dnů nedošlo u žádného z testovaných vzorků ke změně hladiny o více jak 9 %

Ve FN Motol provedeno stanovení hladin CGV u 49 pacientů po transplantaci plic

Kritéria: věk \geq 18 let
IV GCV do 48 h po transplantaci, 2 x denně 5 mg/kg
imunosupresiva
krevní obraz, ALT, GGT, kreatinin, cystatin C
koncentrace GCV – C_0 , C_3 , C_5

21 pacientů (42 %) hladiny nižší než 1 – 2 mg/l

18 pacientů (37 %) hladiny v terapeutickém rozmezí

10 pacientů (21 %) hladiny vyšší než terapeutické rozmezí

Ganciclovir therapeutic drug monitoring in transplant recipients

Anne-Grete Märtson ^{1*}, Angela E. Edwina¹, Johannes G. M. Burgerhof², Stefan P. Berger³, Anoek de Joode³, Kevin Damman⁴, Erik A. M. Verschuuren⁵, Hans Blokzijl⁶, Martijn Bakker⁷, Lambert F. Span⁷, Tjip S. van der Werf^{3,5}, Daan J. Touw¹, Marieke G. G. Sturkenboom^{1†}, Marjolein Knoester^{8†} and Jan W. C. Alffenaar^{1,9,10,11†}

Analýza 390 vzorků pacientů po SOT či HSCT 46 pacientů profylaxe, 39 pacientů léčba CMV

PROFYLAXE			LÉČBA		
31	67 %	↓	19	49 %	↓
11	34 %	ter. roz.	14	36 %	ter. roz.
4	9 %	↑	6	15 %	↑

Předčasně narozená holčička, prokázaná CMV infekce

Datum	Hmotnost (kg)	Koncentrace (mg/l)	Dávka (mg)
19.10.2020	0,86	4,88	5,15 -0-5,16
22.10.2020	0,86	1,26	2,58 -0-02,58
26.10.2020	0,86	1,68	3,87 -0 - 3,87
29.10.2020	1,1	2,56	6,05 - 0 - 6,05
4.11.2020	1,1	2,34	6,05 - 0 - 6,05
9.11.2020	1,46	4,44	20 - 0 - 20
12.11.2020	1,46	2,06	10 - 0 - 10
19.11.2020	1,6	0,78	10 - 0 - 10
24.11.2020	1,6	1,90	17,6 - 0 - 17,6
26.11.2020	1,6	1,81	20,8 - 0 - 20,8
2.12.2020	1,7	1,50	22,0 - 0 - 22,0
10.12.2020	2,16	0,54	22,0 - 0 - 22,0
12.10.2020	2,16	0,74	34,0 - 0 - 34,0

10.11. furosemid

22.11. furosemid vysazen

03/2021 Česká společnost klinické biochemie - **Doporučení pro validace a verifikace postupů laboratorních vyšetření ve zdravotnických laboratořích**

In house metody

Výhody

- finance
- možnost „poupravit“ analýzu nebo přípravu vzorku

Nevýhody

- časově náročné
- nutná úplná validace

Závěr

- zavedena jednoduchá LC-MS/MS metoda
- doporučeno provádět TDM GCV u vybraných skupin pacientů
- vysoká inter a intraindividuální variabilita
- nezbytná spolupráce laboratoře, farmakologa či farmaceuta a klinika



Děkuji Vám za pozornost

