

ANTIBIOTICI PLASMATICI in LC/MS – Codice LC79010

(Daptomicina, Vancomicina, Streptomicina, Linezolid, Levofloxacin, Ciprofloxacin, Gentamicina, Amikacina, Teicoplanina)

INTRODUZIONE

Tecnicamente si definisce “antibiotico” una sostanza di origine naturale prodotta da un microrganismo, capace di ucciderne un altro. Il termine nell'uso comune attuale indica un farmaco, di origine naturale o di sintesi (chemioterapico) in grado di rallentare o fermare la proliferazione dei batteri. Gli antibiotici si distinguono pertanto in batteriostatici (cioè bloccano la riproduzione del batterio, impedendone la scissione) e battericidi (cioè uccidono direttamente il microrganismo). Usualmente non hanno effetto contro i virus, i funghi ed i parassiti, sui quali agiscono altri generi di chemioterapici.

La **streptomicina** è un antibiotico battericida, il primo ad essere scoperto di una famiglia chiamata amminoglicosidi, uno dei primi rimedi contro la tubercolosi. Viene ottenuto dagli attinobatteri. Questo farmaco non può essere somministrato oralmente, ma tramite regolari iniezioni intramuscolari; un suo effetto collaterale è l'ototossicità, che può portare a una temporanea perdita dell'udito.

La **vancomicina** è un farmaco antibiotico prodotto da *Streptococcus orientalis* che fa parte, insieme alla teicoplanina, della classe dei glicopeptidi. Sono molecole ad alto peso molecolare, che agiscono inibendo la polimerizzazione della parete del peptidoglicano dei batteri Gram positivi. Le endocarditi da enterococchi vengono trattate con vancomicina e gentamicina. Le polmoniti da *Streptococcus pneumoniae*, qualora si sospetti la resistenza alla penicillina, vengono trattate con vancomicina associata a ceftriaxone e rifampicina. La Vancomicina viene anche somministrata come alternativa nei pazienti allergici alle penicilline e/o cefalosporine. Nell'adulto sano il dosaggio è di un 1g ogni 12 ore; per i bambini sono sufficienti 30 mg per kg al giorno.

La **daptomicina** è un nuovo antibiotico lipopeptidico utilizzato nella cura di certe infezioni causate da organismi Gram-positivi. È un composto esistente in natura, che si trova nel saprofago del suolo *Streptomyces roseosporus*. Il suo diverso meccanismo di azione lo potrebbe rendere utile nella cura di infezioni causate da batteri multi-resistenti. La daptomicina ha un meccanismo di azione differenziato, che si basa sull'interruzione di molti aspetti funzionali diversi della membrana cellulare batterica. Sembra che si legghi alla membrana e causi una rapida depolarizzazione, provocando la perdita del potenziale di membrana. Si inibisce così la sintesi di proteine, DNA e RNA, provocando la morte della cellula batterica.

La **gentamicina** è un antibiotico aminoglicosidico prodotto da *Micromonospora purpurea*, con elevata attività contro batteri Gram positivi e Gram negativi. È un potente inibitore della sintesi proteica, legandosi tenacemente alla subunità 30s dei ribosomi, con frammentazione degli stessi e morte cellulare; questa proprietà condiziona il meccanismo d'azione di tutti gli aminoglicosidi, poiché il loro funzionamento è direttamente connesso alla permeabilità di membrana propria di ogni batterio.

Il **linezolid** è un antibiotico per uso ospedaliero attivo su batteri Gram positivi aerobi e anaerobi, e in particolare anche su MRSA (ceppi di *Stafilococcus* meticillino-resistenti) e VRSA (ceppi di *Stafilococcus* vancomicina-resistenti).

La **levofloxacin** è un principio attivo che appartiene alla classe dei fluorochinoloni di seconda generazione.

La **ciprofloxacina** è il nome generico internazionale di un antibiotico sintetico del gruppo dei fluorochinoloni. La Ciprofloxacina è battericida, il suo modo di agire dipende dal blocco della replicazione del DNA batterico, attraverso la sua legatura all'enzima *DNA girasi* (una topoisomerasi di tipo II), il quale consente lo srotolamento necessario per replicare una doppia elica di DNA. Il farmaco ha cento volte una più rilevante affinità per la DNA girasi batterica rispetto a quella dei mammiferi.

La **teicoplanina** è un farmaco antibiotico che fa parte, insieme alla vancomicina, della classe dei glicopeptidi, estratto dall' *Actinoplanes teichomyceticus*.

Sono molecole ad alto peso molecolare, che agiscono inibendo la polimerizzazione della parete del peptoglicano dei batteri gram positivi. L'alto peso molecolare non consente a tali molecole l'attraversamento della membrana cellulare esterna dei germi Gram negativi, per cui la teicoplanina, così come la vancomicina, è inefficace contro questi batteri. Tuttavia la teicoplanina ha un'emivita più lunga (45 - 70 ore) della vancomicina, e ciò può permettere una somministrazione in singola dose quotidiana. Inoltre, la teicoplanina può essere iniettata sia per via endovenosa che per via intramuscolare.

Gli antibiotici possono colpire la flora batterica intestinale e dare, di conseguenze, alterazioni dell'alvo, compensabili con l'assunzione di fermenti lattici. Gli antibiotici possono provocare effetti indesiderati, come reazioni allergiche, dovute alla sensibilità dell'individuo verso uno o più componenti, oppure tossicità ad alto livello di vari distretti dell'organismo o, ancora, intolleranza provocata dall'interazione con altri farmaci. La dipendenza da questi farmaci e l'abuso degli stessi possono portare alla morte.

E' per questo motivo che riveste particolare importanza il dosaggio di questi ultimi anche a basse concentrazioni.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 003	Antibiotici plasmatrici in LC/MS	Aprile 2013
----------------	----------------------------------	-------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

I campioni plasmatici degli Antibiotici vengono deproteinizzati con un opportuno reagente contenente lo standard interno, centrifugate e direttamente iniettati in LC/MS.

Sensibilità del Metodo : 0,4 mg/l

Range dinamico del metodo : 1 - 100 mg/l

<u>Range terapeutico nel siero :</u>	Daptomicina	n. d.
	Vancomicina	n. d.
	Linezolid	n. d.
	Levofloxacin	n. d.
	Ciprofloxacina	n. d.
	Gentamicina	n. d.
	Streptomicina	n. d.
	Amikacina	n. d.
	Teicoplanina	n. d.

CV%:	Daptomicina	4,0 intra serie	Daptomicina	7,1 inter serie
	Vancomicina	2,5 intra serie	Vancomicina	24,7 inter serie
	Linezolid	9,2 intra serie	Linezolid	2,6 inter serie
	Levofloxacin	5,5 intra serie	Levofloxacin	5,9 inter serie
	Ciprofloxacina	4,7 intra serie	Ciprofloxacina	9,0 inter serie
	Gentamicina	8,8 intra serie	Gentamicina	8,4 inter serie
	Streptomicina	11,0 intra serie	Streptomicina	21,5 inter serie
	Amikacina	8,4 intra serie	Amikacina	11,0 inter serie
	Teicoplanina	3,9 intra serie	Teicoplanina	4,5 inter serie

Contenuto della confezione : Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C.

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 30 ml**

Reagente B – Soluzione Stabilizzante, **1 x 1 ml**

Reagente C1 – Calibratore plasmatico – Livello 1, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C2 – Calibratore plasmatico – Livello 2, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C3 – Calibratore plasmatico – Livello 3, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C4 – Calibratore plasmatico – Livello 4, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente C5 – Calibratore plasmatico – Livello 5, **1 x 1 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente D – Soluzione Diluente, **1 x 20 ml**

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **1 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **1 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo
Modalità di lavoro MRM, ESI positivo
Computer gestionale
Autocampionatore

Dotazione opzionale :

Modalità per il prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel o con EDTA come anticoagulante. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a - 20 °C. Stabile 4 settimane.

PROCEDURA ANALITICA PER GLI ANTIBIOTICI (eccetto la TEICOPLANINA)

FASE 1 :

In eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Reagente C1 – Calibratore – Livello 1	100 µl						
Reagente C2 – Calibratore – Livello 2		100 µl					
Reagente C3 – Calibratore – Livello 3			100 µl				
Reagente C4 – Calibratore – Livello 4				100 µl			
Reagente C5 – Calibratore – Livello 5					100 µl		
Campione						100 µl	
Controlli							100 µl
Reagente B – Soluzione Stabilizzante	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Reagente A – Soluzione Deproteinizzante + Std Interno	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Al vortex per 20 secondi

FASE 2: Centrifugare a 14.000 giri per 10 minuti.

N.B.: il campione è stabile 48 ore a 2-8 °C

FASE 3: diluire 200 µl di surnatante con 200 µl di **Reagente D – Soluzione Diluente**

Al vortex per 20 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl del surnatante nel sistema LC

PROCEDURA ANALITICA PER LA TEICOPLANINA

FASE 1 :

In eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Reagente C1 – Calibratore – Livello 1	100 µl						
Reagente C2 – Calibratore – Livello 2		100 µl					
Reagente C3 – Calibratore – Livello 3			100 µl				
Reagente C4 – Calibratore – Livello 4				100 µl			
Reagente C5 – Calibratore – Livello 5					100 µl		
Campione						100 µl	
Controlli							100 µl
Reagente A – Soluzione Deproteinizzante + Std Interno	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Al vortex per 20 secondi

FASE 2: Centrifugare a 14.000 giri per 10 minuti.

N.B.: il campione è stabile 48 ore a 2-8 °C

FASE 3: diluire 200 µl di surnatante con 200 µl di **Reagente D – Soluzione Diluente**

Al vortex per 20 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl del surnatante nel sistema LC

ANTIBIOTICI PLASMATICI - Avvertenze

REAGENTI C1-C2-C3-C4-C5 – CALIBRATORE LIOFILO PLASMATICO Lot. 001

ANTIBIOTICI:	Livello 1 mg/L	Livello 2 mg/L	Livello 3 mg/L	Livello 4 mg/L	Livello 5 mg/L
Daptomicina	1,3	8,0	15,0	29,3	50,5
Vancomicina	1,1	6,5	14,1	27,8	51,8
Linezolid	1,2	9,6	21,2	32,2	51,7
Levofloxacin	1,1	8,2	15,6	31,4	57,0
Ciprofloxacina	1,1	8,8	15,8	30,3	54,0
Gentamicina	1,0	7,3	15,7	32,9	50,6
Streptomicina	1,1	6,5	12,7	26,5	50,3
Amikacina	1,0	7,7	17,0	30,2	49,3
Teicoplanina					
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 1 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.					
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilati sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 7 giorni se conservati a 2–8 °C e 2 mesi a –20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.					
Confezionamento : 5 x 1 x 1 ml					
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.					

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* GOLD 50 x 2.1 mm, 3 µm. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di H₂O : Fase Mobile B (5 : 95 v/v) al flusso di 300 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con una soluzione di H₂O : Fase Mobile A (5 : 95 v/v) al flusso di 300 µl / minuto per 15 minuti.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA E STOCCAGGIO DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di H₂O : Fase Mobile B (5 : 95 v/v) per 15 minuti scaricandola. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Fase Mobile B (5 : 95 v/v).

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa, prima di ogni seduta analitica, con Acetonitrile o Metanolo. Lavaggio dell'ago dell'autocampionatore intra - serie con Acetonitrile o Metanolo.

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	95	5	300
0.50	95	5	300
2.00	5	95	300
3.59	5	95	300
4.00	95	5	300
5.00	95	5	300

ANALITA	PARENT ION
Daptomicina	811.1
Vancomicina	725.2
Linezolid	338.0
Levofloxacin	362.0
Ciprofloxacina	332.4
Gentamicina	478.3
Streptomicina	582.0
Amikacina	586.2
Teicoplanina	940.8
Standard Interno (Diazepam)	285.4

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC79016	Calibratore plasmatico per Antibiotici	5 x 1 x 2 ml
LC79017	Controllo plasmatico per Antibiotici – Livello 1	5 x 2 ml
LC79018	Controllo plasmatico per Antibiotici – Livello 2	5 x 2 ml
LC79019	Controllo plasmatico per Antibiotici – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
S29307U	Vial di vetro a volume ridotto complete di tappi	1 x 100 PZ
ZTF2500305213	Colonna analitica GOLD 50 x 2.1 mm, 3 µm	1 Pz
SK79010	Starter kit per Antibiotici	1 Pz



ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

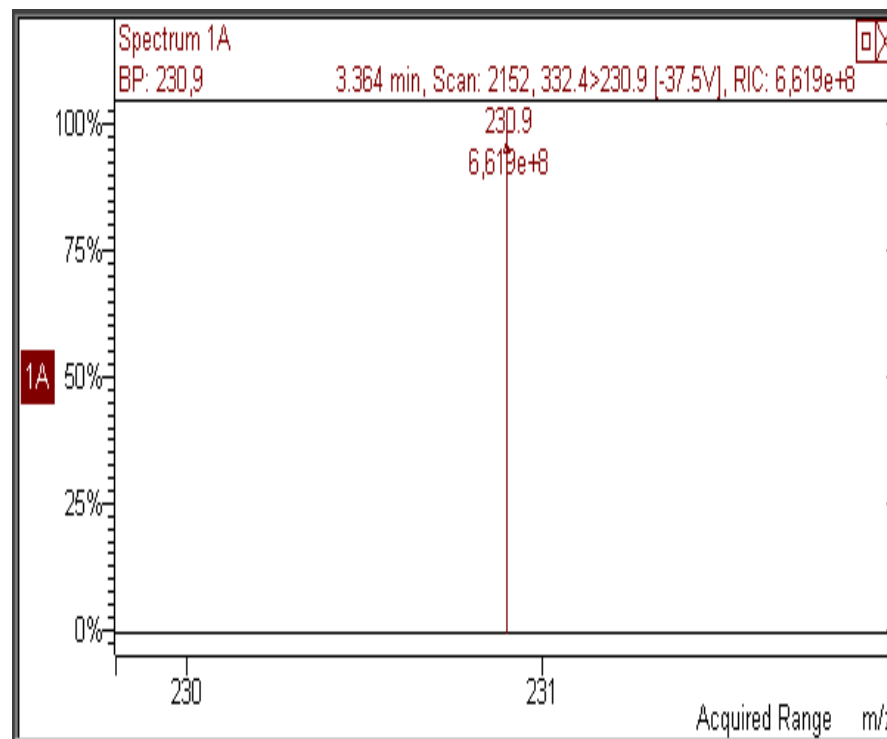
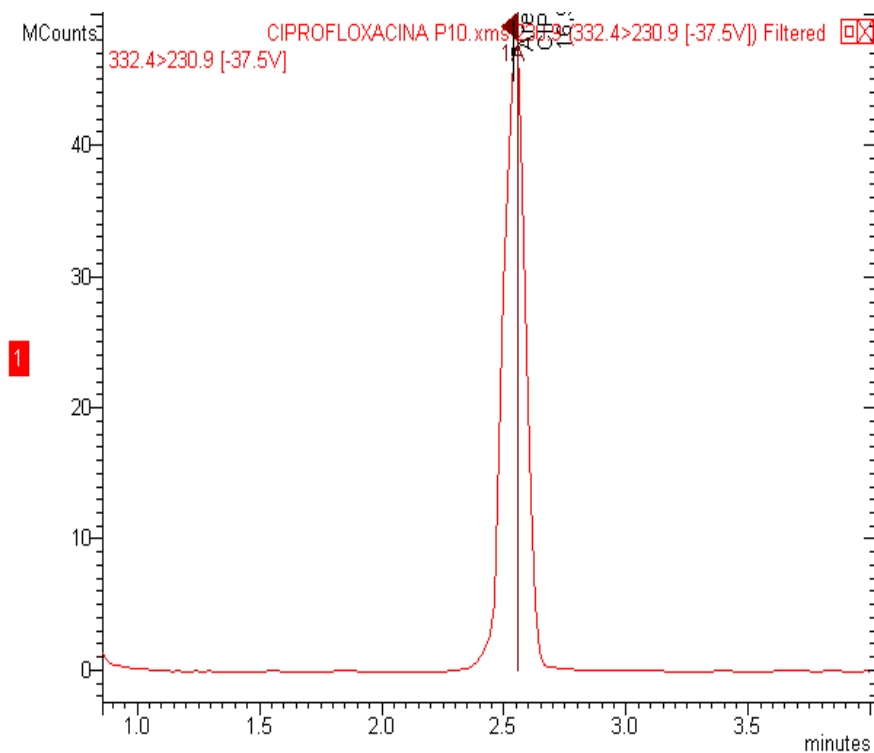


Fig. 1 :	Calibratore liofilo
R.T. 2.5	Ciprofloxacina 10 mg/l

Fig. 2 :	Spettro di Massa della Ciprofloxacina
TRANSIZIONI: 332.4 >230.9	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

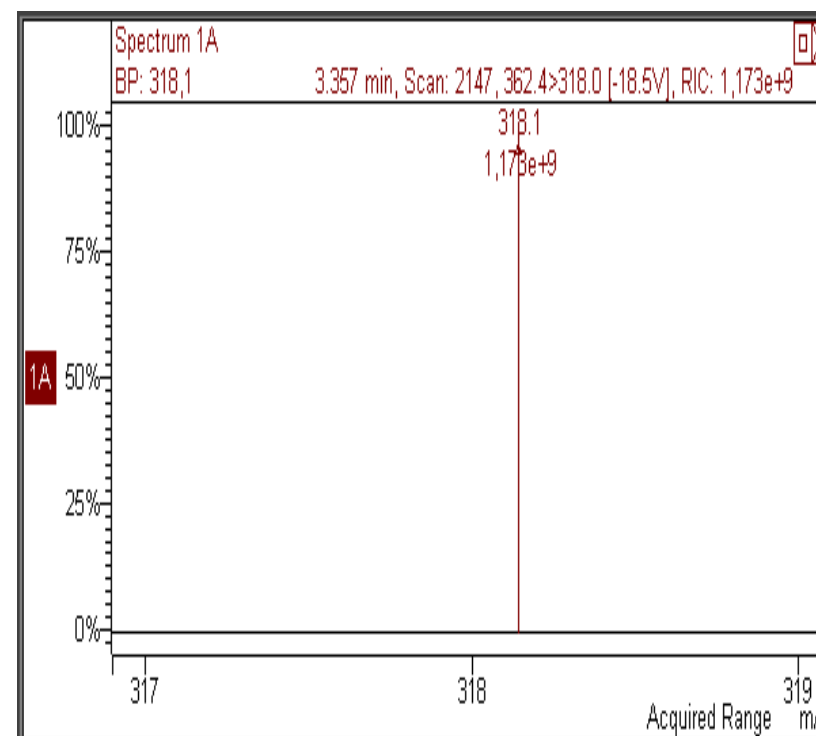
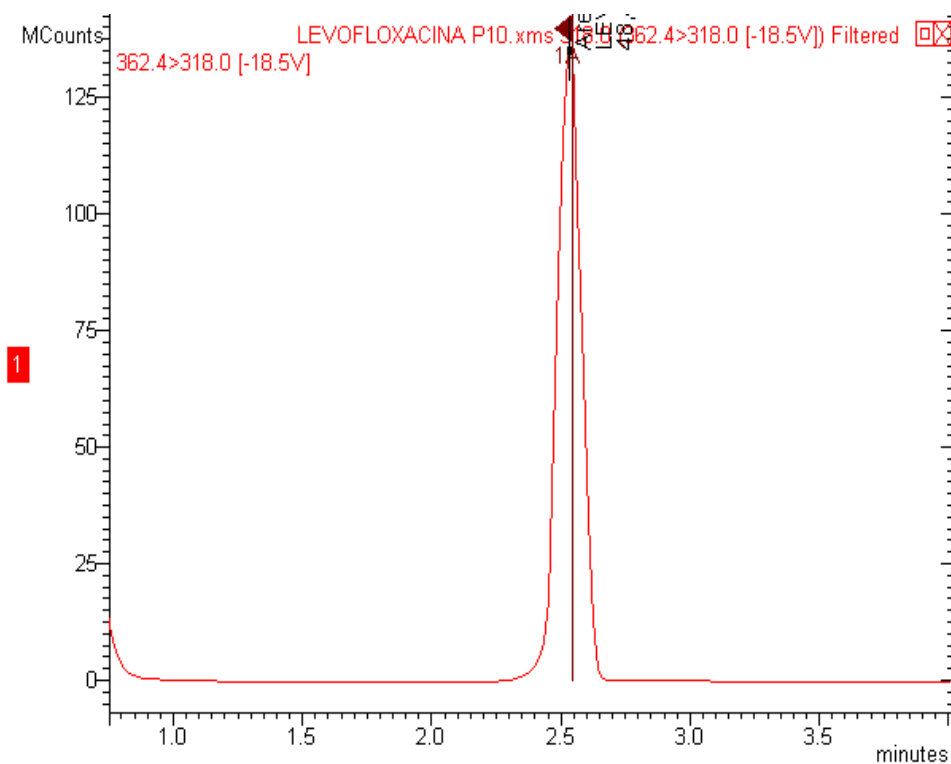


Fig. 3 : Calibratore liofilo
R.T. 2.5 Levofloxacin 10 mg/l

Fig. 4 : Spettro di Massa della Levofloxacin
TRANSIZIONI: 362.4>318.1

ANTIBIOTICI PLASMATICI (Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

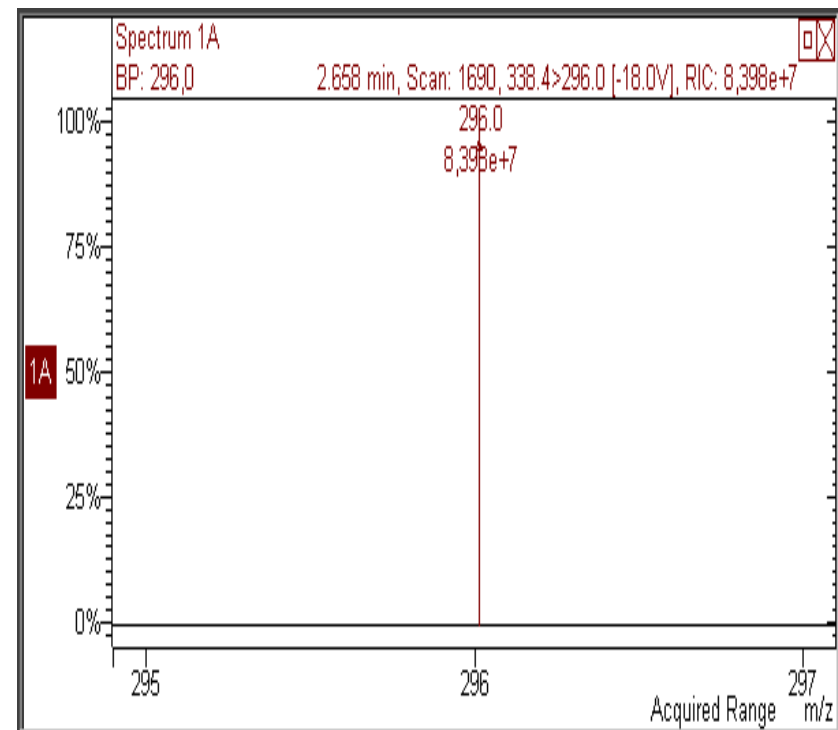
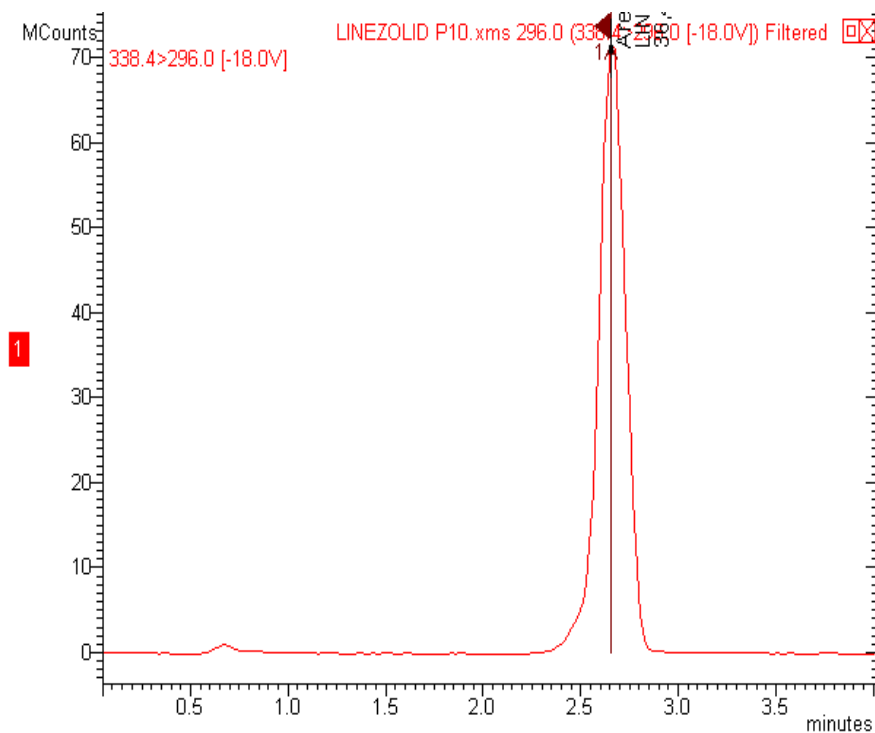


Fig. 5 :	Calibratore liofilo
R.T. 2.6	Linezolid 10 mg/l

Fig. 6 :	Spettro di Massa del Linezolid
TRANSIZIONI: 338.4>296.0	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

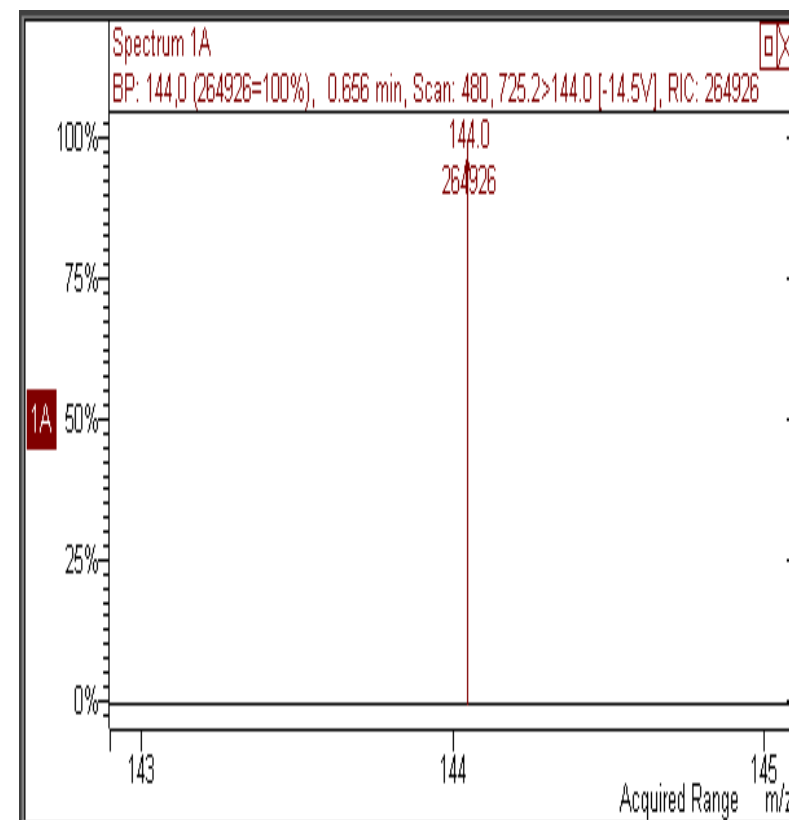
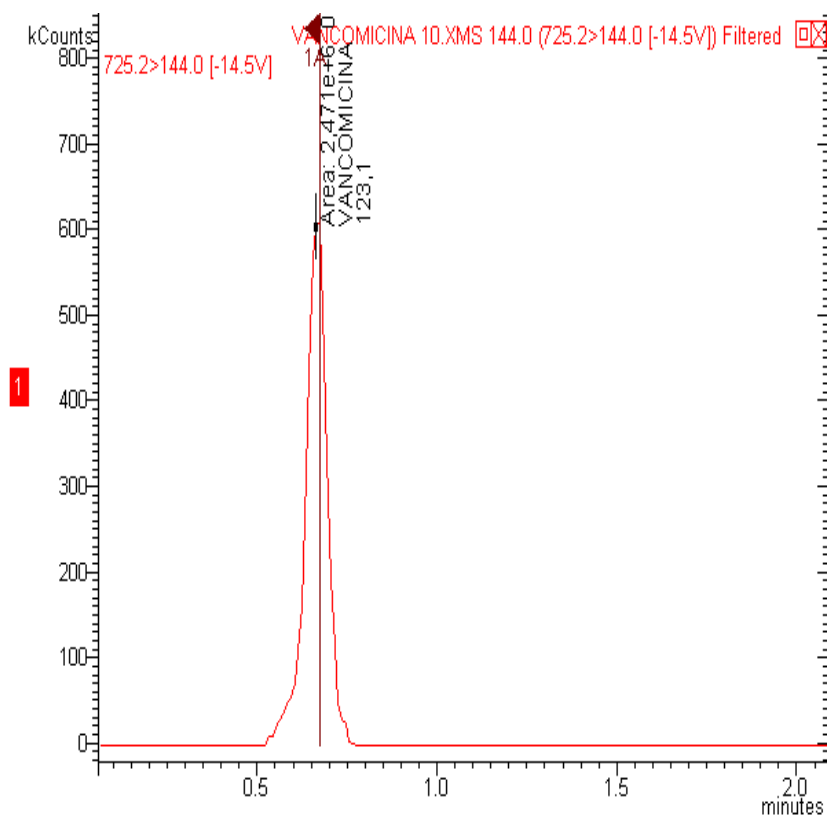


Fig. 7 :	Calibratore liofilo
R.T. 0.65	Vancomicina 10 mg/l

Fig. 8 :	Spettro di Massa della Vancomicina
TRANSIZIONI: 725.2 > 144.0	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

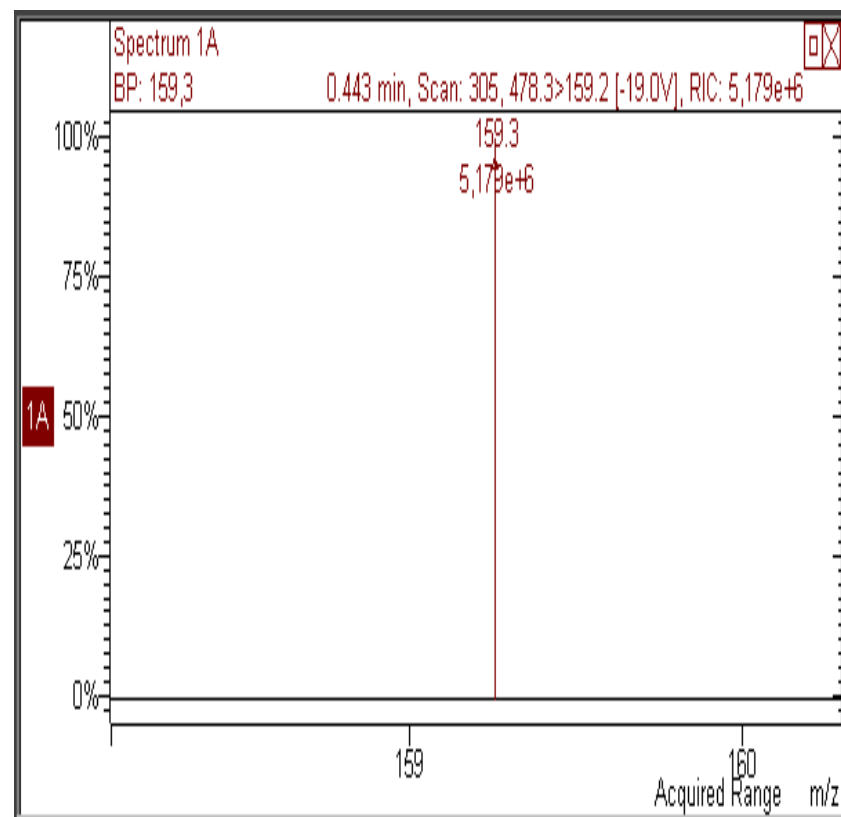
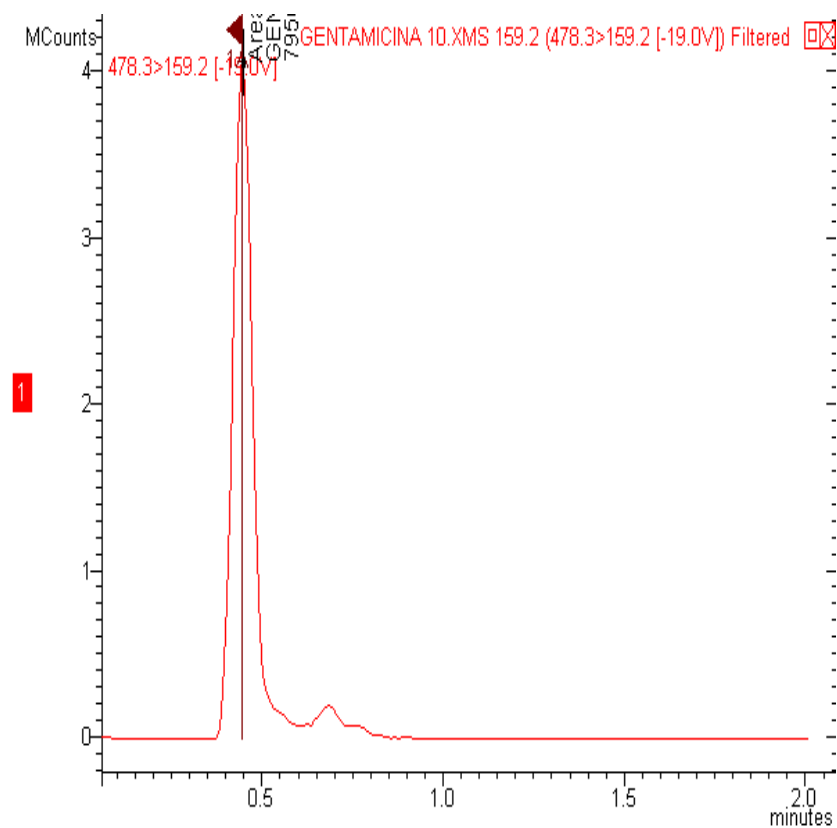


Fig. 9 :	Calibratore liofilo
R.T. 0.40	Gentamicina 10 mg/l

Fig. 10 :	Spettro di Massa della Gentamicina
TRANSIZIONI: 478.3>159.3	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

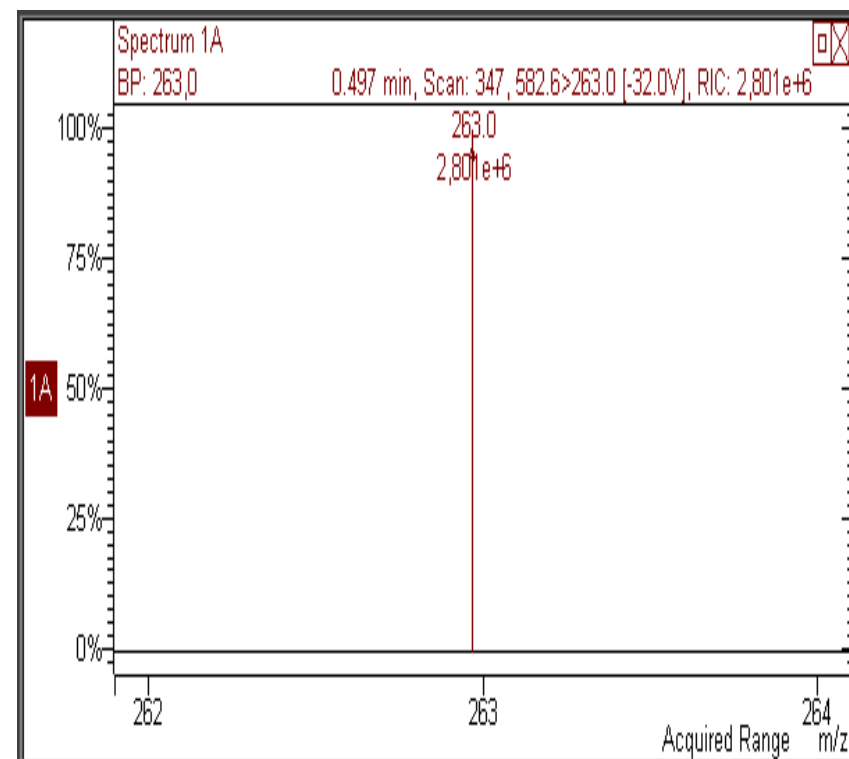
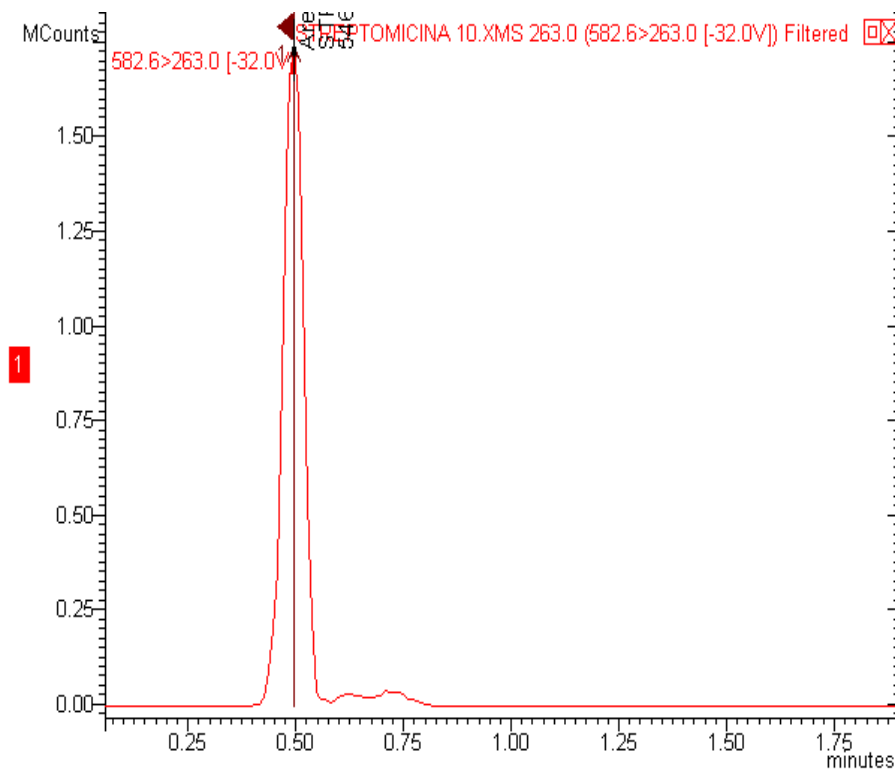


Fig. 11 :	Calibratore liofilo
R.T. 0.50	Streptomicina 10 mg/l

Fig. 12 :	Spettro di Massa della Streptomicina
TRANSIZIONI: 582.6>263.0	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

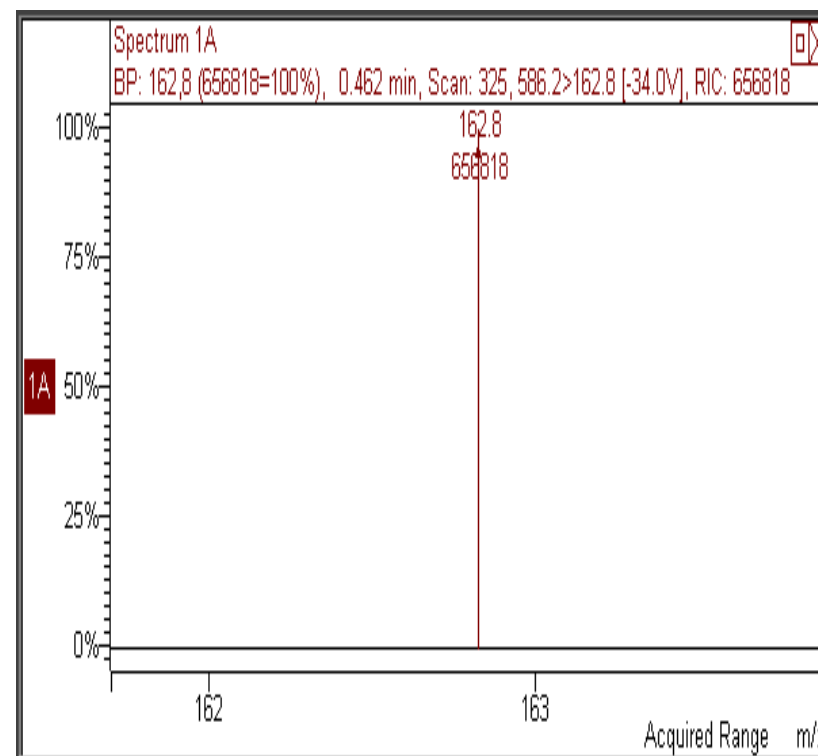
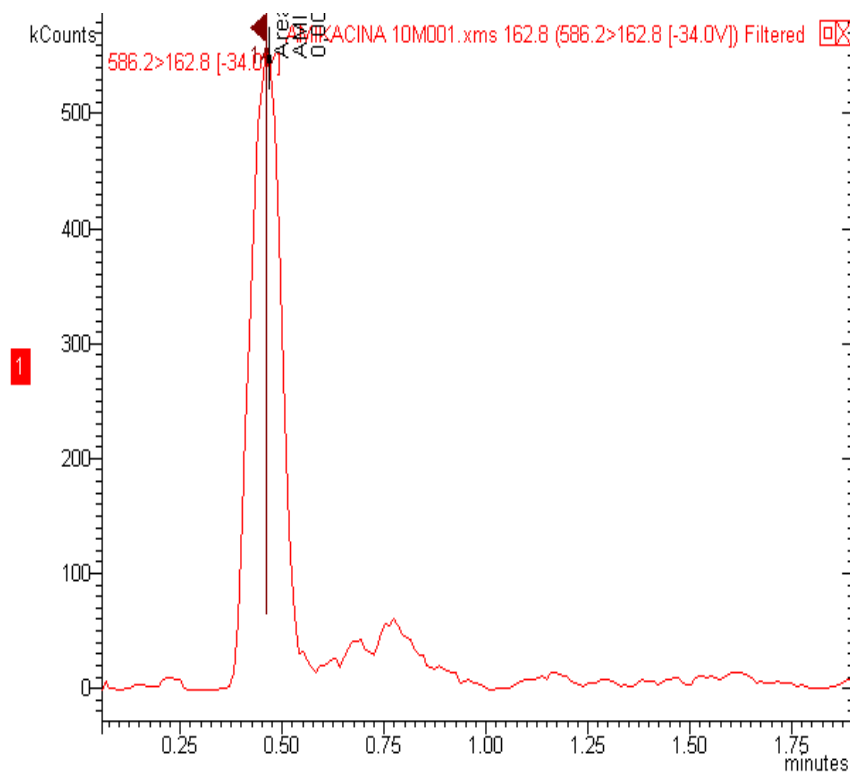


Fig. 13 :	Calibratore Iiofilo
R.T. 0.40	Amikacina 10 mg/l

Fig. 14 :	Spettro di Massa della Amikacina
TRANSIZIONI: 586.2>162.8	

ANTIBIOTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi/Spettri di Riferimento)

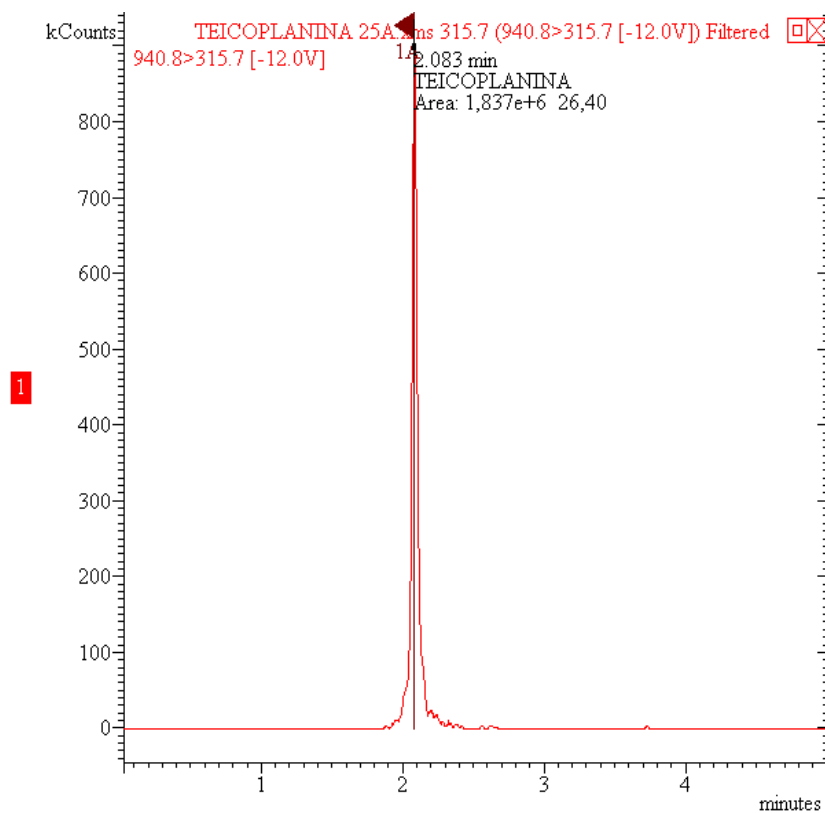


Fig. 15 :	Calibratore liofilo
R.T. 2.08	Teicoplanina 25 mg/l

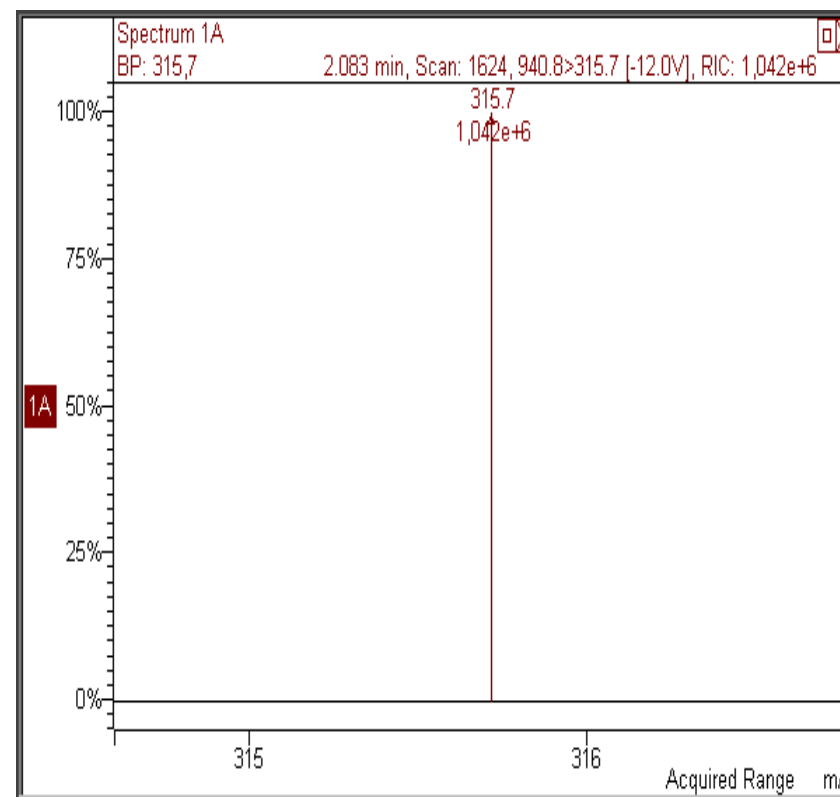


Fig. 16 :	Spettro di Massa della Teicoplanina
TRANSIZIONI: 940,8>315,7	