

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Meropenem mittels Dried Blood Spots (DBS) auf der Intensivstation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Daniel Monastyrski

aus Frankfurt am Main

Magdeburg, den 19.07.2022

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Definition, Epidemiologie und Pathogenese von nosokomialen Infektionen auf der Intensivstation.....	7
1.2 Carbapeneme - Meropenem.....	8
1.2.1 Wirkmechanismus und Wirkspektrum	8
1.2.2 Indikation und Dosierung.....	9
1.2.3 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Meropenem.....	10
1.2.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) und Interaktionen.....	11
1.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	12
1.3.1 Analytik von Meropenem	14
1.4 Dried Blot Spots (DBS) – Eine Übersicht.....	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material, Methoden und Patienten.....	18
2.1 Material	18
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	18
2.2.2 Verwendete Lösungen und Kalibrierung	20
2.2.3 Lösungen für die HPLC	22
2.2.4 Aufbereitung Vollblut aus DBS.....	22
2.2.5 HPLC-System: Säulen und Konfiguration	23
2.3 Validierung	24
2.4 Berechnung der Plasmakonzentration aus Vollblut und DBS	26
2.5 Patienten	26
2.5.1 Patientenkollektiv, Probenentnahme und Transport.....	26
2.6 Ethikvotum	27
2.7 Datenschutz.....	28
2.8 Statistische Auswertung.....	28
3 Ergebnisse.....	29

3.1	HPLC-MS Methode	29
3.1.1	Probenaufbereitung und Extraktionsausbeute der DBS Karten.....	29
3.1.2	Gradientenoptimierung	29
3.1.3	Detektion und Chromatogramm.....	29
3.2	Berechnung der Plasmakonzentration aus Vollblut.....	30
3.3	Validierung.....	32
3.3.1	Kalibrierung.....	32
3.3.2	Präzision, Richtigkeit, Robustheit und Matrixunabhängigkeit	33
3.3.3	Stabilität	34
3.4	Patientenproben	38
4	Diskussion	40
4.1	Validierung und Herstellung der DBS.....	40
4.2	Stabilität	42
4.3	Klinische Anwendbarkeit.....	44
4.4	Limitationen	47
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	47
5	Literaturverzeichnis	48
	Danksagung.....	54
	Selbstständigkeitserklärung.....	55
	Darstellung des Bildungsweges.....	56
	Anhang	57

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Monastyrski, Daniel

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Meropenem mittels Dried Blood Spots (DBS) auf der Intensivstation
2022, 57 Bl., 16 Abb., 4 Tab., 74 Ref.

Kurzreferat

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Meropenem auf Intensivstationen ist empfehlenswert, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen und Über- oder Unterdosierungen und somit Resistenzentwicklung zu vermeiden. Problematisch für Kliniken ohne entsprechendes Laborequipment ist die chemische Instabilität von Meropenem, die ein Versenden der Patientenproben auf Trockeneis notwendig macht. Messungen in Dried Blood Spots (DBS) haben den Vorteil leichter Probengewinnung und Versendung bei Raumtemperatur. Unser Ziel war es deshalb, den praktikablen Einsatz von DBS für die Messanalytik von Meropenem zu untersuchen. Es wurde ein LC-MS/MS Messverfahren für Meropenem in DBS entwickelt und validiert. Besonderes Augenmerk lag auf den Stabilitätsmessungen und der klinischen Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin DBS von 33 kritisch kranken Patienten der Intensivstation der Universitätsklinik Magdeburg zusätzlich zur routinemäßigen Bestimmung von Meropenem aus Plasma untersucht. Die Ergebnisse der beiden Messmethoden wurden mittels Intra-Klassen-Korrelation (ICC) für absolute Übereinstimmung miteinander verglichen. Meropenem lässt sich mit guter Präzision (relative Standardabweichung <11,6 % bei 1 µg/ml) und Richtigkeit (Abweichung vom Sollwert: 1,78 % bei 1 µg/ml) aus DBS quantifizieren. Die Intra-Klassen-Korrelation zwischen aus DBS errechnetem Plasmaspiegel und dem gemessenen Plasmaspiegel von Meropenem ergab einen ICC von 0,985. Der Bland-Altman-Plot zeigte ein vernachlässigbares Bias mit akzeptablen Limits of Agreement. Die Stabilität von Meropenem in DBS ist hoch; bei Raumtemperatur zerfallen < 15 % Meropenem in 24 h. Nach drei Tagen sind noch mehr als 80 % nachweisbar. Die Bestimmung von Meropenem aus DBS ist eine geeignete Alternative zur Messung von Plasmaspiegeln im Rahmen des Routine-TDM. Aus den DBS Ergebnissen lassen sich Plasmaspiegel mit guter Richtigkeit reproduzieren. Aufgrund der wesentlich verbesserten Haltbarkeit von Meropenem in DBS im Vergleich zu Plasma, ist ein einfacher und kostengünstiger Versand von den Kliniken zum Labor möglich.

Schlüsselwörter: Carbapenem, Meropenem, Dried Blood Spot (DBS), Therapeutisches Drug Monitoring (TDM), LC-MS/MS, Intensivmedizin

Abkürzungsverzeichnis

AmpC	AmpC Beta-Laktamase
AUC	Area under the curve (dt.: Fläche unter der Kurve)
C	Konzentration
C _{DBS}	DBS Vollblutkonzentration
C _{P, Ber.}	Berechnete Plasmakonzentration
DBS	Dried Blood Spot
DHP-1	Dehydropeptidase-I
DPS	Dried Plasma Spot
EBF	European Bioanalysis Forum
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamase
ESI	Elektro Spray-Ionisation
F	Korrekturfaktor
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography (dt.: Hydrophile Interaktionschromatographie)
Hkt	Hämatokrit
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IS	Interner Standard
ICC	Intraklassen-Korrelation
ITS	Intensivstation
m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
MHK	Minimale Hemmkonzentration

MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MS	Massenspektrometrie
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
NI	Nosokomiale Infektion
PBP	Penicillin-Bindungs-Protein
RP	reversed phase (dt: Umkehrphase)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (dt.: Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung

1 Einleitung

1.1 Definition, Epidemiologie und Pathogenese von nosokomialen Infektionen auf der Intensivstation

Die nosokomiale Infektion (NI) (von griechisch *nósos* ‚Krankheit‘ sowie *komein* ‚pflegen‘) ist definiert als *„eine Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand“* [1]. Die zeitlich definierte Spanne für das Auftreten einer NI liegt üblicherweise bei 48-72 h nach Aufnahme in eine medizinische Einrichtung, wobei die Infektion nicht schon vorher bestehen darf oder sich in der Inkubationszeit befindet [2]. In Deutschland treten jährlich schätzungsweise 500.000 NI mit bis zu 15.000 Todesfällen auf [3]. Das Auftreten von NI wird im Vergleich der Belegung der Stationen am häufigsten auf Intensivstationen (ITS) beobachtet. Zu den häufigsten NI zählen unter anderem die unteren Atemwegsinfektionen (24 %), postoperative Wundinfektionen (22,4 %) und Harnwegsinfektionen (21,6 %). Die drei häufigsten dokumentierten Erreger einer NI sind *Escherichia coli* (16,6%), *Clostridium difficile* (13,6 %) und *Staphylococcus aureus* (12 %) [4]. Kritisch kranke Patienten auf einer ITS sind besonders anfällig für solche NI, die zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen können [5]. Die Ursachen hierfür sind häufig eingesetzte invasive Maßnahmen wie die maschinelle Beatmung, zentrale Venenkatheter, periphere Katheter und Drainagen [6]. Außerdem sind nosokomiale Pneumonien, höheres Alter, der Einsatz von Glukokortikoiden oder Chemotherapeutika bedeutsame Risikofaktoren, die mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität auf ITS assoziiert sind [7]. Pathophysiologisch lässt sich die erhöhte Anfälligkeit für NI durch zwei zentrale Mechanismen erklären. Zum einen spielt eine herabgesetzte Immunbarriere eine entscheidende Rolle, die zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit führt. Außerdem haben Intensivpatienten häufig deutlich abgeschwächte physiologische Reflexe, welche der Abwehr von Erregern entgegenzutreten können. Zum anderen spielt die Kolonisation von pathogenen Keimen eine weitere entscheidende Rolle. Diese Keime bilden sich bevorzugt an invasiven Zugängen und ziehen lange antibiotische Behandlungen nach sich [2]. Der Einsatz von Antibiotika ist im Vergleich mit anderen Stationen auf der ITS am höchsten. Der häufig kalkulierte Gebrauch von Antibiotika fördert die Entwicklung von bakteriellen Resistenzen mit der Folge, dass vermehrt auf Reserveantibiotika zurückgegriffen werden muss [8,4]. Somit konnte in den letzten Jahren ein

signifikanter Anstieg der Anwendung von Meropenem verzeichnet werden [9,4]. NI sind mit einem deutlich verlängerten Krankenhausaufenthalt sowie wesentlich höheren Behandlungskosten verbunden [10].

1.2 Carbapeneme - Meropenem

Das Breitspektrumantibiotikum Meropenem gehört zu der Gruppe der Carbapeneme und kommt als intravenöse Therapie einer Vielzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien zum Einsatz.

1.2.1 Wirkmechanismus und Wirkspektrum

Meropenem ist ein β -lactam-Antibiotikum aus der Gruppe der Carbapeneme. Chemisch unterscheiden sich Carbapeneme zu klassischen β -lactam-Antibiotika durch den Austausch eines Schwefelatoms an Position 1 und einer ungesättigten Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 der Thiazolidin-Ringstruktur [11]. Nachfolgend sind in der Abbildung 1 die Strukturformeln dargestellt [12,13]. Die bakterizide Wirkung beruht auf der Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese und führt auf diese Weise zum Zelltod. Carbapeneme können die Zellwand sehr leicht durchdringen und binden mit hoher Affinität an spezifische Penicillin-Bindungs-Proteine (PBP). Hierdurch wird unter anderem die Peptidoglykan-Transpeptidase gehemmt und somit die Quervernetzung des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand gestört. Des Weiteren weisen alle Carbapeneme eine besondere intrinsische Resistenz gegen nahezu alle β -Lactamasen auf. Die β -Lactamasestabilität lässt sich durch den trans- α -1-hydroxyethyl Substituenten an Position 6 des β -Lactamrings der Carbapeneme erklären, wodurch eine Hydrolyse verhindert wird (Fig. 1, Fig. 2) [14]. Meropenem gehört mit Ertapenem, Biapenem und Doripenem zu den neueren Carbapenemen und unterscheidet sich zu älteren Substanzen im Wesentlichen durch seine ausgeprägte Dehydropeptidase-1-Stabilität (DHP-1). DHP-1 ist ein Enzym, das sich in der Niere befindet und zu einer Hydrolyse vom β -Lactamrings führt. Ältere Substanzen werden daher in Kombination mit einem DHP-1 Inhibitor verabreicht [15,16].

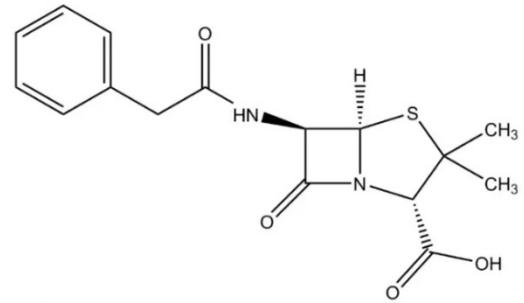
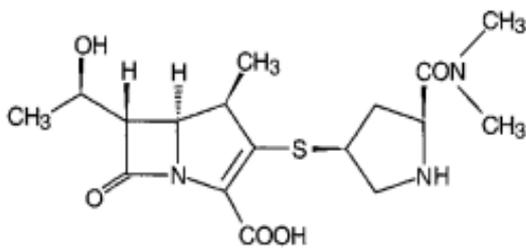


Abbildung 1: Strukturformel Meropenem (links) und Benzylpenicillin (rechts)

Als β -lactam-Antibiotikum hat Meropenem ein sehr breites Wirkspektrum. Es zeigt eine sehr gute antibakterielle Wirkung auf klinisch relevante Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* u.v.m. Im Vergleich zu Imipenem ist Meropenem wirksamer gegen Gram-negative Bakterien inklusive *Pseudomonas aeruginosa*. Grund ist der Pyrollidinring am zweiten Kohlenstoffatom [17]. Zusätzlich wirkt Meropenem gegen ESBL- und AmpC-bildende Enterobakterien. Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (MSSA), *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* und Viridans-Streptokokken gehören ebenfalls zum Wirkspektrum von Meropenem. Eine eher schwache Wirkung zeigt sich gegen Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*.

Anaerobier wie *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* werden durch Meropenem miterfasst [18].

1.2.2 Indikation und Dosierung

Als Breitspektrum- und Reserveantibiotikum kommt Meropenem bei komplizierten bakteriellen Infektionen als kalkulierte Monotherapie zum Einsatz [19]. Eine Übersicht der wichtigsten Indikationen ist in Abbildung 2 dargestellt.

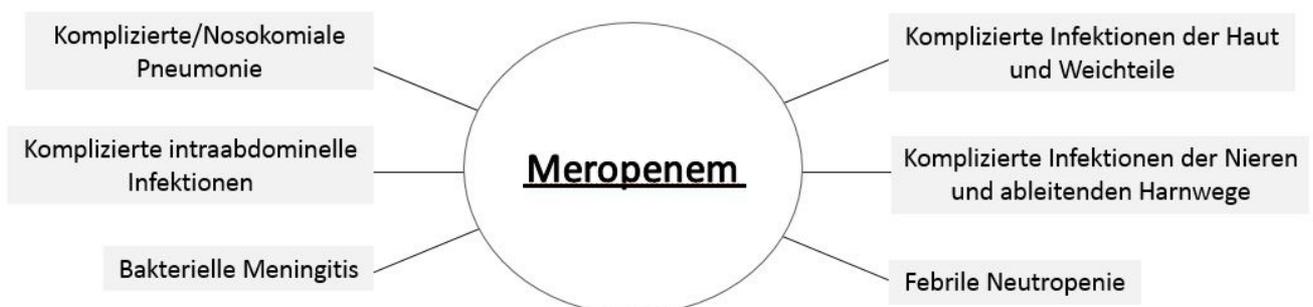


Abbildung 2: Die wichtigsten Indikationen einer Meropenemtherapie

Die empfohlene Dosierung für Meropenem bei Erwachsenen liegt im Bereich von 1,5-6 g pro Tag, aufgeteilt auf drei Tagesdosen. Üblicherweise werden alle 8 h 1 g intravenös als Bolusinjektion über 5 Minuten oder als Infusion über 15-30 Minuten verabreicht. Ausnahmen sind bakterielle Meningitiden und respiratorische Infektionen bei zystischer Fibrose, bei denen Dosen von 2 g alle 8 h empfohlen werden. Bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz muss die Dosis angepasst werden [20,6]. Des Weiteren muss ein besonderes Augenmerk auf kritisch kranke Patienten mit einer SIRS oder Sepsis gelegt werden. Eine veränderte Hämodynamik und Gefäßpermeabilität, eine verminderte Ejektionsfraktion des Herzens und eine zu Beginn renale Hyperfiltration können leicht zu Fehldosierungen führen. Dies gilt ebenfalls für Patienten mit Nierenersatzverfahren oder anderen extrakorporalen Therapien, da der Meropenemspiegel durch diese Verfahren deutlich abfallen kann. Zusätzlich besteht die Gefahr einer Organdysfunktion, wodurch die Pharmakokinetik einer Substanz unberechenbar wird [21][22,23]. Bei Patienten mit einer Leberinsuffizienz muss keine Dosisanpassung erfolgen [20].

1.2.3 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Meropenem

Die Pharmakokinetik beschreibt die Prozesse der Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination eines Pharmakons im menschlichen Körper. Abbildung 3 zeigt einen Auszug der wichtigsten pharmakokinetischen Parameter, die für ein antibakterielles Arzneimittel von Bedeutung sind. Die Pharmakodynamik wiederum beschreibt, wie das Pharmakon an seinem Zielort in Abhängigkeit von der Dosis und anderen Faktoren wirkt. Hierbei spielt unter anderem die Zeit, in der die Serumkonzentration eines Arzneimittels während eines Dosierungszeitraums über der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) bleibt ($T > \text{MHK}$) eine wichtige Rolle. Die MHK wird in der Regel als MHK_{90} angegeben und beschreibt die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der mindestens 90 % der getesteten Stämme in ihrem Wachstum gehemmt werden. Außerdem gehören zu den weiteren pharmakodynamischen Parametern die Bestimmung des Verhältnisses aus Spitzenspiegel und MHK ($C_{\text{max}}/\text{MHK}$) sowie das Verhältnis aus der Fläche unter der Serumkonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) innerhalb 24 h und der MHK ($\text{AUC}_{24}/\text{MHK}$). Pharmakodynamisch gesehen hängt die Effektivität der bakteriziden Wirkung eines Antibiotikums von der Wechselwirkung zwischen der Wirkstoffkonzentration am Infektionsort, der bakteriellen Ausbreitung und der MHK des Erregers ab. Daraus folgt, dass eine Änderung eines dieser Faktoren die Aktivität des Antibiotikums gegen einen bestimmten Erreger beeinflusst und sich auf das Ergebnis der Therapie auswirken kann [24].

Meropenem wird durch Hydrolyse des β -Lactamrings verstoffwechselt und weist eine vernachlässigbare Plasmaproteinbindung (2 %) auf. Hauptsächlich wird Meropenem über die Niere eliminiert. Dabei werden ungefähr 70 % einer Dosis unverändert ausgeschieden, weitere 28 % verbleiben als mikrobiologischer inaktiver Metabolit und weitere 2 % werden über den Faeces ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt bei gesunden Patienten mit normaler Nierenfunktion ca. 1 h. Um eine Überdosierung zu vermeiden, muss bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion eine Dosisanpassung anhand der Kreatinin-Clearance erfolgen. Nach intravenöser Gabe lassen sich wirksame Konzentrationen in vielen verschiedenen Körperkompartimenten nachweisen, was auf eine gute Penetration der Substanz schließen lässt [20]. Meropenem hat wie die meisten anderen β -lactam-Antibiotika eine zeitabhängige Wirkung. Die Wirkung ist also dann am effektivsten, wenn die Konzentration des Antibiotikums möglichst lange oberhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des pathogenen Keims liegt ($\%T > \text{MHK}$). MHK Richtwerte können der EUCAST-Datenbank für die entsprechenden pathogenen Keime entnommen werden. Der Wirkspiegel von Meropenem sollte mindestens über 60 % der Applikationszeit über dem 4-5x der MHK liegen [25]. Außerdem wird bei den Carbapenemen neben der zeitabhängigen Wirkung auch noch ein konzentrationsabhängiger postantibiotischer Effekt auf gram-negative Bakterien vermutet [26].

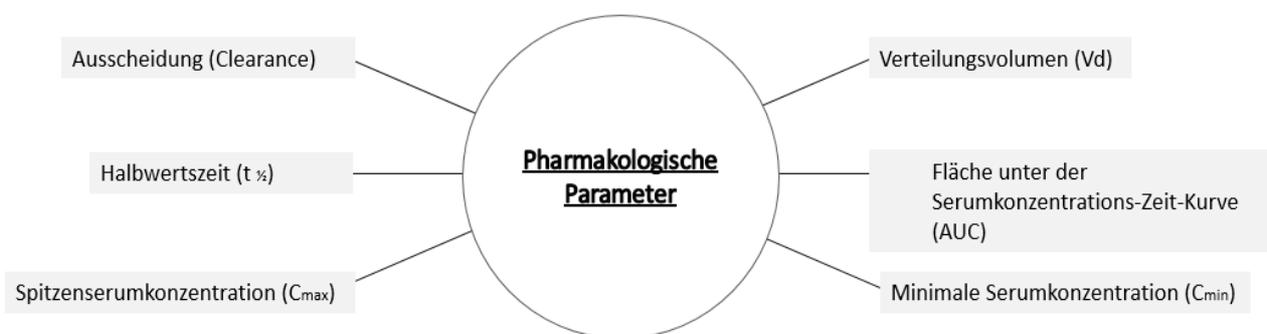


Abbildung 3: Übersicht und Auszug der wichtigsten pharmakologischen Parameter von Meropenem

1.2.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) und Interaktionen

Zu den häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen Durchfall, Übelkeit und Erbrechen, Juckreiz und Hautausschlag. Diese Nebenwirkungen wurden als milde eingestuft und führten nur bei 1,4 % der Patienten zu einem Abbruch der Therapie. Wie alle β -lactam-Antibiotika können auch Carbapeneme zu Veränderung von Laborparametern führen. Zu den häufigsten veränderten Parametern unter Meropenem zählen hierbei die Thrombozyten und Leberenzyme

[27]. Die Gabe von Meropenem in hohen Dosen, wie sie manchmal notwendig sind, können dabei unter anderem zu zentralnervösen Störungen, gastrointestinalen und hämatologischen Nebenwirkungen führen. Vor allem septische Patienten weisen unter der Behandlung ein dosisabhängiges erhöhtes Risiko für neurologische Nebenwirkungen auf [28]. Besonders hervorzuheben sind hierbei Krampfanfälle, die nach Gabe von Meropenem beobachtet wurden [29]. Unter der Therapie kann die Gefahr einer medikamenteninduzierten, nicht-komplement aktivierten Immnhämolyse bestehen, welche durch eine strenge Kontrolle der Wirkspiegel in Verbindung mit aktuellen Blutwerten verhindert werden kann [30].

Es sind nur wenige Interaktionen von Meropenem mit anderen Substanzen bekannt. Die gleichzeitige Gabe von Probenecid führt aufgrund der Konkurrenz um die renale tubuläre Sekretion zu einer Halbwertszeitverlängerung und zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Meropenem. Außerdem konnte ein Abfall der Plasmakonzentration von Valproinsäure bei simultaner Gabe mit Meropenem beobachtet werden [20].

1.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)

Das Therapeutische Drug Monitoring (TDM) dient der Bestimmung von Serum- und Plasmakonzentration unterschiedlichster biologischer und chemischer Substanzen und dessen Metaboliten. In den frühen 1970er Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass mittels TDM und Festlegung eines therapeutischen Bereichs die Toxizität verschiedener Arzneimittel (u.a. Digoxin, Phenytoin und Lithium) verringert werden konnte [31]. Der therapeutische Bereich eines Arzneimittels beschreibt einen bestimmten Bereich der Serum- bzw. Plasmakonzentration indem der gewünschte therapeutische Effekt erwartet wird [32]. In der Regel haben die meisten Arzneimittel einen starr definierten therapeutischen Bereich, unabhängig der Indikationen, Altersgruppen sowie Begleitmedikationen und Komorbiditäten. Dosierungsempfehlungen in den Fachinformationen von Arzneimittel wurden meist anhand eines gesunden Patientenkollektivs ermittelt und geben somit nicht die Realität im stationären Bereich wieder [33]. Durch das TDM ist eine Interpretation und individuelle Dosisanpassung der Ergebnisse (durch ein fachmedizinisches Personal) anhand von pharmakokinetischen- und dynamischen Grundkenntnissen möglich. Voraussetzung sind zudem sowohl die Kenntnis der pharmakologischen Eigenschaften der zu analysierenden Substanz als auch der Zustand des Patienten. Somit können empfohlene Wirkstoffkonzentrationen (therapeutischer Bereich) im Blut sowie ein klinisches Ansprechen besser beurteilt und erzielt werden [34]. Negative Effekte aufgrund zu hoher oder zu niedriger

Wirkspiegel wie beispielsweise ein vermehrtes Auftreten an Nebenwirkungen oder eine erhöhte Resistenzbildung können auf diese Weise vermieden werden. Im Allgemeinen besteht eine Indikation zum TDM bei einer zu erwartenden Abweichung der Pharmakokinetik. Gründe hierfür können eine bestehende oder neu aufgetretene Nieren-, Herz- oder Leberinsuffizienz, extremes Über-, oder Untergewicht sowie Polymedikation und Medikamentengabe über eine Ernährungssonde sein [33]. TDM ist daher besonders bei kritisch kranken Patienten sinnvoll, da diese aufgrund der hier bereits beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen (Kap. 1.2.2) eine veränderte Pharmakokinetik aufweisen können [23]. Mögliche Folgen sind unzureichende Wirkspiegel mit ausbleibendem therapeutischen Effekt und im ungünstigen Fall eine Resistenzbildung. Ziel ist es also, durch das TDM die Verbesserung der Pharmakotherapie des individuellen Patienten und zugleich die Erhöhung der Patientensicherheit zu erreichen [34].

Nachdem die Indikation zum TDM gestellt wurde, spielt der Zeitpunkt der Probenentnahme eine entscheidende Rolle. Während eines Applikationsintervalls bestehen die Möglichkeiten einer Talspiegel- oder Spitzenspiegelbestimmung. Letzteres ist lediglich bei Applikationsformen mit vernachlässigbarer Resorptionsphase (z.B. i.v. Applikation) sinnvoll. Die Blutentnahme erfolgt dann 30 Minuten nach erfolgter Medikamentenverabreichung und stellt einen paraklinischen definierten Spitzenspiegel dar. Der Talspiegel gibt die niedrigste Blutspiegelkonzentration wieder und wird während eines Applikationsintervalls stets vor der nächsten Gabe bestimmt. Diese Bestimmung ist unabhängig der Applikationsform. Der optimale Zeitpunkt der ersten Probenentnahme für das TDM ist nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes der absorbierten und eliminierten Menge eines Antibiotikums, welches nach 4-5 Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) erzielt wird. Letztendlich beeinflusst dadurch eine veränderte Pharmakokinetik (wie z.B. eine Niereninsuffizienz) den idealen Probenentnahmezeitpunkt. Nach erfolgter Probenentnahme ist ein zügiger Transport an das zuständige Labor wichtig. Durch eine schnelle analytische Bestimmung kann im aktuellen Applikationsintervall eine Ergebnisübermittlung sowie fachgerechte Empfehlung zur Therapieanpassung erfolgen. Da das TDM in Deutschland nicht flächendeckend an allen Kliniken vorhanden ist, ist in vielen Fällen ein Probenversand an TDM Zentren notwendig. Licht- und thermolabile Substanzen wie z.B. Carbapeneme müssen entsprechend per Expressversand und auf Trockeneis versendet werden. Hierdurch entsteht ein deutlich höherer logistischer Aufwand [35,36]. Eine aktuelle Studie, basierend auf einer Umfrage, spiegelt zusammenfassend die Lage zur Verfügbarkeit und Nutzen des TDM auf deutschen ITS wider. Darin wird deutlich, dass das TDM, ausgenommen vom TDM von Vancomycin, für zahlreiche andere Antibiotika

(insbesondere Meropenem und β -Lactam-Antibiotika) deutlich häufiger gewünscht ist, als es zur Verfügung steht [37].

1.3.1 Analytik von Meropenem

Meropenem wird in der Routine mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatografen (HPLC) aus Plasma aufgetrennt. Anschließend kann die Analyse mit einem UV-Spektrometer oder Massenspektrometer erfolgen. Die UV-Spektrometrie ist das etablierte Verfahren und wird zur Routine-TDM am Universitätsklinikum Magdeburg eingesetzt [38]. Die Massenspektrometrie ist zwar deutlich empfindlicher als die UV-Spektrometrie, wird jedoch aus finanziellen und logistischen Gründen nicht routinemäßig angewandt. Unsere Studiengruppe hat bereits ein validiertes Verfahren für die Bestimmung von Meropenem aus Plasma mit Hilfe einer Hydrophilen Interaktionschromatografie (HILIC) und Massenspektrometer (= HILIC-MS/MS) entwickelt und publiziert [39].

Ergebnisse der Studie Binder et al. zeigen inadäquate Wirkspiegelkonzentrationen bei ITS Patienten unter Standarddosierungen mit Meropenem [40]. In einer retrospektiven Studie an Patienten der Intensivstation der Universität Magdeburg konnte der Effekt und Nutzen einer täglichen TDM-gestützten Therapie mit Meropenem gezeigt werden. Hierbei ergaben sich deutliche Hinweise auf eine Mortalitätsreduktion bei Patienten unter regelmäßiger TDM Kontrolle [33]. Das TDM von Meropenem auf ITS ist wie bereits beschrieben bei zahlreichen Arzneimitteltherapien empfohlen, wird jedoch nicht routinemäßig durchgeführt [22]. Die Gründe hierfür sind zum einen das fehlende Equipment zur Durchführung eines TDM von Meropenem an vielen Standorten und zum anderen der logistische Aufwand, um Meropenem an entsprechende Labore zu versenden. Letzteres betrifft die Stabilität von Meropenem. Bei Raumtemperatur ist mit einem Verlust von 7 % innerhalb der ersten 4 h zu rechnen. Ein Verlust von 10 % bleibt klinisch ohne therapeutische Konsequenz. Um also einen effizienten Transport gewährleisten zu können, muss Meropenem auf Trockeneis gelagert und versendet werden [35].

1.4 Dried Blot Spots (DBS) – Eine Übersicht

Dried Blot Spots (DBS) sind Blutkärtchen, worauf Blutstropfen getrocknet und anschließend mit verschiedensten analytischen Methoden ausgewertet werden können. DBS bietet hierbei eine einfache Probensammlung, in der nur eine geringe Menge an Blut zur Analyse benötigt wird. Das Blut kann also zum Beispiel eigenständig vom Patienten zu Hause, wie bei der Blutzuckermessung, mittels einer feinen Lanzette aus der Fingerkuppe (kapilläres Blut) gewonnen werden. Hierdurch

können dem Patienten Schmerzen und Hämatome bei der Blutentnahme sowie Klinik- und Arztbesuche erspart werden [41]. Eine kapilläre Blutentnahme unterscheidet sich im Vergleich zu venösem Vollblut weder in der Erythrozytenzahl, dem Hämoglobin noch dem Hämatokrit (Hkt) [42]. Im Hinblick auf die aktuelle Covid-19 Pandemie präsentierte sich ein deutlicher Rückgang von ambulanten als auch klinischen Patientenvorstellungen [43]. In solch einer beispielhaften Extremsituationen wäre die eigenständige Blutentnahme für Verlaufskontrollen auf DBS in manchen Fällen eine Alternative zum Arztbesuch. Hinzukommend werden nur geringe Blutvolumina benötigt, sodass eine Blutarmut (Anämie) weder provoziert bzw. eine bekannte Anämie aggraviert wird. Dieses Prinzip stützt eine Säule der Prävention und Management einer Anämie im Rahmen des „Patient-Blood-Management“ [44,45]. Ein weiterer Vorteil der DBS besteht in einem einfachen und kostengünstigen Versand [46]. Zudem wird im Allgemeinen eine gute Stabilität unterschiedlicher Substanzen auf DBS beschrieben [47].

Die DBS Methode ist vor allem im Neugeborenen Screening bereits fest etabliert und wurde im Jahre 1963 von Robert Guthrie erstmalig zur Diagnostik der angeborenen Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie angewandt. Die Basis dieser Diagnostik entsprach damals einem bakteriellen Hemmtest durch das Beimpfen eines Nährbodens mit dem Bakterium *Bacillus subtilis* und anschließende Zugabe der getrockneten Blutprobe. Dieses Verfahren hatte eine hohe Sensitivität in der Diagnostik, erbrachte jedoch aufgrund zahlreicher äußerer Störfaktoren (z.B. Nahrungsaufnahme in den ersten Lebenstagen) gehäuft falsch negative Ergebnisse. Im Laufe der Zeit entwickelten sich mittels DBS deutlich empfindlichere Nachweismethoden. In den 90er Jahren etablierte sich allmählich die Bestimmung von Substanzen aus DBS mittels Massenspektrometrie (MS), mit Hilfe derer sich im Hinblick auf die Nachweisgrenzen deutlich empfindlichere Ergebnisse erheben lassen. Darüber hinaus etablierte sich das DBS MS Verfahren auch außerhalb des Neugeborenen Screenings. Die Bestimmung von Benzoylgonin, einem Metaboliten von Kokain, war mittels DBS MS eine der Ersten dieser Art. Zahlreiche weitere Substanzen sind im Laufe der Zeit hinzugekommen [47]. Mittlerweile werden viele Arzneimittel im Rahmen des TDM mittels der DBS Methode bestimmt. Arzneimittel, die im Bereich der Hämatonkologie und Transplantationsmedizin eingesetzt werden, sind hierbei als führend zu erwähnen [48].

Die Vorteile der DBS sind zu Beginn bereits beschrieben worden. Jedoch sind zuvor in der Methodenentwicklung und Validierung zahlreiche Hürden für eine effiziente Bestimmung zu überwinden. Die folgende Übersicht (Abb. 4) soll die wichtigsten Hürden und Probleme der DBS Methode veranschaulichen. Ein zentrales Problem in der Validierung und Bestimmung auf DBS ist

der Hämatokrit (Hkt). Der Hkt beschreibt den Volumenanteil an zellulären Bestandteilen im Vollblut. Änderungen des Hkt führen zu einer veränderten Blutviskosität und schließlich einer unterschiedlichen Verteilung des Blutropfens auf dem DBS. Hierdurch variiert das Blutvolumen innerhalb der ausgestanzten DBS Disc. Denniff et al. beschreiben, dass die Größe des Blutropfens auf der DBS nachweislich proportional und linear mit steigendem Hkt abnimmt. Diese Annahme führt zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Konzentration des Analyten, wenn diese mit der Standardkalibrierung mit einem anderen Hämatokritwert verglichen und bestimmt wird [49]. Die Analytik von Meropenem aus DBS ist eine Möglichkeit, die Stabilitätsschwierigkeiten während des Probenverkehrs zu umgehen. Hierfür wird ein kleiner Blutropfen auf ein Filterpapier getropft, getrocknet und anschließend ohne großen Aufwand an ein Ziellabor transportiert. Die Bestimmung von Ertapenem aus DBS stellt im Hinblick auf unsere Arbeit und Stabilitätsverbesserung eine wichtige und interessante Grundlage dar [50]. Da es sich um eine Substanz derselben Antibiotikaklasse handelt, bot sich eine gute Referenz zu unserer Versuchsreihe an.

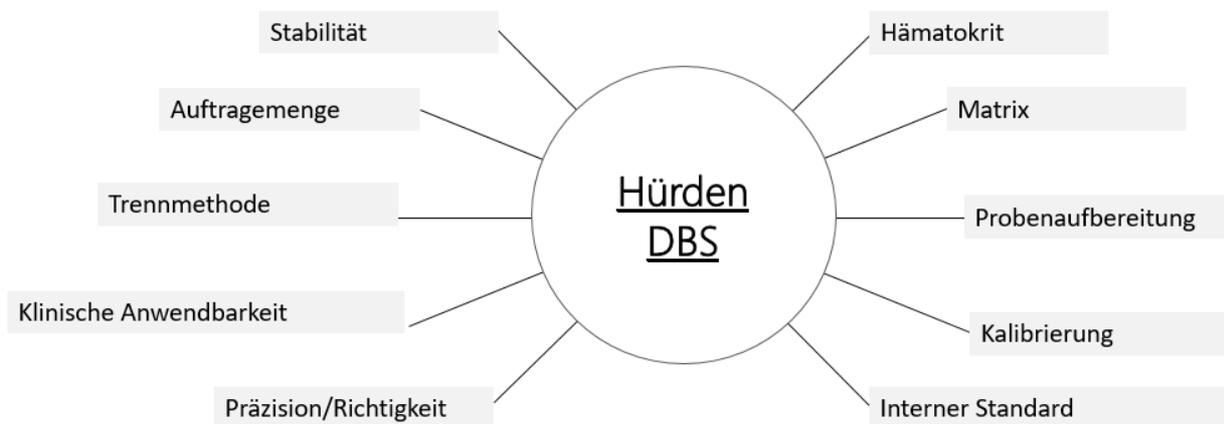


Abbildung 4: Übersicht der Hürden und Probleme der DBS

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Meropenem auf Intensivstationen ist empfehlenswert, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen und Über- oder Unterdosierungen und somit Resistenzentwicklung zu vermeiden. Problematisch für Kliniken ohne entsprechendes Laborequipment ist die chemische Instabilität von Meropenem, die ein Versenden der Patientenproben auf Trockeneis notwendig macht. Messungen in Dried Blot Spots (DBS) haben den Vorteil leichter Probengewinnung und Transport bei Raumtemperatur. Unser Ziel war es deshalb, den praktikablen Einsatz von DBS für die Messanalytik von Meropenem zu untersuchen.

Die Entwicklung des Analyseverfahrens von Meropenem auf Dried Blood Spots (DBS) soll sowohl an nicht universitären Standorten als auch im ambulanten Bereich eine einfache und kostengünstige Bestimmung des optimalen Wirkspiegels ermöglichen. Ziel dieser Arbeit war es also, ein spezifisches und präzises Messverfahren für DBS zu entwickeln und die Anwendbarkeit auf Patientenproben zu untersuchen.

2 Material, Methoden und Patienten

2.1 Material

Eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Herstellerangaben sind im Anhang in zu finden.

2.2 Methoden

2.2.1 Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein analytisches Trennverfahren zur Auftrennung unterschiedlichster Stoffgemische und gehört zur Gruppe der Säulenchromatographien. Das Grundprinzip beruht auf einem Verteilungsgleichgewicht zwischen einer stationären und mobilen Phase. Die HPLC besteht aus einer analytischen Säule, die aus einem dichten Verband von porösen Teilchen (meist Silicagelpartikel) zusammengesetzt ist und die stationäre Phase bildet. Das Elutionsmittel wird als mobile Phase mit dem zu analysierenden Stoffgemisch durch die Säule geleitet. Einer analytischen Säule sind sogenannte Vorsäulen vorgeschaltet. Diese dienen dem Schutz vor Verschmutzungen chemischer und mechanischer Art. Die Probenaufgabe erfolgt heutzutage meist automatisiert. Die Säule wird mit Hilfe eines Thermostats stets auf einer konstanten Temperatur gehalten, um die Verteilungsgleichgewichte konstant zu halten. Anschließend erfolgt die Messung der aufgetrennten Substanzen durch einen Detektor. Die Auswertung der chromatographischen Peaks und Konzentrationen der Substanzen erfolgt durch eine Messsoftware am Computer. Eine heutzutage häufig genutzte Methode ist die reverse-Phase (RP)- oder Umkehrphasen-Chromatographie zur Auftrennung von organischen Substanzen. Die stationäre Phase weist hier im Vergleich zur Normalphasenchromatographie „umgekehrte“ Polaritätsverhältnisse auf. An die stationäre Phase sind unpolare Seitenketten gebunden und sie verhält sich somit hydrophob. Die mobile Phase ist polar geladen und das Elutionsmittel hat eine entgegengesetzte Polarität zur stationären Phase. Als polare Elutionsmittel werden meistens Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser Gemische verwendet.

Die Auftrennung kann isokratisch oder als Gradientenelution erfolgen. Letztere unterscheidet sich von der isokratischen durch eine laufende Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase während der Auftrennung. Hierdurch kann die Elutionskraft stetig erhöht

werden. Auf diesem Weg können stark retinierte Substanzen schneller in die mobile Phase überführt werden, wodurch sich eine kürzere Retentionszeit mit schmalere Peaks ergibt [51]. Eine neuere Trenntechnik ist die sogenannte HILIC (hydrophilic interaction chromatography), die in dieser Arbeit als analytische Trennmethode verwendet wurde. Diese beruht auf einer polaren stationären Phase (Silicagel mit einer Polyethylenimin-Beschichtung) und einer vorwiegend unpolaren mobilen Phase. Auf der stationären Phase befindet sich eine immobilisierte Wasserschicht, zwischen denen eine Auftrennung des Analyten stattfindet. Aufgrund der polaren stationären Wasserschicht werden polare Verbindungen aus der mobilen Phase stark retiniert. Die Auftrennung erfolgt orthogonal zur RP-Chromatographie [52]. Die Detektion wurde hier mit einem Massenspektrometer (MS) durchgeführt. Mit Hilfe der Elektro Spray-Ionisation (ESI) wird der Analyt nach Durchlaufen der Säule vernebelt und durch ein elektrisches Spannungsfeld ionisiert. Die Ionen gelangen anschließend zum Massenspektrometer, das einen Quadrupol-Massenfilter beinhaltet. Dieser besteht aus vier Stabelektroden, die die Ionen in einem elektrischen Wechselfeld anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis auftrennen. Die Selektivität des Detektionsverfahren kann mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) mit Hilfe mehrerer Massenspektrometerstufen deutlich erhöht werden. Hierzu werden die Ionen wie oben beschrieben nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) selektiert und anschließend in einer Stoßkammer zusätzlich fragmentiert. In einer weiteren Massenspektrometerstufe werden die Fragmente analysiert [51]. Die Detektion mittels Massenspektrometrie hat den Vorteil von sehr hoher Selektivität und Sensitivität. Als Nachteil kann der hohe technische Aufwand verbunden mit hohen Kosten gelten. Die Quantifizierung von Meropenem aus Plasma mittels HILIC MS/MS wurde bereits durch Martens-Lobenhoffer et al. beschrieben und publiziert [39]. Routinemäßig kann die Bestimmung von Meropenem in Plasma im Rahmen des TDM auch mittels HPLC mit UV-Detektion zu deutlich geringeren Kosten erfolgen.

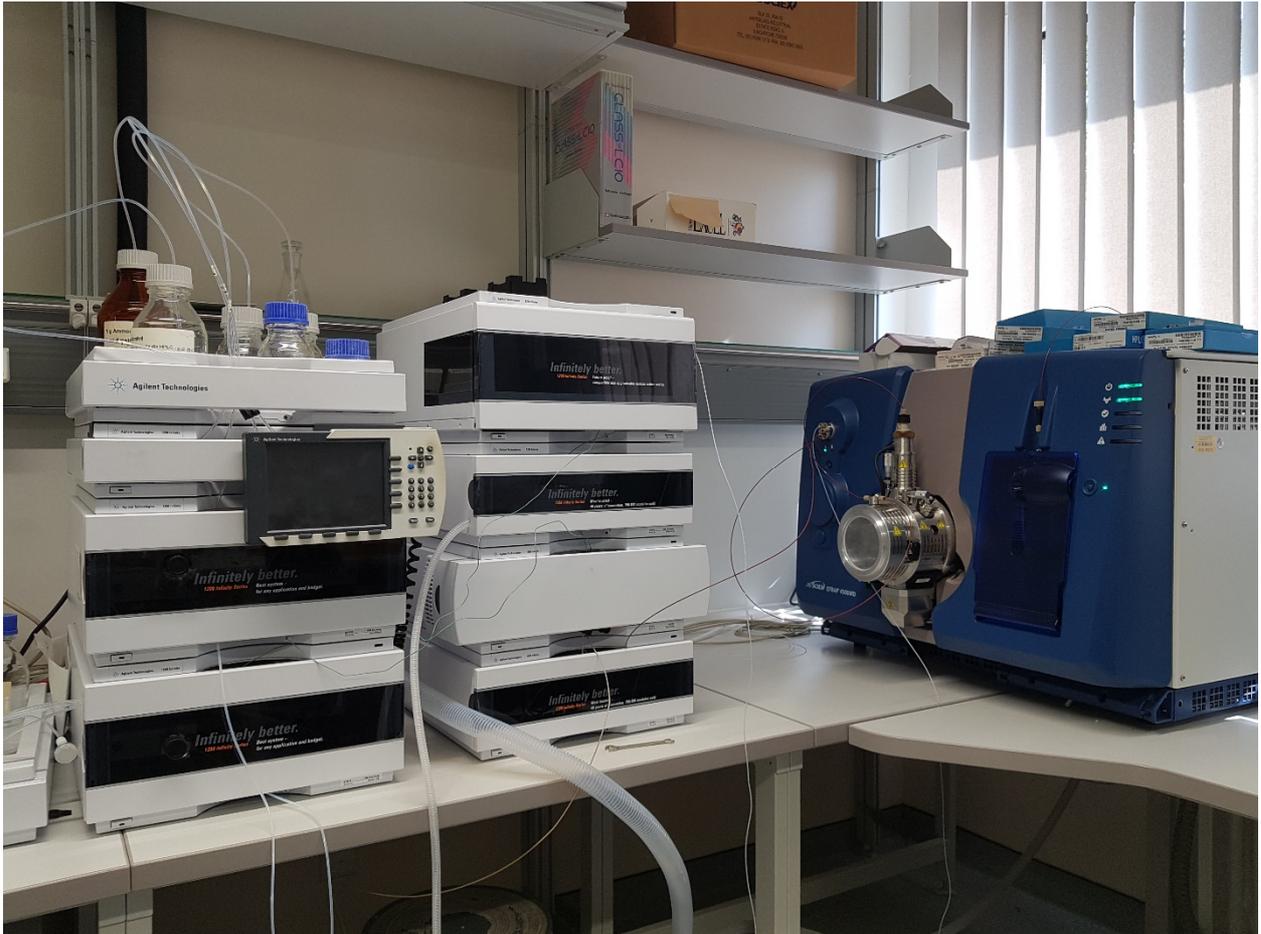


Abbildung 5: Agilent 1260 HPLC Anlage

2.2.2 Verwendete Lösungen und Kalibrierung

Stammlösungen

Die Stammlösungen sind Grundlage für die Herstellung aller folgenden Kalibrierlösungen und des internen Standards (IS). Der IS dient dazu, Schwankungen in der Extraktionseffizienz und der Empfindlichkeit der Detektion auszugleichen und damit die Präzision der Quantifizierung zu verbessern. Der IS sollte dem Analyten möglichst chemisch ähnlich sein. Ideal ist bei massenspektrometrischer Detektion ein isotopenmarkiertes Analogon, das gleiche chemische Eigenschaften aufweist, jedoch vom zu analysierenden Molekül vom Massenspektrometer unterschieden werden kann.

Stammlösung Meropenem: (Konzentration $c = 0,5\text{mg/ml}$): 500 mg Meropenem (Meronem® 500, AstraZeneca) wurde in 1 Liter Wasser gelöst.

Stammlösung Interner Standard IS (Konzentration $c = 2\ \mu\text{g/ml}$): 1 mg Meropenem-D6 (Toronto Research Chemicals, 96 % Reinheit, 99,7 % isotopische Reinheit) gelöst in 1 ml Acetonitril. Anschließende Verdünnung auf 50 ml Wasser.

Kalibrierlösung

Kalibrierlösung Meropenem mit einer Konzentration von $c = 500\ \mu\text{g/ml}$: 500 mg Meropenem (Meronem® 500, AstraZeneca) wurde in 1 Liter Wasser gelöst.

Kalibrierlösung und Bestimmung der Kalibrierfunktion

Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion wurde eine Kalibrierreihe in einem Konzentrationsbereich von $0,5\ \mu\text{g/ml}$ - $50\ \mu\text{g/ml}$ angefertigt. Tabelle 1 gibt im Folgenden die Kalibrierung wieder.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kalibrierproben zur Bestimmung von Meropenem

Probennummer	Zugabe Kalibrierlösung [μL]	Zugabe Vollblut [μL]	Zugabe Wasser [μL]	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
1	1	900	99	0,5
2	2	900	98	1
3	4	900	96	2
4	10	900	90	5
5	20	900	80	10
6	40	900	60	20
7	70	900	30	35
8	100	900	0	50

Die Herstellung der Kalibrierproben erfolgte mit Eigenblut aus EDTA-Blut Röhrchen.

2.2.3 Lösungen für die HPLC

Laufmittel

Die nachfolgenden mobilen Phasen wurden zur Auftrennung und Bestimmung von Meropenem eingesetzt.

Die mobile Phase A bestand aus 1 ml Ammoniumformiat und 1 g Ameisensäure gelöst in 1 L Wasser (pH ca. 3,5). Die mobile Phase B bestand ausschließlich aus Acetonitril.

2.2.4 Aufbereitung Vollblut aus DBS

Im Folgenden werden die notwendigen Arbeitsschritte zur Aufbereitung der Vollblutproben für die Bestimmung von Meropenem auf DBS aufgeführt. Um eine homogene Verteilung der Blutbestandteile zu erreichen, wurden EDTA-Blutröhrchen (BD vacutainer, Heidelberg, Deutschland) nach Eingang zunächst mit einem Vortex-Schüttler aufgeschüttelt und anschließend 15 µL Vollblut auf die DBS-Karten (FTA™ DMPK-C cards, GE Healthcare, Frankfurt, Deutschland, Abb. 6) pipettiert. Das Aufschütteln sollte ein Absetzen von Zellen und deren Bestandteilen am Boden des Blutröhrchens und somit eine Verfälschung des Hämatokrits (Hkt) verhindern. Die DBS Karten trockneten bei Raumtemperatur für ca. 2 h (entsprechend der Vorgaben des Herstellers). Im Anschluss wurde eine im Durchmesser 3 mm große Stanze zentral des Blutflecks entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die Eppendorf-Röhrchen enthielten 200 µL Acetonitril/Wasser in einem Volumenverhältnis von 70:30 und zusätzlich 10 µL IS (Meropenem-D6, Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Kanada). Die Eppendorf-Röhrchen wurden für 12 Minuten auf einen Horizontal-Schüttler gelegt und

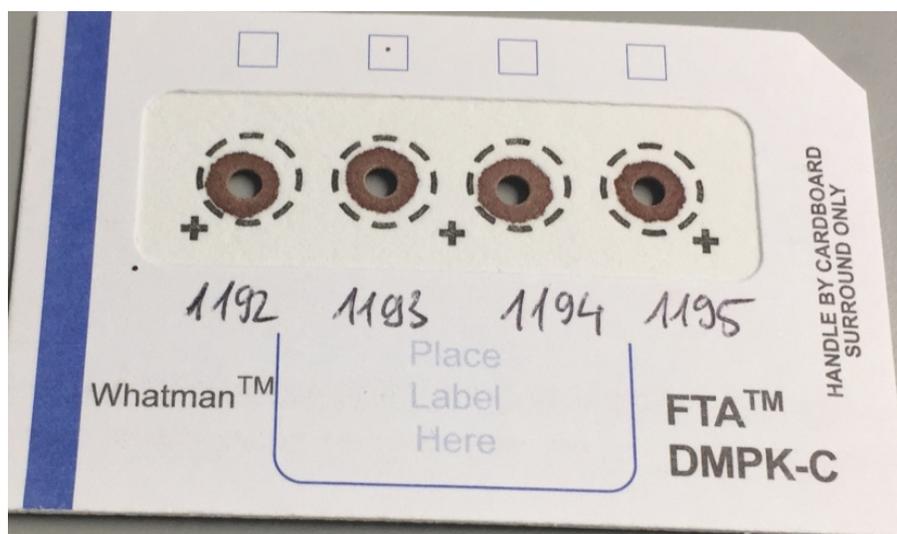


Abbildung 6: Beispiel für eine DBS Filterkarte mit Vollblut und ausgestanzten Proben

zusätzlich für eine Minute in ein Ultraschall-Bad platziert. Beide Methoden sollten die Fällung von Proteinen sowie die Extraktion von Meropenem aus der Blutstanze fördern und die Präzision verbessern. Nach Abschluss der Extraktion wurden 50 µL aus dem Eppendorf-Röhrchen in ein mit 100 µL Acetonitril gefülltes Autosamplergläschen pipettiert. Daraufhin waren die Proben zur HPLC Messung fertig präpariert.

2.2.5 HPLC-System: Säulen und Konfiguration

Die Bestimmung von Meropenem aus DBS erfolgte mit einem Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent, Waldbronn, Deutschland). Als analytische Säule wurde eine Hypersil Gold HILIC 100 mm × 2.1 mm (Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA) mit einer Partikelgröße von 3 µm verwendet. Als Vorsäule kam ein Security Guard 4 mm x 2 mm Filter (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) zum Einsatz. Die HPLC war mit einem QTRAP 4500MD Massenspektrometer (AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland) mit einer Turbo-Ion-Spray (TSP) Quelle verbunden. Die Überwachung und Analyse erfolgte über die Analyst MD Software (Version 1.6.2).

Gradientenprogramm und Detektion

Für die chromatografische Auftrennung von Meropenem und dem IS wurde 10 µL der Probe injiziert. Hierfür wurde eine Gradientenelution durchgeführt, wobei die mobile Phase A aus einer Pufferlösung (1 ml Ammoniumformiat und 1 g Ameisensäure gelöst in 1 L Wasser, pH ca. 3,5) und die mobile Phase B ausschließlich aus Acetonitril bestand. Zum Beginn des chromatographischen Laufs betrug der Anteil der mobilen Phase A 15 % und wurde innerhalb von 3 min auf 30 % gesteigert. Die Fließgeschwindigkeit betrug konstant 0,5 ml pro Minute bei einer Säulentemperatur von 30 ° Celsius. Die gesamte Dauer der chromatographischen Laufzeit betrug 6,6 Minuten.

Die Einstellungen der Ionenquelle und die Daten der gemessenen Fragmentationen sind im Abschnitt „Detektion und Chromatogramm“ (Kap. 3.1.3) beschrieben.

2.3 Validierung

Zur Validierung der DBS-Methodik wurden folgende Parameter erhoben:

- Linearität
- Präzision
- Richtigkeit
- Stabilität
- Applikationsvolumen
- Intraklassen-Korrelation
- Bland-Altman-Plot
- Matrixeffekt

Grundlage der Validierung waren die Empfehlungen der Bioanalytical Method Validation Guidelines der Food and Drug Administration [53] und die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen [54].

Kalibrierung

Die Berechnung einer Kalibrierfunktion mit bekannten Konzentrationen dient der Bestimmung einer unbekannt Konzentration desselben Analyten. Kap. 3.3.1 Abbildung 10 zeigt solch eine Kalibrierfunktion.

Präzision und Richtigkeit

Die Präzision zeigt Abweichungen der Resultate untereinander auf, wobei die Richtigkeit von den Abweichungen zum Zielwert bestimmt wird. Zur Bestimmung beider Parameter wurden Blutproben mit bekannter Konzentration von 1 µg/ml und 50 µg/ml (jeweils n= 10) auf DBS gemessen und analysiert.

Stabilität

Zur Bestimmung der Stabilität wurden die DBS-Karten mit bekannter Meropenemkonzentration (1 µg/ml und 50 µg/ml) bei -20° (Gefrierschrank), 6° (Kühlschrank), 23° (Zimmertemperatur) und 40° Celsius gelagert und gemessen. Die DBS-Karten wurden zum Teil jeweils einmal in Plastiktüten mit Trockengel und einmal ohne Trockengel gelagert. Als Ausgangswert (100 %) diente eine nach 2 h Trockenzeit sofort analysierte DBS-Karte mit den entsprechenden zwei

Konzentrationen. Die Halbwertszeiten von Meropenem wurden in Relation zum Ausgangswert berechnet.

Applikationsvolumen

Der Einfluss des Blutapplikationsvolumen auf das Endergebnis der DBS wurde durch die Applikation von 10 µg/ml Meropenem in unterschiedlichen Volumina (5, 10, 15, 20, and 30 µL, jeweils n = 4) untersucht.

Intraklassenkorrelation (ICC)

Zur Prüfung der Reliabilität wurden beide Messmethoden (geschätzte Plasmakonzentration aus DBS und Messung von Meropenem aus Plasma) miteinander verglichen. Dafür wurde eine Intraklassenkorrelation (ICC), die die Ergebnisse dieser beiden unabhängigen Verfahren miteinander vergleicht, durchgeführt. Der ICC kann Werte zwischen 0 und +1 annehmen. Werte können bei >0,9 als exzellent, zwischen 0,75 – 0,9 als gut, zwischen 0,5 – 0,75 als moderat und <0,5 als schlecht angenommen werden [55].

Bland-Altman-Plot

Der Bland-Altman-Plot ist eine grafische Darstellung zum Vergleich zweier Messmethoden. Hierbei werden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert der beiden Messmethoden aufgetragen, wodurch systematische Abweichungen, Ausreißer sowie die Varianz der Messwerte beurteilt werden können [56].

Matrixeffekt

Der Matrixeffekt untersucht die direkte oder indirekte Änderung des Messsignals durch die Anwesenheit interferierender Substanzen in der Probe. Hierdurch sind Verstärkungen oder Unterdrückungen des Messsignals möglich. Zur Untersuchung der Matrixunabhängigkeit wurde Meropenem mit den beschriebenen Verfahren sowohl aus DBS als auch aus Plasma bestimmt.

2.4 Berechnung der Plasmakonzentration aus Vollblut und DBS

In der Labor- und Klinikroutine ist stets die Angabe der Meropenemkonzentration in Plasma üblich und erwünscht. Grund hierfür sind andernfalls Störgrößen durch zelluläre Bestandteile. Die Bestimmung von Meropenem auf DBS erfolgt jedoch aus Vollblut und liefert dementsprechend Vollblutkonzentrationen. In Kapitel 1.4 wurde bereits der Effekt und die Problematik des Hkt auf DBS beschrieben. Um gebräuchliche Plasmakonzentrationen für die klinische Anwendbarkeit angeben zu können, war das Wissen über die Verteilung von Meropenem im Plasma und den Erythrozyten (rote Blutkörperchen) Voraussetzung für die möglichst genaue Bestimmung und Berechnung dieser Plasmakonzentrationen. Wir untersuchten dieses Verhältnis, indem wir die Vollblutproben unserer Patientengruppe zusammen mit den entsprechenden Plasmaproben mit einer validierten LC-MS/MS-Methode analysierten [39]. Der Anteil von Meropenem im Plasma kann mit der Formel $f_p = (C_{\text{Plasma}} / C_{\text{Vollblut}}) \times (1 - \text{Hkt})$ berechnet werden, wobei Hkt der Hämatokrit und f_p der Anteil des Wirkstoffs im Plasma ist [57]. Unter der Voraussetzung, dass $f_p \approx 1$ ist, kann die Konzentration im Plasma ($C_{\text{P. Ber.}}$) aus DBS Messwerten (C_{DBS}) entsprechend der folgenden Formel berechnet werden:

$$C_{\text{P. Ber.}} = \frac{C_{\text{DBS}}}{(1 - \text{Hkt})} \times F$$

Der Korrekturfaktor F berücksichtigt dabei systematische Unterschiede im Vollblut des spezifischen Patientenkollektivs (z.B. geringere Viskosität) im Vergleich zu dem Vollblut, das zur Validierung benutzt wurde. Der Korrekturfaktor F ergibt sich aus $F = \text{Median Plasmakonzentration} / \text{Median DBS Konzentration Hkt-korrigiert}$.

2.5 Patienten

2.5.1 Patientenkollektiv, Probenentnahme und Transport

Im Zeitraum von April 2017 bis Juni 2017 wurden im Rahmen des TDM 33 Patienten der internistischen ITS am Universitätsklinikum Magdeburg analysiert und ausgewertet. Die Patientenproben wurden vor der Analyse nicht selektiert, sondern stets in der Reihenfolge bearbeitet wie sie zur Routine-TDM eingetroffen sind. Folgende Kriterien wurden vor Beginn der Studie definiert:

Einschlusskriterien:

- Alter: 18–95 Jahre
- Geschlecht: männlich und weiblich
- Körpergewicht: keine Einschränkung
- Indikation: Bestimmung von Meropenem im Rahmen des TDM

Ausschlusskriterien: keine

Auf der ITS erfolgte die venöse Blutentnahme (ca. 4 ml) jeweils vor der nächsten Meropenemgabe (Talspiegel) in ein EDTA-Blutentnahmeröhrchen. Der Proben transport wurde gekühlt durchgeführt und die Probe schnellstmöglich im Institut für Klinische Pharmakologie zentrifugiert, wo die Messung von Meropenem im Plasma stattfand. Von der ohnehin zu verwerfenden Blutprobe wurden ca. 15 µl für die Bestimmung auf DBS entnommen und verarbeitet. Es handelte sich also um eine Doppelmessung von Meropenem zur Arzneistoffkonzentrationsbestimmung (TDM) in Plasma und Vollblut.

Die erhobenen Hämatokritwerte wurden routinemäßig vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Magdeburg bestimmt. Die Referenzwerte für Hämatokrit sind: ♂: 0,39-0,50 und ♀: 0,33-,043.

2.6 Ethikvotum

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum vor (Methodenentwicklung zur Analytik von Meropenem aus DBS IKP 105/2017 Zeichen: 24/17 vom 13.3.2017). Die Bestimmung von Meropenem aus Plasma ist eine Routineuntersuchung und wird täglich im Institut für Klinische Pharmakologie durchgeführt. Die Meropenem-Konzentrationen im Blut schwerstkranker Patienten auf der Intensivstation werden im Rahmen des therapeutischen Drug Monitorings bestimmt und eine Dosisanpassung erfolgt nach entsprechender Therapieberatung. Die Blutprobe befindet sich dementsprechend ohnehin im Labor der Klinischen Pharmakologie. Daher bedarf die Analyse mittels DBS keiner zusätzlichen Blutentnahme und kann vollständig aus den Blutproben der Routine entnommen werden. Nach zweistündiger Trockenzeit werden die Blutstropfen ausgestant und in eine Extraktionslösung mit internem Standard gegeben. Anschließend findet die Extraktion statt, an welche sich die Analyse mittels HPLC-MS anschließt.

Die Messergebnisse des neuen Verfahrens werden mit der Routinemethode verglichen und bewertet.

2.7 Datenschutz

Um den Datenschutz zu gewährleisten, wurden die Patientendaten pseudonymisiert (codiert). Die Datenerhebung erfolgte auf durchnummerierten Erhebungsbögen. Es entstanden keine zusätzlichen Erkenntnisse für den Patienten, da das Meropenem zweimal mittels unterschiedlicher Extraktionsverfahren aus ein und derselben Patientenblutprobe bestimmt wurde.

Die Erfassung von Daten, die zur Generierung von Maßnahmen zur Prävention nosokomialer Infektionen und zur Verminderung der Resistenzsituation bei Krankenhausinfektionen dienen, ist durch §23 Infektionsschutzgesetz gestattet [1].

Eine gesonderte Aufklärung der Patienten über die Datenerfassung oder Einholung des Einverständnisses der Patienten zur Datenerfassung war daher nicht erforderlich, sondern im Rahmen des Behandlungsvertrages in unserem Klinikum erfüllt.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erfassung der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und dem Statistikprogramm IBM SPSS 24. Die grafische Darstellung von Tabellen und Grafiken erfolgte ebenfalls mit Microsoft Excel 2010. Ein signifikanter Zusammenhang wurde bei einem p-Wert von ≤ 0.05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 HPLC-MS Methode

3.1.1 Probenaufbereitung und Extraktionsausbeute der DBS Karten

Die Probenaufbereitung der DBS Karten erfolgte durch eine einfache Proteinfällung mittels Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 70:30 (v:v) und erbrachte eine Extraktionsausbeute von 75,5 %. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Versuche der Probenaufbereitung und die dazugehörige Extraktionsausbeute.

Tabelle 2: Extraktionsausbeute von Meropenem aus DBS durch Proteinfällung

Extraktionslösung [% v:v]	Extraktionsausbeute [%]	Standardabweichung
Methanol/Wasser 50:50	69,0	20,42
Methanol/Wasser 70:30	70,2	7,97
Methanol/Wasser 90:10	71,9	2,19
Acetonitril/Wasser 50:50	75,3	6,20
Acetonitril/Wasser 70:30	75,5	4,59
Acetonitril/Wasser 90:10	70,1	8,82

3.1.2 Gradientenoptimierung

Die Versuche der Gradientenoptimierung sind bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben worden und fanden in dieser Arbeit Anwendung [39].

3.1.3 Detektion und Chromatogramm

Durch die im Massenspektrometer befindliche ESI-Quelle wurde Meropenem und der IS D₆-Meropenem zu einfach geladenen Quasimolekülonen ([M+H]⁺) mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von m/z 384 und m/z 390 aufgetrennt. Anschließend konnte folgendes Fragmentierungsmuster beobachtet werden: m/z 384 → 141, 254 and m/z 390 → 147, 260 für Meropenem und den IS. Die Fragmente m/z 384 → 141 und 390 → 147 wurden zur Quantifizierung und die Fragmente m/z 384 → 254 und 390 → 260 zur Qualifizierung genutzt. Das in Abbildung 7 dargestellte Chromatogramm zeigt die massenspektrometrische Detektion von Meropenem und dem IS. Das grafische Ergebnis zeigt steile und symmetrische Peaks bei

einer Retentionszeit von 4,17 min. Das Chromatogramm zeigt keinerlei Störsignale und lässt auf eine effiziente Auftrennung von endogenen Substanzen schließen.

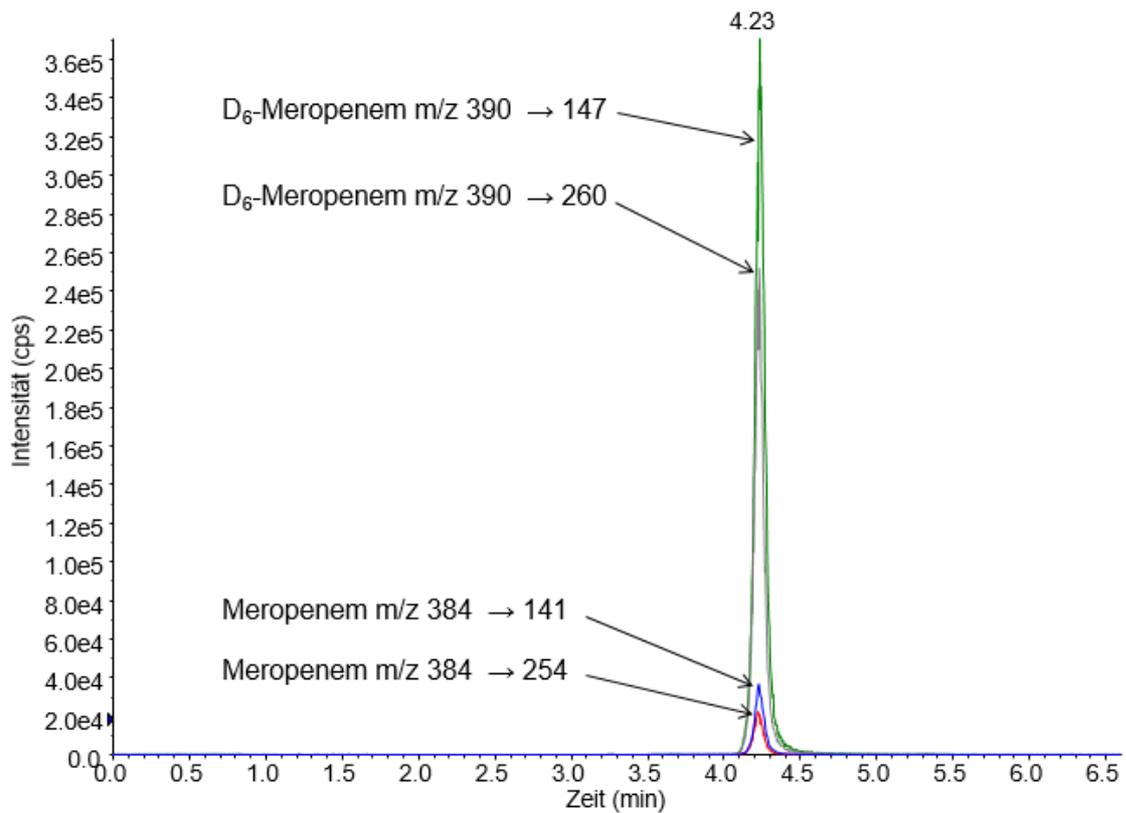


Abbildung 7: LC-MS/MS Chromatogramm: Detektion von Meropenem, RT = 4,23 min m/z 384 →141, 254, IS D₆-Meropenem, RT 4,23 min m/z 390 → 147, 260

3.2 Berechnung der Plasmakonzentration aus Vollblut

Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, korrelierten die Vollblutkonzentrationen unserer Patientengruppe eng mit den Plasmakonzentrationen, waren aber systematisch um den Faktor 1,457 niedriger.

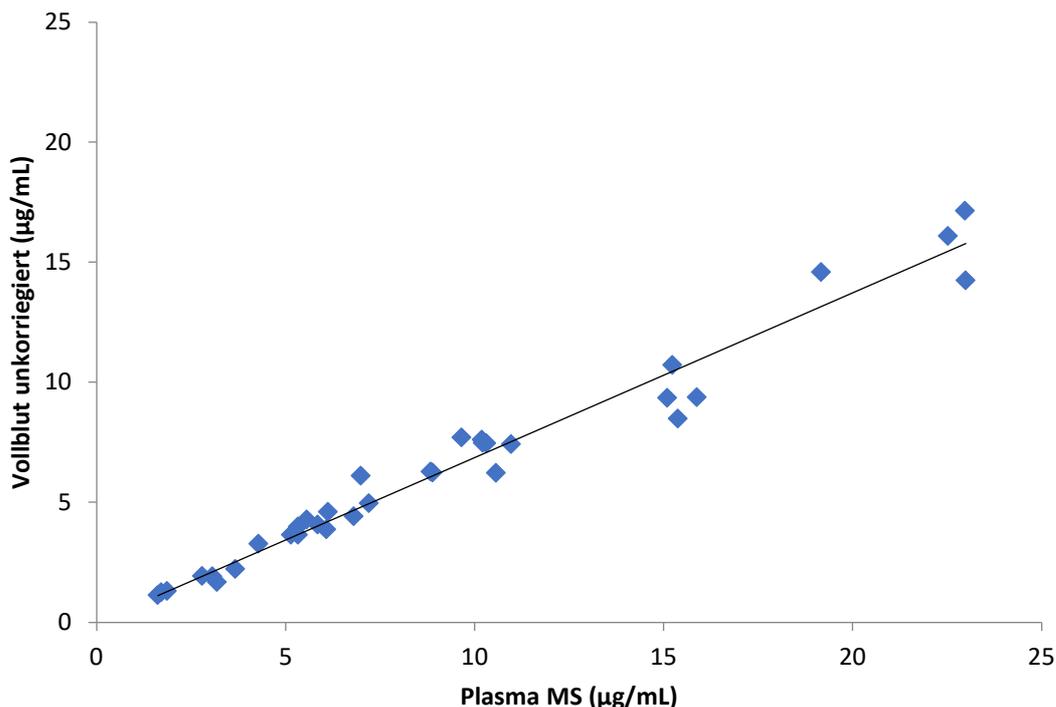


Abbildung 8: Korrelation zwischen Vollblut (unkorrigiert) und Plasma MS
(Korrelationskoeffizient: $r = 0,995$; Korrelationsfunktion $y = 0,687x$)

Wie bereits beschrieben, kann der Anteil von Meropenem im Plasma mit der Formel $f_p = (C_{\text{Plasma}} / C_{\text{Vollblut}}) \times (1 - \text{Hkt})$ berechnet werden, wobei Hkt der Hämatokrit und f_p der Anteil des Wirkstoffs im Plasma ist [57]. In unseren Patientendaten ergab sich ein Wert von $f_p = 1,05 \pm 0,09$, was bedeutet, dass praktisch das gesamte Meropenem im Plasma und keines in den Erythrozyten zu finden ist. Mit diesem Verteilungsfaktor können die Plasmakonzentrationen durch $C_{\text{Plasma}} = C_{\text{Vollblut}} / (1 - \text{Hkt})$ geschätzt werden. Ein Vergleich dieser geschätzten Plasmakonzentrationen mit direkt gemessenen Plasmakonzentrationen ist in Abbildung 9 dargestellt. Wie man dort sieht, spiegeln die geschätzten Plasmakonzentrationen die tatsächlichen Plasmakonzentrationen sehr gut und ohne wesentliche systematische Verzerrungen wider.

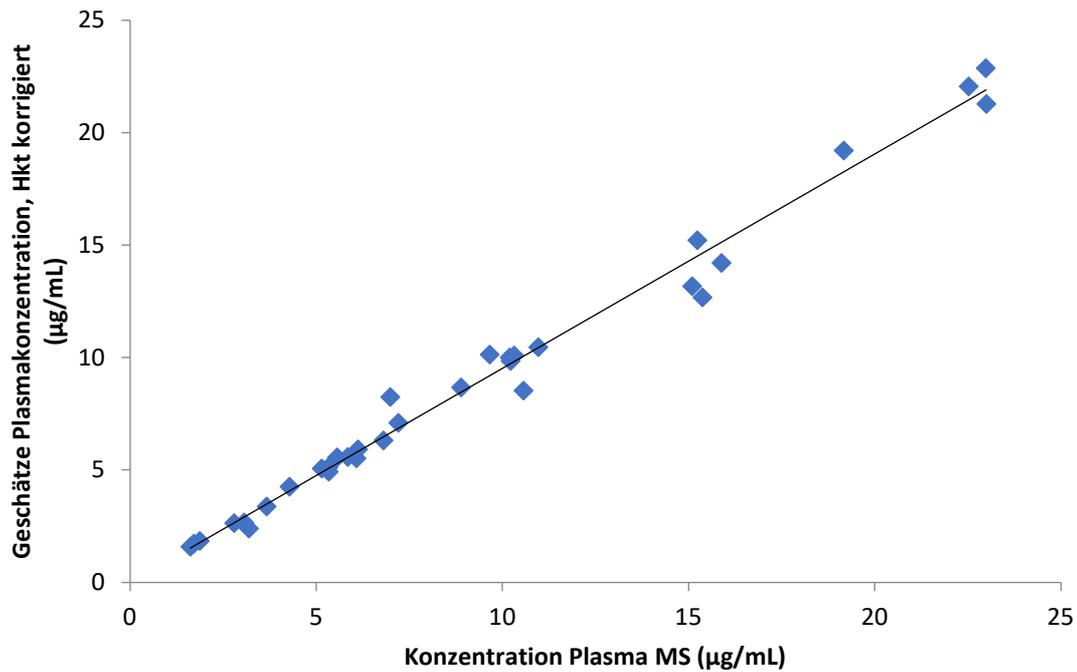


Abbildung 9: Korrelation zwischen Vollblut (Hkt-korrigiert) und Plasma MS
 (Korrelationskoeffizient: $r = 0,998$; Korrelationsfunktion $y = 0,953x$)

3.3 Validierung

3.3.1 Kalibrierung

Die $1/x$ gewichtete Kalibrierfunktion von Meropenem aus DBS ist in Abbildung 10 dargestellt. Diese zeigt einen linearen Verlauf bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9989$ und einer Steigung von 0.0867 ± 0.0011 . Bei einer nicht signifikanten ($p = 0,606$) Abweichung der Kalibrierfunktion vom Achsenabschnitt wurde diese durch den Nullpunkt gezwungen.

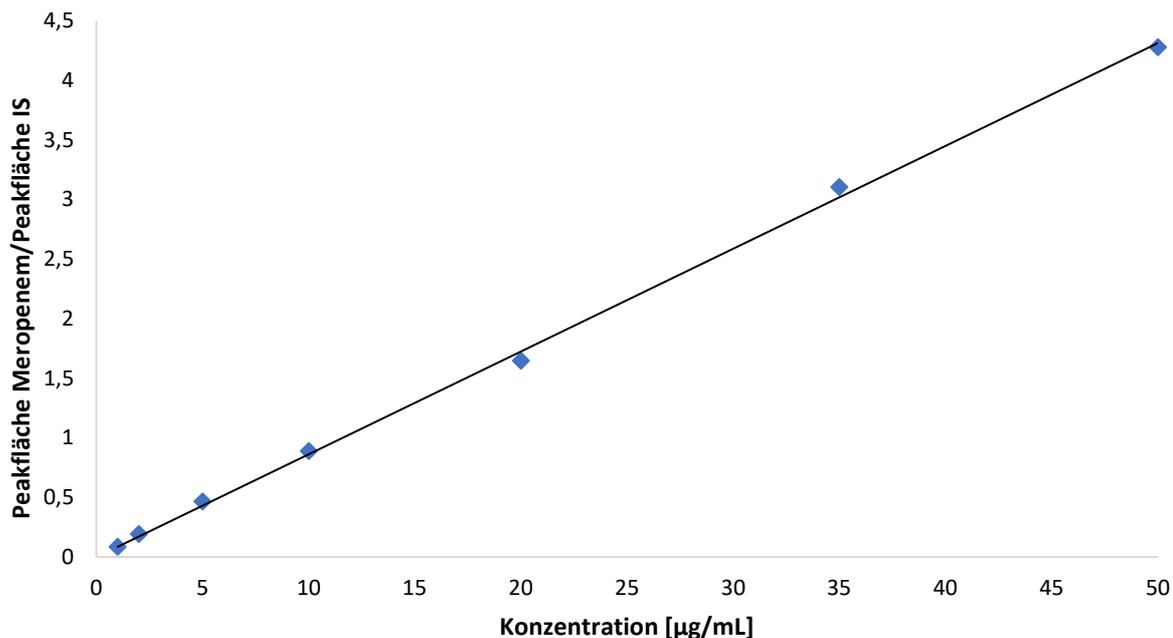


Abbildung 10: $1/x$ gewichtete Kalibrierfunktion von Meropenem mit dem Massenspektrometer, IS Meropenem, (Korrelationskoeffizient: $r = 0.9995$, Kalibrierfunktion: $y = 0,0866x$)

3.3.2 Präzision, Richtigkeit, Robustheit und Matrixunabhängigkeit

Die Präzision und Richtigkeit sind im Folgenden tabellarisch dargestellt. Tabelle 3 veranschaulicht die Bestimmungen in Serie ($n = 10$), die Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag ($n = 5$).

Tabelle 3: Präzision und Richtigkeit in Serie und von Tag zu Tag für die Bestimmung von Meropenem

Präzision und Richtigkeit in Serie			
Meropenem [Konz.]	Mittelwert	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
1 µg/ml	1,02	11,55	101,78
50 µg/ml	48,47	7,38	96,93
Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag			
Meropenem [Konz.]	Mittelwert	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
1 µg/ml	1,03	6,2	102,7
50 µg/ml	52,77	1,4	105,5

Das in einem Bereich von 5 µL bis 50 µL (jeweils n = 4) getestete Applikationsvolumen auf DBS zeigte keinen signifikanten ($p = 0,689$) Einfluss auf das quantitative Ergebnis.

Die Präzision und Richtigkeit dieser Methode entsprachen den Richtlinien der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (U.S. Food and Drug Administration). Empfohlen wird eine relative Standardabweichung von maximal 15 %. Für die untere Bestimmungsgrenze (LLQ) beträgt die maximale Grenze 20 %.

In der Beurteilung der Matrixunabhängigkeit zeigte sich eine Ionensuppression des IS von 13.9 ± 1.8 % bei einer DBS Extraktion aus 6 verschiedenen Blutproben im Vergleich zu Extraktionslösungen ohne DBS in der zu analysierenden Lösung.

3.3.3 Stabilität

Die Stabilität von Meropenem auf DBS bei Raumtemperatur erwies sich über 50 h stabil (Wiederfindung von > 85 % der Ausgangskonzentration). Bei einer Lagerungstemperatur von 6° Celsius führten wir eine Stabilitätsmessung sowohl mit als auch ohne Trockengel durch. Die Lagerung mit Trockengel zeigte dabei eine stabile Konzentration von Meropenem ohne signifikanten Abfall über 7 Tage. Versuche ohne Trockengel gingen mit einer reduzierten Stabilität einher. Die Stabilität bei -20° Celsius (ohne Zusatz von Trockengel) war ebenfalls über einen Zeitraum von 7 Tagen nahezu konstant stabil. Bei Lagerungsbedingungen unter 40° Celsius sahen wir bereits nach 24 h einen signifikanten Abfall, welcher keiner exponentiellen Gesetzmäßigkeit folgte, sodass keine Halbwertszeiten errechnet werden konnten. Im Folgenden ist die Stabilität von Meropenem auf DBS (Abb. 11-12) unter verschiedenen Temperaturen grafisch dargestellt. Zum Vergleich finden sich nachfolgend zusätzliche Abbildung zur Stabilität von Meropenem im Plasma (Abb. 13-14). Tabelle 4 veranschaulicht die gemessenen Konzentrationen von Meropenem auf DBS an verschiedenen Tagen und den Einfluss von Plastiktüten mit Trockengel auf die Lagerung der DBS Karten.

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Stabilität von Meropenem (jeweils 1 µg/ml und 50 µg/ml) auf DBS unter verschiedenen Lagerungsbedingungen über 7 Tage mit und ohne Trockengel. ** Zerfall von weniger als 15 % (aus der Halbwertszeit errechnet)

Lagerung (°C)	Meropenem Blutkonz. (µg mL ⁻¹)	Trockengel (Ja / Nein)	Gemessene Konzentration (±SD) (%)							Ausreichende Stabilität (Ja / Nein)**	
			Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7	48 h	72 h	
23	1	Ja	100,0 (3.2)	83,0 (0.5)	83,0 (3.4)	77,9 (2.6)	65,2 (2.9)	58,0 (2.5)	Ja	Nein	
23	50	Ja	100,0 (4.3)	86,7 (3.4)	81,5 (2.2)	81,1 (2.8)	74,9 (2.9)	67,7 (0.9)	Ja	Ja	
6	1	Ja	100,0 (3.2)	97,5 (5.7)	100,7 (5.9)	98,9 (3.0)	98,0 (2.8)	92,9 (3.0)	Ja	Ja	
6	50	Ja	100,0 (4.3)	95,8 (3.0)	102,2 (4.3)	96,8 (1.6)	90,8 (4.2)	95,8 (5.4)	Ja	Ja	
6	1	Nein	100,0 (0.7)	95,1 (3.1)	82,2 (3.4)	72,0 (5.7)	68,1 (2.6)	61,9 (4.3)	Ja	Nein	
6	50	Nein	100,0 (1.8)	85,6 (1.5)	83,7 (7.4)	77,0 (1.5)	75,2 (5.3)	68,7 (4.9)	Ja	Ja	
-20	1	Nein	100,0 (0.7)	98,4 (5.5)	100,4 (9.7)	87,3 (6.1)	86,0 (7.6)	89,1 (2.0)	Ja	Ja	
-20	50	Nein	100,0 (1.8)	99,3 (6.4)	98,5 (7.5)	99,7 (10.6)	99,7 (6.8)	95,0 (6.0)	Ja	Ja	
40	1	Nein	100,0 (8.9)	37,6 (2.3)	31,6 (1.3)	23,5 (3.2)	21,3 (1.3)	20,6 (2.4)	Nein	Nein	
40	50	Nein	100,0 (9.8)	31,0 (0.8)	22,4 (2.2)	19,8 (0.5)	19,1 (0.5)	15,5 (1.6)	Nein	Nein	

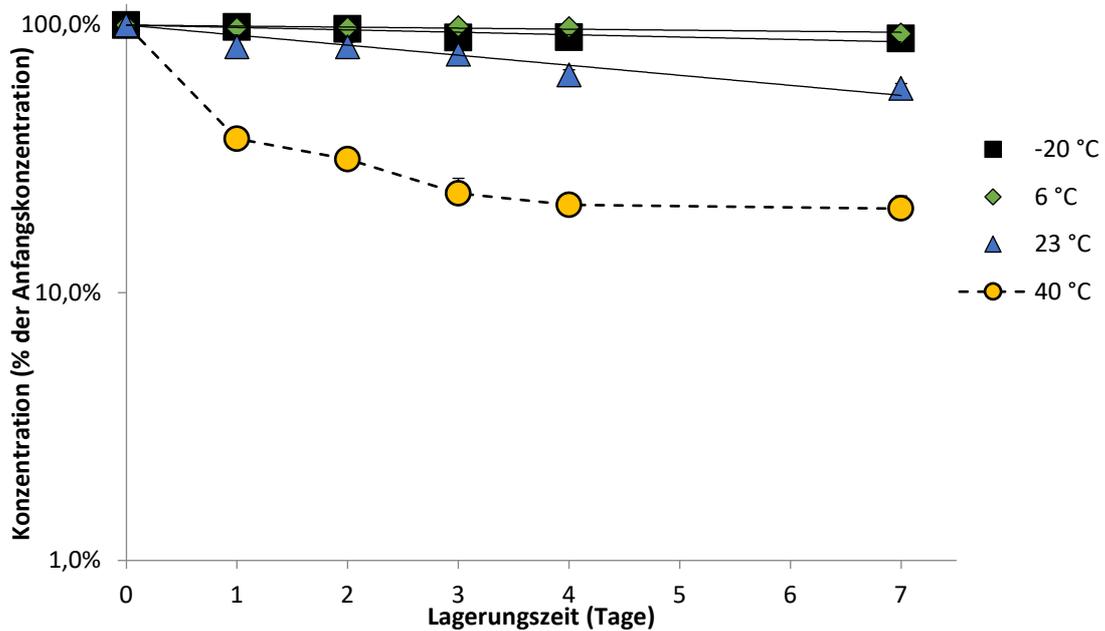


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Stabilität von Meropenem auf DBS (1 µg/mL) unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

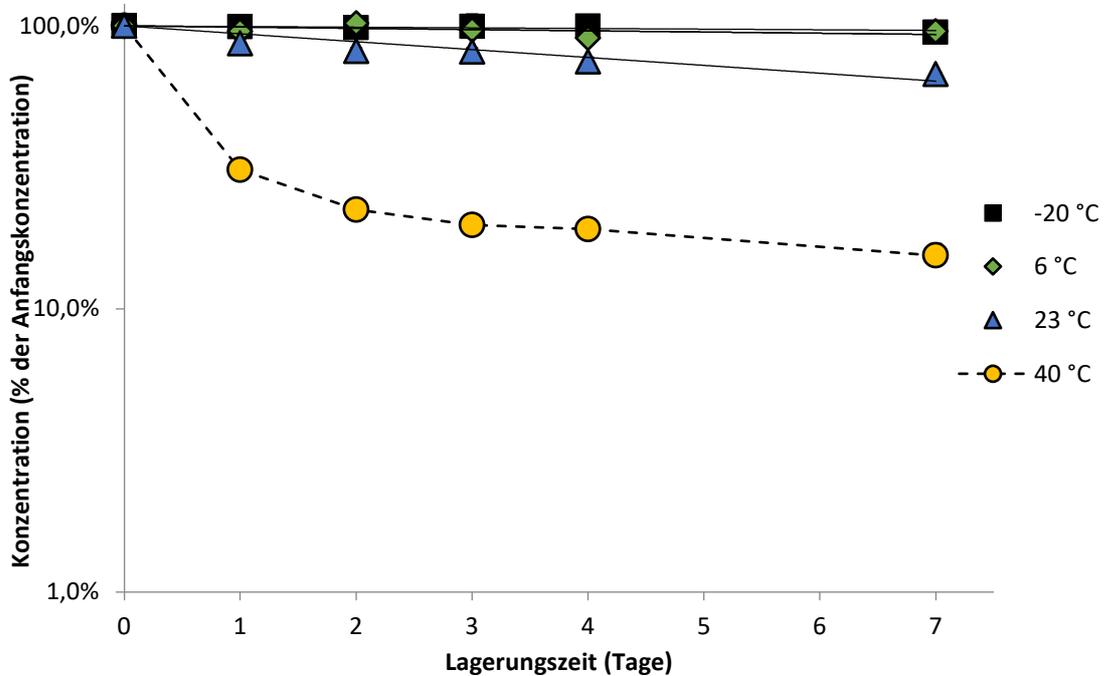


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Stabilität von Meropenem auf DBS (50 µg/mL) unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

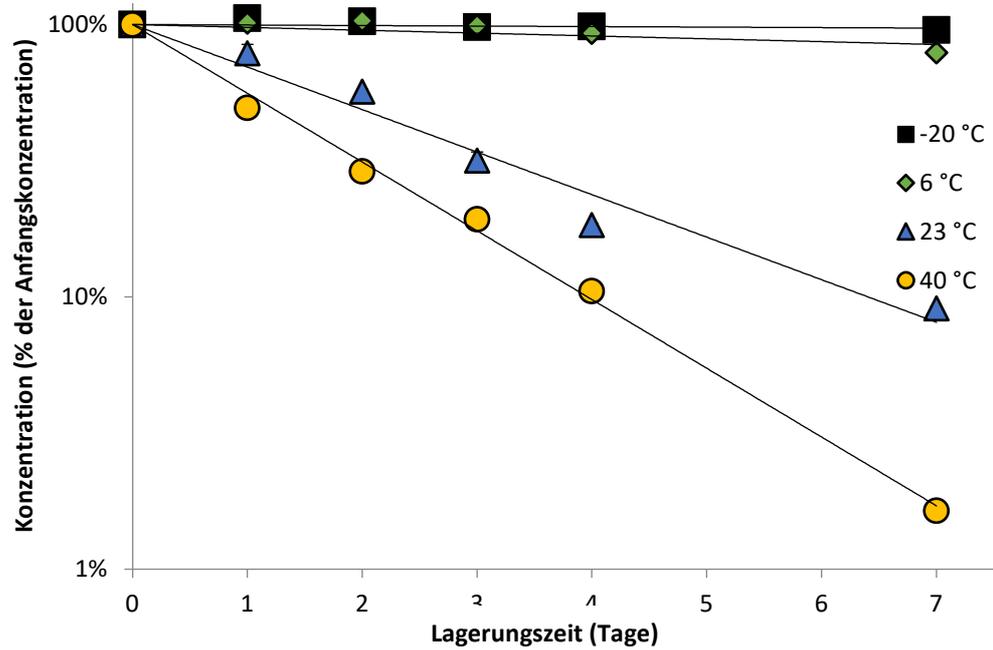


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Stabilität von Meropenem in Plasma (1 µg/mL) unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

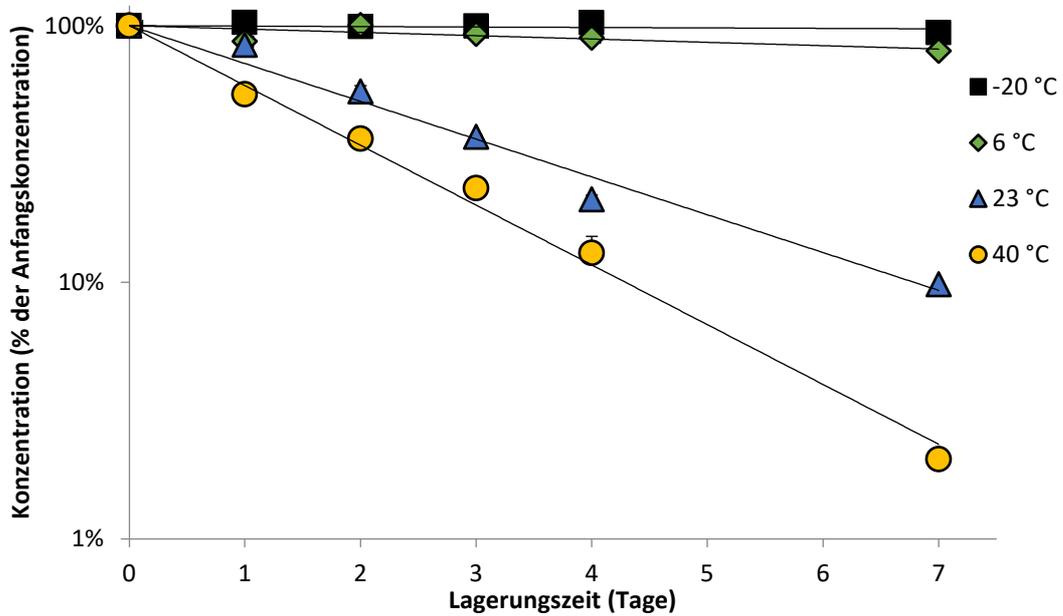


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Stabilität von Meropenem in Plasma (50 µg/mL) unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

3.4 Patientenproben

Die Anwendbarkeit von DBS in der klinischen Routine wurde anhand von 33 Patienten, die im Rahmen des klinischen TDM zur Bestimmung von Meropenem aus Plasma auf der ITS abgenommen wurden, untersucht. Zusätzlich wurde die DBS-Analytik durchgeführt. Der Hämatokrit der Patientenproben, der aus der Labordatenbank erhoben wurde, lag in einem Bereich von 22 %-34 % (min.: 22 %, max.: 34 %, median: 30 %).

Die berechnete Plasmakonzentration aus DBS wurde wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben ermittelt. Der hierfür verwendete Korrekturfaktor lag bei $F = 1,695$. Die geschätzte Plasmakonzentrationen wurden anschließend in einer Korrelation (Abbildung 15) und mittels Bland-Altman-Plot miteinander verglichen und interpretiert (Abbildung 16). Die Berechnung des Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) ergab einen Wert von 0,986 (95 % KI: 0,972-0,993). Der Bland-Altman-Plot zeigte einen Mittelwert der Differenzen von $0,15 \mu\text{g/mL}$. Der obere Toleranzbereich wurde bei einer 2-fachen Standardabweichung mit $2,22 \mu\text{g/mL}$ und der untere Toleranzbereich mit $-1,93 \mu\text{g/mL}$ berechnet (Abbildung 16).

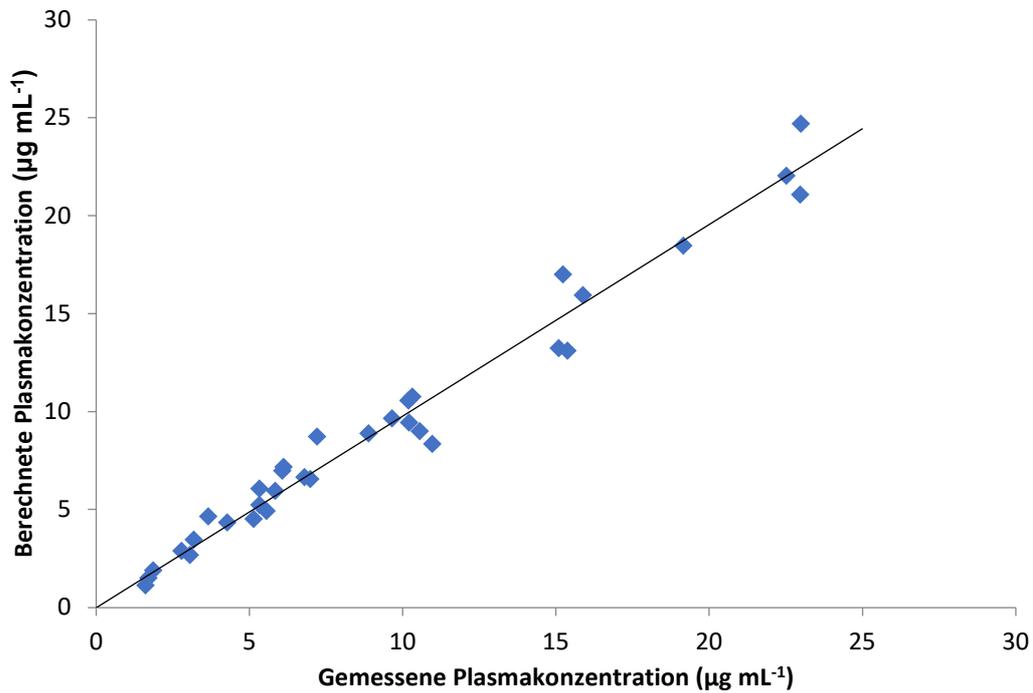


Abbildung 15: Korrelation zwischen gemessener Plasmakonzentration und berechneter Plasmakonzentration aus DBS, Korrelationsfunktion: $y = 0,978x$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9912$

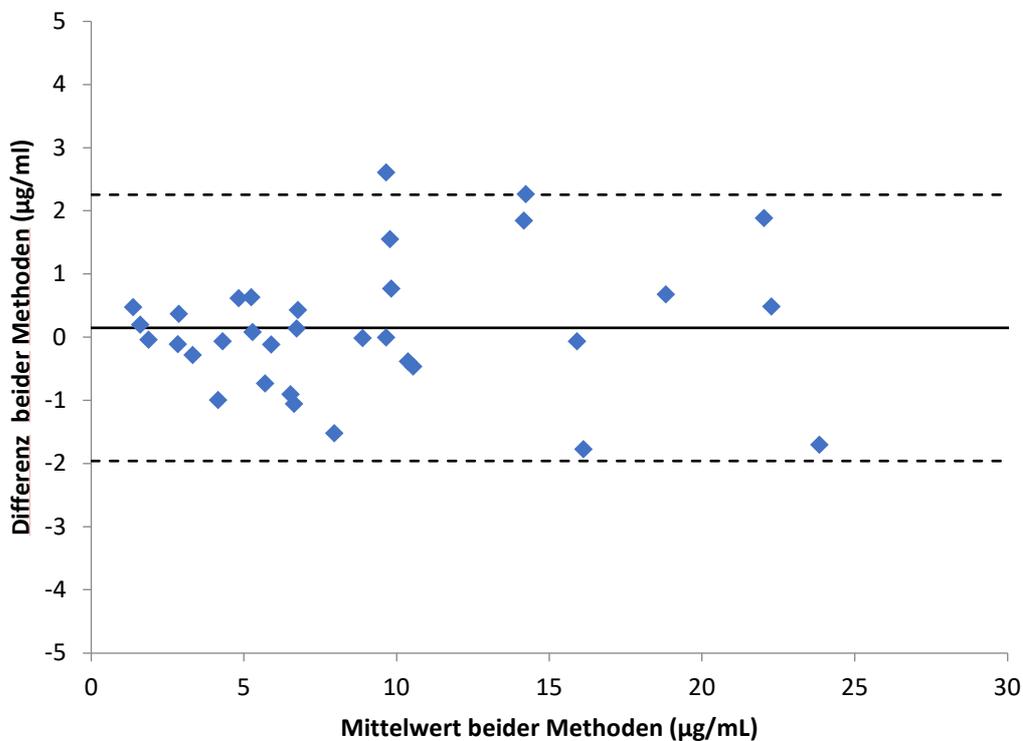


Abbildung 16: Bland Altman Plot. Vergleich der Übereinstimmung zwischen gemessener und aus DBS berechneter Meropenem Plasmakonzentration. Die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert der Differenzen und die gestrichelten Linien die Mittelwerte der Differenzen \pm die 2-fache Standardabweichung wieder.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von DBS eine klinisch anwendbare Methode zur Bestimmung von Meropenem aus Vollblut im Rahmen des TDM zu entwickeln. Nach aktueller Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V. ist eine TDM gestützte antibiotische Therapie für zahlreiche Substanzklassen empfohlen [58]. In der Übersichtsarbeit von Zoller et al. wird die Diskrepanz zwischen verfügbarer und gewünschter TDM gestützter Antibiotikatherapie von Meropenem auf deutschen Intensivstationen deutlich [37]. Aufgrund von fehlendem verfügbarem Laborequipment an zahlreichen Kliniken, wäre ein Versand an entsprechende Labore bei empfohlenem und größtenteils auch gewünschtem TDM notwendig. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag deshalb auf der chemischen Instabilität von Meropenem in Plasma, die ein Versenden der Patientenproben auf Trockeneis notwendig macht, sodass hier eine Stabilitätsverbesserung von Meropenem auf DBS untersucht und evaluiert werden konnte [35].

4.1 Validierung und Herstellung der DBS

Bei der Herstellung und Aufbereitung der DBS mit Vollblut sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in der präklinischen Phase einige Anforderungen zu bewältigen. Dabei spielt der Hkt in der Analytik eine zentrale Rolle, weshalb dieser Einfluss während der Validierung stets berücksichtigt werden muss. Eine grundsätzliche Voraussetzung ist die Kenntnis über die Verteilung und das Bindungsverhalten des Arzneimittels im Blut. Meropenem befindet sich ausschließlich im Plasma. Eine Bindung an zelluläre Bestandteile ließ sich nicht nachweisen. Da der Hkt die Viskosität bestimmt, spielt dieser eine große Rolle bei der Verteilung des Vollblutes auf den DBS, sodass eine regelrechte Aufbereitung der Blutprobe entscheidend ist. Letztendlich hat der Hkt somit einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse in der DBS Bestimmung [59]. Im ersten Schritt der Probenaufbereitung wurden im Rahmen der Validierung die Vollblutröhrchen mit einem Vortex Schüttler aufgeschüttelt. Dadurch wird verhindert, dass die zellulären Bestandteile sich am Boden absetzen und in Folge der Hämatokrit (Hkt) verfälscht wird. Durch mehrere Versuche zeigten sich durch das Aufschütteln deutlich validere DBS Ergebnisse.

Des Weiteren spielt die Wahl der DBS Karten eine nicht unwesentliche Rolle. In unserer Versuchsreihe wurden DBS Karten mit einer unbeschichteten Cellulose Matrix (Whatman FTA DMPK-C) verwendet. In einer Gegenüberstellung fünf verschiedener DBS Karten von Koster et

al. wurde der Effekt des Hkt und der Konzentration untersucht. Hierbei zeigten sich bei allen DBS Karten unter der Zugabe verschiedener Immunsuppressiva eine sowohl vom Hkt- und der Konzentration abhängige Extraktionsleistung. Da dieser Effekt unter den Karten variiert, ist ein Wechsel der DBS Karten während einer Versuchsreihe nicht ohne vorherige Validierung empfohlen [60].

Die empfohlene Auftragsmenge von Vollblut auf DBS beträgt laut Hersteller 15 μ L und könnte bei Abweichungen einen systemischen Einfluss auf das Resultat haben. In der Theorie sollten jedoch unterschiedliche Auftragevolumina aufgrund eines gleichmäßigen Verteilungsmusters auf der DBS keinen Einfluss auf das quantitative Ergebnis haben. Wagner et al. beschreiben jedoch bei hohen Auftragevolumina (> 20 μ L) konsequenterweise auch höhere Blutvolumina in den ausgestanzten DBS-Discs und somit mögliche Konzentrationsunterschiede in der zu analysierenden Substanz [46]. Durch den Versuch mit Hilfe einer Reihe von verschiedenen Applikationsvolumina zeigte sich in unserer Arbeit kein signifikanter Unterschied der anschließend errechneten Plasmakonzentrationen. Eine Abweichung der empfohlenen Blutmenge führt also zu keiner systemischen Beeinflussung der aus der DBS errechneten Plasmaresultate. Entsprechend wäre im klinischen Alltag keine besondere Sorgfalt beim Pipettiervorgang in Bezug auf die Auftragsmenge notwendig. Letztlich hängt der Effekt der Auftragevolumina sicherlich einerseits von der Beschaffenheit der DBS Karten und andererseits auch vom Hkt ab, und sollte deshalb stets berücksichtigt und untersucht werden [46,61]. Die Qualität der präparierten DBS lässt sich üblicherweise anhand visueller Kriterien beurteilen. Darunter werden Merkmale wie die (fast) vollständige Ausfüllung des vorgezeichneten Kreises, eine symmetrische Verteilung um den Mittelpunkt und eine gleichmäßige, dunkelrote Farbe auf beiden Seiten der DBS-Karte betrachtet [62].

Ist eine gleichmäßige Blutverteilung auf den DBS Karten vorausgesetzt, spielt der Ort der auszustanzenden Disc keine Rolle. Eine ungleichmäßige Verteilung, wie sie z.B. auf beschichteten DBS Karten vorkommen kann, kann durch das Ausstechen des gesamten Blutropfens umgangen werden [46]. Substanzen, die sich an oder in Erythrozyten (wie z.B. einige Immunsuppressiva) wiederfinden, sind Stanzen aus der Peripherie aufgrund der Annahme einer dortig vermehrten Anhäufung von Erythrozyten zu umgehen. Das European Bioanalysis Forum (EBF) empfiehlt grundsätzlich, eine Stanze zu entnehmen, die groß genug ist, um eine repräsentative Probe zu erhalten und/oder immer an der gleichen Stelle des Blutflecks zu stanzen [63].

Zur Optimierung der Extraktion von Meropenem aus DBS wurden verschiedene Zusammensetzungen der Extraktionslösungen untersucht. Die beste Extraktionsausbeute von 75,5 % \pm 4,8 % gelang in einer Extraktionslösung von Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 70 %/30 %. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Zusammensetzung war die gute Kompatibilität mit der HILIC-Säule, sodass die fertige Lösung ohne weitere Aufbereitung in das HPLC System gegeben werden konnte.

Die weiteren Zwischenschritte, wie bereits in Kap. 2.2.4 beschrieben, waren nicht weiter störanfällig und einfach durchführbar.

Nach 2-stündiger Trockenzeit erfolgte die Zugabe der DBS-Discs in die Extraktionslösung und im Anschluss eine 12 minutige Schwenkphase auf einem Horizontal-Schüttler. Dadurch ist eine effiziente Vermengung und in der Folge auch Extraktion gewährleistet. Eine längere Schwenkphase zeigte keinen wesentlichen Vorteil. Zur Extraktionsoptimierung wurden die Proben vor der Zugabe in das HPLC-System für eine Minute in ein Ultraschallbad platziert. Dieser Arbeitsschritt erhöhte die Präzision der Extraktion der zur analysierenden Substanz aus der DBS-Disc. Es ist davon auszugehen, dass hierdurch eine vollständige Benetzung der DBS-Disc erzielt und somit eine effizientere Extraktion erreicht und Messfehler minimiert werden können. Versuche ohne diesen Arbeitsschritt gingen mit einer deutlich geringeren Präzision einher. Mit den auf diese Weise erhaltenen Extrakten lassen sich mittels der HILIC Methode Chromatogramme erzielen, die schmale und gut abgrenzbare Peaks der zu analysierenden polaren Substanz (Meropenem) abbilden. Störsignale durch endogene Substanzen oder andere Medikamente wurden nicht beobachtet. Die Präzision und Richtigkeit entspricht den Richtlinien der Bundesärztekammer [54]. In der Untersuchung zur Matrixunabhängigkeit zeigte sich durch die DBS kein Effekt auf die Ergebnisse der Quantifizierung. Die Detektion mittels Massenspektrometers erfasste alle Konzentrationen innerhalb als auch außerhalb des therapeutischen Bereiches.

4.2 Stabilität

Die Evaluierung einer Stabilitätsverbesserung von Meropenem auf DBS war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Die Arbeitsgruppe von Pinder et al. beschreiben eine Stabilität von 4-6h bei Raumtemperatur mit einem Zerfall von weniger als 15 % von Meropenem in Plasma [36]. Im Hinblick auf den Probentransport war die Halbwertszeit ex vivo von Meropenem auf DBS bei Raumtemperatur in unserer Arbeit im Vergleich 7-mal höher als in Plasma. Die Zeitspanne, in

der die Proben als stabil (Nachweis von mindestens 85 % der Ausgangskonzentration) galten, betrug dementsprechend 50 h auf DBS verglichen zu 11 h in Plasma.

Bei einer Lagerungstemperatur von 6° Celsius von Meropenem in Plasma fiel hierbei eine Halbwertszeit von 20 Tagen bei einer maximalen Transportzeit von 4 Tagen auf. Die Stabilität auf DBS war unter -20° und 6° Celsius (letztere unter Zunahme von Trockengel) über einen Zeitraum von 7 Tagen ohne signifikanten Abfall nahezu konstant stabil. La Marca et al. untersuchten die Stabilität von Ertapenem auf DBS unter verschiedenen Temperaturbedingungen, wobei sich lediglich eine akzeptable Stabilität bei -20° Celsius zeigte [50].

Der Effekt von Trockengel lässt sich durch den Vergleich der Stabilität von Meropenem auf DBS bei 6° Celsius mit und ohne Trockengel veranschaulichen. Hier zeigt sich eine vergleichbar gute Haltbarkeit in den ersten beiden Tagen. Erst bei einer Transportzeit darüber hinaus ist eine Stabilitätsverbesserung durch Zunahme von Trockengel zu verzeichnen. In der Gesamtschau der Ergebnisse zeigt sich ein deutlicher Stabilitätsvorteil von Meropenem auf DBS im Vergleich zu Meropenem in Plasma (vgl. Abb. 11-14).

Als Beispiel für erhöhte Temperaturen, wie sie im Sommer vorkommen können, wurde die Stabilität bei einer Temperatur von 40 ° Celsius untersucht. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine Halbwertszeit von Meropenem in Plasma von 30 h und einer maximalen Transportzeit von 7 h. Dieses Ergebnis kann als ausreichend für einen Transport zwischen Klinik und Labor ohne Kühlungsmaßnahmen gewertet werden. Der Zerfall von Meropenem auf DBS folgte erstaunlicherweise bei erhöhter Temperatur keiner exponentiellen Gesetzmäßigkeit, weshalb hier keine Halbwertszeiten errechnet werden konnte. Ein Grund dafür könnte der Einfluss der erhöhten Luftfeuchtigkeit sein, die insbesondere am ersten Tag zu einem beschleunigten Zerfall von Meropenem geführt haben könnte. Die Anwendung von Trockengel könnte die Haltbarkeit in diesem Fall verbessern, dies lässt sich jedoch aktuell aus unserer Versuchsreihe nicht ableiten. In der Gesamtbetrachtung sind solche extremen Bedingungen in Deutschland nicht zu erwarten, sodass diesen Ergebnissen aktuell keine wesentliche Bedeutung zukommt. In der Subsahara-Afrika, dem Ort mit der höchsten HIV-Prävalenz, spielen hohe Temperaturen und lange Transportwege wiederum eine entscheidende Rolle. In einer publizierten Studie von Duthaler et al. wurde die antiretrovirale HIV-Therapie mit Nevirapine, Efavirenz and Lopinavir auf DBS unter extremen Klimabedingungen (40° C und 75 % relative Luftfeuchtigkeit)

untersucht. Hierbei erwiesen sich Nevirapine und Efavirenz über 4 Wochen und Lopinavir für bis zu 2 Wochen auf DBS unter den oben genannten Bedingungen als stabil [64].

Cao et al. untersuchten analog die Stabilität von Meropenem auf Dried Plasma Spots (DPS). Dabei zeigte sich eine akzeptable Stabilität unter Raumtemperatur für 24 h und unter 4° C und -20° C für 7 Tage. Bei erhöhten Temperaturen (40°C) wurde ein starker Konzentrationsabfall bereits in den ersten 24 h beobachtet. Die Ergebnisse stehen größtenteils im Einklang mit unseren Resultaten [65].

Untersuchungen zu einer längeren Haltbarkeit von Meropenem wurden durch die Arbeitsgruppe von Zander et al. im Rahmen von Biobanking durchgeführt [66]. Hier zeigte sich über 6 Monate kein relevanter Zerfall von Meropenem in Plasma bei einer Lagerung bei -80° C. Basierend auf unseren Ergebnissen ist unter diesen Lagerungsbedingungen von einer ähnlichen Haltbarkeit auf DBS auszugehen.

4.3 Klinische Anwendbarkeit

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Untersuchung der klinischen Anwendbarkeit zur Bestimmung des Meropenem Plasmaspiegels auf DBS im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings. Im klinischen Setting konnte die Anwendung der DBS an einem bestimmten Patientenkollektiv (ITS) untersucht werden. La Marca et al. untersuchten lediglich eine geringe Probenanzahl (n = 3), indem Ertapenem gesundem Vollblut zugesetzt und anschließend auf DBS aufgetragen und analysiert wurde [50]. Im klinischen Alltag sind im Rahmen des TDM die Angaben der Plasmakonzentration üblich. Da die Bestimmung von Meropenem aus DBS mit Vollblut erfolgt, galt es in dieser Arbeit eine adäquate Umrechnungsformel zur klinischen Anwendung eines Patientenkollektivs zu erarbeiten. Die DBS Rohdaten fielen in der Bestimmung aus Vollblut erheblich niedriger als in Plasma aus. Ersteres lag im Bereich von 0,48 µg/mL-9,48 µg/mL im Vergleich zur Plasmakonzentration, die im Bereich von 1,61 µg/mL-22,99 µg/mL bestimmt wurde. Bereits auf den ersten Blick scheint eine ungefähr zweifach höhere Konzentration in Plasma vorzuliegen. Der wesentliche Einflussfaktor auf die Bestimmung aus DBS ist der Hkt im Vollblut [57]. Hierbei ist einerseits der analytische und andererseits der physiologische Einfluss zu berücksichtigen [67]. Letzteres wurde zu Beginn unserer Versuchsreihe ex vivo untersucht. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Meropenem weder in noch an den zellulären Bestandteilen gebunden wiederzufinden ist, sodass unter der Berücksichtigung des Hkt auf die Plasmakonzentration geschlossen werden kann. In dieser Arbeit lagen die Hkt-Werte wie

bereits beschrieben in einem Bereich von 22 %-34 %, was niedriger ist als der Wert in der Allgemeinbevölkerung, aber typisch für Patienten der Intensivstation. Insgesamt führen pathophysiologische als auch iatrogene Ursachen auf der ITS zu solch niedrigen Hkt Werten. Peri- und postoperative Blutverluste, stattgehabte Traumata, häufige Blutentnahmen, übermäßige parenterale Flüssigkeitssubstitutionen und unverhältnismäßig niedrig zirkulierende Konzentrationen von Erythropoietin (EPO) im Blut sind einige Gründe, die zu einer Anämie und demzufolge zu einem niedrigem Hkt bei Patienten auf der ITS führen [68]. Hieraus ergibt sich sogleich der wesentliche analytische Einfluss, bei dem davon auszugehen ist, dass die Ausbreitung der Blutropfen bei niedrigem Hkt auf den DBS-Karten unserer Patientenproben systematisch breiter als bei den Kalibrierungsproben mit normalem Hkt ist. Dies führt zu systematisch niedrigeren quantitativen Ergebnissen. Diesem Effekt wurde durch die Berechnung und Zunahme eines Korrekturfaktors $F = 1,695$ entgegengewirkt (siehe Kap. 2.4). An dieser Stelle ist die Publikation von Denniff et al. hervorzuheben, in der die Abhängigkeit und Auswirkungen des Hkt auf die quantitativen Ergebnisse auf DBS verdeutlicht werden [49]. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der in Kapitel 2.4 angewandten Formel klinisch interpretationsfähige Meropenem Plasmakonzentrationen aus DBS Vollblut an Patienten der Intensivstation berechnet und Über- sowie Unterdosierungen im Rahmen des TDM detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse unter Anwendung einer entsprechenden Korrekturformel konnten in der Arbeit von Antunes et al. in der Bestimmung von Tamoxifen und dessen Metabolite auf DBS erzielt werden [69]. Der Vergleich der Ergebnisse der Plasmakonzentration und der berechneten Plasmakonzentration aus DBS ergab in der Intra-Klassen-Korrelation eine gute Übereinstimmung. Der Bland-Altman-Plot zeigte ein vernachlässigbares Bias mit akzeptablen Limits of Agreement und somit eine gute Übereinstimmung beider Messmethoden. Viele Publikationen beschäftigen sich mit dem Einfluss des Hkt auf DBS und wie dieser umgangen oder vermindert werden kann. Um den Hkt völlig zu umgehen, können beispielsweise Dried Plasma Spots (DPS) verwendet werden. Hierzu muss jedoch die Blutprobe vor Zugabe auf die Filterkarten zentrifugiert werden. Alternativ kann dieser Arbeitsschritt mit Hilfe einer Plasma Vorbereitungskarte (z.B. der Firma Noviplex®) umgangen werden. Dabei wird eine bestimmte Menge an Vollblut auf eine Filterkarte aufgetragen, wonach sich durch eine einstufige Festphasenmethode ein entsprechende DPS Disc anfertigen lässt. Cao et al. konnten unter Anwendung dieses Verfahrens eine klinisch anwendbare Methodik der Analytik von Meropenem auf DPS publizieren [65]. Eine Möglichkeit, den Einfluss des Hkt zu minimieren,

besteht laut dem Hersteller Agilent Technologies darin, ein nicht-Zellulosefilterpapier zu verwenden. Unterschiedliche Hkt Werte führen hierbei aufgrund der entsprechenden Filterpapierbeschaffenheit im Vergleich zum klassischen Zellulosefilterpapier zu deutlich geringeren Schwankungen des DBS Blutropfen Durchmessers [67]. Eine weitere Alternative, um die Problematik mit dem Hkt bewältigen zu können, ist es, sich eine Vorstellung über den Hkt der zu analysierenden DBS zu verschaffen. Der logischste und einfachste Weg wäre die Bestimmung des Hkt in einer zusätzlichen Blutentnahme. In unserer Arbeit und im Falle eines TDM im stationären Setting ist diese Option leicht umzusetzen. In einem Szenario, in der die Durchführung der DBS Bestimmung durch den Patienten selbst in einem häuslichen Umfeld durchgeführt wird, stößt diese Option jedoch bereits an ihre Grenzen. An dieser Stelle wäre die Nutzung eines Point-of-Care-Test (POCT), wie z.B. von der Firma HemoCue® entwickelt, möglich. Mit Hilfe dieses Systems können schnell und direkt am Patienten Hämoglobinwerte bestimmt werden. Aus dem Hämoglobinwert können anschließend entsprechende Hkt Werte berechnet werden. Die Beschaffung solcher Systeme ist jedoch enorm kostenintensiv, sodass dies den limitierenden Faktor darstellt [70,59]. Eine weitere Option, den Hkt abzuschätzen, wäre die Berechnung des Hkt anhand der Messung von Bestandteilen der DBS-Disc. Auf diese Weise konnten Capiou et al. anhand der Bestimmung von Kalium in DBS den Hkt der Probe einschätzen [71]. Da die Durchführung der Kaliumbestimmung ebenfalls laborchemisch durchgeführt werden muss, scheint die direkte Bestimmung des Hkt sinnvoller. Aufgrund der zahlreichen Hürden der DBS, wurde in den vergangenen Jahren intensiver nach Alternativen gesucht. Das Volumetric absorptive microsampling (VAMS) wurde hauptsächlich entwickelt, um die Problematiken des Hkt und die eigenständige Durchführung der Proben zu umgehen und zeitgleich die Vorteile der DBS zu vereinen. Das VAMS besteht aus einer porösen hydrophilen weißen Kuppe, die an einem Kunststoffprobenhalter befestigt ist. Nach einem Fingerstich kann ein exakt vordefiniertes Blutvolumen (z.B. 10 oder 20 μL) durch Sog absorbiert werden, wobei jedoch auch hier zahlreiche Fehler in der eigenständigen Durchführung aufkommen können. Nach 2-stündiger Trockenzeit kann die gesamte Probe analysiert werden, sodass ein Ausstanzen wie bei den DBS Karten nicht notwendig ist. Spooner et al. verdeutlichten in ihrer Arbeit, dass Schwankungen des Blutvolumens auf VAMS bei verschiedenen Hkt Blutwerten gering sind [72]. Jedoch zeigte eine Übersichtsarbeit von Kok et al. eine weiterhin Hkt-abhängige Diskrepanz zwischen VAMS- und Plasmakonzentrationen, sodass auch hier weiterhin eine systematische Validierung und entsprechen Anpassung erfolgen muss [73].

Im Hinblick auf die Möglichkeit eines postalischen Versands, lassen sich mit Hilfe der DBS Karten deutlich Kosten sparen. Van Amsterdam et al. sehen hierbei durch die Verwendung von DBS Karten im Vergleich zu einem herkömmlichen Transport mit Plasma auf Trockeneis eine Einsparung von bis zu 200 € pro Versand [74].

4.4 Limitationen

Nachfolgend sind einige Limitationen dieser Arbeit hervorzuheben. Eine Limitation bestand in den nicht repräsentativen Hkt Werten. Weitere Versuche mit unterschiedlichem und breiterem Spektrum von Hkt Werten sind notwendig, um den Einfluss auf die quantitativen Ergebnisse aus DBS und auf die daraus errechneten Plasmakonzentrationen zu untersuchen. Daraus ergeben sich zugleich die Limitationen des Korrekturfaktors, bei der der Hkt-Bereich eines bestimmten Patientenkollektivs vorausgesetzt sein oder eine zusätzliche Hkt-Bestimmung jeder einzelnen DBS durchgeführt werden muss, um Abweichungen detektieren und anschließend korrigieren zu können. Des Weiteren lässt sich aus unserer Arbeit keine Aussage über die Akzeptanz einer DBS Bestimmung an den Kliniken ableiten.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine praktikable und sensitive Methode zur Bestimmung von Meropenem auf DBS erarbeitet werden. Dem ansonsten sehr aufwendigen und kostspieligen Transport von Meropenem in Plasma wird mit dem einfachen postalischen Versand von DBS eine gute Alternative geboten. Zusätzlich zeigte sich bei Raumtemperatur eine gute und ausreichende Stabilität für den regulären Postversand. Die DBS Aufarbeitung ist einfach durchführbar, wobei der Einfluss äußerer Störfaktoren (z.B. im Pipetiervorgang und Probenaufbereitung) gering bleibt. Die Bestimmung von Meropenem aus DBS mittels der HILIC-MS-MS bietet im Rahmen des TDM eine gute Alternative zur Bestimmung von Meropenem aus Plasma. Einer großen Nachfrage nach TDM zahlreicher Arzneimittel könnte mittels der DBS entgegengekommen werden. Ein Nachteil der DBS ist der Preis der DBS-Karten, der je nach Anbieter bei ca. 5 € pro DBS Karte liegt. Weitere Studien zur Bestimmung von Meropenem aus kapillärem Blut sowie von Patienten auf Normalstation mit entsprechenden Hkt Werten wären wünschenswert.

5 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut: Prävention nosokomialer Infektionen und Krankenhaushygiene im IfSG. (2011)
2. Vincent J.-L.: Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*. 361. 2068–77. (2003)
3. Gastmeier P., Geffers C.: Nosokomiale Infektionen in Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr*. 133. 1111–5. (2008)
4. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von Nosokomialen Infektionen: Abschlussbericht PPS 2016. (2016)
5. Weinstein R.: Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *Am J Med*. 91. 179S–84. (1991)
6. Appelgren P., Hellstrom I., Weitzberg E., Soderlund V., Bindslev L., Ransjo U., et al.: Risk factors for nosocomial intensive care infection. *Acta Anaesthesiol Scand*. 45. 710–9. (2001)
7. Cağatay A., Ozcan P., Gulec L., Ince N., Tugrul S., Ozsut H., et al.: Risk factors for mortality of nosocomial bacteraemia in intensive care units. *Med Princ Pract*. 16. 187–92. (2007)
8. Li Y., Xia X., Li X., Xiao K., Zhuang X.: Correlation between the use of antibiotics and development of a resistant bacterial infection in patients in the ICU. *Biosci Trends*. 12. 517–9. (2018)
9. Pakyz A., MacDougall C., Oinonen M., Polk R.: Trends in antibacterial use in US academic health centers. *Arch Intern Med*. 168. 2254–60. (2008)
10. Arefian H., Hagel S., Heublein S., Rissner F., Scherag A., Brunkhorst F., et al.: Extra length of stay and costs because of health care-associated infections at a German university hospital. *Am J Infect Control*. 44. 160–6. (2016)
11. Sunagawa M., Matsumura H., Inoue T., Fukasawa M., Kato M.: A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. *J Antibiot*. 43. 519–32. (1990)
12. Mouton J., van den Anker J.: Meropenem clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 28. 275–86. (1995)
13. Jan Niklas Herbel: Benzylpenicillin. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Benzylpenicillin_10167. (23.12.2021)
14. Moellering R., Eliopoulos G., Sentochnik D.: The carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 24 Suppl A. 1–7. (1989)
15. Shibata T., Iino K., Tanaka T., Hashimoto T., Kameyama Y., Sugimura Y., et al.: Synthetic study of 1-substituted carbapenem antibiotics. *Tetrahedron Letters*. 26. 4739–42. (1985)
16. Fukasawa M., Sumita Y., Harabe E., Tanio T., Nouda H., Kohzuki T., et al.: Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother*. 36. 1577–9. (1992)

- 17.** Zhanel G., Johanson C., Embil J., Noreddin A., Gin A., Vercaigne L., et al.: Ertapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 3. 23–39. (2005)
- 18.** Mohr J.: Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 47 Suppl 1. S41-51. (2008)
- 19.** Mouton Y., Beuscart C.: Empirical monotherapy with meropenem in serious bacterial infections. Meropenem Study Group. *J Antimicrob Chemother.* 36 Suppl A. 145–56. (1995)
- 20.** MerremRM IV (meropenem for injection): US Prescribing Information. AstraZeneca, 2007 Feb. (2007)
- 21.** Kielstein J., Czock D., Schöpke T., Hafer C., Bode-Böger S., Kuse E., et al.: Pharmacokinetics and total elimination of meropenem and vancomycin in intensive care unit patients undergoing extended daily dialysis*. *Critical Care Medicine.* 34. 51–6. (2006)
- 22.** Tröger U., Drust A., Martens-Lobenhoffer J., Tanev I., Braun-Dullaeus R., Bode-Böger S., et al.: Decreased meropenem levels in Intensive Care Unit patients with augmented renal clearance. *Int J Antimicrob Agents.* 40. 370–2. (2012)
- 23.** Muller A., Huttner B., Huttner A.: Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactams and Other Antibiotics in the Intensive Care Unit. *Drugs.* 78. 439–51. (2018)
- 24.** Roberts J., Lipman J.: Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis. *Clin Pharmacokinet.* 45. 755–73. (2006)
- 25.** Roberts J., Lipman J.: Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Critical Care Medicine.* 37. 840-51; quiz 859. (2009)
- 26.** Hanberger H., Svensson E., Nilsson L., Nilsson M.: Pharmacodynamic effects of meropenem on gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14. 383–90. (1995)
- 27.** Norrby S., Newell P., Faulkner K., Lesky W.: Safety profile of meropenem. *J Antimicrob Chemother.* 36 Suppl A. 207–23. (1995)
- 28.** Beumier M., Casu G., Hites M., Wolff F., Cotton F., Vincent J., et al.: Elevated β -lactam concentrations associated with neurological deterioration in ICU septic patients. *Minerva Anesthesiol.* 81. 497–506. (2015)
- 29.** Spina Silva T., Dal-Prá Ducci R., Zorzetto F., Braatz V., Paola L. de, Kowacs P., et al.: Meropenem-induced myoclonus. *Seizure.* 23. 912–4. (2014)
- 30.** Oka S., Shiragami H., Nohgawa M.: Intravascular hemolytic anemia in a patient with antibodies related to meropenem. *Intern Med.* 54. 1291–5. (2015)
- 31.** Smith T., Haber E.: Digoxin intoxication: the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration. *J Clin Invest.* 49. 2377–86. (1970)
- 32.** Cooney L., Loke Y., Golder S., Kirkham J., Jorgensen A., Sinha I., et al.: Overview of systematic reviews of therapeutic ranges: methodologies and recommendations for practice. *BMC Med Res Methodol.* 17. 84. (2017)

- 33.** Bode-Böger S., Tröger U.: Therapeutisches Drug Monitoring von Reserveantibiotika. *Intensivmed.up2date*. 11. 293–308. (2015)
- 34.** Kang J., Lee M.: Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med*. 24. 1–10. (2009)
- 35.** Elkhaili H., Niedergang S., Pompei D., Linger L., Leveque D., Jehl F., et al.: High-performance liquid chromatographic assay for meropenem in serum. *J Chromatogr B, Biomed Appl*. 686. 19–26. (1996)
- 36.** Pinder N., Brenner T., Swoboda S., Weigand M., Hoppe-Tichy T.: Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics - Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *J Pharm Biomed Anal*. 143. 86–93. (2017)
- 37.** Liebchen U., Paal M., Scharf C., Schroeder I., Grabein B., Zander J., et al.: The ONTAI study - a survey on antimicrobial dosing and the practice of therapeutic drug monitoring in German intensive care units. *J Crit Care*. 60. 260–6. (2020)
- 38.** Briscoe S., McWhinney B., Lipman J., Roberts J., Ungerer J.: A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 907. 178–84. (2012)
- 39.** Martens-Lobenhoffer J., Bode-Böger S.: Quantification of meropenem in human plasma by HILIC - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1046. 13–7. (2017)
- 40.** Binder L., Schwörer H., Hoppe S., Streit F., Neumann S., Beckmann A., et al.: Pharmacokinetics of meropenem in critically ill patients with severe infections. *Ther Drug Monit*. 35. 63–70. (2013)
- 41.** Galena H.: Complications occurring from diagnostic venipuncture. *J Fam Pract*. 34. 582–4. (1992)
- 42.** Yang Z., Yang S., Chen L., Qu J., Zhu J., Tang Z., et al.: Comparison of blood counts in venous, fingertip and arterial blood and their measurement variation. *Clin Lab Haematol*. 23. 155–9. (2001)
- 43.** Chatterji P., Li Y.: Effects of the COVID-19 Pandemic on Outpatient Providers in the United States. *Med Care*. 59. 58–61. (2021)
- 44.** Meybohm P., Schmitz-Rixen T., Steinbicker A., Schwenk W., Zacharowski K.: Das Patient-Blood-Management-Konzept : Gemeinsame Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. *Chirurg*. 88. 867–70. (2017)
- 45.** Rawal G., Kumar R., Yadav S., Singh A.: Anemia in Intensive Care: A Review of Current Concepts. *J Crit Care Med (Targu Mures)*. 2. 109–14. (2016)

- 46.** Wagner M., Tonoli D., Varesio E., Hopfgartner G.: The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom Rev.* 35. 361–438. (2016)
- 47.** Zakaria R., Allen K., Koplin J., Roche P., Greaves R.: Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC.* 27. 288–317. (2016)
- 48.** Zijp T., Izzah Z., Åberg C., Gan C., Bakker S., Touw D., et al.: Clinical Value of Emerging Bioanalytical Methods for Drug Measurements: A Scoping Review of Their Applicability for Medication Adherence and Therapeutic Drug Monitoring. *Drugs.* 81. 1983–2002. (2021)
- 49.** Denniff P., Spooner N.: The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis.* 2. 1385–95. (2010)
- 50.** La Marca G., Giocaliere E., Villanelli F., Malvagia S., Funghini S., Ombrone D., et al.: Development of an UPLC-MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal.* 61. 108–13. (2012)
- 51.** Böcker J.: *Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese.* Würzburg. Vogel 1996
- 52.** Buszewski B., Noga S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 402. 231–47. (2012)
- 53.** U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine: Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. (2018)
- 54.** Neufassung der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK. *Deutsches Ärzteblatt Online.* (2019)
- 55.** Koo T., Li M.: A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med.* 15. 155–63. (2016)
- 56.** Grouven U., Bender R., Ziegler A., Lange S.: Vergleich von Messmethoden. *Dtsch Med Wochenschr.* 132 Suppl 1. e69-73. (2007)
- 57.** Antunes M., Charão M., Linden R.: Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin Biochem.* 49. 1035–46. (2016)
- 58.** S3- Leitlinie Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus. *AWMF online.* (2018)
- 59.** Kesel P. de, Capiou S., Lambert W., Stove C.: Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis.* 6. 1871–4. (2014)
- 60.** Koster R., Botma R., Greijdanus B., Uges D., Kosterink J., Touw D., et al.: The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants. *Bioanalysis.* 7. 1225–35. (2015)

- 61.** Knapen L., Beer Y. de, Brüggemann R., Stolk L., Vries F. de, Tjan-Heijnen V., et al.: Development and validation of an analytical method using UPLC-MS/MS to quantify everolimus in dried blood spots in the oncology setting. *J Pharm Biomed Anal.* 149. 106–13. (2018)
- 62.** Edelbroek P., van der Heijden J., Stolk L.: Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit.* 31. 327–36. (2009)
- 63.** Klak A., Pauwels S., Vermeersch P.: Preanalytical considerations in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants with dried blood spots. *Diagnosis (Berl).* 6. 57–68. (2019)
- 64.** Duthaler U., Berger B., Erb S., Battegay M., Letang E., Gaugler S., et al.: Using dried blood spots to facilitate therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in resource-poor regions. *J Antimicrob Chemother.* 73. 2729–37. (2018)
- 65.** Cao H., Jiang Y., Wang S.: Dried Plasma Spot Based LC–MS/MS Method for Monitoring of Meropenem in the Blood of Treated Patients. *Molecules.* 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27061991>. (2022)
- 66.** Zander J., Maier B., Suhr A., Zoller M., Frey L., Teupser D., et al.: Quantification of piperacillin, tazobactam, cefepime, meropenem, ciprofloxacin and linezolid in serum using an isotope dilution UHPLC-MS/MS method with semi-automated sample preparation. *Clin Chem Lab Med.* 53. 781–91. (2015)
- 67.** Kesel P. de, Sadones N., Capiou S., Lambert W., Stove C.: Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis.* 5. 2023–41. (2013)
- 68.** Fink M.: Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia. *Crit Care.* 8 Suppl 2. S9-10. (2004)
- 69.** Antunes M., Raymundo S., Oliveira V. de, Staudt D., Gössling G., Peteffi G., et al.: Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in dried blood spots--development, validation and clinical application during breast cancer adjuvant therapy. *Talanta.* 132. 775–84. (2015)
- 70.** Schenck H. von, Falkensson M., Lundberg B.: Evaluation of "HemoCue," a new device for determining hemoglobin. *Clin Chem.* 32. 526–9. (1986)
- 71.** Capiou S., Stove V., Lambert W., Stove C.: Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Anal Chem.* 85. 404–10. (2013)
- 72.** Spooner N., Denniff P., Michielsen L., Vries R. de, Ji Q., Arnold M., et al.: A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis.* 7. 653–9. (2015)
- 73.** Kok M., Fillet M.: Volumetric absorptive microsampling: Current advances and applications. *J Pharm Biomed Anal.* 147. 288–96. (2018)

74. van Amsterdam P., Waldrop C.: The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis*. 2. 1783–6. (2010)

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Meropenem mittels Dried Blood Spots (DBS) auf der Intensivstation

im Institut für Klinische Pharmakologie mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefanie M Bode-Böger, MPH und Dr. rer. nat. Jens Martens-Lobenhoffer ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Frankfurt am Main, den 19.07.2022

Daniel Monastyrski

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Anhang

Materialien:

- DBS Filterkarten Typ FTA™ DMPK-C (GE Healthcare, Frankfurt).
- Acetonitril: Hypergrade für die LC-MS (Merck, Darmstadt).
- Ammoniumformiat: Reagent Grade 97 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).
- Ameisensäure: Puriss. p.a. > 98 % (Merck, Darmstadt).
- Meropenem: Meronem® 500 Pulver zur Herstellung von Infusionslösungen (Astra Zeneca GmbH, Wedel), enthält Meropenem × 3 H₂O entsprechen 500 mg Meropenem zusammen mit 104 mg Natriumcarbonat als Puffersubstanz.
- Meropenem-D6: Toronto Research Chemicals, 96 % Reinheit, 99,7 % Reinheit bezüglich Isotopenzusammensetzung (Toronto, Ontario, Kanada).
- Agilent 1260 HPLC Anlage (Binäre Pumpe, thermostatisierter Autosampler, thermostatisiertes Säulenkompartiment; Agilent Technologies, Waldbronn).
- Qtrap MD4500 Tandem Massenspektrometer mit Turbo Ion Spray Ionenquelle (AB Sciex, Darmstadt).
- Gerätesteuerung und Messdatenauswertung erfolgte über das Analyst Software Paket, Version 1.6.2 (AB Sciex, Darmstadt).
- Die HPLC-Trennung erfolgte über eine Hypersil GOLD HILIC 100 × 2,1 mm Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die HPLC-Säule wurde durch ein SecurityGuard Vorsäulenfilter mit 4 × 2 mm SILICA Filttereinsatz (Phenomenex, Aschaffenburg) geschützt.