

# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VANCOMICINA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.

## VALIDATION OF A IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF VANCOMYCIN IN CEREBOSPINAL FLUID.

Lucrecia Marks<sup>1,5</sup>, Solange Duchein<sup>2</sup>, Isabel Inés González<sup>1,3</sup>, Hector Andrés Suárez<sup>1,3</sup>, Susana Rivolta<sup>1,4</sup>.

1. Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Laboratorio. Córdoba, Argentina.
2. Fundación Lennox, Laboratorio. Córdoba, Argentina.
3. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Farmacología. Córdoba, Argentina.
4. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Salud Pública. Córdoba, Argentina.
5. Email de contacto: [marks.lucrecia@gmail.com](mailto:marks.lucrecia@gmail.com)

### Conceptos clave:

Si bien algunos autores internacionales han validado métodos para la determinación de vancomicina en líquido cefalorraquídeo, son pocos los que lo han realizado para métodos inmunológicos.

El aporte de este trabajo radica en la posibilidad de ofrecer una nueva herramienta para el monitoreo de los niveles de vancomicina en líquido cefalorraquídeo en pacientes críticos con infecciones graves a nivel del sistema nervioso central, permitiendo ajustar la dosis del antibiótico y así, mejorar la eficacia terapéutica y disminuir el riesgo de efectos tóxicos.

Recibido: 2019-02-25 Aceptado: 2019-04-17

DOI: <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v76.n2.23550>



© Universidad Nacional de Córdoba

### Resumen:

**Introducción:** La vancomicina (VAN) es un antibiótico utilizado para el tratamiento de infecciones graves. Su uso está relacionado con efectos adversos como hiperemia facial aguda, nefrotoxicidad y ototoxicidad. Al tener un rango terapéutico muy estrecho, el monitoreo terapéutico resulta necesario para maximizar la eficiencia y minimizar los efectos tóxicos. Se estima que su concentración en líquido cefalorraquídeo (LCR) es, aproximadamente, un 10% de la plasmática en pacientes que reciben tratamiento endovenoso del mismo y que presentan inflamación de las meninges. Las concentraciones plasmáticas de VAN no son un indicador confiable de las presentes en LCR. El objetivo de este trabajo fue validar un método inmunológico basado en la interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) para la determinación de VAN en LCR. **Materiales y Métodos:** Se validó el método KIMS para la valoración de VAN en LCR. Para ello, se determinaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, interferencia, selectividad y especificidad. **Resultados:** el método fue lineal en un intervalo entre 0 y 15 µg/mL, los CV% obtenidos oscilaron entre 0,7 y 2,5% en el rango lineal. Los LOD y LOQ fueron 0,4 µg/mL y 1,4 µg/mL respectivamente. La ecuación de la recta obtenida en base a la correlación de métodos entre KIMS y HPLC-UV fue  $y = 0,9151x + 1,1695$ ,  $R^2 = 0,9453$ . **Conclusión:** El método KIMS demostró tener una sensibilidad y especificidad apropiadas para la determinación de VAN en LCR y, ser una herramienta útil para el monitoreo de pacientes que presenten infecciones complicadas a nivel del SNC.

**Palabras claves:** vancomicina; líquido cefalorraquídeo; inmunoensayo; monitoreo de drogas.

### Abstract:

**Introduction:** Vancomycin (VAN) is an antibiotic used to treat serious infections. Its use is related to adverse effects such as acute facial hyperemia, nephrotoxicity and ototoxicity. By having a very narrow therapeutic range, its monitoring is necessary to maximize efficiency and minimize toxic effects. It is estimated that its concentration in cerebrospinal fluid (CSF) is approximately 10% of the plasma level in patients who receive intravenous treatment and who have meninges inflammation. Plasma concentrations of VAN are not a reliable indicator of those present in CSF. The aim of this study was to validate an immunological method based on the kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS) for the determination of VAN in CSF. **Materials and Methods:** KIMS was validated for the evaluation of VAN in CSF. For this, the parameters of linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, interference, selectivity and specificity were determined. **Results:** The method was linear in a range between 0 and 15 µg/mL, the CV% obtained oscillated between 0.7 and 2.5% on the linear range. The LOD and LOQ were 0.4 µg/mL and 1.4 µg/mL respectively. The equation of the line obtained based on the correlation of methods between KIMS and HPLC-UV was  $y = 0.9151x + 1.1695$ ,  $R^2 = 0.9453$ . **Conclusion:** The KIMS method demonstrated to have an adequate sensitivity and specificity to determine VAN in CSF and being a useful tool for monitoring patients who present complicated infections at CNS level.

**Keywords:** vancomycin; cerebrospinal fluid; immunoassay; drug monitoring.

## Introducción

La Vancomicina (VAN) es un glucopéptido tricíclico antibiótico, utilizado para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias Gram positivas multirresistentes, particularmente, organismos meticilino-resistentes como *Staphylococcus aureus* (MRSA), también utilizada en pacientes alérgicos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Su efecto bactericida consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular mediante la unión a las terminales D-alanil-D-alanina en la cadena de peptidoglicano. El perfil farmacocinético de VAN es complejo y puede ser caracterizado por modelos de uno, dos o tres compartimentos. Posee una pobre absorción luego de la administración oral, por lo tanto, debe ser administrada de forma parenteral para la terapia de infecciones sistémicas. La vida media en pacientes con función renal normal es aproximadamente 6hs. Un 30% de la dosis se une a proteínas plasmáticas<sup>(1)</sup>, el 80-90% es eliminado sin cambios por filtración glomerular dentro de las 24hs luego de la administración de una única dosis<sup>(2-3)</sup>. Su uso está frecuentemente relacionado con efectos adversos como hiperemia facial aguda, nefrotoxicidad y ototoxicidad. Al tener un rango terapéutico muy estrecho, el monitoreo terapéutico resulta necesario para maximizar la eficiencia y minimizar los efectos tóxicos<sup>(4)</sup>. Los niveles plasmáticos deben ser determinados en condiciones de estado-estacionario, aproximadamente antes de la cuarta dosis. La concentración plasmática mínima debe ser mayor a 10  $\mu\text{g/mL}$  para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana; el pico de concentración luego de 1 hora de la infusión debe encontrarse entre 20-40  $\mu\text{g/mL}$ . El monitoreo de VAN es recomendado en pacientes que reciben dosis altas, en aquellos que poseen alto riesgo de toxicidad, en los que tienen una función renal alterada y en los casos en el que el tiempo de tratamiento es prolongado.

El ingreso de drogas al líquido cefalorraquídeo (LCR) desde la sangre es regulada por la barrera hemato-encefálica (BHE). La penetración de drogas al epitelio coroidal, y su distribución dentro del LCR, está influenciada por la inflamación de ésta. Algunos medicamentos también tienen la capacidad de alterar la permeabilidad de la BHE y, de esta manera, permitir el ingreso de VAN al LCR. Se estima que la concentración en LCR de este antibiótico es aproximadamente un 10% de la concentración plasmática en pacientes que presentan inflamación de las meninges. Los cambios en la concentración de VAN en el LCR ocurren más lentamente que en la sangre y, por lo tanto, el pico máximo de concentración es retardado respecto al plasma. Debido a que la relación entre la concentración de droga y el tiempo en el plasma no es paralela a la que ocurre en el LCR, las concentraciones plasmáticas de VAN no son un indicador confiable de las concentraciones en LCR durante el intervalo de dosis<sup>(5)</sup>.

Luego de una administración sistémica de VAN es muy difícil conseguir y mantener concentraciones elevadas dentro del LCR ventricular. La administración directa de pequeñas dosis de VAN directamente en el LCR permite obtener concentraciones altas de la droga en él. Existe una gran cantidad de condiciones que pueden alterar el volumen de distribución y la depuración de VAN en el SNC, la acumulación en el LCR puede ocurrir en pacientes con enfermedades que alteren la dinámica convencional de este, o bien, que disminuya la depuración de la droga en él.

Si bien no se han realizado estudios prospectivos para determinar el rango terapéutico de VAN en LCR, el objetivo es mantener las concentraciones de ésta por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del microorganismo infectante; algunos autores identifican las "concentraciones deseadas" en un rango de concentración en valle entre 5 y 20  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(6)</sup>. Numerosos autores han estudiado la concentración de VAN en el LCR encontrando valores muy diversos de acuerdo con la vía de administración, patología del paciente, la dosis y el tiempo de toma de muestra; en este sentido, el rango de concentraciones hallado va desde 0,3 a 187,3  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(7-8)</sup>. Las defensas del organismo en el SNC son relativamente menores que en otros sitios del organismo, por lo que la actividad bactericida de VAN en el LCR dentro de los ventrículos es crítica para la rápida esterilización de éste. Concentraciones sub-terapéuticas de VAN están asociadas con una colonización bacteriana persistente. A su vez, concentraciones elevadas en el LCR pueden estar asociadas

con neurotoxicidad, por lo que su concentración debería ser determinada. Esto permitiría ajustar el esquema terapéutico para mantener las concentraciones de VAN en LCR dentro del rango terapéutico eficiente<sup>(9)</sup>.

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de VAN en fluidos biológicos, entre ellos se encuentran métodos inmunológicos como inmunopolarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo enzimático homogéneo (EMIT) y radioinmunoensayo (RIA); y métodos cromatográficos. VAN ha sido cuantificada en suero y plasma utilizando métodos de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV), de fluorescencia, electroquímica y espectrometría de masas<sup>(10)</sup>.

Disponer de un método inmunológico, validado en nuestro nosocomio, para la determinación de la concentración de VAN en LCR, brinda la posibilidad de ajustar la dosis en base a concentraciones del fármaco libre, fracción responsable del efecto biológico directo. Esta información, permitiría optimizar el tratamiento de pacientes con infecciones severas a nivel del SNC, mejorando así su pronóstico y disminuyendo el riesgo de los posibles efectos adversos producidos por este antibiótico.

El objetivo del presente trabajo consiste en validar un método inmunológico basado en la interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS) para la determinación de VAN en LCR.

## Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad durante el período de marzo a octubre de 2018.

La validación del método KIMS para determinar VAN en LCR, se basó en la realización de las pruebas y procedimientos requeridos por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA) contempladas en la Guía para validación de métodos de ensayo (GUI-LE-03) para el cambio de matriz de un método validado en plasma/suero<sup>(11)</sup>. Se estudiaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, interferencia, selectividad y especificidad<sup>(12-13)</sup>.

Para estudiar los parámetros antes mencionados se utilizó un pool de LCR libre de drogas, obtenido de muestras de pacientes remitidas al laboratorio con solicitud de análisis citológico y bacteriológico, el cual se fortificó con una solución de VAN preparada a partir de clorhidrato de vancomicina de la marca KLONAL (VANCOMAX). Este pool fue valorado por el método de referencia HPLC-UV y la concentración fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Se prepararon los estándares de VAN de distintas concentraciones a partir del pool de LCR valorado previamente.

La determinación de VAN por KIMS se realizó en un equipo cobas C311 de Roche, y los reactivos provistos fueron utilizados según las especificaciones y procedimientos recomendados por el fabricante. Este método utiliza un anticuerpo (Ac) anti-VAN que se fija de forma covalente a micropartículas, mientras que el derivado del fármaco se une a una macromolécula. La interacción cinética de micropartículas en solución se induce al unirse el conjugado de la VAN al Ac que recubre las micropartículas y se inhibe por la VAN presente en la muestra biológica. El conjugado de VAN y la VAN presente en la muestra, compiten por fijarse al Ac anti-VAN que recubre las micropartículas. La interacción cinética de micropartículas resultante es indirectamente proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra<sup>(14)</sup>.

El método de referencia utilizado fue la cromatografía líquida de alta performance con detector ultravioleta (UV), en un cromatógrafo de la marca Agilent, 1220 LC System; las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6x150mm, 5  $\mu\text{m}$ ; fase móvil isocrática compuesta por un buffer fosfato 0,025M y Acetonitrilo (100:10 v/v) a pH 3, con un flujo de 1 mL/min; el volumen de inyección utilizado fue 20  $\mu\text{L}$  y la lectura se realizó a 205 nm.

### Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico de arrojar resultados proporcionales a la cantidad de analito presente en una muestra, dentro de un rango determinado.

Se elaboró una curva de calibración en base a estándares de LCR de concentración conocida de 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 y 20 µg/mL de VAN. Cada estándar se midió por cuadruplicado utilizando el método KIMS. Se realizó una recta de regresión graficando la concentración obtenida para cada estándar por KIMS en función de la concentración preparada. Además, se evaluó estadísticamente el procedimiento con la prueba t de Student como un mejor indicador del modelo lineal.

### Precisión

Se tomaron los datos del análisis por cuadruplicado de los distintos estándares de LCR preparados y se calculó el desvío estándar (DE) y el coeficiente de variación porcentual (CV%) a cada nivel de concentración.

### Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se obtuvieron a partir de la curva de linealidad;  $LOD = 3Sa/b$ ;  $LOQ = 10Sa/b$ , donde Sa es el desvío estándar de la ordenada al origen y b la pendiente.

### Estudio de Interferencia

A estándares conocidos de VAN en LCR de 2,5 y 10 µg/mL se agregaron distintos fármacos utilizados frecuentemente en pacientes internados en terapia intensiva y, en concomitancia con VAN. Estos

fármacos fueron fluconazol (FLUCONOVAG 2 mg/mL), ceftriaxona (CEFTRIAZ 1 g) y meropenem (KLOPENEM 500 mg) en una concentración final de 100 µg/mL. Se analizaron los estándares de VAN con y sin agregado de interferentes por el método KIMS con un n=10 y, para analizar los resultados, se aplicó una prueba t para muestras apareadas.

### Estudio de selectividad y especificidad

Un total de 40 muestras de LCR fortificadas con VAN, a distintas concentraciones, se analizaron por HPLC-UV y KIMS. Para evaluar los parámetros antes mencionados se realizó un análisis de regresión estadístico.

## Resultados

### Linealidad

Del análisis de regresión se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0,9788x + 0,1361$ ;  $R^2 = 0,9983$ . Del análisis estadístico se obtuvo un  $t_{obs} > t_{crit}$  ( $54,068 > 2,056$ ) lo que permite concluir que existe una correlación lineal estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. El rango de medición obtenido fue de 0 a 15 µg/mL (Figura 1).

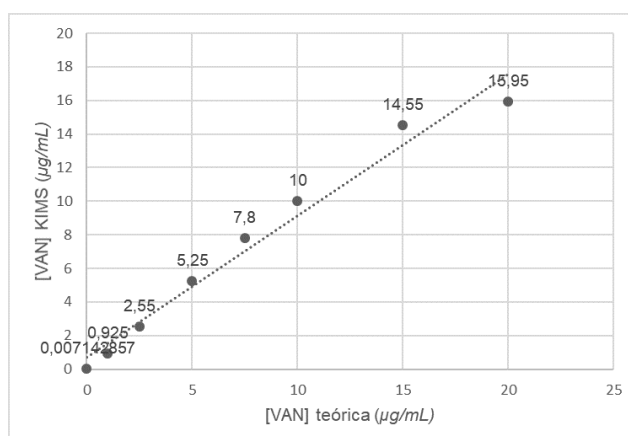


Figura N° 1. Linealidad del método KIMS para la determinación de VAN en LCR 0-15 µg/mL.  $y = 0,8452x + 0,6847$   $R^2 = 0,9748$

### Precisión

Los resultados del estudio de precisión se expresaron en términos de desviación estándar (DE) y coeficiente de variación porcentual (CV%) y se muestran en la Tabla N° 1.

Tabla N°1: Datos del análisis de precisión.

VAN (µg/mL)	X (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV%
0	0,1	0,13	125,1
1	0,925	0,15	16,2
2,5	2,55	0,06	2,3
5	5,25	0,13	2,5
7,5	7,8	0,08	1,0
10	10	0,08	0,8
15	14,55	0,10	0,7
20	15,95	0,29	1,8

### Límite de Detección y Cuantificación

En base a los resultados donde  $S_a = 0,1391$  y  $b = 0,1361$ , se pueden establecer  $LOD = 0,4$  µg/mL ( $LOD = 3Sa/b$ ) y;  $LOQ = 1,4$  µg/mL ( $LOQ = 10Sa/b$ ).

### Interferencia

Los resultados obtenidos demostraron que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de estándar de VAN con y sin el agregado de los interferentes descriptos previamente tanto para el nivel de 2,5 como 10,0 µg/mL ( $p = 0,69$  y  $0,09$  respectivamente).

### Especificidad y Selectividad

Para evaluar los parámetros mencionados, se realizó una comparación de métodos donde la variable dependiente fue KIMS y la regresora HPLC-UV (n=40) (Tabla N° 2). Se realizó un gráfico de Bland y Altman y, en base al mismo se detectaron muestras como posibles outliers; se realizó un análisis de las diferencias para su detección donde el rango fue de -3,53 a 2,08 µg/mL. En base a ello se excluyeron un total de 3 muestras (muestra 1,4,5) por superar los límites establecidos (Figura N° 2). Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta por el método de cuadrados mínimos  $y = 0,9151x + 1,1695$ ;  $R^2 = 0,9453$  (n=37); para la cual tanto la pendiente como la ordenada al origen se encuentran dentro de los parámetros estadísticamente significativos ( $p = 1,1335 \cdot 10^{-23}$  y  $0,00025$  respectivamente) (Figura N° 3).

Tabla N°2: Comparación del método en estudio (KIMS) contra el de referencia (HPLC-UV).  
Las muestras indicadas con \* son consideradas outliers.

N°	HPLC (µg/mL)	KIMS (µg/mL)
1*	16,21	13,2
2	11,53	11,6
3	10,68	10
4*	2,78	8,6
5*	4,20	8,3
6	4,71	6,2
7	3,76	4,6
8	2,88	3,3
9	2,01	1,7
10	15,28	13,3
11	9,38	9,4
12	6,92	7,8
13	6,68	7,2
14	4,57	5,2
15	3,67	4,2
16	1,91	2,4
17	5,14	6,7
18	5,12	5,6
19	3,69	3,9
20	2,57	2,5
21	3,08	3,8
22	2,67	2,7
23	9,11	9,7
24	8,37	9,4
25	6,47	8,9
26	7,72	9,1
27	6,09	8,9
28	7,73	8,5
29	7,24	8,6
30	6,90	8
31	6,94	7,7
32	6,03	6,9
33	5,56	6,9
34	4,56	6,3
35	4,71	5,5
36	2,12	1,8
37	13,96	14,3
38	13,83	13,9
39	13,78	13,2
40	12,91	12,6

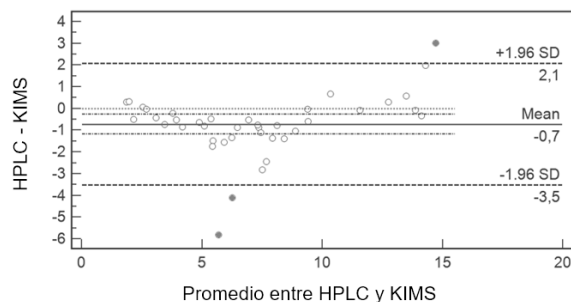
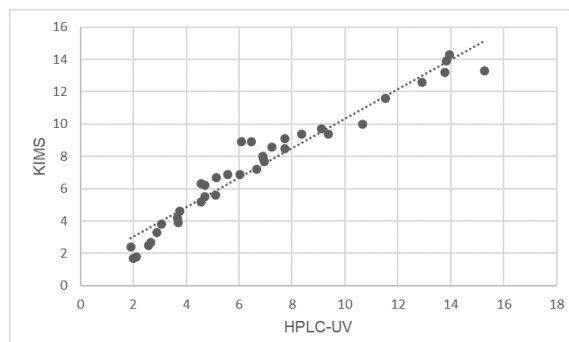


Figura N° 2. Gráfico de Bland y Altman

Figura N° 3. Comparación de métodos, KIMS vs HPLC-UV.  $y = 0,9151x + 1,1695$   $R^2 = 0,9453$ 

## Discusión

La terapia de las infecciones del SNC con VAN puede no ser óptima, a pesar de su amplia utilización, debido a su dificultad para atravesar la BHE. Los factores que impactan en su penetración dentro del LCR incluyen el tamaño molecular, lipofilicidad, unión a proteínas plasmáticas y la afinidad por mecanismos de transporte activo<sup>(15)</sup>. Su monitoreo terapéutico permite evaluar la relación entre la eficacia clínica y sus parámetros farmacocinéticos y, de esta forma, desarrollar un régimen terapéutico individualizado<sup>(16)</sup>. Según los resultados obtenidos, la determinación de VAN en LCR por KIMS tiene una linealidad adecuada con un rango de trabajo que va desde 1,4 a 15 µg/mL. El rango lineal es menor que el establecido por el fabricante para la determinación de VAN en suero/plasma (4,0 – 80,0 µg/mL); sin embargo, el LOQ obtenido en nuestro trabajo es menor. Debido a la gran variabilidad interindividual reportada para la penetración de VAN al SNC, sumada a la dependencia existente de acuerdo con la patología subyacente y a los distintos esquemas de administración de VAN<sup>(17-18)</sup>, no se ha podido establecer un valor de referencia para la concentración terapéutica de VAN en LCR, aunque, ciertos autores, sugieren una concentración deseada entre 5-20 µg/mL<sup>(19)</sup>. La gran variabilidad de la concentración de VAN en LCR dada por factores como la terapia esteroidea concomitante<sup>(20)</sup>, pacientes sin inflamación meníngea, o pacientes en estado crítico de salud; es reflejada por la relación LCR/plasma que va de 0,00 a 0,81<sup>(21)</sup>. Es por este motivo que resulta de gran utilidad la cuantificación de valores bajos de esta droga en la matriz ensayada.

Los ensayos de interferencia mostraron que no existe reactividad cruzada o interferencia significativa con las drogas ensayadas, que habitualmente pueden ser coadministradas junto con VAN<sup>(22-23)</sup>. En la comparación de métodos se observa que el método KIMS mide con un error constante de 1,1695 µg/mL y un error proporcional de 0,9151 µg/mL respecto del método considerado como referencia. Esto último coincide con datos reportados en la bibliografía, en los cuales otros autores mencionan que los métodos inmunológicos arrojan valores ligeramente superiores a los obtenidos por HPLC<sup>(24-25)</sup>.

## Conclusión

El método KIMS demostró poseer una sensibilidad y especificidad adecuadas para la determinación de VAN en LCR, siguiendo los pasos requeridos por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA-05) para implementar un cambio de matriz en el método utilizado. Se pudo demostrar que el método KIMS para la determinación de VAN en LCR es rápido, sensible y específico.

La metodología podrá utilizarse para determinar las concentraciones de VAN en LCR en pacientes críticos bajo tratamiento con esta droga, a fin de lograr una mejor eficacia terapéutica y disminuir el riesgo de efectos adversos.

**Limitaciones de responsabilidad:** El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad y no se contó con ninguna fuente de financiación externa a la institución.

**Fuentes de financiación:** Para este trabajo no se contó con fuentes de apoyo externas.

## Bibliografía

- Brunton L.; Chabner B.; Knollman B.; Goodman E Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 11 edición, Mc Graw Hill, 2007.
- Lenka J.; Lenka K. K.; Dagmar S.; Petr S.; Milan K. *Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography – A review*. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 6–20.
- Muppidi K.; Pumerantz A.S.; Betageri G.; Wang J. *Development and Validation of a Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method with UV Detection for the Determination of Vancomycin in Mouse Plasma*. *J Chromat Separation Techniq.* 2013, 4:1, 165.
- Matsumoto K.; Takesue Y.; Ohmagari N.; Mochizuki T.; Mikamo H.; Seki M.; et al. *Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring*. *J Infect Chemother.* 2013, 19, 365-380.
- Jill B. Thompson J.B.; Einhaus S.; Buckingham S.; Phelps S.J. *Vancomycin for Treating Cerebrospinal Fluid Shunt Infections in Pediatric Patients: Review Article*. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2005, 10:1, 14-25.
- Al Jeraisy M.; Phelps S.j.; Christensen M.L.; Einhaus S. *Intraventricular Vancomycin in Pediatric Patients With CSF Shunt Infections*. *J. Pediatr Pharmacol Ther.* 2004; 9:1, 36-42.
- Jill B. Thompson J.B.; Einhaus S.; Buckingham S.; Phelps S.J. *Vancomycin for Treating Cerebrospinal Fluid Shunt Infections in Pediatric Patients: Review Article*. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2005, 10:1, 14-25.
- Shokouhi S.; Alavi Darazam I. *Determination of vancomycin trough level in serum and cerebrospinal fluid of patients with acute community-acquired meningitis: A prospective study*, *J Infect.* 2014.
- Mark S. L.; Hatton J. *Vancomycin administration into the cerebrospinal fluid: a review*. *Ann Pharmacother.* 1993, 27, 912-21.
- Muppidi K.; Pumerantz A.S.; Betageri G.; Wang J. *Development and Validation of a Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method with UV Detection for the Determination of Vancomycin in Mouse Plasma*. *J Chromat Separation Techniq.* 2013, 4:1, 165.
- MC-OAA: *Manual de la Calidad del OAA: vigente*
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis – IUPAC Technical Report – Pure & Appl.Chem.* 2002, 74:5, 835-855.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including detection and quantification capabilities- IUPAC recommendations– Pure & Appl.Chem.* 1995, 67:10, 1699-1723.
- Roche. *ONLINE TDM Vancomycin Gen.3.* 2017, 1-5.
- Beach J.E.; Perrott J.; Turgeon R.D.; Ensom M.H.H. *Penetration of Vancomycin into the Cerebrospinal Fluid: A Systematic Review*. *Clin Pharmacokinet.* 2017. doi.10.1007/s40262-017-0548-y

16. Men P.; Li H.B.; Zhai S.D.; Zhao R.S. Association between the AUC<sub>0-24</sub>/MIC Ratio of Vancomycin and Its Clinical Effectiveness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2016, 11 (1).
17. Mader M.M.D.; Czorlich P.; König C.; Fuhrmann V.; Kluge S.; Westphal M.; Grensemann J. Intrathecal penetration of meropenem and vancomycin administered by continuous infusion in patients suffering from ventriculitis - a retrospective analysis. *Acta Neurochir.* 2018, 160:11, 2099-2105.
18. Matsumoto K.; Takesue Y.; Ohmagari N.; Mochizuki T.; Mikamo H.; Seki M.; et al. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J Infect Chemother.* 2013, 19, 365-380.
19. Al Jeraisy M.; Phelps S.j.; Christensen M.L.; Einhaus S. Intraventricular Vancomycin in Pediatric Patients With CSF Shunt Infections. *J.Pediatr Pharmacol Ther.* 2004; 9:1, 36-42.
20. Lee SA, Kim JK, Jo DS, Kim SJ. Response of Vancomycin according to Steroid Dosage in Pediatric Patients with Culture-Proven Bacterial Meningitis. *Infect Chemother.* 2017, 49:4, 262-267.
21. Beach J.E.; Perrott J.; Turgeon R.D.; Ensom M.H.H. Penetration of Vancomycin into the Cerebrospinal Fluid: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet.* 2017. doi.10.1007/s40262-017-0548-y
22. Usman M.; Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). *SpringerPlus.* 2016, 5:124.
23. Tariq A.; Siddiqui M.R.; Kumar J.; Reddy D.; Singh Negi P.; Chaudhary M.; et al. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of ceftriaxone and vancomycin in pharmaceutical formulations and biological samples. *ScienceAsia.* 2010, 36, 297-304.
24. Barco S.; Castagnola E.; Gennai I.; Barbagallo L.; Loy A.; Tripodi G.; Cangemi G. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice, *Journal of Chemotherapy.* 2016, 28:5, 395-402.
25. Shokouhi S.; Alavi Darazam I. Determination of vancomycin trough level in serum and cerebrospinal fluid of patients with acute community-acquired meningitis: A prospective study, *J Infect.* 2014.