

POSIEDZENIE KLINICZNE dn. 09.04.2024

Zastosowanie techniki mikropróbkiowania i alternatywnych matryc biologicznych w terapii monitorowanej leków o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń w populacji pediatrycznej

mgr Agnieszka Czajkowska

dr n. med. i n. o zdr. Arkadiusz Kocur

PRACOWNIA TERAPII MONITOROWANEJ, FARMAKOKINETYKI KLINICZNEJ I TOKSYKOLOGII

ZAKŁAD BIOCHEMII KLINICZNEJ

dr Jacek Rubik

PORADNIA TRANSPLANTACJI NEREK

KLINIKA NEFROLOGII, TRANSPLANTACJI NEREK I NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO



INSTYTUT „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

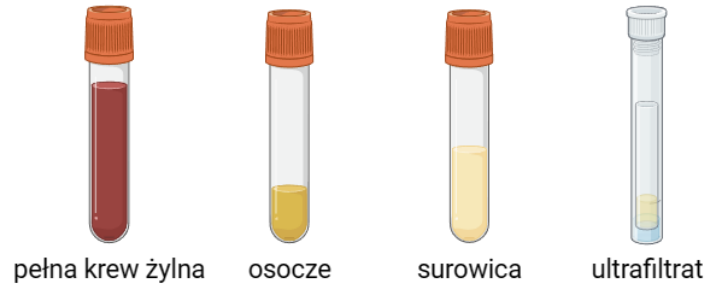


Metody mikrosamplingu redukują ilość pobieranego materiału biologicznego do przynajmniej 50 mikrolitrów (μL) – w praktyce do nawet **10 μL**



Czy wykorzystanie 40 mikrolitrów krwi żyłnej sposobem klasycznym można już nazwać mikrosamplinem?

MATERIAŁ RUTYNOWO STOSOWANY W TERAPEUTCZNYM MONITOROWANIU LEKÓW



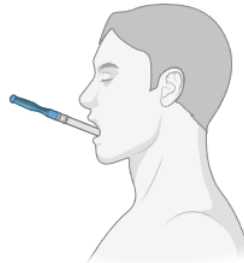
ALTERNATYWNY MATERIAŁ BIOLOGICZNY STOSOWANY W TERAPEUTCZNYM MONITOROWANIU LEKÓW



włosy



łzy



ślina



pot



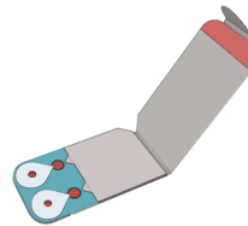
mleko matki



mocz



paznokcie



krew włośniczkowa



materiał tkankowy
(biopłat)



płyn mózgowo-
rdzeniowy

Table 2. Policies and recommendations on safe blood sample volume limits for paediatric clinical research as identified through a review of the literature

Institution/Body	Maximum volume allowed for a single draw		Maximum cumulative draw volume allowed
	% of TBV	ml/kg	
Toronto Hospital for Sick Children Research Ethics Board ²⁹	5	3.75–4.0 ^a	5% of TBV within 3 months
USC/LA Children's Hospital ²²	2.5–2.7 (within 24 hour) ^a	2	4 ml/kg within 30 days
Wayne State University ²³	1	0.8	10% of TBV or 8 ml/kg within 8 weeks
Partners Human Research Committee ²⁴	3.6–3.9 ^a	<3	<3 ml/kg within 8 weeks
University of California Davis ²⁵	2.5	2 ^a	5% of TBV within 30 days
Duke University ²⁶	Note: Minimum blood Hb required at time of blood draw, 7 g/dl (9–10 g/dl if cardiorespiratory compromise present) For expedited IRB approval		3 ml/kg or 50 ml total (whichever is less) over 8 weeks
	2.5 ^a	2, up to 200 ml total	7 ml/kg over 8 weeks (up to 5 draws of 7 ml/kg per year)
	(for review by convened IRB; note: special precautions and justification required for more than this limit)		
KEMRI–Wellcome Trust Research Programme, Kilifi, Kenya ^b	1.9–2.3 ^a	1.7–2.4	Not stated
	(2005 guideline for total volume drawn)		
	1.3 ^a	1	5 ml/kg within 8 weeks
	(2008 guideline for volume drawn for research purposes in addition to volume needed for routine care)		
US Dept of Health and Human Services, Office for Human Research Protections ¹⁷	3.8 ^a	3, up to 50 ml total	3 ml/kg, up to 50 ml total within 8 weeks
Kauffman 2000 ²⁸	3.0	2.4 ^a	Not stated
Gambia Government–MRC Joint Ethics Committee ²⁷	Range: 2.4 (e.g. 1-kg infant) to 0.3 (e.g. 20-kg 4-year-old or 30-kg 9-year-old) ^a	2, up to max 5 ml (age 0–4 yr); 10 ml (age 5–9 yr); 15 ml (age 10–14 yr); 30 ml (age ≥ 15 yr)	Within 3 months same as for one draw, "usually"

Hb, haemoglobin; IRB, institutional review board; ml/kg, millilitres per kilogram of body weight; MRC, Medical Research Council; TBV, total blood volume.

^a Calculated on the basis of a TBV of 75–80 ml/kg (in neonates, 100 ml/kg). Non-italicised content is quoted directly from the sources.

^b Provided by the KEMRI–Wellcome Trust Research Programme, Kilifi, Kenya, in October 2006 with an updated version provided to the author in August 2009. These are local practice guidelines reflecting the latest recommendations of this institution.

REGULAR ARTICLE

Blood draws up to 3% of blood volume in clinical trials are safe in childrenClaudia Peplow¹, Robin Assfalg¹, Andreas Beyerlein¹, Joerg Hasford², Ezio Bonifacio³, Anette-G Ziegler (anette-g.ziegler@helmholtz-muenchen.de)^{1,4} 

1.Institute of Diabetes Research, Helmholtz Zentrum München and Forschergruppe Diabetes, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Neuherberg, Germany

2.Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

3.DFG Center for Regenerative Therapies Dresden, Faculty of Medicine, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany

4.Forschergruppe Diabetes e.V., Neuherberg, Germany

•**Całkowita objętość krwi (TBV) i wiek** : TBV u dzieci różni się w zależności od ich wieku. Na przykład noworodki mają około 85–90 ml/kg masy ciała, podczas gdy starsze dzieci mogą mieć około 70 ml/kg. Ta różna objętość krwi podkreśla potrzebę zachowania ostrożności podczas pobierania krwi dostosowanej do wieku.

•**Limity bezpiecznego pobierania** : Liczne badania i wytyczne sugerują, że w przypadku niemowląt i dzieci maksymalna ilość krwi pobranej w ciągu 24 godzin powinna wynosić od 1% do 5% ich TBV. Jednak złotym standardem jest utrzymanie go poniżej 3% TBV. Postępy takie jak mikropróbkiowanie sprawiają, że trzymanie się tych niskich wartości procentowych jest bardziej osiągalne. Warto zauważyć, że w przypadku chorych dzieci limit ten jest jeszcze bardziej rygorystyczny i wynosi 3,8% TBV w ciągu jednego dnia. W dłuższym okresie, na przykład przez osiem tygodni, należy pobrać jedynie do 10% TBV.

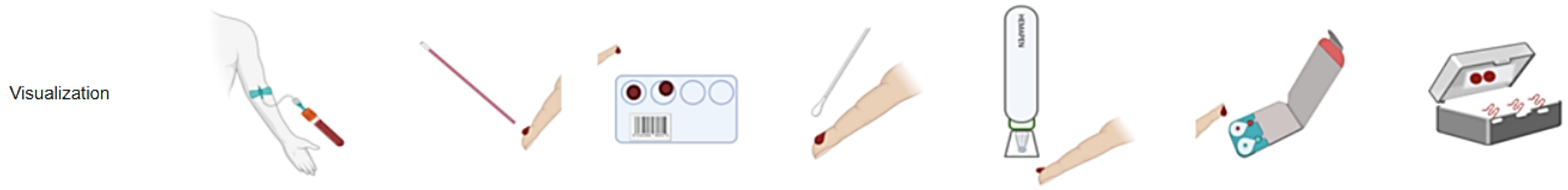
Kilka czynników sprawia, że pobieranie krwi u dzieci jest trudniejsze:

1.Mniejsze żyły : Żyły u dzieci są mniejsze i dostęp do nich może być trudniejszy.

2.Lęk i strach : Wiele dzieci boi się igieł, przez co zabieg jest dla nich bardziej traumatyczny niż dla dorosłych.






3.Ograniczona objętość : Ze względu na ograniczoną ilość krwi, którą można pobrać, należy zadbać o prawidłowe postępowanie z próbkami, zwłaszcza jeśli wymaganych jest wiele badań.

Feature	Venipuncture	CMS	DBS	VAMS Mitra™	VAMS HemaPen™	qDBS Capitainer™	VAMS/qDBS hemaXis™
Type of matrix	whole blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood
Sampling	invasive (venipuncture)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)
Sample self-collection	impossible	impossible	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)
Sample volume	inaccurate (non-volumetric)	inaccurate (non-volumetric) or quantitative	inaccurate (non-volumetric)	quantitative (10, 20 or 30 µL) with RSD <4%	quantitative (2.74 µL)	quantitative (10 µL)	quantitative (10 µL)
Risk of sample contamination	possible (except vacuum and closed devices)	extremely high	high	high	extremely low	high	high
Visual control of blood loading	possible	possible	confined	possible	possible	possible (with control of sample volume)	possible (with control of sample volume)
Sample storage in RT	undesirable	undesirable	possible	possible, but with desiccant and in the dark	possible	possible, but with desiccant and in the dark	possible
Sample transportation	cold chain is required	cold chain is required	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions
Shipping by post	impossible	impossible	possible	possible	possible	possible	possible

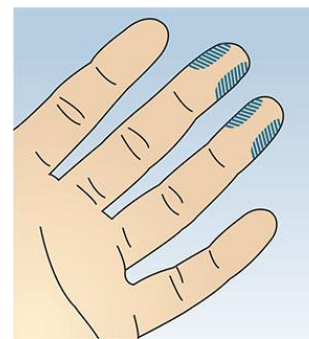


Kocur A, Pawiński T. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):681. <https://doi.org/10.3390/ijms24010681>

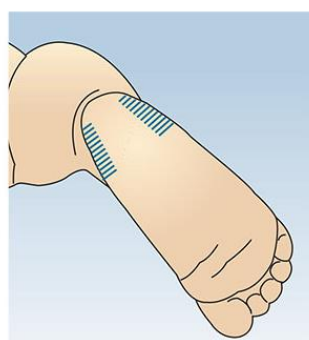
Safety-Lancet

					
Design	Mini	Normal	Extra	Super	Neonatal
Penetration depth	1.6 mm	1.8 mm	1.8 mm	1.6 mm	1.2 mm
Needle size	28 G	21 G	18 G	Blade 1.5 mm	Blade 1.5 mm
Blood volume	Low	Medium	Medium to High	High	Medium to High

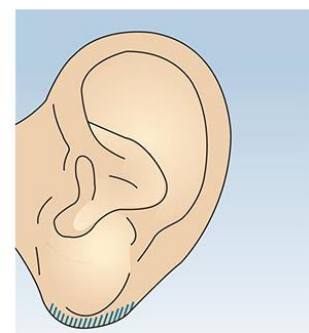
1 Fingertip



2 Heel



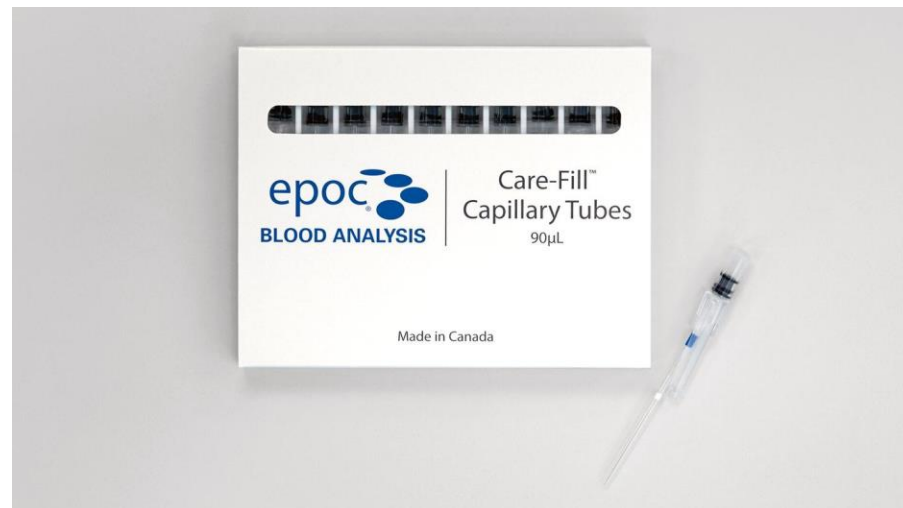
3 Earlobe



Safety-Heel®

Design	Application	Penetration depth	Incision length
	Neonates	1.0 mm	2.5 mm
	Premature infants	0.85 mm	1.75 mm

CMS – *Capillary MicroSampling* systemy kapilarne

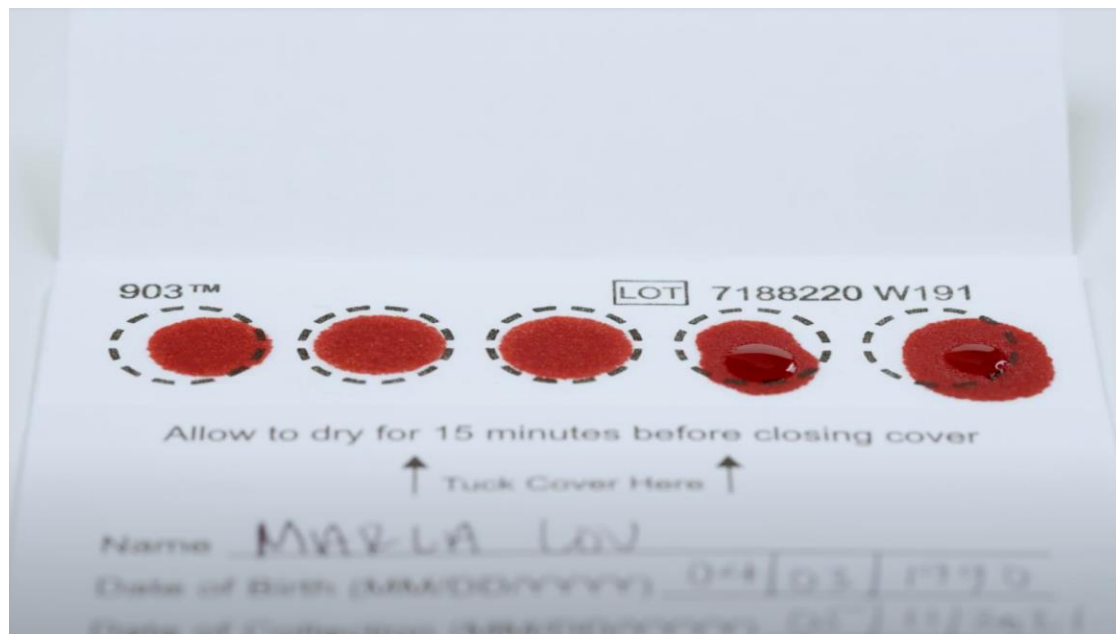


Capillary technique with an End-to-End capillary

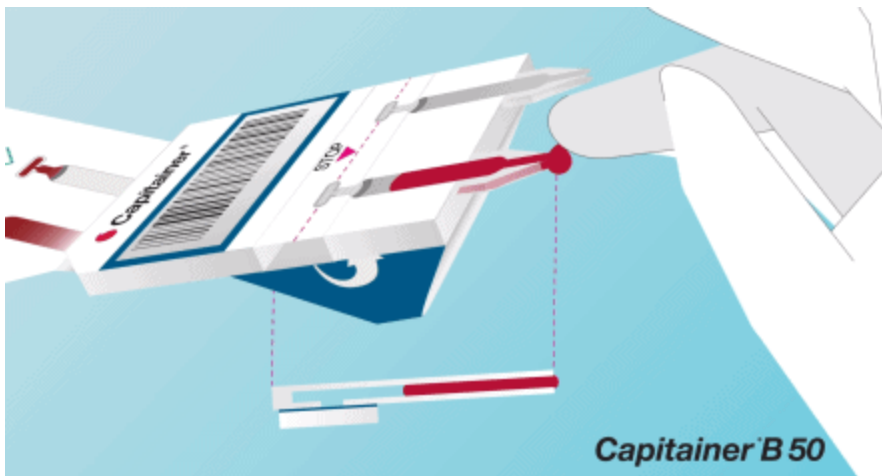


Blood sample collection using the collection rim

DBS – *Dried Blood Spot* sucha kropla krwi na bibule

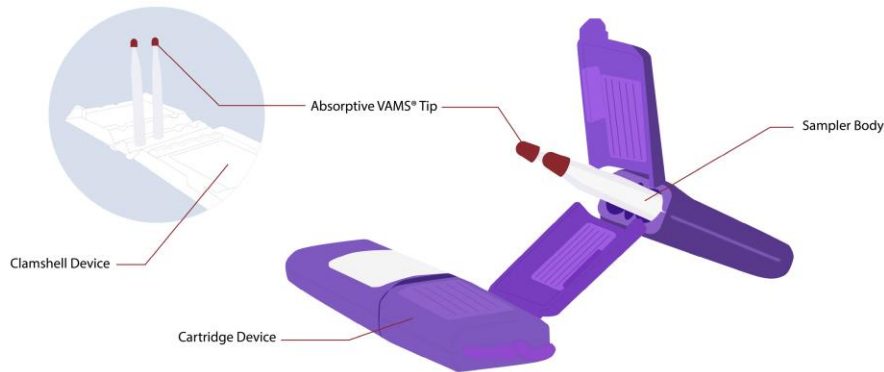


qDBS – quantitative *Dried Blood Spot* objętościowa sucha kropla krwi na bibule



VAMS - Volumetric Absorptive MicroSampling

mikropróbkiwanie wolumetryczno-absorpcyjne



Zestaw do samodzielnej pobierania próbek w warunkach domowych



+ instrukcja papierowa (dodatkowe wsparcie – film w aplikacji)

VAMS lekiem na non-adherence?

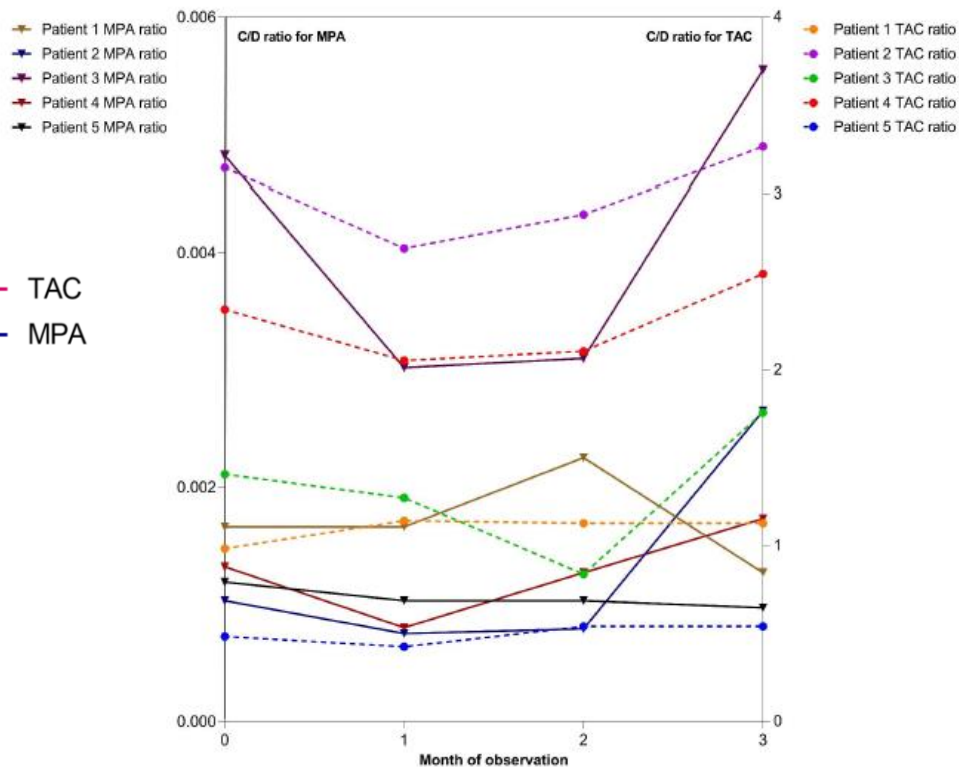
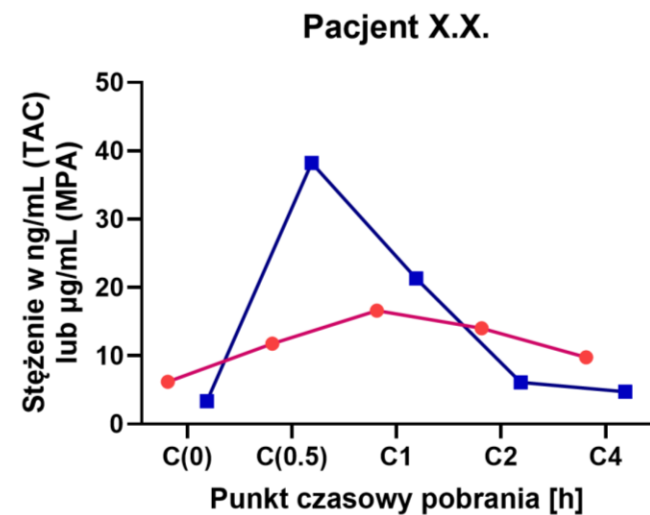
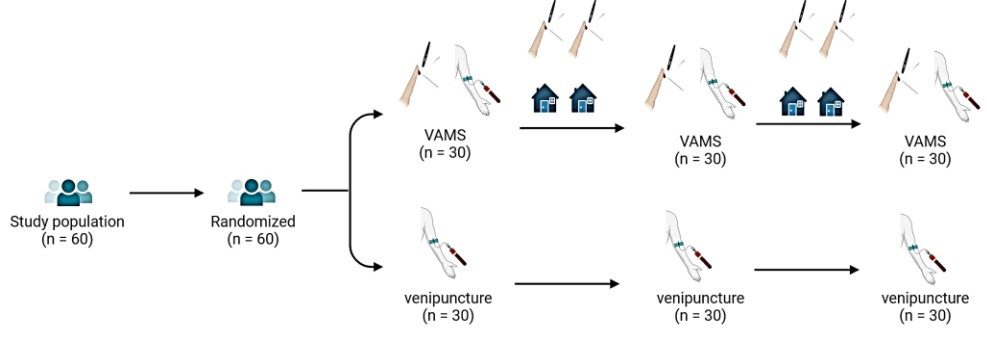


Figure 3. Representative graph for the selected number of patients included in the VAMS group. Limited data are presented due to the better clarity of the poster.

The average CV of C/D ratio in the VAMS group is 6,79% (4,26 – 25,81) and 5,67% (3,89 – 17,66) for TAC and MPA, respectively.

The average CV of C/D ratio in the standard/venipuncture group is 10,43% (5,68 – 38,16) and 9,70% (2,89 – 47,66) for TAC and MPA, respectively.

Poprawność pobierania próbek

- W okresie: 05.2022-03.2024

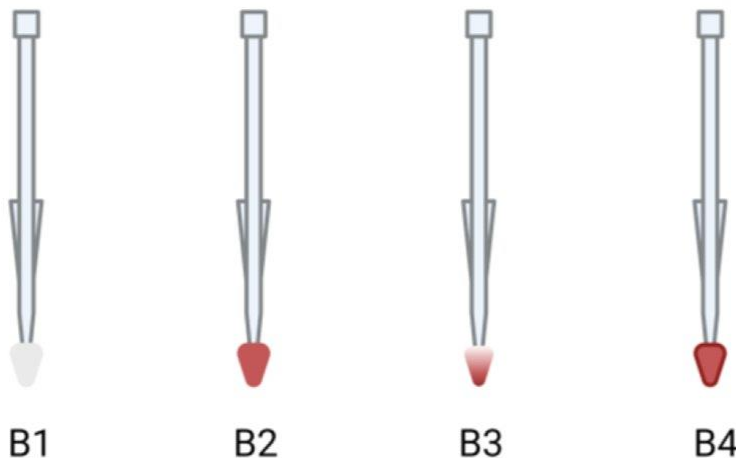
Łączna ilość próbek VAMS pobranych w IP-CZD (przez pielęgniarkę/przez lekarza/samodzielnie przez pacjenta, również w warunkach domowych)

ok. **686**

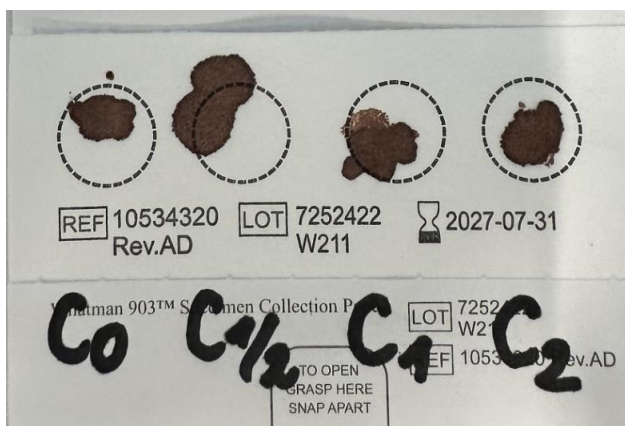
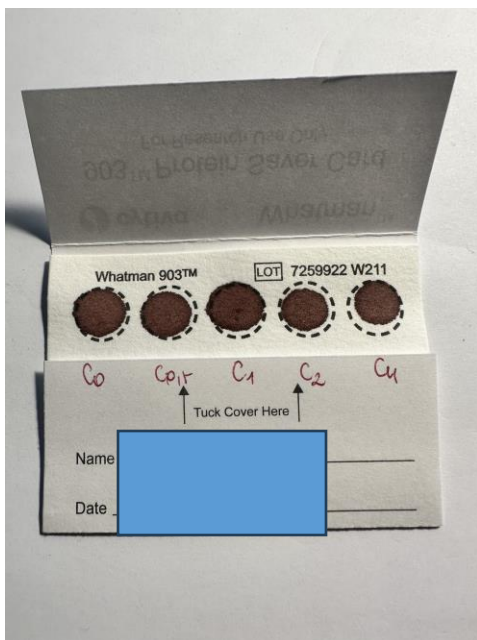
Łącznie ilość błędów:

6 pustych VAMS-ów (0.87%),

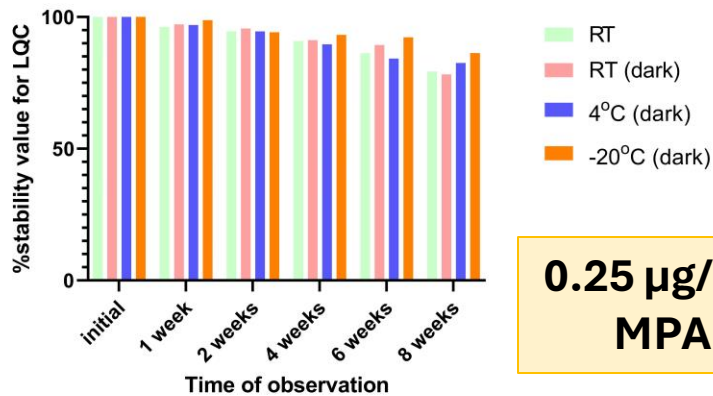
22 niecałkowicie napełnionych próbników VAMS (3.21%)



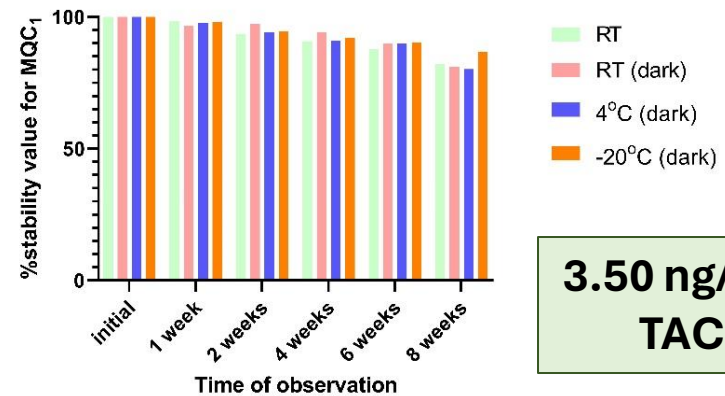
B1 – pusty VAMS,
B2 – poprawnie
pobrana próbka,
B3 – niecałkowicie
pobrana próbka
B4 – „przeładowana”
próbka



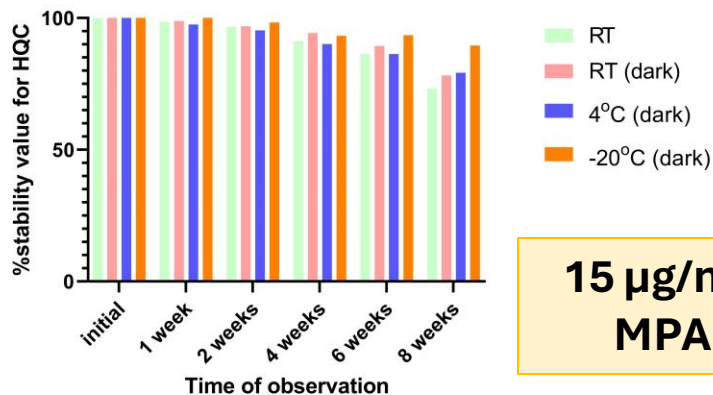
A co ze stabilnością próbek?



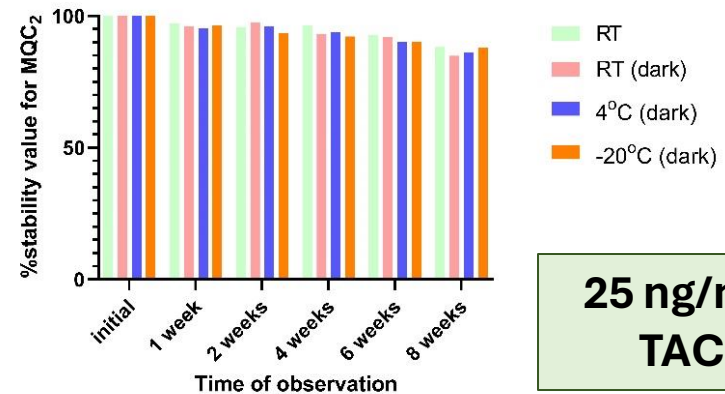
**0.25 µg/mL
MPA**



**3.50 ng/mL
TAC**



**15 µg/mL
MPA**



**25 ng/mL
TAC**

Pytanie z ankiety przeprowadzonej przez nasz zespół wśród ośrodków bazy CERTAIN:

Does your facility routinely measure the level of tacrolimus in the blood sent by a patient from home or another hospital?

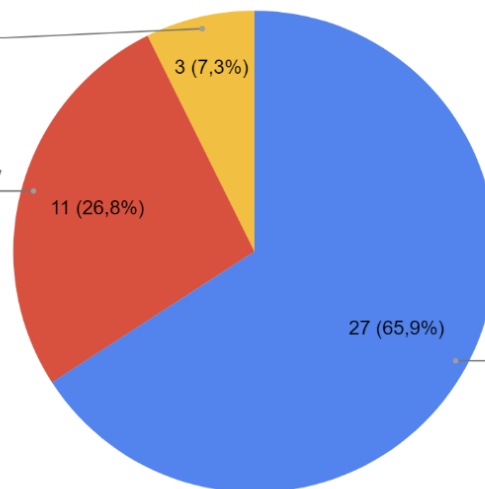
How is blood collected to routinely measure the level of tacrolimus?

Self-collected by patient or caregiver

7,3%

Collected by HCPs outside of Facility

26,8%



Collected by HCPs at Facility
65,9%

At 7.3% sites blood is self-collected by patient or a caregiver at home.

Podziękowania dla Krzysztofa Sienickiego (WisePatient) za pomoc w przygotowaniu ankiety i opracowaniu jej wyników

Co można, a czego nie można oznaczyć w mikropróbkach?

HEMATOKRYT, HEMOGLOBINA, ale **MORFOLOGIA** już nie...

CHEMIA KLINICZNA

KOAGULOLOGIA

IMMUNOLOGIA – częściowo tak

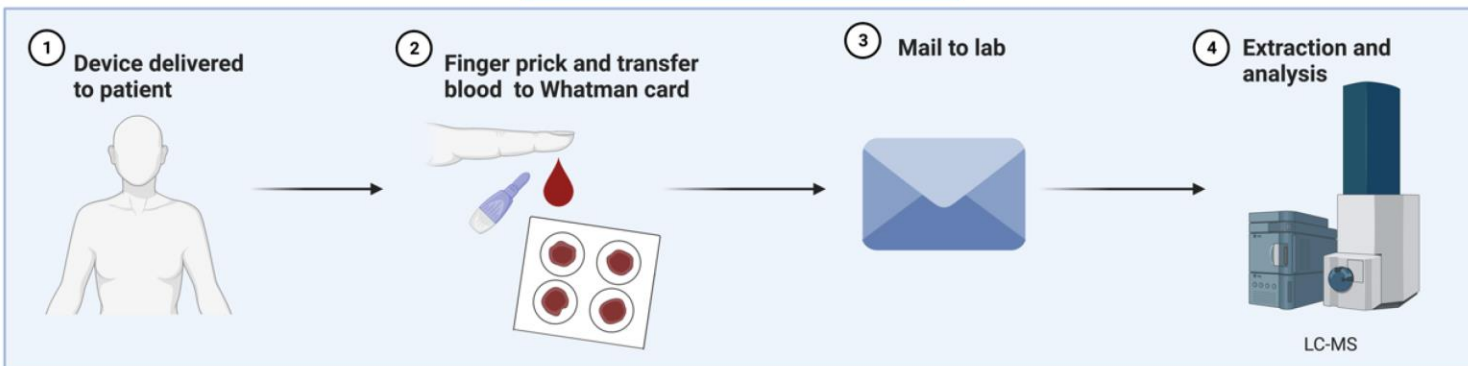
TERAPIA MONITOROWANA STĘŻENIEM LEKU:

- antybiotyki, leki przeciwwirusowe, leki przeciwgrzybicze;
- immunosupresanty;
- leki immunomodulujące, przeciwciała monoklonalne;
- leki kardiologiczne;
- leki przeciwkrzepliwe;
- leki przeciwpadaczkowe, przeciwdepresyjne, psychotropowe, itd.

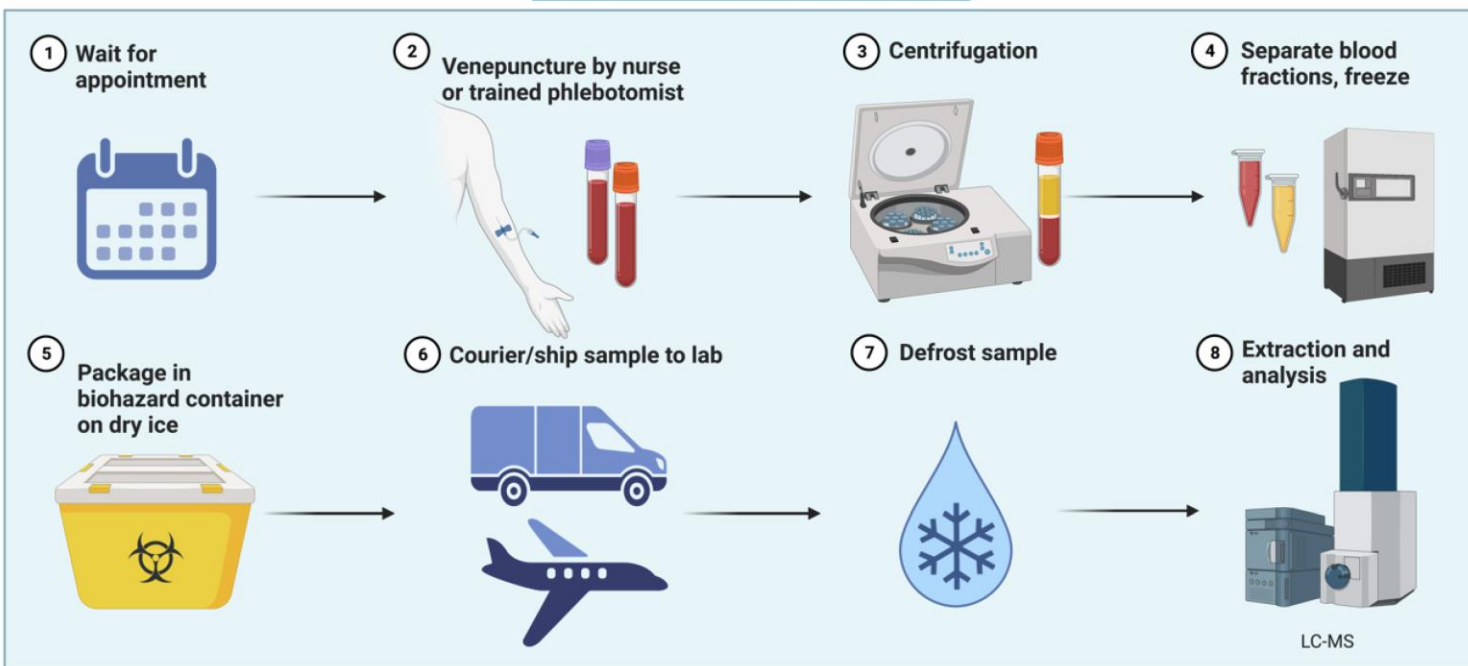
TOKSYKOLOGIA



Microsampling Workflow



Venepuncture Workflow



Roberts, J.L.; Whiley, L.; Gray, N.; Gay, M.; Lawler, N.G. Advanced Microsamples: Current Applications and Considerations for Mass Spectrometry-Based Metabolic Phenotyping Pipelines. *Separations* **2022**, *9*, 175. <https://doi.org/10.3390/separations9070175>

IMMUNOSUPRESANTY

- Opracowane w IP-CZD i WUM metody analityczne oznaczania: TAC, MPA, CSA, SIR (RAPA), EVE, ale również możliwe monitorowanie: poziomu kreatyniny, kwasu moczowego, mocznika, czy toksyn mocznicowych, takich jak TMAO.
- Potwierdzona skuteczność (możliwość) samodzielnego pobierania próbek VAMS w warunkach domowych przez pacjentów – w tym kontrola adherence.
- Potwierdzona możliwość oznaczania próbek w ramach tzw. profili farmakokinetycznych – badanie aktualnie prowadzone w Poradni Transplantacji Nerek

ANTYBIOTYKI

W literaturze opisane:

- AMIKACYNA
- AMPICYLINA
- CEFEPIM
- CEFTRIAXON
- FOSFOMYCYNA
- GENTAMYCYNA
- **MEROPENEM**
- PIPERACYLINA
- TAZOBAKTAM
- **WANKOMYCYNA...**

... ale tylko dla meropenemu i wankomycyny dokonano walidacji klinicznej, tj. dokonano korelacji próbek (osocze vs VAMS)



„Wpływ dawkowania ukierunkowanego na cel, opartego na modelu farmakokinetyki klinicznej leków przeciwdrobnoustrojowych, na wynik kliniczny i jakość życia dzieci i noworodków - analiza bezpieczeństwa, skuteczności i opłacalności”.



AGENCJA
BADAŃ
MEDYCZNYCH

**OPRACOWANIE METOD
ANALITYCZNYCH DLA 50 ANALITÓW
OPARTYCH O TECHNIKĘ
MIKROSAMPLINGU**

Leki przeciwpadaczkowe



Clin Chem Lab Med 2020; 58(5): 828–835

DE GRUYTER

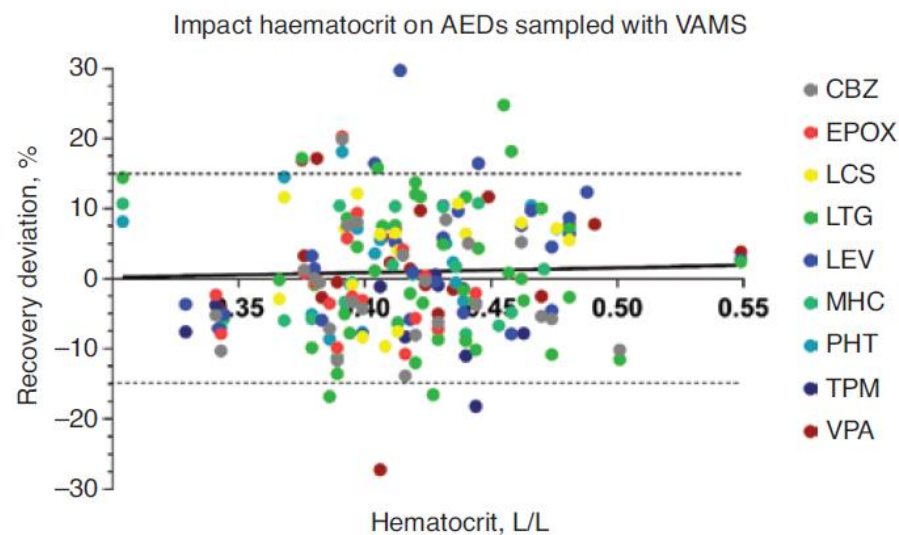
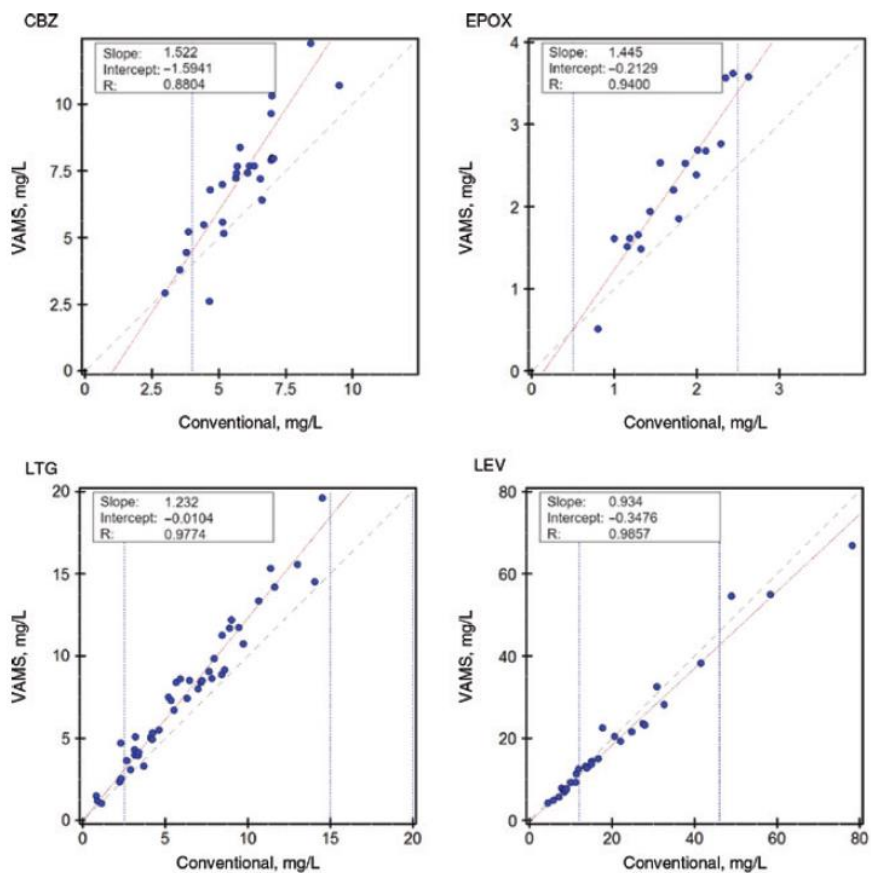
Thierry P.I.J.M. Canisius, J.W.P. Hans Soons*, Pauline Verschuure,
Emmeke A. Wammes-van der Heijden, Rob P.W. Rouhl and H.J. Marian Majoie

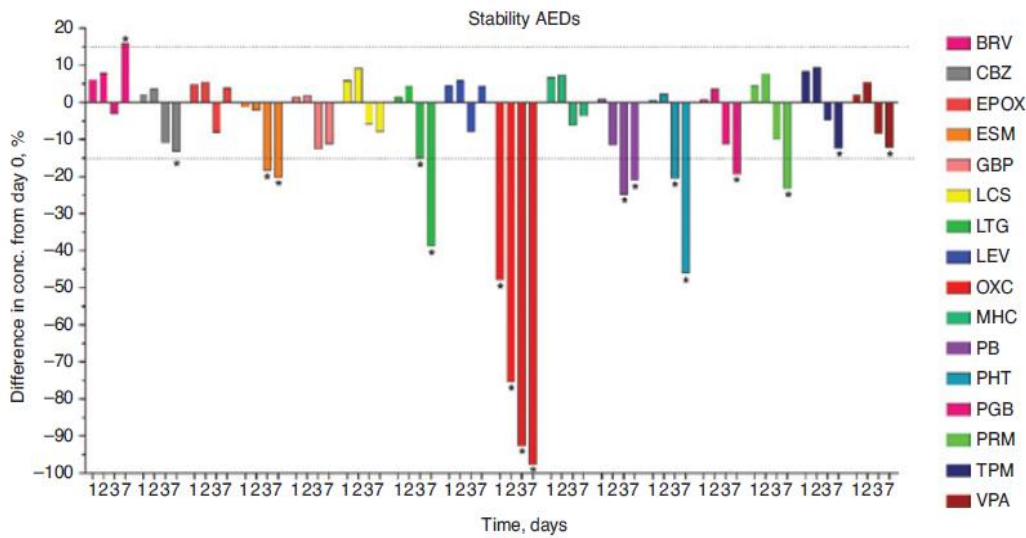
Therapeutic drug monitoring of anti-epileptic drugs – a clinical verification of volumetric absorptive micro sampling

- **14 leków p/padaczkowych plus 2 aktywne metabolity**
 - karbamazepina, okskarbazepina, primidon, fenytoina, etosuximid, fenobarbital, gabapentyna, topiramát, kwas walproinowy, lakoamid, levetiracetam, brivaracetam
- 138 pacjentów
- **wysoka korelacja pomiędzy VAMS a klasyczną metodą** (oznaczenia w surowicy) ($R > 0.9$) i odzysk $> 90\%$

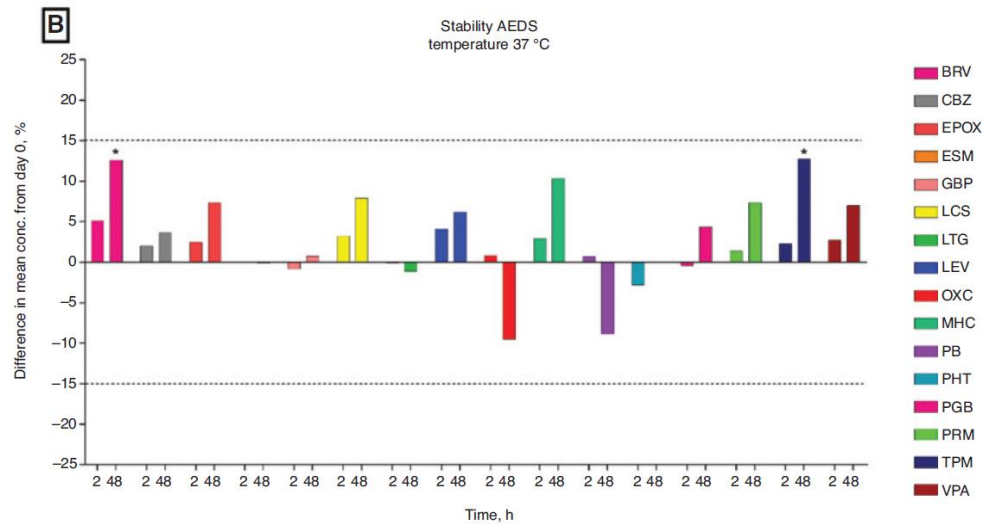
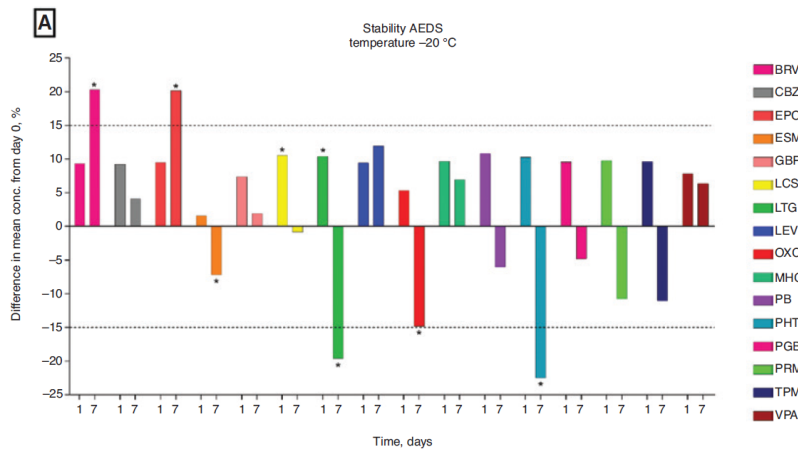
Wykazano korelację dla oznaczeń wykonywanych w surowicy (metoda konwencjonalna) oraz w krwi pobranej za pomocą systemu VAMS.

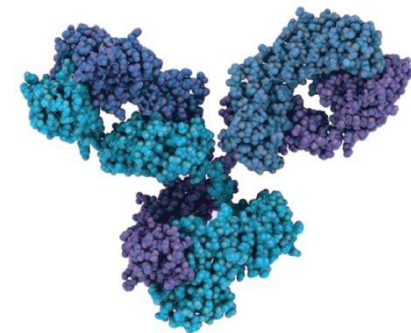
Wahania hematokrytu w zakresie 30-55% nie powodują zmian w stężeniu leków





- okskarbazepina jest skrajnie niestabilna w RT, ale jej żywotność wydłuża się w temperaturze -20 oraz 37°C
- czasy stabilności opisywane w innych publikacjach różnią się pod niższych- wymagana jest walidacja warunków przechowywania





Leki biologiczne



British Journal of Clinical
Pharmacology


Br J Clin Pharmacol (2017) 83 2474–2484 2474

PHARMACOKINETICS

Dried blood spots from finger prick facilitate therapeutic drug monitoring of adalimumab and anti-adalimumab in patients with inflammatory diseases

Correspondence Karien Bloem, Department of Immunopathology, Sanquin Research, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands. Tel.: +31 20 5123248; E-mail: k.bloem@sanquin.nl

Received 12 December 2016; **Revised** 30 May 2017; **Accepted** 4 July 2017

Eva L. Kneepkens¹, Mieke F. Pouw^{1,2}, Gerrit Jan Wolbink^{1,2}, Tiny Schaap³, Michael T. Nurmohamed^{1,4}, Annick de Vries³, Theo Rispens² and Karien Bloem^{2,3} 

- badanie obejmujące 161 pacjentów leczonych z powodu chorób zapalnych (reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczycą zesztyniające zapalenie stawów kręgosłupa)
- stężenie leku mierzone było za pomocą testu ELISA



- przechowywanie kart nie wpływało na stężenie adalimumabu (<3 miesięcy), albuminy oraz IgG
- stężenia leku w DBS są niższe niż w surowicy, ale nie wymagają korekty (CV%=7%)
- brak istotnego wpływu hematokrytu na wyniki oznaczenia



Table 1

Description and formula of five different methods to calculate serum fraction in order to convert DBS values into DBS-serum concentrations

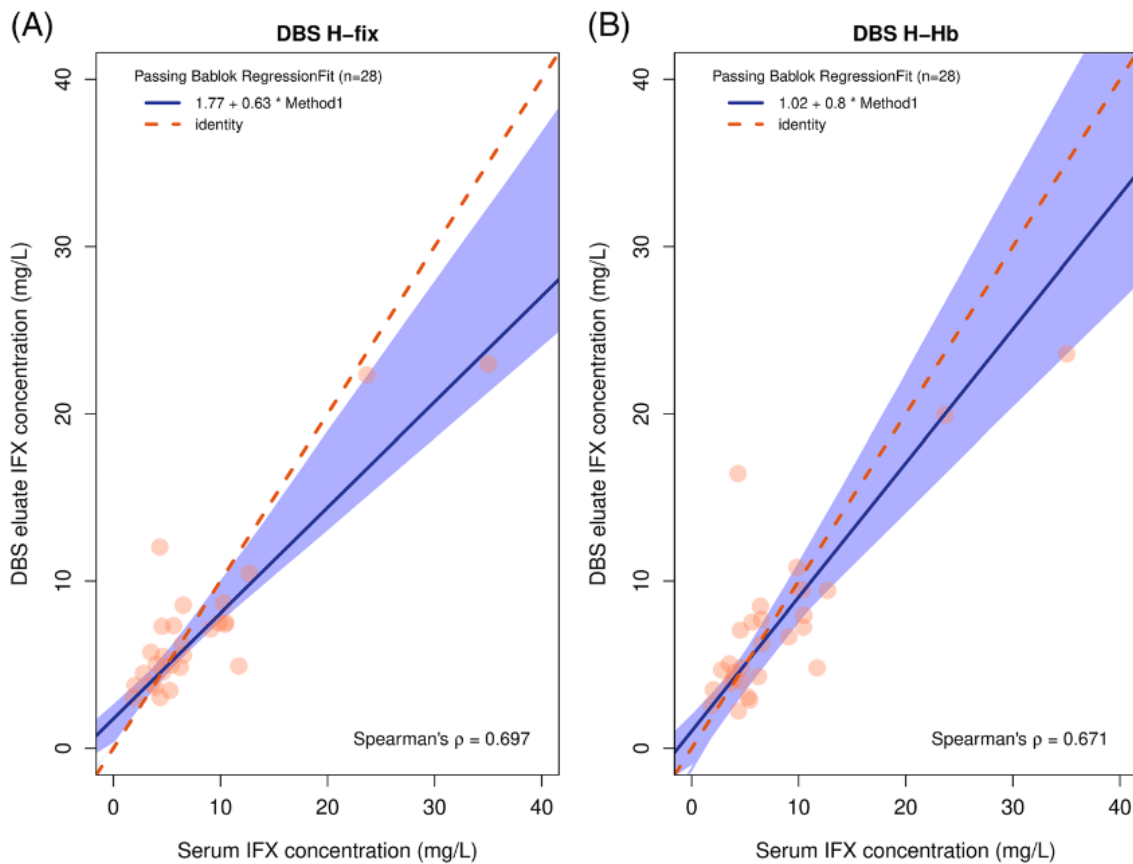
	Method	Description	Formula
Reference methods	Vp A	Serum fraction in DBS eluate is calculated with albumin marker protein concentrations in both serum and DBS eluate	$C_S = C_e \cdot \frac{alb_s}{alb_e}$
	Vp H	Serum fraction in DBS eluate is calculated by DBS area in combination with the Vp Hct	$C_S = C_e \cdot \frac{1}{1 - Hct} \cdot \frac{V_e}{A(Hct) \cdot (v_0 + v_1 \cdot Hct)}$
Diagnostic methods	DBS A42	Serum fraction in DBS eluate is estimated based on albumin marker protein concentration in DBS eluate and a fixed albumin concentration of 42 g l ⁻¹ in serum	$C_S = C_e \cdot \frac{42}{alb_e}$
	DBS H0.42	Serum fraction in DBS eluate is based on DBS area in combination with a fixed Hct factor of 0.42	$C_S = C_e \cdot \frac{1}{1 - 0.42} \cdot \frac{V_e}{A(Hct) \cdot (v_0 + v_1 \cdot 0.42)}$
	DBS Hcomp	Serum fraction in DBS eluate is based on DBS area in combination with a Hct factor computed from Hb measurements	$C_S = C_e \cdot \frac{1}{1 - Hct} \cdot \frac{V_e}{A(Hct) \cdot (v_0 + v_1 \cdot Hct)}$ $Hct = \frac{-v_0 + \sqrt{v_0^2 + 4 \cdot \frac{y \cdot Hb_e \cdot V_e}{A(Hct)} \cdot v_1}}{2 \cdot v_1}$

A(Hct) = area of the DBS; alb_e = albumin concentration in eluate; alb_s = albumin concentration in serum; c_e = concentration in DBS eluate; c_s = serum concentration; DBS = dried blood spot; Hb_e = Hb concentration in eluate; Hct = haematocrit; v₀ and v₁ = parameters determined by Hct dependent spreading of blood on filter paper; V_e = volume of the eluate; Vp = venepuncture; γ = conversion factor between Hb and Hct

Dried blood samples can support monitoring of infliximab concentrations in patients with inflammatory bowel disease: A clinical validation

Sophie E. Berends^{1,2}  | Geert R. A. M. D'Haens² | Tiny Schaap³ | Annick de Vries³ | Theo Rispens⁴ | Karien Bloem³  | Ron A. A. Mathôt¹

- 40 pacjentów (dorosłych) z chorobami zapalnymi jelit
- wielokrotne pobrania krwi:
 - w szpitalu przed dawką, w C_{max} , w 2, 3 i 5 tygodniu po wlewie
 - w domu: w 4 tygodniu po wlewie
- sprawdzono wpływ hematokrytu oraz samodzielnego pobrania na wyniki stężenia leku
- oznaczenia w DBS oraz w VAMS



- zarówno VAMS, jak i DBS są dobrymi narzędziami do pobrań krwi w kierunku oznaczenia stężenia infliximabu
- zmienność w próbkach pobieranych samodzielnie przez pacjentów była większa niż w uzyskiwanych w szpitalu, co wynika z braku doświadczenia

Microsampling w toksykologii

Quantitation of phosphatidylethanol in dried blood after volumetric absorptive microsampling

Katleen Van Uytvanghe^a, Maria del Mar Ramirez Fernandez^b, Aurelie De Vos^a, Sarah MR. Wille^b, Christophe Pol Stove^{a,*}



^a *Laboratory of Toxicology, Department of Bioanalysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ottergemsesteenweg 460, 9000, Ghent, Belgium*

^b *Federal Public Service Justice, National Institute of Criminalistics and Criminology, Chaussée de Vilvorde 100, 1120, Brussels, Belgium*

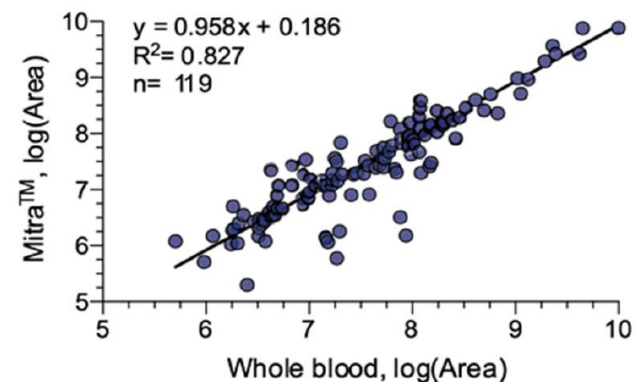
- fosfatydyloetanol (PEth)- wrażliwy i specyficzny marker spożycia etanolu
 - powstaje z połączenia fosfolipidu z etanolem
 - 40-50g etanolu/ dobę przez ponad 3 tygodnie
 - $t_{1/2}$ 4-7 dni przy zachowaniu abstynencji (wykrywany do 1 miesiąca)
- badanie wykazało, że zastosowanie suchej matrycy jest wskazane przy analizie w kierunku PEth ze względu na znacznie wydłużoną stabilność związku oraz na ograniczenie powstawania markera *ex vivo*

Article

New Trend in Toxicological Screening Using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) and High-Resolution Mass Spectrometry (HR/MS) Combination

Pascal Houzé ^{1,2,*}, Ilona Borowski ¹, Eugénie Bito ¹, Romain Magny ^{1,3}, Athina Morcos ¹, Sebastian Voicu ^{3,4}, Bruno Mégarbane ^{3,4}  and Laurence Labat ^{1,4} 

- opracowanie metodyki pozwalającej na identyfikację 87 z 90 planowanych do oznaczenia związków
- dla większości związków LoD < 12.5 ng/mL
- wysoka zgodność pomiędzy wynikami w krwi pełnej i VAMS
- możliwość przechowywania próbek przez długi czas (RT do 7 dni; -20°C kilka miesięcy)



Oznaczenia metali

BIOANALYSIS, VOL. 16, NO. 4 | RESEARCH ARTICLE

Validation of Mitra[®] VAMS[®] as a blood collection technique for trace elements analysis using ICP-MS/MS

Anthony Breton , Ciprian Mihai Cirtiu  , Cyril Muehlethaler, James Rudge & Normand Fleury

Published Online: 16 Jan 2024 | <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0180>

BIOANALYSIS, VOL. 15, NO. 2 | RESEARCH ARTICLE

Method development for the quantification of lead levels in whole blood sampled on Mitra[®] with VAMS[®] tips by inductively coupled plasma-MS/MS

Anthony Breton , Ciprian Mihai Cirtiu  , Normand Fleury, André Lajeunesse & James Rudge

Published Online: 9 Mar 2023 | <https://doi.org/10.4155/bio-2022-0242>