

化学发光微粒子免疫法在测定他克莫司血药浓度中的作用

汪 涛(陕西省安康市中医医院检验科 725000)

【摘要】 目的 评价分析化学发光微粒子免疫法(CMIA)在测定他克莫司血药浓度检测中的作用。**方法** 回顾性分析西安交通大学第一附属医院收集的 60 例肝肾移植患者血液标本,并将收集的血液标本均实施 CMIA 测定他克莫司血药浓度,同时采用 Architect i2000 自动免疫分析系统对他克莫司定值质控品连续测定 5 d,计算他克莫司定值质控品斜率、非线性度、截距、漂移度和携带污染率。**结果** 连续测定 5 d 各水平质控品测定值和靶值的偏差在允许范围内,总不精密度(CV)也在可以接受的范围内;同时连续测定 5 d 他克莫司质控品截距平均值为 12.17,非线性度平均值为 0.65,斜率平均值为 7.62,漂移度平均值为 0.15,携带污染率为 -0.12%,斜率和截距差异均有统计学意义($P < 0.05$),携带污染率、非线性度及漂移度和用刻度因子(中值-低值)进行校正后斜率差异无统计学意义($P > 0.05$)。335 份血液标本浓度在 3~20 $\mu\text{g/L}$ 的治疗浓度范围内有 281 份,占 83.89%。**结论** CMIA 在他克莫司免疫抑制剂血药浓度测定中具有良好的精密度和准确度,同时性能指标也符合临床基本要求,可以作为他克莫司免疫抑制剂血药浓度检测首选方法。

【关键词】 血药浓度监测; 化学发光微粒子免疫法; 他克莫司; 精密度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)23-3502-03

Effect of CMIA on the determination of tacrolimus WANG Tao(Department of Clinical Laboratory, Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang, Shaanxi 725000, China)

【Abstract】 Objective To analyze and evaluate the effect of chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) on determination of tacrolimus. **Methods** 60 cases of blood samples were collected from patients received liver or renal transplantation in the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, and detected the blood concentration of tacrolimus by CMIA. Architect i2000 automatic immunoassay system was used to detect the quality controls of tacrolimus for 5 d in a row, so as to calculate the slope, nonlinearity, intercept, driftance and contamination rate of tacrolimus fixed value quality control. **Results** After 5-day continuous detection, the results showed that the deviations between measured values and target values of the quality controls with different tacrolimus concentrations as well as the coefficient of variation (CV) were within the allowable range. The average intercept, nonlinearity, slope, driftance and contamination rate of 5-day continuous detection were 12.17, 0.65, 7.62, 0.15, and -0.12%, respectively. The differences both of slope and intercept were significant ($P < 0.05$). The contamination rate, nonlinearity, driftance, and the slope correction with calibration factors (median value-low value) had no significantly difference ($P > 0.05$). Among 335 cases of samples, there were 281 cases (83.89%), within the tacrolimus therapeutic range (3~20 $\mu\text{g/L}$). **Conclusion** The CMIA determination of tacrolimus has good tightness and accuracy, and its performance indicators also meet the clinical basic requirements. It is a preferred method for the detection of tacrolimus concentration in blood.

【Key words】 determination of blood drug concentration; chemiluminescent microparticle immunoassay; tacrolimus; precision

他克莫司是临床应用较为广泛的大环内酯类抗菌药物,目前被广泛应用在接受器官移植的患者。他克莫司血药浓度监测不仅能够为临床医生制订和调整用药方案提供重要依据,同时对保证临床药物应用的安全性和有效性也具有重要的作用和价值^[1]。目前国内外血药浓度测定的方法主要有高效毛细管电泳法、高效液相质谱联用法、放射免疫法和酶联免疫吸附试验、化学发光微粒子免疫法(CMIA)、微粒子酶免疫法^[2]。其中 CMIA 是测定免疫抑制剂血药浓度的一种高灵敏度的监测新方法。本研究为了分析 CMIA 在测定他克莫司血药浓度中的效果,特对 60 例来自 2012 年 10 月到 2014 年 10 月西安

交通大学第一附属医院接受肝肾移植患者血液标本进行分析,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 10 月到 2014 年 10 月来西安交通大学第一附属医院接受肾移植或肝移植患者的临床资料,共 60 例,其中男 34 例、女 26 例,年龄 15~70 岁、平均(42.63±5.74)岁,平均体重(64.75±2.34)kg。本组所有患者均实施他克莫司药物治疗,他克莫司每隔 12 h 服药一次,肝移植患者剂量为 0.1~0.2 mg/kg,肾移植患者剂量为 0.15~0.30 mg/kg,分 2 次口服。血样标本采集时间为患者服药前 30

min,每例患者分别取 3 mL 上肢静脉血液,并放置在 EDTA-K₂ 抗凝管中,患者所有血标标本均在当日进行检测,共检测 335 份血液标本。

1.2 仪器与试剂 CIMA 主要采用美国雅培公司生产的 Architect i2000 自动免疫分析系统及其相应的标准品和配套的 Tacrolimus 试剂盒;质控品为美国 BIO-RAD 公司提供的定值质控品,他克莫司定值质控品的低值为 4.90 ng/mL,中值为 12.10 ng/mL,高值为 20.70 ng/mL。漩涡混合器主要采用德国 IKA 公司生产的 Vortex Genius3 型号。

1.3 检测方法

1.3.1 标本处理 CMIA 测定血标标本时,常规开机后,24 h 运转,并给予常规保养,将试剂放置在仪器试剂仓中,配套标准品在定标后每次测试需要进行室内质控。然后将所有的质控品、标准品及临床样品均按照以下测定方式进行分析:首先在 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 样品,然后再加入 200 μ L 前处理液,并采用漩涡混合器进行充分漩涡,再在 13 000 r/min 高速台式离心机(美国 Heraeus 公司生产)下离心 6 min。离心结束后将上清液顺序倒入样品杯中上机测试,30 min 后自动打印测试结果。另外应保证所有质控品全部在控。他克莫司药物最低检测限值小于或等于 15.0 ng/mL,线性范围为 2.0~30.0 ng/mL。

1.3.2 定值质控品的处理 采用 1.3.1 标本处理方法每天按照中、中、高、低、中、中、低、低、高、高、中的顺序对定值质控品测定各 1 次,其中前 2 个中值检测结果不纳入研究,而后几项检测中,若有 1 个不合格时应对该批所有数据进行重新测定,连续 5 d 记录有效数据,同时保证所有质控品全部在控。

1.3.3 两种质控品检测结果评定方式 采用 Architect i2000 自动免疫分析系统对他克莫司质控品进行检测评价:(1)测定值和靶值偏倚分析时,计算每天各水平质控品测定值均值和各级质控品测定值总均值和靶值的差值,同时根据差值不超过 $\pm 15\% \times$ 靶值的标准进行判断差值是否在可以接受的范围内。(2)总不精密度(CV)的接受范围,总 CV 接受范围主要根据文

献提供的计算方法进行计算,同时采用试剂盒说明书提供的 CV 允许范围($CV < 8\%$)为标准进行判断总 CV 接受范围。(3)质控品测定结果多元回归分析,采用多元回归分析法对质控品测定值进行分析,同时计算其斜率、非线性度、截距、漂移度和携带污染率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件对本研究检测数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示,采用 *t* 进行检验,同时采用多元回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 他克莫司质控品测定值与靶值偏差分析 见表 1。采用 Architect i2000 自动免疫分析系统对他克莫司质控品连续 5 d 中、高低各水平质控品测定值均值和靶值的结果分析得知,连续测定 5 d 各水平质控品测定值和靶值偏差在允许范围内。

2.2 总 CV 分析结果 见表 2。由他克莫司各级质控品测定结果可以得出总 CV,分析结果可以得知,连续测定 5 d 各水平质控品测定值和靶值的总 CV 在可以接受的范围内。

2.3 CMIA 检测 60 例患者临床血液标本结果分析 本研究采用 CMIA 检测 60 例患者 335 份血液标本分析得知,335 份血液标本浓度在 3~20 μ g/L 的治疗浓度范围内有 281 份,占 83.89%,见表 3。

2.4 移植后不同时间测定结果分析 见表 4。将他克莫司全血浓度测定按照移植后时间进行分组比较标本频率和血药浓度平均值可以得知,移植后不同患者他克莫司全血浓度实测值相差较大,说明存在较大的个体差异。

表 1 他克莫司各级质控品测定结果分析(ng/mL)

测定项目	测定值均值					总均值 (Y)	靶值 (C)	差值 (D)	允许 偏差
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天				
高值	19.74	19.64	19.87	20.03	20.77	20.01	20.70	-0.69	± 3.10
中值	11.94	12.18	11.46	11.50	11.61	11.74	12.11	-0.37	± 1.82
低值	4.98	4.64	4.78	4.71	4.67	4.76	4.92	-0.16	± 0.74

注:D=Y-C;允许偏差范围为 $\pm 15\% \times$ 靶值。

表 2 他克莫司质控品连续 5 d 检测各水平质控品 CV 结果

测定项目	每天均值 方差(S)	总批内 方差(R)	校正日间 方差(T)	总不精密 度方差(U)	总不精密 度标准差(V)	总均值 (ng/mL)	CV(%)
高值	0.19	1.40	0.000	1.130	0.560	20.01	2.81
中值	0.10	0.75	0.000	0.600	0.300	11.74	2.55
低值	0.02	0.50	0.004	0.046	0.023	4.76	0.48

注: $t=S-R/3$,当 $T < 0.00$ 时,计为 0.00; $U=R+T$; $V=U/2$; $CV=V/\text{总均值} \times 100\%$ 。

表 3 335 份血液标本全血浓度测定范围

浓度范围(ng/mL)	样品数(n)	百分比(%)
≤ 3	32	9.56
$> 3 \sim 5$	81	24.18
$> 5 \sim 8$	74	22.09
$> 8 \sim 10$	83	24.78
$> 10 \sim 15$	31	9.25
$> 15 \sim 20$	12	3.58
> 20	22	3.57

表 4 不同时间他克莫司全血浓度测定结果分析

术后时间(个月)	n	百分比(%)	全血浓度($\bar{x} \pm s$, ng/mL)
≤ 1	53	15.82	13.42 ± 5.36
$> 1 \sim 3$	81	24.18	9.12 ± 3.23
$> 3 \sim 6$	60	17.91	7.16 ± 2.27
$> 6 \sim 12$	74	22.09	6.35 ± 1.38
> 12	67	20.00	5.36 ± 0.18

2.5 多元回归分析 通过对本研究连续测定 5 d 他克莫司各

级水平质控品分析,并通过对他克莫司质控品斜率、非线性度、截距、漂移度和携带污染率分析得知,连续测定 5 d 他克莫司质控品截距的平均值为 12.17,非线性度平均值为 0.65,斜率平均值为 7.62,漂移度平均值为 0.15,携带污染率为 -0.12% 。其中斜率和截距差异均有统计学意义($P < 0.05$),携带污染率、非线性度及漂移度和用刻度因子(中值—低值)进行校正后斜率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

他克莫司是目前临床常用的大环内酯类免疫抑制剂,此种药物首次用于临床是在 1989 年,其主要是从驻波链霉菌中发酵、纯化分离出来的一种新型的免疫抑制剂。国外有关学者研究表明,他克莫司的免疫抑制作用主要是通过对 T 细胞释放白细胞介素-2 和白细胞介素-3、干扰素而达到抑制作用,其不仅能够有效提高移植后肾存活率,同时对降低不良反应也具有重要作用^[3]。目前此种药物已经被广泛应用在预防移植患者急性或者慢性排斥反应中,但是由于他克莫司药物个体吸收率和清除率差别较大,同时具有治疗范围狭窄及口服吸收生物利用度低,用药剂量与血药浓度缺乏紧密的相关性,从而增加临床给药的难度^[4-5]。因此,在使用他克莫司对肝肾移植患者治疗中,应注意对患者的血药浓度进行测定,及时根据患者的特点进行调整药物,最大限度减少药物对患者肾脏的损坏,抑制不良反应发生。

目前临床常用的监测血药浓度的方法有微粒子酶免疫法、高效液相色谱法及化学发光法等,不同的检测方法由于检测原理不同,对标本提取的方法及对代谢物识别方法不同等,所以检测结果也有所不同。近年来,临床最常用的检测他克莫司免疫抑制剂的方法为微粒子酶免疫分析法(MEIA)。但是随着 CMIA 的推出,CMIA 逐渐将 MEIA 代替。CMIA 是近年来发展起来的一种新型的高灵敏度检测技术,其技术原理主要为:首先采用吖啶酯进行标记他克莫司分子作为酶竞争物,然后采用他克莫司单克隆抗体包被的顺次微珠作为捕获物。在对检测血液样品进行测定时,首先对样品进行前处理,再将处理完后的样品和包被单抗的顺次微珠相互混合,加入吖啶酯标记的他克莫司作为酶竞争物,并与微珠上的他克莫司药物抗体进行结合,接种采用磁场促使微珠分离,清洗后再将预激活法和激发试剂产生化学发光反应,最后根据标准曲线得出他克莫司的浓度^[6]。美国雅培公司生产的试剂盒就是根据此原理进行设计的。另外,多数学者研究表明,美国雅培公司生产的 CMIA 他克莫司测定试剂盒在 Architect i2000 自动免疫分析系统中应用,不仅自动化程度高,同时其准确性和精密度也非常高,目前此种技术已经得到广泛应用,但是由于此系统价格和维修费用较高,所以基层医院使用较少^[7]。另外还有研究表明,Architect i2000 自动免疫分析系统中配套使用的他克莫司检测试剂盒的包被载体为此类颗粒,其不仅能够有效增加反应表面积,提高检测的灵敏度,缩短检测时间,同时在检测中通过采用磁力吸附法进行分离磁颗粒能够进一步提高检测的特异性^[8]。

本研究结果表明,连续测定 5 d 各水平质控品测定值和靶值的偏差以及总 CV 均在允许接受的范围内,同时连续测定 5 d 他克莫司质控品截距平均值为 12.17,非线性度平均值为 0.65,斜率平均值为 7.62,漂移度平均值为 0.15,携带污染率

为 -0.12% ,斜率和截距差异有统计学意义($P < 0.05$),说明定值质控品测定值和参考值具有恒定误差;携带污染率、非线性度、漂移度和用刻度因子(中值—低值)进行校正后斜率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 CMIA 具有非常好的线性关系。关于肝肾移植后他克莫司的理想治疗范围一般推荐为移植后初期 12 h 全血浓度在 $5 \sim 20$ ng/mL。本研究结果显示,335 份血液标本浓度在 $3 \sim 20$ $\mu\text{g/L}$ 的治疗浓度范围内有 281 份,占 83.89%,移植后不同患者他克莫司全血浓度实测值相差较大,说明存在较大的个体差异。因此临床应针对检测结果,构建新的治疗窗,同时加强与临床医生和药师之间的沟通,能够为临床肝和肾移植患者制订切实、有效、合理的治疗方案,最大限度减少肝和肾移植患者临床用药的不良反应及排斥反应,提高患者预后^[9]。

综上所述,他克莫司免疫抑制剂血药浓度测定中 CMIA 的应用,不仅准确度和精密度较高,同时携带污染率及漂移度对 CMIA 测定结果没有影响,性能指标可靠性高。另外,应注意由于不同患者个体间的他克莫司吸收和代谢存在差异,因此临床对患者实施他克莫司治疗应定期监测血药浓度,根据血药浓度给予患者最佳的剂量,减少毒副反应。

参考文献

- [1] 冯艳青,刘振红,张杨丽. 三种他克莫司测定试剂盒测定移植病人全血中他克莫司浓度的比较[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(8):1993-1996.
- [2] 于翠霞,樊宏伟,胡云芳. 化学发光微粒子免疫法研究甲钴胺在健康人体内的药动学和生物等效性[J]. 中国药师,2014,17(10):1619-1622.
- [3] Muduma G, Shaw J, Hart WM, et al. Odeyemi A3Cost utility analysis of immunosuppressive regimens in adult renal transplant recipients in England and Wales[J]. Patient Preference Adherence, 2014,4(8):1537-1546.
- [4] 袁梅,张弋. 中药、中药成分与常见食物对他克莫司血药浓度的影响[J]. 药品评价,2013,10(16):20-24.
- [5] Patel J, Kobashigawa JA. Quest for lower immunosuppression in cardiac transplantation: an analysis of the TICTAC trial[J]. Future Cardiol, 2011,7(3):293-297.
- [6] 祁洪刚,翁锡君,任雨,等. 肾移植后早期转换西罗莫司治疗对肾小球滤过率影响的临床观察[J]. 现代实用医学, 2012,24(8):891-893.
- [7] 刘旭华,戚润鹏. 化学发光微粒子免疫法监测他克莫司血药浓度的临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(11):1216-1218.
- [8] 夏宁,刘海菊,范久波. 雅培 i4000 快速测定血浆丙戊酸浓度及在儿科中的应用效果[J]. 现代中西医结合杂志, 2014,23(2):117-119.
- [9] 马连学,李艳菊,魏巍. 化学发光微粒免疫法和酶联免疫吸附法检测乙肝表面抗原的结果对比分析[J]. 中国实用医药,2014,9(9):89-90.