

# 酶放大免疫测定法和酶联免疫吸附法测定他克莫司血药浓度的比较

钱文璟\*,李璐,田洁,吴建龙(深圳市第二人民医院药学部,广东深圳 518035)

中图分类号 R969.1;R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)26-2424-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.26.10

**摘要** 目的:考察酶放大免疫测定法(EMIT)和酶联免疫吸附法(ELISA)测定他克莫司血药浓度的特点。方法:两种方法分别测定29名患者共35份全血样本中的他克莫司浓度,并比较两者间的相关性。结果:EMIT法测定他克莫司血药浓度结果高于ELISA法,两组间有极显著性差异( $P<0.01$ ),但两组结果相关性良好( $R^2=0.9203$ )。结论:两种方法均可用于常规的他克莫司治疗药物浓度监测。建议长期服用他克莫司的患者应相对固定地选用同一种方法检测血药浓度,以便为临床提供准确可靠的个性化用药依据。

**关键词** 他克莫司;血药浓度;酶放大免疫测定法;酶联免疫吸附法

## Comparison of the Determination of Blood Concentration of Tacrolimus by EMIT and ELISA

QIAN Wen-jing, LI Lu, TIAN Jie, WU Jian-long (Dept. of Pharmacy, Shenzhen Municipal Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the characteristics of EMIT and ELISA for the determination the blood concentration of tacrolimus. METHODS: 35 blood samples were collected from 29 patients. Assay of tacrolimus was based on EMIT and ELISA. RESULTS: The measurement value of EMIT was significant higher than that of ELISA, there was significant difference between 2 methods ( $P<0.01$ ); good relationship was found between 2 methods ( $R^2=0.9203$ ). CONCLUSIONS: 2 method are suitable for drug concentration monitoring of common tacrolimus. It is suggested to determine blood concentration of tacrolimus in patients receiving long-term therapy of tacrolimus by the same method in order to provide reference for accurate and reliable data of individual drug use.

**KEY WORDS** Tacrolimus; Blood concentration; EMIT; ELISA

VPA一级吸收和消除的一房室开放模型 $F=100\%$ <sup>[9]</sup>。

VPA的稳态血药浓度往往受到许多药物的影响<sup>[10]</sup>,且VPA是肝药酶抑制剂,可抑制其他药在肝脏的代谢<sup>[11]</sup>,加之其蛋白结合率很高,可影响其他药的治疗效果。本研究结果表明PB合用会减少VPA的稳态血药浓度,反而PT与CBZ对VPA的血药浓度影响不显著,VPA最低的血药浓度出现在与PB合用。合用时VPA浓度的降低很有可能是因为PB、PT、CBZ等能诱导肝微粒体酶,加速VPA的代谢。因此,临床上联合应用时应注意监测VPA游离血药浓度,及时调整给药。

总之,针对VPA的血药浓度波动及各影响因素,临床药师可以通过提醒患者服用VPA和血药浓度监测时需注意的事项,使患者配合监测,达到提高监测结果的准确性。同时在得到准确的监测结果后,与医师进行相互沟通,提高患者的用药疗效,使临床上能认识到血药浓度监测的必要性。另外,在对患者进行调整治疗时,往往需掌握患者过往的用药情况、疗效。因此,在进行VPA治疗时,需建立患者个人的详细资料及血药浓度监测档案,这样既能给患者当前的治疗提供可靠依据,又能为患者未来的治疗提供资料。

### 参考文献

[1] May T, Rambeck B. Serum concentrations of valproic acid: influence of dose and comedication[J]. *Ther Drug Monit*, 1985, 7(4): 387.

- [2] Levy RH, Pitlick WH, Eichelbaum M, et al. *Meta-bolism of antiepileptic drugs*[M]. New York: Raven Press, 1984: 115-125.
- [3] 林仰, 德巴金及维生素B<sub>6</sub>联合治疗癫痫的临床观察[J]. *实用医技杂志*, 2006, 13(10): 1684.
- [4] 全国神经外科癫痫防治协作组. 神经外科围手术期和外伤后癫痫的预防及治疗指南: 草案[J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(12): 1189.
- [5] 张少文, 张华年, 宋新文, 等. 660例抗癫痫药血药浓度监测分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(11): 920.
- [6] Minns RA, Brown JK, Blackwood DHR, et al. Valproate levels in children with epilepsy[J]. *Lancet*, 1982, 1(4): 677.
- [7] 郭玉娇, 王蔚青, 邵志高, 等. 我院2009年抗癫痫药物血药浓度监测结果分析[J]. *中国药房*, 2010, 21(28): 2658.
- [8] 姜德春. 丙戊酸钠各种剂型的药代动力学[J]. *中国当代儿科学杂志*, 2001, 3(4): 430.
- [9] 陈刚. 治疗药物监测: 理论与实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 398.
- [10] 蒋艳, 钱爱而, 邹素兰, 等. 丙戊酸血药浓度监测的临床评价[J]. *中国药房*, 2007, 18(23): 1840.
- [11] 张敬军, 俞丽云, 霍治平, 等. 丙戊酸钠与苯妥英钠或卡马西平相互作用的血浓度观察[J]. *中国医院药学杂志*, 1995, 15(12): 539.

(收稿日期: 2013-01-22 修回日期: 2013-02-20)

\* 副主任药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学、治疗药物监测。电话: 0755-83366388-2297。E-mail: qianwenjing@163.com

他克莫司(Tacrolimus, FK506)是从土壤真菌中提取的一种大环内酯类物质,为选择性T淋巴细胞钙调神经磷酸酶抑制剂,其体外免疫抑制作用为环孢菌素A的50~100倍。作为第2代免疫抑制剂的代表性药物,其广泛应用于器官移植术后抗排斥反应和某些自身免疫性疾病的治疗,具有药效强、使用剂量低、器官存活率高、急性排斥反应低等特点。他克莫司存在一定毒性,不良反应类似于环孢菌素,包括肾毒性、神经毒性、消化系统不适、葡萄糖不耐受等。他克莫司的有效血药浓度范围窄,血药浓度受诸多因素影响,不同患者体内的药动学参数个体差异大,因此,临床使用时有必要进行治疗药物监测(Therapeutic drug monitoring, TDM)。而不同监测方法测定结果的准确性是衡量血药浓度对临床治疗评价的关键。本文考察目前国内临床普遍认同并比较常用的两种临床检测方法:酶放大免疫测定(Enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT)法和酶联免疫吸附(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法在他克莫司血药浓度测定方面的特点。本研究国内尚无报道,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Viva-E(生化分析仪(德国西门子公司));DNM-9602型酶标分析仪(北京普朗公司);VORTEX-5涡旋混合器(海门其林贝尔公司);XK96型微量振荡器(姜堰市新康医疗器械有限公司);高速离心机(美国雅培公司)。

### 1.2 试剂

Emi<sup>®</sup> 2000他克莫司检测试剂(批号:8R019UL-E2)、标准液(批号:8R019UL-E3)、预处理试剂(批号:8R019UL-E1)、质控试剂(Tac/CsA Control)(批号:1284)均为德国西门子公司提供;PRO-Trac<sup>™</sup> II Tacrolimus Elisa Kit(96人份)检测试剂、标准及质控试剂(意大利Diasorin公司,批号:129011)。

### 1.3 临床资料

29位患者,其中肝移植术后患者3例,肾移植术后患者22例,肾病患者4例。男性21例,女性8例,年龄11~61岁。器官移植时间、用药时间14d~12年,肝肾功能基本正常。

## 2 方法

采用EMIT法和ELISA法两种检测方法测定患者他克莫司血药浓度。两份均使用全血样本,患者抽血时间为用药后12h的次晨(空腹),全血样本收集于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K)抗凝管中备用。取血当天用两种方法分别测定。

### 2.1 测定方法

2.1.1 EMIT法:1.5 ml离心管中先加入预处理试剂50 μl和沉淀剂(甲醇)200 μl,混匀,分别吸取6个浓度的标准液、各浓度的质控品、全血样本200 μl缓慢加入管中,立即充分涡旋混合30 s,静置2 min,10 800 r/min离心10 min,离心结束后倾倒入所有上清液置样品管中上机测定。定标曲线完成后,仪器可自动拟合出质控品和样品的浓度结果。

2.1.2 ELISA法:分别吸取6个浓度的标准液、低、高两个浓度的质控品,全血样本各25 μl加入1.5 ml离心管中,加入150 μl消化液,涡旋混合器上充分混匀,室温孵育15 min,75 ℃水浴箱中孵育15 min,取出后立即混匀,10 800 r/min离心10 min,离心结束后吸取上清液100 μl加入酶标微孔板中,各孔中再分别加抗体50 μl,放在振荡器上振荡(振幅:700次/min)30 min后,每孔加入稀释酶液50 μl,室温振荡60 min。震荡结束后用洗板液洗微孔板3次并拍干孔内液体,每孔加入底物200 μl,

室温振荡15 min,加入终止液100 μl,轻轻摇晃混匀,立即在酶标仪450/630 nm双波长下测定吸光度,使用4PL软件制作标准曲线,计算各样品浓度值。

### 2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线及质控:(1)EMIT法使用新启用的试剂盒进行定标试验。标准曲线质量浓度分别为:0、2.5、5、10、20、30 ng/ml,线性范围为2~30 ng/ml。定标后每次测试均跟随低、中、高3个浓度水平的质控进行控制。当质控在规定限度范围内时,沿用首次的定标曲线;如质控超标,需重新定标。(2)ELISA法每次测试均同时做标准曲线,质量浓度梯度为:0、0.3、1、3、10、30 ng/ml,线性范围为1~30 ng/ml。并用 $c_1$ 、 $c_2$ 两个浓度水平的质控进行控制。

2.2.2 精密度试验:(1)日内精密度:EMIT法测定低、中、高3个浓度水平的质控样品,ELISA法测定 $c_1$ 、 $c_2$ 两个浓度水平的质控样品。同日内分别处理各质控样品各5份,依法测定,计算平均值和相对标准偏差。(2)日间精密度:连续10次测定质控样品,计算平均值和相对标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )。

2.2.3 回收率试验:测定的各浓度水平的质控品结果,分别用测得值除以质控样品标示量再乘以100%,即得回收率。

### 2.3 统计处理

采用SPSS 16.0统计分析软件对用两种不同检测方法测定结果作统计分析。

## 3 结果

### 3.1 两种检测方法的方法学考察

两种方法的测定结果均符合《中国药典》对生物样品检测RSD<15%的要求,结果见表1。

表1 EMIT法和ELISA法测定的精密度及回收率试验结果  
Fig 1 Precision and recovery of EMIT and ELISA

方法	质控靶值, ng/ml	日内精密度(n=5)			日间精密度(n=10)		
		$\bar{x} \pm s$ , ng/ml	RSD, %	回收率, %	$\bar{x} \pm s$ , ng/ml	RSD, %	回收率, %
EMIT法	5.0	5.0±0.36	7.1	100.4	5.5±0.83	15.2	109.9
	9.8	9.1±0.27	3.0	92.5	9.8±1.3	12.9	99.6
	19.0	17.1±1.6	9.4	90.0	18.8±1.8	9.6	98.8
ELISA法	2.0	2.3±0.069	0.3	113.8	2.1±0.15	7.4	102.6
	15.0	14.0±0.59	4.3	93.4	14.6±2.1	14.6	97.2

### 3.2 两种检测方法测定他克莫司血药浓度的相关性

两种检测方法所得结果及两组结果的平均值、差值见表2。EMIT法测定值(8.12±3.70)ng/ml明显高于ELISA法测定值(5.14±3.18)ng/ml。两组测定值进行配对t检验分析,结果, $t=15.88, P<0.01$ ,显示两组测定值之间的差异有非常显著的统计学意义。以ELISA法测定值为X轴,EMIT法测定值为Y值,绘制散点(见图1),拟合线性回归方程为: $Y=1.116 9X+2.376 2 (R^2=0.920 3)$ ,表明两组数据有较好的相关性。Bland-Altman曲线表示两种方法测定值的差值与均值之比(见图2),横坐标为两种方法同一样本两次检测结果的平均值之和,纵坐标为两种方法同一样本两次检测结果的平均值之差。结果,两种方法95%的一致性界限为(2.98±2.17) ng/ml<sup>[3]</sup>,绝大部分两种方法对应点落在95%的一致性界限内,仅1组数据落在界限外。表明两种方法测定结果的一致性较好。

## 4 讨论

他克莫司血药浓度测定的方法较多<sup>[2]</sup>,如:放射免疫分析法、ELISA法、EMIT法、微粒子酶免疫分析(Microparticle enzyme immunoassay, MEIA)法、液-质联用(LC-MS/MS)法、化

表2 EMIT法和ELISA法测定患者他克莫司谷质量浓度结果

Fig 2 Results of trough concentration of tacrolimus by EMIT and ELISA

序号	ELISA测定值, ng/ml	EMIT测定值, ng/ml	两种方法测定结果的平均值, ng/ml	两种方法测定结果的差值, ng/ml
1	5.98	8.9	7.44	2.92
2	7.99	10.7	9.35	2.71
3	5.40	7.0	6.20	1.60
4	3.49	5.5	4.50	2.01
5	3.39	4.6	4.00	1.21
6	6.67	8.2	7.44	1.53
7	2.10	4.9	3.50	2.80
8	1.73	4.6	3.17	2.87
9	4.20	8.9	6.55	4.70
10	5.20	10.1	7.65	4.90
11	4.37	9.2	6.79	4.83
12	3.19	5.8	4.50	2.61
13	7.18	10.6	8.89	3.42
14	1.67	3.5	2.59	1.83
15	5.29	8.2	6.75	2.91
16	3.66	5.8	4.73	2.14
17	10.67	16.3	13.49	5.63
18	6.29	10.9	8.60	4.61
19	6.30	10.6	8.45	4.30
20	3.00	5.0	4.00	2.00
21	2.00	3.9	2.95	1.90
22	2.04	5.0	3.52	2.96
23	7.39	10.3	8.85	2.91
24	16.85	19.5	18.18	2.65
25	0.93	2.1	1.52	1.17
26	4.25	7.4	5.83	3.15
27	11.10	15.7	13.40	4.60
28	3.86	7.4	5.63	3.54
29	5.30	8.0	6.65	2.70
30	5.78	8.0	6.89	2.22
31	5.78	8.3	7.04	2.52
32	3.83	8.5	5.17	4.67
33	8.25	11.3	9.78	3.05
34	2.18	5.3	3.74	3.12
35	2.68	6.2	4.44	3.52
$\bar{x} \pm s$	5.14 ± 3.18	8.12 ± 3.70	6.63 ± 3.41	2.98 ± 1.11

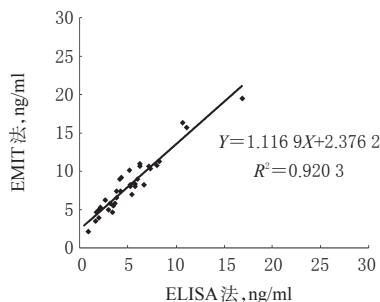


图1 EMIT法和ELISA法测定他克莫司浓度结果的相关性  
Fig 1 Correlation of the concentration of FK506 by EMIT and ELISA

学发光免疫分析(Chemistry luminescence immunoassay, CLIA)法、生物分析法等。

LC-MS/MS法被视为他克莫司血药浓度测定的“金标准”,

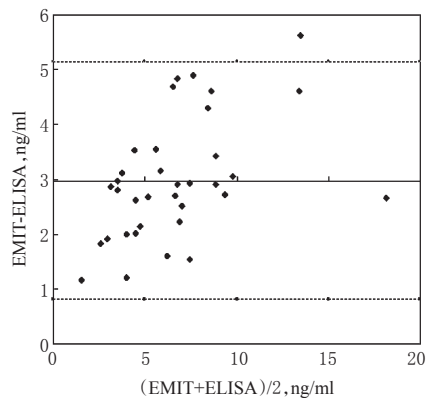


图2 EMIT法和ELISA法测定他克莫司浓度的Bland-Altman图

Fig 2 Bland-Altman plot of the concentration of FK506 by EMIT and ELISA

其方法学不受他克莫司体内代谢产物的影响,特异性高、专属性强、灵敏度高、检测限低(0.1 ng/ml)。但因其设备成本高,特别是对操作人员的专业技术水平要求高,样品前处理过程较繁琐、时间长,前处理方法学、色谱、质谱条件等因不同实验室而难以标准化操作,目前仍多应用于实验室研究,在临床常规检测中难以普及应用。而免疫分析法因试剂商品化、自动化程度高、准确性和重复性较好、检测速度快、操作方便等特性,在临床常规检测中得以广泛应用。比较常用的几种免疫分析方法:ELISA法的准确性和敏感性较好,设备及试剂成本较低,但检测过程较为繁琐,试验时长约4 h;MEIA法使用美国Abbott公司开发的全自动快速微粒子酶分析仪(IMx),自动化程度高,但近年该机型及配套试剂在全球已停止生产供应,目前我国已无法使用;EMIT法是20世纪70年代初开发应用的一种半定量的均相免疫分析法,Svya公司开发了自动化的Viva-E®生化分析仪,后由西门子公司收购,在我国国内各临床检验室广泛使用。

关于上述几种常用检测方法在他克莫司血药浓度结果的比对,已有一些研究结果<sup>[2-5]</sup>,不同的方法对样本提取的过程不同,对代谢物的识别亦不同,因此所得的结果也存在差异。但基本上公认的是,LC-MS/MS测定值一般低于免疫分析方法的结果<sup>[4]</sup>,是因为该方法能有效区分他克莫司和代谢产物,有效避免了抗原抗体反应中的交叉反应的情况。而两种免疫试剂的说明书<sup>[1-2]</sup>均提供证据证明本公司试剂测得结果与LC-MS/MS一致性良好。

本文考察EMIT法和ELISA法分别测定同一血样中他克莫司浓度的结果,显示:两种方法测定的结果有非常显著的统计学差异( $P < 0.01$ ),EMIT法结果显著高于ELISA法结果,但两法的相关性及一致性良好。这一结论与叶伟民等<sup>[4]</sup>认为MEIA法结果显著高于ELISA法、丁慧等<sup>[3]</sup>认为:EMIT法结果与MEIA法一致性好的结论一致,可以很好地相互印证。

由于免疫方法测定他克莫司浓度的影响因素很多<sup>[6]</sup>,为了客观评价两种方法的可靠性和准确性,本研究对整个操作过程作了严格要求:环境温度控制在 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,样本采集、存放、实验器具的选用等尽可能保持一致性,严格按照标准操作规程由同一操作者进行实验,以尽量减少偶然误差。绘制的质控图显示,两种方法日内、日间质控良好,变异符合有关规定。EMIT法的低浓度质控变异最大,ELISA法的高浓度质控变异

# 他克莫司血药浓度监测与合理用药分析

谢 华\*,王 荣,武晓玉,李文斌,张娟红,贾正平(兰州军区兰州总医院全军高原环境损伤防治重点实验室/全军临床药理基地,兰州 730050)

中图分类号 R979.5;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)26-2427-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.26.11

**摘要** 目的:通过分析服用他克莫司(FK506)患者的全血浓度监测结果,参考有效的治疗范围,为FK506血药浓度监测及临床合理用药提供参考。方法:采用回顾性分析,以我院2011年12月—2012年12月FK506血药浓度监测的977人次为研究对象,对血药浓度监测结果正常范围的治疗效果及异常监测结果进行分析。结果:977人次中,正常、低于、高于参考范围所占的比例分别为65.5%、33.2%、1.3%。血药浓度的异常可能与患者的饮食、依从性、合并用药、血容量、监测方法及个体差异有关。FK506不良反应相对少见。结论:应用FK506时应遵循个体化用药的原则,从小剂量开始,并根据患者FK506的血药浓度、肝肾功能及机体的耐受力进行综合评估,及时调整用药。

**关键词** 他克莫司;血药浓度监测;合理用药

## Analysis of Blood Concentration Monitoring of Tacrolimus and Rational Use of Drugs

XIE Hua, WANG Rong, WU Xiao-yu, LI Wen-bin, ZHANG Juan-hong, JIA Zheng-ping (Key Laboratory of The Plateau of The Environmental Damage Control of PLA/Base of Clinical Pharmacology of PLA, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for blood concentration monitoring of tacrolimus (FK506) and clinical use of drug by analyzing the blood concentration monitoring results of FK506 and referring to the effective range of treatment. METHODS: Blood concentration of FK506 in 977 patients as research object was determined by retrospective method in our hospital during Dec. 2011—Dec. 2012. Therapeutic effect of normal range of blood concentration monitoring was analyzed as well as results of abnormal monitoring. RESULTS: Among 977 patients, blood concentration of FK605 which was equal to, lower than or higher than reference range accounted for 65.5%, 33.2% and 1.3%, respectively. Abnormal blood concentration may be related to the compliance of patient and drug dosage. The adverse drug reactions of FK506 was rarely found. CONCLUSIONS: FK506 should follow the principle of individual medication, starting from small dose; based on the blood concentration of FK506, liver and kidney function and the body's tolerance were evaluated comprehensively to adjust medication timely.

**KEY WORDS** Tacrolimus; Blood concentration monitoring; Rational use of drugs

他克莫司(FK506)属钙调神经磷酸酶抑制剂,其免疫抑制作用机制<sup>[1]</sup>与环孢素相似。FK506在体内与T淋巴细胞胞质内的FK506结合蛋白(FK506BP)结合,形成的FK506-FKBP复合

物抑制钙调蛋白磷酸酶的磷酸化酶活性,抑制Ca<sup>2+</sup>内流,使T细胞核因子不能去磷酸化,进而抑制T细胞特异性的转录因子(NF-AT)的活化剂白介素类(ILs)细胞因子的合成。其也可抑

次大,可能与两种方法在标准曲线制作时浓度点的分布有关。EMIT法的标准曲线横坐标上的浓度点为倍比增加,而ELISA法标准曲线以浓度的对数为横坐标。同时,EMIT法的低浓度标准点比ELISA法少,定量限(2.0 ng/ml)较ELISA法(0.3 ng/ml)高,而ELISA法超过10 ng/ml的标准点少而稀疏,故显示高浓度时误差较大。

由于两种方法的检测结果有统计学意义的差异,虽然有较好的一致性,但还是建议同一患者应尽量长期选用同一种方法来检测他克莫司的血药浓度,以便为临床提供准确可靠的个性化用药依据。

## 参考文献

[1] 陈卉. Bland-Altman分析在临床测量方法一致性评价中

\* 副主任药师。研究方向:治疗药物监测。电话:0931-8994675。E-mail: xiehua-72@163.com

的应用[J]. 中国卫生统计, 2007, 24(3): 308.

- [2] 丁春雷, 刘丽宏, 马萍, 等. 他克莫司治疗药物监测研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(20): 1 580.
- [3] 丁慧, 董振南, 贾兴旺, 等. 他克莫司血药浓度的方法学评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(4): 264.
- [4] 叶伟民, 陆慧琦, 朱焯, 等. 他克莫司在临床检测中的方法学比较[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(2): 85.
- [5] 李义龙, 王萌, 唐志毅. 人全血他克莫司浓度高效液相色谱-质谱法检测方法学的建立及性能评价[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(32): 2 290.
- [6] 乔小云, 陈冲, 蒋俊毅. 用酶增强免疫分析法监测他克莫司血药浓度的质控评估[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(1): 40.

(收稿日期:2013-05-05 修回日期:2013-05-15)