

化学发光免疫分析法测定患者血浆伏立康唑浓度的验证与评价^Δ

张倩*,李沐,李博,秦伟,王晓雪,张丹,杜雯雯,王晓星,李朋梅,张相林,陈文倩[#](中日友好医院药
学部,北京 100029)

中图分类号 R978.5 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)10-1221-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.10.014



摘要 目的:验证并评价化学发光免疫分析法(CLIA)用于伏立康唑血药浓度的测定。方法:(1)验证 CLIA 法,进行检测限、重复性、线性、准确度及精密度 5 个方面的验证;(2)评价 CLIA 法,收集 2023 年 1—2 月该院进行伏立康唑血药浓度监测的 113 例患者的血浆样本,分别用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)和 CLIA 法进行检测,采用配对 *t* 检验、组内相关系数(ICC)、Passing-Bablok 回归和 Bland-Altman 分析比较两种方法的相关性及一致性。结果:经验证,CLIA 法用于测定伏立康唑血药浓度符合分析技术要求,方法稳定可靠。CLIA 法检测的血浆伏立康唑平均浓度为(3.843±2.056) μg/mL,高于 UPLC-MS/MS 法测得的(3.399±1.959) μg/mL,差异有统计学意义($P<0.01$)。两种方法测定结果的 ICC 为 0.932($P<0.001$);Passing-Bablok 回归方程为 $Y=0.0834+1.099X$ ($R=0.956, n=113$),方程斜率为 1.099(95%CI=1.030~1.161),截距为 0.0834(95%CI=-0.062~0.251),两种方法测定值之间存在良好的线性相关关系。Bland-Altman 分析显示,两种方法的平均偏差为 0.442 μg/mL(95%CI=0.331~0.558 μg/mL),平均偏差百分比为 14.49%(95%CI=11.47%~17.51%),一致性尚可接受。结论:CLIA 法稳定可靠、操作简便、检测效率高,更适用于临床样本检测。CLIA 法与 UPLC-MS/MS 法测定的结果相关性良好,一致性尚可,CLIA 法可作为 UPLC-MS/MS 法的潜在替代方法用于临床检测伏立康唑血药浓度。

关键词 伏立康唑;化学发光免疫分析法;质谱法;治疗药物监测

Validation and Evaluation of Chemiluminescence Immunoassay for Determination of Voriconazole in Plasma of Patients^Δ

ZHANG Qian, LI Shu, LI Bo, QIN Wei, WANG Xiaoxue, ZHANG Dan, DU Wenwen, WANG Xiaoxing, LI Pengmei, ZHANG Xianglin, CHEN Wenqian (Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To validate and evaluate the chemiluminescence immunoassay (CLIA) for the determination of voriconazole blood concentration. **METHODS:** (1) The CLIA method was verified in five aspects: detection limit, repeatability, linearity, accuracy and precision. (2) The CLIA method was evaluated. Plasma samples of 113 patients who were monitored for voriconazole blood concentration in the hospital from Jan. to Feb. 2023 were collected and detected by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and CLIA method respectively. The correlation and consistency of the two methods were compared by using paired *t*-test, intragroup correlation coefficient (ICC), Passing-Bablok regression, and Bland-Altman analysis. **RESULTS:** It was validated that the CLIA method for the determination of voriconazole blood concentration met the requirements of analytical techniques, and the method was stable and reliable. The mean concentration of voriconazole in plasma was (3.843±2.056) μg/mL determined by CLIA method, higher than (3.399±1.959) μg/mL by UPLC-MS/MS method, with statistically significant differences ($P<0.01$). ICC of the two methods was 0.932 ($P<0.001$). The Passing-Bablok regression equation was $Y=0.0834+1.099X$ ($R=0.956, n=113$), the slope of the equation was 1.099 (95%CI=1.030-1.161), and the intercept was 0.0834 (95%CI=-0.062-0.251), there was a good linear correlation between the two methods. According to the Bland-Altman analysis, the mean absolute bias between CLIA and UPLC-MS/MS was 0.442 μg/mL (95%CI=0.331-0.558 μg/mL), the average bias in percentage between CLIA and UPLC-MS/MS was 14.49% (95%CI=11.47%-17.51%), which was an acceptable consistency between the two methods. **CONCLUSIONS:** The CLIA method is stable, reliable, easy to operate, and has high detection efficiency, making it more suitable for clinical sample testing. The correlation between the results determined by CLIA

Δ 基金项目:中日友好医院临床研究及转化跃升项目(No. 2023-NHLHCRF-YYPP-TS-03)

* 药师。研究方向:治疗药物监测、合理用药。E-mail:13390910263@163.com

通信作者:副主任药师。研究方向:治疗药物监测、定量药理学。E-mail:chenwq08@126.com

method and UPLC-MS/MS method is good and in acceptable consistency, and the CLIA method can be used for the clinical detection of voriconazole as a potential alternative to the UPLC-MS/MS method.

KEYWORDS Voriconazole; Chemiluminescence immunoassay; Mass spectrometry; Therapeutic drug monitoring

随着免疫抑制人群的扩大,包括实体器官移植或造血干细胞移植、自身免疫性疾病及接受免疫调节疗法的恶性肿瘤患者等人群,侵袭性真菌病的发病率越来越高^[1]。伏立康唑为第2代三唑类广谱抗真菌药,被推荐用于侵袭性真菌病的初级疗法和免疫抑制患者的抗真菌预防,是目前预防和治疗侵袭性曲霉病的一线用药^[2-3]。伏立康唑的稳态谷浓度与疗效、安全性的相关性高,但该药具有非线性药动力学特征,个体化差异大^[4];并具有显著的药物间相互作用,因此谷浓度水平差异大且难以预测,国内外指南和相关研究均推荐在使用伏立康唑时应进行治疗药物监测(TDM)^[2-3,5-7]。我国指南推荐伏立康唑谷浓度参考范围为1.0~5.5 μg/mL,以确保疗效并减少不良反应发生^[5]。

目前,伏立康唑的TDM方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)、生物分析法及酶放大免疫分析法(EMIT)等^[8-11]。UPLC-MS/MS已被广泛用于各种小分子化合物的定量检测,具有灵敏度高、专属性好等特点。然而,该方法用于临床样本检测仍存在不足之处,包括需进行自建方法的开发、对样本进行前处理、对操作人员分析技术能力要求较高等。化学发光免疫分析法(CLIA)是将化学发光系统与免疫反应相结合的分析方法,通过化学探针在化学反应中的发光强度来标记样品,从而确定样品的浓度,包括直接使用发光体标记物(如吡啶酯)的直接CLIA法,以及采用酶标记的间接CLIA法^[12-13]。目前,使用酶标记抗体仍是CLIA法的主流,最常用的标记酶是以发光酚或其衍生物为底物的辣根过氧化物酶和以1,2-二氧杂环芳基磷酸酯(AMPPD)为底物的碱性磷酸酶(ALP)^[14]。CLIA法具有灵敏度高、线性范围宽、无散射光干扰、特异性好、设备操作简便和检测效率高等优点,尤其适用于临床“即送即测”型样本,目前也已被用于环孢素、他克莫司、地高辛和丙戊酸等多种药物浓度的临床监测^[12-13]。

目前,尚未有CLIA法用于伏立康唑血药浓度监测的报道。本研究旨在构建并验证一种ALP标记的CLIA法,该方法以顺磁性微粒为载体,利用稳定且发光强度高的AMPPD与ALP的间接化学发光反应,从而检测伏立康唑的浓度;同时,将该方法与UPLC-MS/MS法进行比较,评价两种方法用于测定伏立康唑血药浓度的相关性和一致性,以便更好地开展伏立康唑的TDM工作。

1 材料与方法

1.1 样本来源

选取2023年1—2月我院进行伏立康唑血药浓度监测的患者113例,抽取稳态谷浓度血样2 mL,置于EDTA-K抗凝管中,3 000 r/min(离心半径19.7 cm),离心5 min,吸取上层血浆作为检测样本。

1.2 仪器

DF200i型全自动化学发光免疫分析仪(北京丹大生物技

术有限公司);Acquity UPLC超高效液相色谱仪、Quattro Premier XE型三重四极杆质谱仪、电喷雾离子化源(ESI)及Masslynx 4.1数据处理系统(美国Waters公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.3 药品与试剂

伏立康唑测定试剂盒(CLIA法,北京丹大生物技术有限公司,批号为HUU072 M);伏立康唑对照品(珠海润都制药股份有限公司,含量为99.5%,批号为5813050202);伏立康唑-d3对照品(加拿大Toronto Research Chemicals公司,含量为98%,批号为3-Juz-110-1);甲酸(色谱纯,德国CNW公司)、乙腈(色谱纯,美国Fisher Scientific公司);超纯水。

1.4 CLIA法

1.4.1 制备标准曲线:使用伏立康唑测定试剂盒配套产品校准品,在DF200i型全自动化学发光免疫分析仪中扫入试剂校准条码,使用试剂盒配套产品校准品进行校准,得到标准曲线。

1.4.2 验证性能指标:(1)检测限,使用样本稀释液将校准品稀释为5份0.3 μg/mL的样本后,每份样本重复5次,要求<检测限的样本数为0。(2)重复性,测定高、低质控样品各10次,计算平均值及变异系数(CV),要求CV<2%。(3)线性,使用样本稀释液将校准品倍比稀释,配制成质量浓度为0.5、1、2、4、8和16 μg/mL的标准曲线样本,每份样本重复3次,计算平均值。将测定浓度平均值与理论浓度用最小二乘法进行线性拟合,得到线性回归方程,并计算线性相关系数(*r*)。(4)准确度,将线性高值(CS)与空白血浆(C0)按照1:10比例混合后,配置成样本(C),分别测试CS、C0和C各3次,计算回收率,要求回收率为85%~115%。(5)精密度,对验证材料每日分析1批次,2个浓度,每个浓度重复测定4次,连续5 d,记录结果并计算均值、标准差和批内精密度(%),要求精密度的RSD<5%。

1.4.3 样本分析:按照仪器标准操作流程规范操作,仪器自行取样、分析、测定,每批次血浆样本测定时需平行测定质控样品。若质控样品超出标示范围,则需进行标准曲线校正和样品重测。

1.5 UPLC-MS/MS法

UPLC-MS/MS法的样本前处理方法、色谱与质谱条件均来自本实验室之前的研究^[15],具体如下。

1.5.1 血浆样本前处理:精密吸取血浆样品50 μL,加内标液(伏立康唑-d3 5 μg/mL)20 μL,加乙腈(含0.1%甲酸)550 μL,涡旋5 min,12 000 r/min(离心半径5.8 cm),离心10 min,取上清液200 μL加入样品瓶进样。

1.5.2 色谱条件:流动相A为水(含2 mmol/L乙酸铵及0.1%甲酸),流动相B为乙腈(含0.1%甲酸);色谱柱为Acquity UPLC BEH-C₁₈柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm);柱温为40℃;流速为0.2 mL/min。梯度洗脱条件,0 min,30% B;0~1 min,30%~100% B;1~2 min,100% B;2~4 min,100%~

30%B。进样量为 2 μL 。

1.5.3 质谱条件:正离子检测模式(+ESI)下,毛细管电压为 1.0 kV;锥孔电压为 30 V;锥孔温度为 120 $^{\circ}\text{C}$;离子源温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气(N_2)流速为 900 L/h;锥孔反吹气流速为 10 L/h;采用多反应监测扫描方式;母离子/子离子质荷比:伏立康唑 m/z 350.1-281.1,伏立康唑-d3(IS) m/z 353.1-284.1。

1.6 统计学方法

采用 Excel 2016 对数据进行统计整理,采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析,配对检验,并计算组内相关系数(ICC)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。CLIA 法为比较的待评价系统,以 UPLC-MS/MS 法为检测系统,使用 MedCalc 医学统计软件,进行 Passing-Bablok 回归和 Bland-Altman 分析。

2 结果

2.1 CLIA 方法验证

(1)检出限:检测 5 份 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样本,每份重复 5 次,低于空白线 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样本数为 0,符合要求。(2)重复性:低质控为 (5.128 ± 0.090) $\mu\text{g}/\text{mL}$,CV 为 1.73%;高质控为 (9.356 ± 0.160) $\mu\text{g}/\text{mL}$,CV 为 1.72%,符合要求。(3)线性:线性回归方程为 $y = 1.0328x + 0.2472$,线性范围为 0.5~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数 $r = 0.9992$,符合技术要求。(4)准确度:回收率为 106.73%,符合要求。(5)精密度:浓度为 (3.639 ± 0.160) $\mu\text{g}/\text{mL}$,精密度为 4.44%,符合要求。

2.2 伏立康唑水平分析

CLIA 法检测的伏立康唑血药浓度范围为 0.19~12.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均浓度为 (3.843 ± 2.056) $\mu\text{g}/\text{mL}$;UPLC-MS/MS 法检测的伏立康唑血药浓度范围为 0.10~12.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均浓度为 (3.399 ± 1.959) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。CLIA 法检测得到的平均浓度为 UPLC-MS/MS 法结果的 113.1%。

2.3 相关性及一致性分析

为了确定两种方法之间是否存在显著相关性,以 UPLC-MS/MS 法测定的浓度结果为横坐标(X),以 CLIA 法测定的浓度结果为纵坐标(Y),采用 Passing-Bablok 回归方法进行线性回归分析,见图 1。两种方法呈线性相关, $R = 0.956$,回归方程为 $Y = 0.0834 + 1.099X$,方程的斜率为 1.099(95%CI = 1.030~1.161),截距为 0.0834(95%CI = -0.062~0.251)。两种方法测定结果的 ICC 为 0.932, $P < 0.001$,也表明两种方法测定伏立康唑浓度有较强的相关性。

在一致性方面,配对 t 检验结果, $t = 7.763$, $P < 0.05$,差异有统计学意义,两种方法的检测结果存在差异,CLIA 法测定的伏立康唑血药浓度高于 UPLC-MS/MS 法。对两种方法的检测结果进行 Bland-Altman 分析,结果表明,94.69% (107/113) 的浓度结果落在 95%一致性界限区间内,两种方法检测结果的平均绝对偏差为 0.442 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (95%CI = 0.331~0.558 $\mu\text{g}/\text{mL}$),平均偏差百分比为 14.49%(95%CI = 11.47%~17.51%),见图 2—3。

3 讨论

伏立康唑为广谱三唑类抗真菌药,是侵袭性曲霉病的一线用药,具有非线性药动学的特点,包括基因在内的多种因素均会影响其血药浓度,个体化差异大;同时,该药为肝药酶的

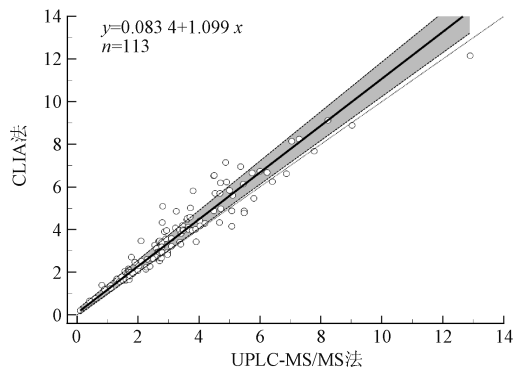


图 1 UPLC-MS/MS 与 CLIA 法检测伏立康唑浓度结果相关性

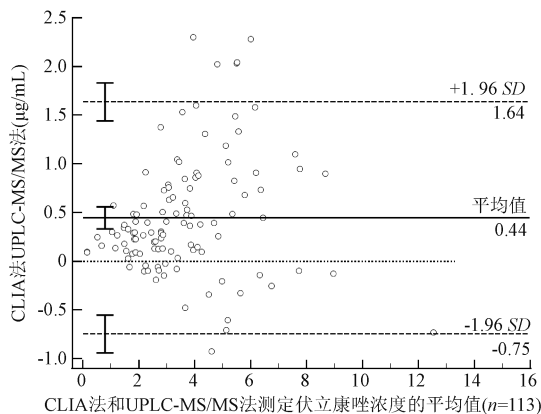


图 2 UPLC-MS/MS 法与 CLIA 法测定血浆伏立康唑浓度的绝对偏差图

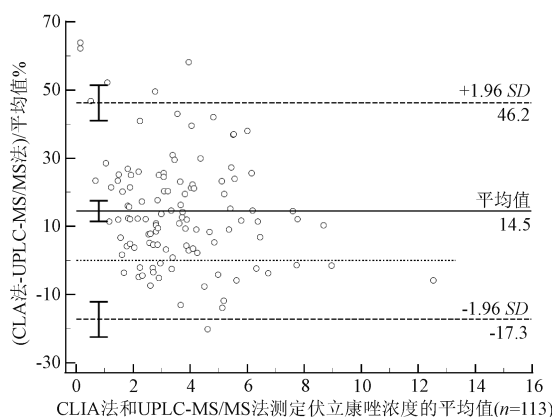


图 3 UPLC-MS/MS 法与 CLIA 法之间的百分比偏差图

底物及抑制剂,存在较多的药物相互作用,因此有必要对其进行 TDM。现有研究和各大指南均表明,伏立康唑谷浓度与其疗效和毒性有较强的相关性,临床使用时需监测伏立康唑稳态谷浓度^[2,5-6]。

目前,报道较多的伏立康唑血药浓度监测方法仍是 UPLC-MS/MS 法^[11,16]。尽管质谱法是目前小分子定量检测的“金标准”,但存在以下不足:仪器成本高,需自建方法,样本前处理步骤繁琐,操作技术要求较高等。相比之下,免疫法具有自动化程度高、前处理简单、仪器操作便捷等优势,有利于临

床检测工作的实施与开展。

本研究验证了 CLIA 法用于测定患者血浆伏立康唑浓度,各项性能指标均符合生物样本定量分析要求,且该方法较 UPLC-MS/MS 法更加省时省力。CLIA 法中,可将采血管离心后获得的血浆样本直接上机,无需进行沉淀离心等前处理步骤,约 0.5 h 后获得第 1 个样本浓度,随后约 1 min 得到 1 个样本浓度结果。然而,UPLC-MS/MS 法需对样本进行前处理,若无高通量的自动化前处理手段辅助,该步骤仍十分耗时,约 2~3 h 后获得第 1 个样本浓度,随后每 4 min 获得 1 个样本浓度结果^[15]。

本研究比较了 CLIA 法与 UPLC-MS/MS 法用于测定伏立康唑血药浓度的相关性和一致性,结果显示,两种方法的测定结果具有较强的相关性,一致性尚可接受。本研究中,CLIA 法检测的伏立康唑浓度略高于 UPLC-MS/MS 法的测定结果,差异有统计学意义($P < 0.05$),前者平均浓度水平偏高 13.1%。Bland-Altman 分析表明,两种方法检测结果的平均绝对偏差为 0.442 $\mu\text{g/mL}$ (95% $CI = 0.331 \sim 0.558 \mu\text{g/mL}$),平均偏差百分比为 14.49%(95% $CI = 11.47\% \sim 17.51\%$)。结合生物样本定量分析方法的相关要求,该方法自身检测水平的偏差在 $\pm 15\%$ 可接受(即准确度),因此认为偏差程度尚可接受。

CLIA 法检测结果偏高,最主要的原因可能是受到伏立康唑代谢物的影响,使得抗体识别到的目标物增多,导致结果偏高;另一个原因可能是病理生理因素的影响,包括年龄、种族、基因型以及药物相互作用等多种因素均可以影响伏立康唑的血药浓度。以上情况同样发生于其他免疫法测定伏立康唑血药浓度,如 EMIT 法,且结果的偏高程度和变异度更大^[17],但不同厂家的试剂盒得到的结果也存在差异^[18]。

本研究测定的样本浓度结果大多是治疗水平,即 1~5.5 $\mu\text{g/mL}$ 。CLIA 法测定结果有 86 个样本为治疗水平,23 个样本为潜在毒性水平($> 5.5 \mu\text{g/mL}$);UPLC-MS/MS 法测定结果有 95 个治疗水平的样本,12 个潜在毒性水平的样本。一致性分析中,有 6 个样本未落在 95% 一致性界限区间内,UPLC-MS/MS 法测定这 6 个样本均为治疗水平,而 CLIA 法测定结果显示其中 4 个样本浓度偏高,平均偏差 2.09 $\mu\text{g/mL}$,为潜在毒性水平。以上情况提示,低、中浓度水平的样本一致性更好,而 CLIA 法测定的高浓度水平结果偏差可能更大,临床解读结果时应注意。由于本研究的低、高浓度亚组样本量较少,故未进行亚组之间的分析,提示后续可扩大检测的样本量,进一步明确偏差影响的范围及程度。

尽管 UPLC-MS/MS 法灵敏度高,准确性好,但需要指出的是,由于临床样本送检时间的不规律性,其在临床应用方面仍存在不足。CLIA 法稳定可靠、快速方便,能做到即送即测,更适用于临床常规检测。因此,尽管本研究中 CLIA 法与 UPLC-MS/MS 法的一致性还有待进一步提升,但仍提示 CLIA 法可用于伏立康唑的血药浓度监测,且具有较好的临床应用价值。

综上所述,本研究建立了一种酶标记的 CLIA 法用于测定伏立康唑血药浓度,该方法各项性能指标良好,符合定量分析要求,且具有操作简单、检测效率高等优点,适用于临床样本检测。CLIA 法与 UPLC-MS/MS 法测定的结果相关性好,一致性尚可接受,可作为 UPLC-MS/MS 法的潜在替代方法用于伏

立康唑血药浓度监测。后续应扩大样本量,进一步明确一致性,以便更加准确地进行浓度结果的解读。

参考文献

- [1] BOUTIN C A, LUONG M L. Update on therapeutic approaches for invasive fungal infections in adults [J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2024, 11: 20499361231224980.
- [2] 林志强,张清泉,陈婷婷. 伏立康唑的治疗药物监测:国内外相关指南概览[J]. *药物不良反应杂志*, 2020, 22(7): 409-415.
- [3] ULLMANN A J, AGUADO J M, ARIKAN-AKDAGLI S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24 Suppl 1: e1-e38.
- [4] HOPE W W. Population pharmacokinetics of voriconazole in adults [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(1): 526-531.
- [5] CHEN K, ZHANG X L, KE X Y, et al. Individualized medication of voriconazole: a practice guideline of the division of therapeutic drug monitoring, Chinese pharmacological society [J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(6): 663-674.
- [6] PATTERSON T F, THOMPSON G R 3rd, DENNING D W, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(4): e1-e60.
- [7] TAKESUE Y, HANAI Y, ODA K, et al. Clinical practice guideline for the therapeutic drug monitoring of voriconazole in Non-Asian and Asian adult patients: consensus review by the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring [J]. *Clin Ther*, 2022, 44(12): 1604-1623.
- [8] 丁记者,林小青,温悦,等. 高效液相色谱法与酶放大免疫分析法检测人血浆中伏立康唑浓度的比较 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 29(4): 266-271.
- [9] TONINI J, BAILLY S, GAUTIER-VEYRET E, et al. Contribution of a simple bioassay in effective therapeutic drug monitoring of posaconazole and voriconazole [J]. *Ther Drug Monit*, 2015, 37(5): 685-688.
- [10] STEINMANN J, HUELSEWEDE J, BUER J, et al. Comparison and evaluation of a novel bioassay and high-performance liquid chromatography for the clinical measurement of serum voriconazole concentrations [J]. *Mycoses*, 2011, 54(5): e421-e428.
- [11] CATTOIR L, FAUVARQUE G, DEGANDT S, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole: validation of a novel ARKTM immunoassay and comparison with ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53(5): e135-e139.
- [12] XIAO Q, XU C X. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2020, 124: 115780.
- [13] CINQUANTA L, FONTANA D E, BIZZARO N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? [J]. *Auto Immun Highlights*, 2017, 8(1): 9.
- [14] 汪晨,吴洁,宗晨,等. 化学发光免疫分析方法与应用进展 [J]. *分析化学*, 2012, 40(1): 3-10.
- [15] 王晓雪,陈文倩,刘慧芳,等. 利用同位素稀释质谱法测定人血浆中伏立康唑及治疗药物监测实践 [J]. *中国药师*, 2019, 22(7): 1189-1192.

(下转第 1229 页)