

不同保存条件对化学发光微粒子免疫分析法 监测环孢素血药浓度的影响[△]

张凌鹏*, 陈井霞, 杨云云, 李 丹, 王学彬, 高丽红^{#1}, 王 卓^{#2} (海军军医大学第一附属医院药剂科, 上海 200433)

中图分类号 R979.5 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)08-0900-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.08.002

摘 要 目的:探讨全血标本不同保存条件对环孢素血药浓度测定结果的影响。方法:收集该院患者常规测定环孢素血药浓度后的废弃标本共计 80 例,每个标本混匀后分装 3 份,分别于室温(20~25 ℃)、冷藏(2~8 ℃)和冷冻(-35~-30 ℃)条件下避光保存 7 d。采用化学发光微粒子免疫分析法测定不同保存条件下的环孢素血药浓度。结果:室温、冷冻保存 7 d 的环孢素浓度分别为(213.0±128.3)、(207.4±121.7) ng/mL,与采样当日测定的血药浓度(212.0±123.5) ng/mL 相比,差异均无统计学意义($P=0.792$ 、 $P=0.188$);冷藏保存 7 d 的环孢素浓度为(198.4±113.8) ng/mL,较采样当日测定浓度低 6.6%,差异有统计学意义($P=0.002$)。结论:冷藏保存 7 d 的环孢素血药浓度普遍降低,室温或冷冻保存 7 d 对环孢素血药浓度无影响。若环孢素标本采样当日不能及时检测,可将标本于室温避光或冷冻保存,并于 7 d 内完成测定。

关键词 环孢素; 治疗药物监测; 保存条件; 化学发光微粒子免疫检测法

Effect of Different Preservation Conditions on Monitoring the Blood Concentration of Cyclosporine by Chemiluminescence Microparticle Immunoassay[△]

ZHANG Lingpeng, CHEN Jingxia, YANG Yunyun, LI Dan, WANG Xuebin, GAO Lihong, WANG Zhuo (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effect of different preservation conditions on monitoring the blood concentration of cyclosporine in whole blood sample. **METHODS:** A total of 80 discarded samples for routine monitoring of blood concentration were collected from this hospital, each sample was mixed and evenly divided into 3 parts, which were preserved at room temperature (20-25 ℃), refrigerated (2-8 ℃) and frozen (-35~-30 ℃) away from light for 7 days. Chemiluminescence microparticle immunoassay was adopted to detect the blood concentration of cyclosporine under different preservation conditions. **RESULTS:** The concentrations of cyclosporine were (213.0±128.3) ng/mL at room temperature and (207.4±121.7) ng/mL at frozen condition for 7 days, which had no statistically significant differences compared with the blood concentrations of (212.0±123.5) ng/mL measured on the sampled day ($P=0.792$, $P=0.188$); while the concentration of cyclosporine at refrigerated condition for 7 days was (198.4±113.8) ng/mL, which was 6.6% lower than that measured on the sampled day, with statistically significant difference ($P=0.002$). **CONCLUSIONS:** The blood concentration of cyclosporine is generally decreased after 7 days of refrigeration, while 7 days of preservation at room temperature or frozen have no effect on the blood concentration of cyclosporine. If the cyclosporine sample cannot be detected in time on the day of sampling, it can be preserved at room temperature or frozen away from light, and the determination should be completed within 7 days.

KEYWORDS Cyclosporine; Therapeutic drug monitoring; Preservation condition; Chemiluminescence microparticle immunoassay

△ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 82173900);促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划项目(No. SHDC2020CR4072);上海长海医院医学基础研究专项青年培育项目(No. 2021JCQN19);上海长海医院青年启动基金项目(No. 2020QNB11)

* 主管药师。研究方向:治疗药物监测。E-mail:zhanglingpeng1976@163.com

通信作者 1:主管药师,博士。研究方向:治疗药物监测。E-mail:congrong2002@163.com

通信作者 2:主任药师,博士。研究方向:临床药学。E-mail:wangzhuo088@163.com

环孢素为真菌源性的环状十一氨基酸多肽的免疫抑制剂,目前主要用于实体器官移植、造血干细胞移植和免疫性疾病^[1]。环孢素治疗窗窄,药动学个体差异大,体内药物暴露量影响因素多,需定期对其进行治疗药物监测(TDM)^[2]。临床常规监测全血环孢素谷浓度或峰浓度,评价环孢素的疗效和安全性,便于及时调整环孢素的用药方案^[1-3]。

目前,新型冠状病毒奥密克戎在全球肆虐,社区、医院封控频繁,居家隔离成为常态^[4]。使用环孢素治疗的患者免疫功能低下,新型冠状病毒感染风险较大,不能正常进行门诊随访和监测药物浓度,难以判断环孢素浓度是否在治疗窗内,治疗效果和安全性也无法评估^[5]。因治疗的需要,封控小区居家患者及新型冠状病毒感染者定点医院隔离期间采集的环孢素标本,转运前消杀和运输耗时长,导致标本采集当日不能及时检测^[6]。此外,在非新型冠状病毒肺炎疫情流行期间,诸多医疗机构 TDM 实验室接受本地或异地的快递标本,采集和送达当日均不能及时检测^[2,6-7]。环孢素浓度检测试剂盒要求当日采集标本如不能及时处理,需在保存时限内完成检测。因此,亟需探究不同保存条件对环孢素浓度检测结果的影响。本研究通过探讨常温、冷藏和冷冻条件保存 7 d 后全血环孢素的稳定性,针对新型冠状病毒肺炎疫情居家隔离及非疫情期间异地不便门诊随访的患者,为其环孢素 TDM 样本的科学转运及保存提供依据,确保 TDM 结果的可靠性。

1 材料与方法

1.1 样本来源

收集 2021 年 12 月至 2022 年 3 月我院服用环孢素患者常规监测后的废弃标本 80 例次。采血管:EDTA 抗凝管;样本量:1~2 mL;标本要求:不凝血;患者标本采样时间:再次服药前或服药 2 h 后;常规监测环孢素血药浓度作为初始对照值。

1.2 仪器

ARCHITECT i1000_{SR} 型全自动免疫分析仪(美国 Abbott 公司);XW-80A 型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司);100/200/1 000 μL 型移液枪(德国 Eppendorf 公司);Micro17 型高速离心机(美国 Thermo Electron Corporation 公司);BCD-322 型冰箱(德国 Siemens 公司)。

1.3 试剂

环孢素测定试剂盒(美国 Abbott 公司,批号为 25039M800);标准曲线液(美国 Abbott 公司,批号为 85K28921),全血质控品(美国 Bio-rad 公司,批号分别为 21883、21891 和 21892)。

1.4 样本分装与保存

全血标本混匀后,每个标本用移液枪精密吸取 200 μL 至离心管中,平行分装 3 份,密封。分别室温(20~25 ℃)、冷藏(2~8 ℃)、冷冻(-35~-30 ℃)避光保存 7 d。冷藏、冷冻保存的标本在测定前,均室温放置 30 min 以上,按照标本前处理标准步骤处理并检测。

1.5 环孢素分析方法

(1)环孢素血药浓度测定方法:采用化学发光微粒子免疫

分析法(CMIA),测定标本保存前后环孢素浓度,试剂盒检测范围为 0~1 500 ng/mL,检测限≤25.0 ng/mL^[6,8-9]。(2)标本前处理操作步骤:①标本于旋涡混合器强力涡旋 2~3 s,用移液枪精密吸取 200 μL 全血至离心管中;②移液枪精密吸取 100 μL 全血溶解剂加入离心管,用旋涡混合器强力涡旋 5~10 s;③再移液枪精密吸取 400 μL 环孢素全血沉淀剂,立即盖上离心管,用旋涡混合器强力涡旋 10~15 s 至充分混匀;④用高速离心机 10 000 r/min 离心 6 min(离心半径 5.6 cm);⑤将上清液倒入移植预处理管中,用旋涡混合器涡旋 5~10 s,上机检测。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 23.0 统计分析软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间采用配对 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义,并对保存 7 d 前后数据进行线性相关分析。

2 结果

2.1 基本资料

80 例环孢素样本主要来自常规环孢素浓度监测后废弃标本,样本来源患者基本资料见表 1。

表 1 环孢素样本来源患者基本资料(*n*=80)

Tab 1 General information of source patient of cyclosporine sample (*n*=80)

项目	指标	数据
性别/例(%)	男性	45 (56.25)
	女性	35 (43.75)
年龄/($\bar{x} \pm s$,岁)		45.10±12.01
体重/($\bar{x} \pm s$,kg)		60.47±10.71
诊断/例(%)	血液系统(造血干细胞移植等)	46 (57.50)
	肾移植	29 (36.25)
	不孕辅助生殖	5 (6.25)

2.2 室内质量控制情况

TDM 日常工作中做好室内质量控制对环孢素浓度检测至关重要^[10]。本实验室采用质控图联合 Westgard 多规则法进行室内质量控制^[11]。2021 年 11 月至 2022 年 3 月,开展本研究期间,3 个批号的在控质控品变异系数(CV)均<10%(见表 2),实验当日室内质控实测值相对偏差均<10%(见表 3)。以上合格的质控为本研究提供了保障。

表 2 2021 年 11 月至 2022 年 3 月环孢素 TDM 室内质量控制情况

Tab 2 Internal quality control of cyclosporine TDM from November 2021 to March 2022

质控批号	质控次数	质控靶值/ (ng/mL)	质控实测值/ ($\bar{x} \pm s$,ng/mL)	在控质控/ 次(%)	CV/%
21891	34	80.8	80.5±7.4	33(97.06)	9.19
21892	48	178	180.5±15.9	46(95.83)	8.82
21883	25	423	366.6±32.7	23(92.00)	8.92

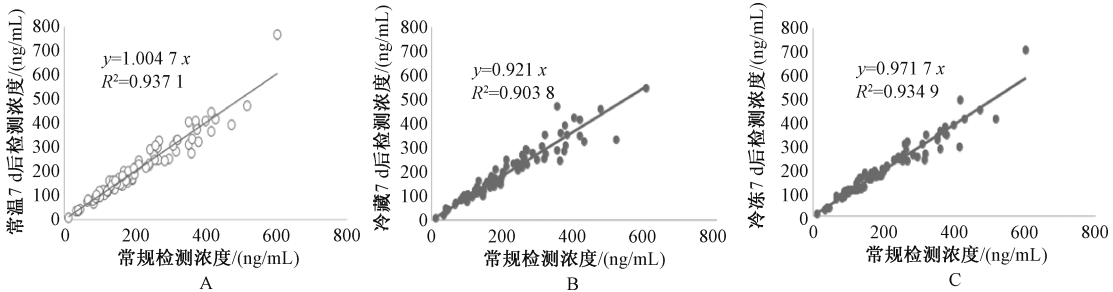
2.3 不同条件保存 7 d 环孢素浓度变化

室温保存 7 d,环孢素血药浓度降低者 43 例(占 53.75%),浓度变化超过 15%的有 6 例(占 7.50%),差值为-1.4(-82.1, 164.2) ng/mL,变化范围在-24.39%~27.25%;冷藏保存 7 d,环孢素血药浓度降低者 54 例(占 67.50%),浓度变化超过

表3 实验日环孢素 TDM 室内质量控制情况				
Tab 3 Internal quality control of cyclosporine TDM on experimental day				
实验日期	质控批号	质控靶值/ (ng/mL)	质控实测值/ (ng/mL)	质控实测值 相对偏差/%
2021年12月17日	21883	423	359.6	-1.91
2021年12月24日	21892	80.8	80.9	0.50
2021年12月31日	21892	178	170.5	-5.54
2022年1月5日	21891	80.8	78.4	-2.61
2022年3月7日	21892	178	173.5	-3.88

15%的有 22 例(占 27.50%),差值为-5.3(-184.3,118.4)ng/mL,变化范围在-43.90%~33.66%;冷冻保存 7 d,环孢素血药浓度降低者 47 例(占 58.75%),浓度变化超过 15%的有 11 例(占 13.75%),差值为-4.2(-123.4~102.5) ng/mL,变化范围在-33.77%~26.22%。

室温、冷冻保存 7 d 的环孢素浓度分别为(213.0±



A. 常温;B. 冷藏;C. 冷冻
A. room temperature; B. refrigerated condition; C. frozen condition
图1 不同条件保存 7 d 与采样当日环孢素浓度的线性相关分析

Fig 1 Linear correlation analysis of blood concentration of cyclosporine under different preservation conditions for 7 days and the sampled day

3 讨论

环孢素不仅被用于器官移植领域,还被用于自身免疫性疾病及不孕不育辅助生殖等^[1]。相关指南、共识推荐,环孢素使用者必须定期进行 TDM,优化环孢素用药方案,提高治疗效果和降低不良反应^[1-3]。对于患者因各种困难(如新型冠状病毒肺炎疫情防控和异地居住)不能按计划进行门诊随访及监测环孢素浓度,在选择其他方式送检标本过程中,合适的标本保存条件对环孢素浓度检测结果至关重要^[4-6]。

环孢素检测试剂盒说明书提示,EDTA-K₂ 抗凝标本常温保存 1 d,冷藏保存 7 d,超过 7 d 需冷冻保存。按上述条件保存标本,环孢素浓度不会显著变化。

本研究结果发现,室温保存 7 d 与采样当日环孢素浓度的差异无统计学意义($P>0.05$),与环孢素检测试剂盒说明书不一致。尽管冷藏保存 7 d 环孢素浓度相对于采样当日降低 6.6%($P<0.05$),但其与采样当日环孢素浓度线性相关性良好。环孢素检测试剂盒(CMIA 法)总体精密度要求 $\leq 15\%$ 。因此,对冷藏保存 7 d 的环孢素标本进行 TDM,为环孢素用药方案调整提供参考。另外,冷冻保存 7 d 与采样当日环孢素浓

度(218.3)、(207.4±121.7) ng/mL,与采样当日测定的血药浓度[(212.0±123.5) ng/mL]相比,差异无统计学意义($P=0.792$ 、 $P=0.188$);冷藏保存 7 d 的环孢素浓度为(198.4±113.8) ng/mL,较采样当日测定浓度显著降低 6.6%,差异有统计学意义($P=0.002$),见表 4。线性回归分析发现,尽管冷藏保存 7 d 较采样当日测定的环孢素浓度显著降低($P=0.002$),但相关性好($R^2=0.9038$),见图 1。

表4 不同条件保存 7 d 的环孢素血药浓度($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

Tab 4 Blood concentration of cyclosporine under different preservation conditions for 7 days ($\bar{x}\pm s$,ng/mL)					
保存条件	最低浓度	最高浓度	血药浓度	R^2	P
采样当日	12.3	602.6	212.0±123.5	—	—
室温 7 d	9.3	766.8	213.0±128.3	0.937 1	0.792
冷藏 7 d	6.9	547.8	198.4±113.8	0.903 8	0.002
冷冻 7 d	7.9	705.1	207.4±121.7	0.934 9	0.188

度的差异无统计学意义($P>0.05$),标本溶血不影响稳定性研究结果,与环孢素检测试剂盒说明书一致,与文献报道一致^[12]。

综上所述,针对新型冠状病毒肺炎疫情居家隔离及非疫情期间异地不便门诊随访的患者,本研究为其转运及保存环孢素 TDM 样本提供了科学依据。然而,本研究样本量少,具有一定的局限性,后续尚需进一步验证和探索。

参考文献

- [1] 中华医学会器官移植学分会. 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范(2019 版)[J]. 器官移植, 2019, 10(3): 213-226.
- [2] 王磊, 孙文利, 陈佳琦, 等. 环孢素 A 血药浓度监测相关实验室检测研究进展[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2019, 7(2): 65-70.
- [3] SATOH S, MIURA M. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs[J]. Rinsho Byori, 2016, 64(12): 1381-1389.
- [4] TIAN D D, SUN Y H, XU H H, et al. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant[J]. J Med Virol, 2022, 94(6): 2376-2383.
- [5] AZZI Y, BARTASH R, SCALEA J, et al. COVID-19 and solid

organ transplantation: a review article [J]. Transplantation, 2021, 105(1): 37-55.

[6] 缪文清, 石晨阳, 尹悦勤, 等. 新型冠状病毒灭活方式对化学发光微粒子免疫检测法监测环孢素血药浓度的影响[J]. 中南药学, 2021, 19(10): 2028-2031.

[7] 孙浩, 杨振宇, 肇丽梅. 环孢素血药浓度异常患者的处置及分析[J]. 医药导报, 2021, 40(8): 1120-1123.

[8] WANG X B, GAO Y, YANG Y Y, et al. Validation and evaluation of a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay for cyclosporine quantitative analysis in human whole blood [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 177: 112890.

[9] MEI S H, WANG J Q, CHEN D, et al. Simultaneous determination of cyclosporine and tacrolimus in human whole blood by ultra-high

performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and comparison with a chemiluminescence microparticle immunoassay [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1087/1088: 36-42.

[10] 王磊, 王红春, 刘红星. 利用六西格玛管理评价环孢素 A 血药浓度监测结果[J]. 临床检验杂志(电子版), 2019, 8(4): 36-38.

[11] 湛介秀, 高丽红, 骆锦前, 等. 质控图联合 Westgard 多规则法在他克莫司治疗药物监测质量控制及药学服务中的应用[J]. 药学服务与研究, 2019, 19(6): 413-417.

[12] 王琳珊, 邢晓清, 刘洪涛, 等. 环孢素 A 血药浓度影响因素的研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(28): 180-181.

(收稿日期:2022-04-24 修回日期:2022-05-09)

(上接第 899 页)

通过以上修订和完善工作,最终形成 37 条推荐意见,由指南指导委员会审定通过。

3 讨论

《医疗机构药品遴选指南》为注册标准指南,其制定需遵循科学规范的指南制定方法。目前,多项指南制定手册中对指南的外审工作提出了明确要求,例如,在指南正式发布前必须进行外审;外审人员需为未直接参与指南制定的利益相关人员;指南专家组需根据外审反馈结果对指南推荐意见进行修改和完善等^[6-8]。可见,指南外审是保障指南推荐意见科学性、明晰性和可行性的重要环节,更是保障该指南可以纳入更为广泛和重要观点的手段,可极大地提高指南的应用推广价值。

随着方法学的不断完善,我国多部临床实践指南在制定过程中也对外审方式和步骤进行了积极的探索,提供了方法学支持和实践经验,为本指南规范、标准的制定和科学开展外审工作奠定了基础^[9-11]。

本指南外审调查工作中,共有 12 个省市 18 位专家参与,平衡了地域分布因素,结果具有一定的代表性。同时,考虑医疗机构中药品遴选工作虽整体为多学科集体决策,但对药品的审查、初步遴选及评估主要依赖医院药学专业技术人员。因此,调研专家主要选取在医疗机构工作的药学专家,并在此基础上选取了医疗卫生行政管理专家、护理专家和药品生产流通企业专家作为补充。兼顾多方利益视角,保障了外审结果的全面性和可靠性。

通过对指南外审反馈情况的分析可见,其结果科学可靠,主观建议合理。基于外审结果,指南专家组对部分推荐意见进行完善,并对指南的整体内容进行了修订和提升,使之更具有可读性和应用便捷性。

本研究也存在一定的局限性;在外审专家的选择上,未采取随机抽样方法,而是更为注重专家的专业性质和实践经验,可能存在选择性偏倚。因此,在本指南的推广应用过程

中,还应继续广泛收集各方意见和建议,不断探索完善,以期促进医疗机构药品遴选工作的规范开展,提升药事管理质量和水平。

参考文献

[1] Institute of Medicine. Clinical practice guidelines we can trust[M]. Washington, DC, USA: National Academies Press, 2011:16-20.

[2] 杨克虎. 世界卫生组织指南制定手册[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2013:9-72.

[3] SINCLAIR D, ISBA R, KREDO T, et al. World Health Organization guideline development: an evaluation[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63715.

[4] 李正翔, 丁健, 张玉, 等. 医疗机构药品遴选指南计划书[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(24): 2501-2505.

[5] 李正翔, 段蓉. 基于德尔菲法构建《医疗机构药品遴选指南》研究问题及药品遴选指标体系[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(22): 2372-2376.

[6] SCHÜNEMANN H J, WIERCIOCH W, ETXEANDIA I, et al. Guidelines 2.0: systematic development of a comprehensive checklist for a successful guideline enterprise[J]. CMAJ, 2014, 186(3): E123-E142.

[7] CHEN Y L, YAO L, XIAO X J, et al. Quality assessment of clinical guidelines in China: 1993-2010[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(20): 3660-3664.

[8] 韦当, 王小琴, 吴琼芳, 等. 2011 年中国临床实践指南质量评价[J]. 中国循证医学杂志, 2013, 13(6): 760-763.

[9] 周鹏翔, 陈逸, 徐保平, 等. 《儿科阿奇霉素注射使用的快速建议指南》推荐意见的外审调查[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(17): 1773-1776.

[10] 陈恳, 宋再伟, 刘维, 等. 《中国伏立康唑个体化用药指南》推荐意见的外审[J]. 药物流行病学杂志, 2017, 26(2): 143-148.

[11] 陈恳, 王琪, 陈耀龙, 等. 《中国万古霉素治疗药物监测指南》推荐意见的外审调查[J]. 中国循证医学杂志, 2015, 15(6): 719-722.

(收稿日期:2022-04-16 修回日期:2022-05-13)