

# 酶放大免疫法与荧光免疫层析法检测万古霉素血液浓度的对比研究

师亚玲, 丰 航, 廉江平, 张 鹏, 李 黎 (陕西省人民医院药学部, 西安 710068)

**摘要:** **目的** 比较酶放大免疫法 (enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT) 和荧光免疫层析法 (fluorescence immunochromatography assay, FICA) 测定万古霉素血液浓度的结果及相关性分析。**方法** 收集 2020 年 9 月 ~ 11 月需要进行万古霉素血液浓度检测的样本 121 例, 分别采用 EMIT 法和 FICA 法测定万古霉素血液浓度, 使用 SPSS18.0 进行配对  $t$  检验及 Pearson 相关性分析, 采用 Bland-Altman 分析测定结果的一致性。**结果** EMIT 法测定回收率在 99.8%~106.4% 之间, FICA 测定回收率在 98.4%~107.2% 之间, 两种方法日间和日内精密度均 < 20%, 均符合生物样品检定要求。EMIT 法测定 121 个样品结果均值为  $18.83 \pm 11.24 \mu\text{g/ml}$ , FICA 法检测结果均值为  $18.16 \pm 9.67 \mu\text{g/ml}$ 。配对样本的  $t$  检验结果表明, 两种方法检测结果差异无统计学意义 ( $t=1.584, P=0.117$ )。Pearson 分析相关系数为  $r=0.946$  ( $P < 0.05$ ), Bland-Altman 图有 115 个数据在一致性界限内 (95.0%), 表明两种检测方法有良好的相关性和一致性。**结论** EMIT 法测定万古霉素血液浓度较 FICA 法偏高, 两种方法所得结果间具有相关性和一致性。两种方法均为有效可靠的万古霉素血液浓度监测方法, 在临床选择测定方法时, 应综合考虑样本、实验室条件、人员配置等因素。

**关键词:** 酶放大免疫法; 荧光免疫层析法; 万古霉素; 血液浓度

中图分类号: Q503; R978.1 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 01-168-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.034

## Comparison of Enzyme-multiplied Immunoassay and Fluorescence Immunochromatography in the Detecting Blood Concentrations of Vancomycin

SHI Ya-ling, FENG Hang, LIAN Jiang-ping, ZHANG Peng, LI Li

(Department of Pharmacy, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

**Abstract: Objective** To compare the results of enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT) and fluorescence immunochromatography assay (FICA) for quantitative determination of vancomycin concentrations in serum. **Method** 121 blood samples were collected from September 2020 to November 2020 for determination of vancomycin concentrations by the EMIT and FICA respectively. SPSS18.0 was used for  $t$  test and correlation analysis, and Bland-Altman plot was used for the consistency analysis. **Results** The recoveries of EMIT method and FICA were 99.8%~106.4% and 98.4%~107.2% respectively. The precision of the two methods were less than 20%, and both of them met the requirements of biological sample verification. The mean value of 121 samples determined by EMIT method was  $18.83 \pm 11.24 \mu\text{g/ml}$ , and the mean value of FICA was  $18.16 \pm 9.67 \mu\text{g/ml}$ . The results of paired  $t$  test showed that there was no statistical difference between the two methods ( $t=1.584, P=0.117$ ). The correlation coefficient of Pearson analysis was  $r=0.946$  ( $P < 0.05$ ), and 115 data of Bland-Altman plot were within the consistency limit (95.0%), indicating that the two detection methods had good correlation and consistency. **Conclusion** Blood concentration of vancomycin determined by EMIT method was higher than that by FICA. EMIT and FICA assay are both effective and reliable methods for vancomycin concentration monitoring. The samples, laboratory conditions, personnel allocation and other factors should be taken into account when selecting the determination method in clinical practice.

**Keywords:** enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT); fluorescence immunochromatographic assay (FICA); vancomycin; blood concentration

万古霉素 (vancomycin) 是一种糖肽类的抗生素, 是目前治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA) 感染的首选药物。万古霉素具有一定的肾毒性与耳毒性, 因其治疗窗窄, 个体差异较大, 血

液浓度过低可能导致耐药性或治疗无效, 血液浓度过高容易诱发严重不良反应, 因此需要对患者的血液浓度进行监测<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 对万古霉素的血液浓度进行监测可以提高临床治疗的有效性, 减少不良反应的发生<sup>[1]</sup>。

作者简介: 师亚玲 (1991-), 女, 硕士, 主管药师, 专业: 临床药学, E-mail: xjshiyaling@163.com。

通讯作者: 李黎 (1986-), 女, 硕士, 主管药师, 专业: 临床药学, E-mail: 18829573334@163.com。

目前,万古霉素血液浓度监测方法有微生物法、色谱法和免疫学方法<sup>[3-4]</sup>。酶放大免疫法(enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT)是免疫法的一种,是目前临床应用较为普遍的一种方法,其通过测量酶活性来估计样品中半抗原的量,根据吸光度的变化测定酶活性的变化,从而确定血液浓度。荧光免疫层析法(fluorescence immunochromatography assay, FICA)是利用现有的技术开发出应用于血液浓度检测的一种方法,其利用层析夹心法的工作原理,通过标记荧光结合物转化为定量的结果。EMIT有商业试剂盒,样品处理简单,测量速度快,准确度高,可以同时测量多个样品,目前临床应用较为广泛<sup>[5-6]</sup>,但其仪器及试剂盒昂贵,对检测环境和试剂存放温度要求严格,样本检测成本相对较高。FICA法成本相对较低,对环境温度无严格要求,目前已开发出其应用于血液浓度检测的商业仪器及试剂盒,但其国内应用较少,检测结果的准确度尚未有文献报道。本研究使用EMIT法和FICA法分别检测万古霉素血液浓度,并对其进行分析比较,确定检测方法间的一致性,以期临床提供一种快速简便的万古霉素血液浓度检测方法。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2020年9月~11月我院住院患者静脉滴注万古霉素需要进行血液浓度检测的样本,共计121例。其中男性74例,女性47例,平均年龄 $45.2 \pm 6.3$ 岁。患者主要分布在呼吸内科(34.8%)、重症医学科(42.3%)和急诊外科(22.9%)。患者平均住院日为 $23.9 \pm 11.9$ 天,住院期间万古霉素平均使用时间为 $8.2 \pm 7.2$ 天。

**1.2 仪器与试剂** EMIT法使用全自动临床化学分析仪 Viva-E(德国西门子公司),所用万古霉素检测试剂及配套定标液(6个万古霉素浓度水平)均由西门子公司提供。FICA法使用金浩峰 KHF01 荧光免疫分析仪(北京丹大生物技术有限公司),所用万古霉素测定试剂盒由北京丹大生物技术有限公司提供。TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂),治疗药物监测质控物(美国伯乐公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 样本采集:**对于肾功能正常的成人患者,开始给药后大于48h检测万古霉素血液浓度,而对于

肾功能不全的成人患者,开始给药后大于72h检测万古霉素血液浓度,并根据患者肾脏功能调整检测时机<sup>[7]</sup>。所有患者每次给药1g,间隔为每8h或每12h。在患者体内血液浓度达稳态后,于患者当日清晨用药前30min采集全血,使用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集2~3ml,3500r/min离心5min,取上层血浆检测。

**1.3.2 FICA法样品测定:**测定前按要求将仪器各参数校准至最佳状态。将试剂盒配套的校准信息卡信息录入,并选择相应样本类型的校准曲线。对中、低质控品进行检测以确定结果的准确性和有效性。将样本按照仪器及试剂盒要求的标准操作规程进行测定。

**1.3.3 EMIT法样品测定:**测定前按要求将仪器各参数校准至最佳状态。取浓度为0, 5, 10, 20, 30和50  $\mu\text{g/ml}$ 万古霉素定标液进行上样检测,拟合标准曲线。对中、低质控品进行检测以确定结果的准确性和有效性。将样本按照仪器及试剂盒要求的标准操作规程进行测定。

**1.3.4 回收率试验:**质控品取中、低质控品各5份,上样后测定其实际浓度,与理论值进行比较,计算回收率。低质控靶值为11.30  $\mu\text{g/ml}$ ,中质控靶值为30.10  $\mu\text{g/ml}$ ,回收率=(理论浓度/实测浓度) $\times 100\%$ 。

**1.3.5 精密度试验:**取中、低质控品各5份,上样后在不同仪器同一日内分别连续检测5次,计算日内精密度。在不同仪器不同日内检测5次,计算日间精密度。

**1.4 统计学分析** 使用SPSS18.0软件分析数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对两组数据进行配对样本 $t$ 检验,采用Pearson相关分析和Bland-Altman分析考察两组结果的相关性和一致性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两种方法测定结果的方法学分析** 见表1。EMIT法和FICA法日间和日内精密度均 $< 20\%$ 。EMIT法测定回收率在99.8%~106.4%之间,FICA法测定回收率在98.4%~107.2%之间。两种方法检测精密度和回收率均符合生物样品检定要求。

表1 EMIT法与FICA法精密度结果比较 [ $(\bar{x} \pm s)$   $\mu\text{g/ml}$ , RSD%]

质量浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	EMIT		FICA	
	日内精密度	日间精密度	日内精密度	日间精密度
11.30	$12.70 \pm 0.21, 1.65$	$12.75 \pm 0.87, 6.82$	$13.18 \pm 0.26, 1.97$	$13.37 \pm 1.01, 7.55$
30.10	$32.75 \pm 0.66, 2.02$	$31.40 \pm 1.15, 3.66$	$32.93 \pm 1.98, 6.01$	$33.82 \pm 2.22, 6.56$

2.2 两种方法测定结果比较 EMIT法测定121个样品结果均值为 $18.83 \pm 11.24 \mu\text{g/ml}$ , 范围在 $2.20 \sim 46.70 \mu\text{g/ml}$ 之间。FICA法检测结果均值为 $18.16 \pm 9.67 \mu\text{g/ml}$ , 范围在 $1.81 \sim 37.18 \mu\text{g/ml}$ 之间。配对样本的 $t$ 检验结果表明, 两种方法检测结果差异无统计学意义( $t=1.584, P=0.117$ )。

2.3 两种方法测定结果相关性和一致性分析 对两组数据结果做散点图见图1, 表明两种方法测定结果呈正相关( $r^2=0.8946$ )。根据Pearson双变量相关分析结果, 两种方法的检测结果相关系数为 $r=0.946$  ( $P < 0.05$ ), 说明其测定结果高度相关。采用Bland-Altman分析比较检测结果的一致性, 其平均偏差为 $0.67 \pm 3.78 \mu\text{g/ml}$ 。以两组结果的均值为 $X$ 轴, 差值为 $Y$ 轴做图, 结果如图2。95%一致性界限范围为 $-6.74 \sim 8.09$ , 有115个数据在一致性界限内(95.0%), 说明这两种测定方法有较好的一致性。

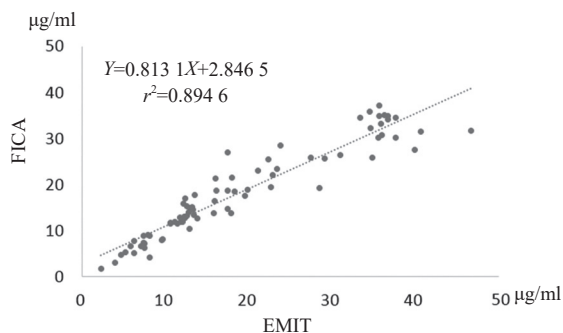


图1 EMIT法和FICA法测定结果散点图

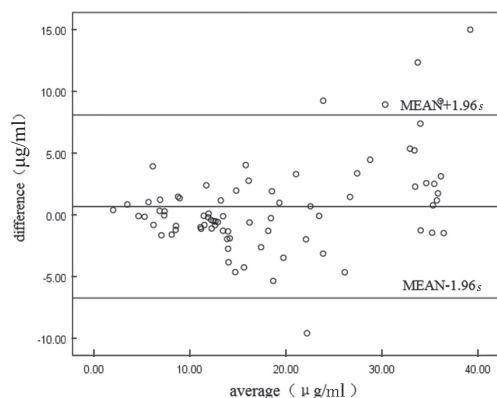


图2 EMIT法和FICA法测定结果的Bland-Altman分析

### 3 讨论

本研究利用EMIT法和FICA法检测万古霉素血液浓度。EMIT法是基于样本中万古霉素和酶试剂中葡萄糖6-磷酸脱氢酶(G6PDH)标记的万古霉素竞争抗体结合位点, 导致吸光度变化, 根据吸光度的变化测定酶活性的变化, 从而确定万古霉素的血药浓度<sup>[5, 8]</sup>。FICA法是基于抗原特异性免疫反应的新型膜检测技术, 该技术以条状纤维层析材

料为固定相, 测试液为流动相, 荧光标记抗体固定于连接垫, 通过毛细血管作用使待分析物在层析条上移动, 待测小分子抗原与荧光抗体结合后, 剩余的荧光标记抗体与检测线上的包被抗体结合, 通过内建曲线计算出样本浓度。本研究结果表明, EMIT法测定结果均值高于FICA法, 分析可能原因为两种方法原理不同, 检测结果可能存在一定差异, 另外FICA法在对样本稀释过程中由于人员的操作对结果产生影响, 而EMIT法在测定过程中由于环境温度变化等因素也会造成结果的偏差, 但两种方法检测结果的差异无统计学意义( $t=1.584, P=0.117$ )。

EMIT法线性范围为 $2.00 \sim 50.00 \mu\text{g/ml}$ , FICA法线性范围为 $1.00 \sim 40.00 \mu\text{g/ml}$ 。在准确度和精密度的比较中, 由于所使用的高质控靶值为 $52.60 \mu\text{g/ml}$ , 超过了两种检测方法线性范围, 所以只进行中、低质控的分析。由于两种方法线性范围存在差异, 因此在临床测定万古霉素血液浓度时, 为保证检测结果的准确性, 可根据样本可能的分布范围选择适合的检测方法。EMIT法有商业试剂盒, 样品处理简单, 可以同时测量多个样品, 但仪器及配套试剂价格较为昂贵, 对实验室检测温度要求高( $18^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$ ), 试剂盒需在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱保存<sup>[9-10]</sup>, 试剂盒为120人份包装, 有效期较短, 此方法适用于样本量较大, 经费充足的医疗机构<sup>[8, 11]</sup>。FICA法样本处理中存在两步稀释过程, 因此人员的操作对最终结果影响较大, 其试剂盒为单人份包装, 使用一次性测试卡, 可以有效避免试剂浪费, 仪器及配套试剂价格相对较低, 试剂盒可在 $2^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 条件下储存, 有效期较长(18个月), 此方法适用于样本量较少、经费有限的基层医疗机构<sup>[12]</sup>。

综上所述, EMIT法测定结果均值高于FICA法, 但其差异无统计学意义( $t=1.584, P=0.117$ ), 两种方法所得结果间具有相关性和一致性。由于两种方法线性范围存在差异, 因此在临床测定万古霉素血液浓度时, 为保证检测结果的准确性, 可根据样本可能的分布范围选择适合的检测方法。EMIT法和FICA法均为有效可靠的万古霉素血液浓度检测方法, 在临床选择测定方法时, 应综合考虑样本、实验室条件、人员配置等因素。

### 参考文献:

- [1] 万古霉素临床应用剂量专家组. 万古霉素临床应用中国专家共识(2011版)[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(8): 561-573.  
Expert Group of Vancomycin Clinical Dose. Chinese expert consensus on clinical application of Vancomycin[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2011, 30(8): 561-573.



- [2] 师亚玲, 方志远, 李苗, 等. 万古霉素首次监测与个体化给药后血药浓度未达标的影响因素分析 [J]. 中国药师, 2020,23(2):307-310.  
SHI Yaling, FANG Zhiyuan, LI Zhuo, et al. Analysis of the related factors in vancomycin concentrations not up to standard after first monitoring and individualized administration [J]. China Pharmacist, 2020,23(2):307-310.
- [3] HU M W, ANNE L, FORNI T, et al. Measurement of vancomycin in renally impaired patient samples using a new high-performance liquid chromatography method with vitamin B12 internal standard: comparison of high-performance liquid chromatography, emit, and fluorescence polarization immunoassay methods.[J]. Therapeutic Drug Monitoring, 1990, 12(6) : 562-569.
- [4] 张开礼, 李成, 李玉珍, 等. HPLC 法与微生物法测定人血浆中去甲万古霉素浓度的差异比较 [J]. 中国药房, 2015, 26(26):3655-3657.  
ZHANG Kaili, LI Cheng, LI Yuzhen, et al. Comparison of plasma concentration of norvancomycin by HPLC and microbiological method[J]. China Pharmacy, 2015, 26(26):3655-3657.
- [5] 王敏, 柳航, 金路, 等. 酶放大免疫分析法与二维高效液相色谱法监测万古霉素血药浓度的比较 [J]. 药学与临床研究, 2018, 26(1):26-29.  
WANG Min, LIU Hang, JIN Lu, et al. Comparison of EMIT and 2D-HPLC-UV in the quantification of vancomycin in human plasma[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2018, 26(1):26-29.
- [6] 廉江平, 丰航, 方志远, 等. EMIT 与 HPLC 法测定肾移植术后患者体内霉酚酸血药浓度结果比较 [J]. 现代检验医学杂志, 2017,32(3):74-78.  
LIAN Jiangping, FENG Hang, FANG Zhiyuan, et al. Research on results of plasma mycophenolic acid concentration detected by EMIT and HPLC in the patients after renal transplantation[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3):74-78.
- [7] 何娜, 苏珊, 翟所迪, 等. 《中国万古霉素治疗药物监测指南 (2020 更新版)》解读 [J]. 临床药物治疗杂志, 2021,19(1):12-16.  
HE Na, SU Shan, ZHAI Suodi, et al. Evidence-
- based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin:2020 update[J]. Clinical Medication Journal, 2021,19(1):12-16.
- [8] 乔小云, 朱怀军, 王羽. 酶放大免疫分析法监测万古霉素血药浓度的质控评估 [J]. 药学与临床研究, 2013, 21(5):516-519.  
QIAO Xiaoyun, ZHU Huaijun, WANG Yu. Evaluation of quality control for the therapeutic drug monitoring of vancomycin by the enzyme-multiplied immunoassay technique[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2013, 21(5):516-519.
- [9] 周清武. EMIT 法检测环孢素血药浓度的动态飘逸校正系数研究 [J]. 中国药房, 2018, 29(8):1078-1082.  
ZHOU Qingwu. Study on dynamic upwarp state correction coefficient of Cyclosporine blood concentration determined by EMIT[J]. China Pharmacy, 2018, 29(8):1078-1082.
- [10] 刘焕君, 张蕊, 李荣, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆霉酚酸浓度及与 EMIT 法的相关性分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(22):3802-3806.  
LIU Huanjun, ZHANG Rui, LI Rong, et al. Determination of mycophenolic acid in human plasma by LC-MS / MS and its correlation with EMIT[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, 36(22):3802-3806.
- [11] 徐霞, 纪松岗, 侯翔宇, 等. EMIT 法与 HPLC 法测定人全血环孢素谷浓度的比较 [J]. 中国药师, 2014, 17(12):2003-2006.  
XU Xia, JI Songgang, HOU Xiangyu, et al. Comparative study on concentration monitoring of CsA in human whole blood by EMIT and HPLC[J]. China Pharmacist, 2014, 17(12):2003-2006.
- [12] 王玲萍, 许中, 陆茜莹, 等. 干式时间分辨荧光免疫层析法检测血清抗链球菌溶血素“O”的方法学性能验证 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5):131-133,167.  
WANG Lingping, XU Zhong, LU Qianying, et al. Validation of dry time-resolved fluorescence immunochromatography for detection of serum anti streptolysin” O” [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5):131-133,167.

收稿日期: 2021-02-24 修回日期: 2021-05-08

(上接第135页)

- [21] WANG C Q. MiR-195 reverses 5-FU resistance through targeting HMGA1 in gastric cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019,23(9):3771-3778.
- [22] ZHAO Xiaomeng, DAI Lili, YUE Qifang, et al. MiR-195 inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of endometrial carcinoma cells by targeting SOX4[J]. J Biosci, 2019,44(6):146.
- [23] HAN Wei, WANG Lifan, ZHANG Linhan, et al. Circular RNA circ-RAD23B promotes cell growth and invasion by miR-593-3p/CCND2 and miR-653-5p/TIAM1 pathways in non-small cell lung cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019,510(3):462-466.
- [24] QIN Hailong, WANG Xuejun, YANG Bixian, et al. Notoginsenoside R1 attenuates breast cancer progression by targeting CCND2 and YBX3[J]. Chin Med J (Engl), 2021,134(5):546-554.
- [25] MITRA P. Transcription regulation of MYB: a potential and novel therapeutic target in cancer.[J]. Ann Transl Med, 2018,6(22):443.
- [26] GENG Guojun, YANG Yingtao, JIANG Jie, et al. MicroRNA-30a suppresses non-small cell lung cancer by targeting Myb-related protein B[J]. Exp Ther Med, 2018,15(2):1633-1639.
- [27] SU Keli, ZHANG Tingcui, WANG Yongrui, et al. Retraction Note: Diagnostic and prognostic value of plasma microRNA-195 in patients with non-small cell lung cancer[J]. World J Surg Oncol, 2019,17(1):119.
- [28] LI Qun, WANG Jianmin. Long noncoding RNA ZFAS1 enhances adriamycin resistance in pediatric acute myeloid leukemia through the miR-195/Myb axis[J]. RSC Adv, 2019, 9(48):28126-28134.

收稿日期: 2021-05-24 修回日期: 2021-09-09