

- [2] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华医学会中华儿科杂志编辑委员会. 新生儿败血症诊疗方案[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41: 897-899.
- [3] 吕媛, 任静, 缪珀, 等. 新生儿肺炎克雷伯菌败血症临床分析[J]. 中国新生儿科杂志, 2013, 28(2): 76-79.
- [4] SPECK K, RAWAT N, WEINER N C, et al. A systematic approach developing a ventilator-associated pneumonia prevention bundle [J]. Am J Infect Control, 2016, 44(6): 652-656.
- [5] CHUNG THE H, KARKEY A, PHAM THANH D, et al. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* [J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(3): 227-239.
- [6] ZHANG C, SHERMAN M P, PRINCE L S, et al. Paneth cell ablation in the presence of *Klebsiella pneumoniae* induces necrotizing enterocolitis (NEC)-like injury in the small intestine of immature mice [J]. Dis Model Mech, 2012, 5(4): 522-532.
- [7] 孙晔佳, 顾克菊. 某院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌检出与耐药表型分布[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(2): 130-137.
- [8] 湛敏, 陈泽彬, 欧阳珊, 等. 1 例产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌肺炎患儿的抗感染治疗分析[J]. 儿科药理学杂志, 2018, 24(5): 43-46.
- [9] 王芬芳, 杨坤祥, 徐华. 新生儿医院感染肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(1): 107-109.
- [10] STOESSER N, GIESS A, BATTY E M, et al. Genome sequencing of an extended series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonatal infections in a Nepali hospital characterizes the extent of community-versus hospital-associated transmission in an endemic setting [J]. Antimicrob agents chemother, 2014, 58(12): 7347-7357.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2018-03-29 修回日期:2018-07-27)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2019.06.017

• 论著 •

改良酶放大免疫法提高甲氨蝶呤检测灵敏度

邴海峰, 李中 (大连市儿童医院, 辽宁大连 116012)

[摘要]目的:通过对现有检测方法进行改良,将西门子 VIVA-E 生化分析仪对甲氨蝶呤的检测灵敏度从 0.30 $\mu\text{mol/L}$ 提升至 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 。方法:设置参数,降低试剂用量从 180 μL 降至 110 μL ,同时更改定标点浓度为 0、0.05、0.10、0.25、0.50 和 1.00 $\mu\text{mol/L}$,建立新方法。分别使用改良法、商业化方法及 LC-MS/MS 法测量相同的样本进行对照检验。结果:改良后新方法在 0.30~1.00 $\mu\text{mol/L}$ 范围内与商业化的方法有良好的相关性,在 0.05~1.00 $\mu\text{mol/L}$ 范围内改良法与 LC-MS/MS 法有良好的相关性。结论:改良法在提高灵敏度的前提下将单个试剂盒的测量次数从 140 次提升至 210 次,显著降低了检测成本,且检测结果准确可靠,可在临床推广应用。

[关键词]甲氨蝶呤,血药浓度,酶放大免疫法,灵敏度

[中图分类号]R917

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2019)06-0052-04

Improvement of Detection Sensitivity of Methotrexate by Modified Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

Bing Haifeng, Li Zhong (Dalian Children's Hospital, Liaoning Dalian 116012, China)

[Abstract]Objective: Through improving the existing detection method, to improve the sensitivity of the Siemens VIVA-E biochemical analyzer to methotrexate from 0.30 $\mu\text{mol/L}$ to 0.05 $\mu\text{mol/L}$. Methods: The new method was established by setting parameters, reducing the reagent dosage from 180 μL to 110 μL , and changing the fixed punctuation concentration to 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 and 1.00 $\mu\text{mol/L}$. The same samples were respectively measured by using the modified method, commercial method and LC-MS/MS method for the control test. Results: The improved method had good correlation with the commercial method in the range of 0.30~1.00 $\mu\text{mol/L}$. The improved method had good correlation with LC-MS/MS in the range of 0.05~1.00 $\mu\text{mol/L}$. Conclusion: Under the premise of improving sensitivity, the improved method increases the number of measurements of a single kit from 140 to 210, which greatly reduces the detection cost; and the detection results are accurate and reliable, and can be applied and promoted in clinical practice.

[Keywords] methotrexate; blood drug concentration; enzyme multiplied immunoassay technique; sensitivity

甲氨蝶呤(MTX)在儿科被广泛应用于淋巴细胞白血病等恶性肿瘤的治疗。静脉大剂量注射 MTX 后必须及时给予叶酸进行解救,以免出现严重不良反应,解救的用量及时机非常重要,关系到整个化疗的成败。现行化疗方案中,要

求 72 h MTX<0.10 $\mu\text{mol/L}$ 或 96 h MTX<0.05 $\mu\text{mol/L}$ 时方可停止解救^[1]。西门子公司 VIVA-E 生化分析仪提供了便捷的商业化检测方法,可在 30 min 内报告结果,满足临床需要。但在临床应用中存在一个明显的问题,检测下限只

作者简介:邴海峰(1973.11-),男,大学本科,主管药师,主要从事医院药学工作,E-mail: bhf139@163.com。

通讯作者:李中(1976.11-),女,硕士,主任药师,主要从事临床药学工作,E-mail: lzhong163@163.com。

能达到 0.30 $\mu\text{mol/L}$, 无法满足临床需要^[2-3]。本研究利用 Viva-E 提供的编程模式, 通过调整样本进样量和定标浓度, 以达到提升检测的灵敏度和降低成本的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

本次研究的仪器是西门子公司 VIVA-E 全自动生化分析仪, MTX 试剂及配套定标液购自西门子公司, 批号 6L119UL。质控品购自 Bio-Rad (Irvine, CA), 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的标准品购自上海阿拉丁试剂公司。进行 LC-MS/MS 法对照的仪器为 LC-20AD 液相色谱仪、AB SCIEX QTRAP® 4500 质谱仪。

1.2 试剂的配制

试剂套装中包含抗体/底物复合物 A、酶制剂 B、缓冲液及定标液。试剂 A 和 B 用去离子水分别复溶至 3.0 mL, 轻轻摇匀后于室温下放置 1 h, 之后用缓冲液按 1:9 的比例稀释。

部分浓度的定标液 (0、0.20、0.50、1.00 $\mu\text{mol/L}$) 按说明书上的要求直接使用 1.00 mL 去离子水复溶, 1.50 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 的定标物则分别加入 1.50 mL 和 2.00 mL 去离子水复溶至 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 。0.20 $\mu\text{mol/L}$ 的定标物则稀释至 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 定标物稀释至 0.10 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。新制备的定标曲线点为 0、0.05、0.10、0.25、0.50 和 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 对 VIVA-E 进行设置

Viva-E 提供编程模式可以自定试剂、样本取样量和定标点浓度。本研究将试剂 A 和 B 的取样量从 180 μL 降至 110 μL (110 μL 是 Viva-E 中 MTX 实验的最低用量)。试剂原包装中定标曲线的 6 个浓度为 0、0.20、0.50、1.00、1.50 和 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 。A 瓶和 B 瓶的试剂量减少后反应物的浓度不能高于 1.00 $\mu\text{mol/L}$, 因此新定标曲线修改为 0、0.05、0.10、0.25、0.50 和 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 。方法建立后, 浓度在 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 以上的样本在测量前需稀释至曲线范围内 (0.05 ~ 1.00 $\mu\text{mol/L}$)。稀释倍数为 10 倍、100 倍、1 000 倍。

1.4 批内及批间精密度

根据急性淋巴细胞白血病的诊疗指南, 将 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 作为定量限来验证精密度。使用 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的定标液及浓度分别为 0.21、0.42、0.78 $\mu\text{mol/L}$ 的三个样本进行批内 ($n=10$) 及批间精密度实验 ($n=25$)。比较测量结果与期望值。

1.5 线性关系

将 2.00 $\mu\text{mol/L}$ 定标液设为 (hc) 缓冲液设为 (c0), 按下列方法稀释后确定线性关系: 1hc+1c0 (1.00 $\mu\text{mol/L}$), 2hc+3c0 (0.80 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+2c0 (0.67 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+3c0 (0.50 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+5c0 (0.33 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+9c0 (0.20 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+19c0 (0.10 $\mu\text{mol/L}$), 1hc+39c0 (0.05 $\mu\text{mol/L}$)。每个配制好的样本测试 3 次, 然后用其均值确定线性关系。

1.6 LC-MS/MS 法的操作步骤

以盐酸苯海拉明为内标物, 乙腈为流动相沉淀蛋白。使用 Hypersil ODS-BP C₁₈ (5 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm) 柱进行液相分离。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下以 0.5 mL/min 的速度梯度洗脱。当 m/z 455.0 $\rightarrow$ 308.1 时检测甲氨蝶呤, 在 m/z 256.0 $\rightarrow$ 167.0 时

检测苯海拉明^[4-5]。

1.7 不同方法结果的比较

从大连市儿童医院血液科病房中取得 80 份样本, 每份样本都同时用改良 EMIT 法和 LC-MS/MS 法进行测量。两组结果比较后进行相关性回归分析 (MedCalc Statistical Software, Version 15.6.1)。其余 60 份样本分别采用商业化 EMIT 法及改良 EMIT 法进行测量确定相关性。

1.8 干扰性实验

将部分测试后的样品进行搅拌, 使红细胞破裂, 之后再测试, 两组结果进行配对 t 检验 (SPSS 23.0), 以确定血红蛋白对检测结果的影响。

将部分测试过的样品中添加 20% 脂肪乳使脂肪乳的浓度为 1 000 ng/dL, 之后再次进行测试, 两组结果进行配对 t 检验, 以确定脂肪乳对检测结果的影响。

使用不含有甲氨蝶呤的黄疸样本向其中加入定量的甲氨蝶呤, 将测量值与期望值进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 批内及批间精密度

配制 4 个不同浓度的样本 0.05、0.12、0.43、0.82 $\mu\text{mol/L}$, 每个样本连续测量 10 次为批内精密度; 每个样本每天测量 5 次, 连续测量 5 d, 为批间精密度。见表 1、表 2。

表 1 批内精密度实验 ($n=10$)

Level	Target	Mean	SD	% CV	% Bias
1	0.05	0.050	0.004	9.43	<0.01
2	0.12	0.121	0.010	8.22	0.83
3	0.43	0.428	0.021	5.02	-0.47
4	0.82	0.817	0.026	3.22	-0.37

表 2 批间精密度实验 ($n=25$)

Level	Target	Mean	SD	% CV	% Bias
1	0.05	0.049	0.006	11.62	-1.60
2	0.12	0.113	0.011	9.78	-5.67
3	0.43	0.418	0.019	4.55	-2.88
4	0.82	0.799	0.032	4.11	-2.59

2.2 线性关系

按前述方法将定标液稀释成 1.00、0.80、0.67、0.50、0.33、0.20、0.10、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的液体。以测量值为 Y 轴, 期望值为 X 轴, 得到的回归方程为 $Y=0.9913X+0.0046$ ($r^2=0.9997$)。

LC-MS/MS 法的测量结果在 0.002 ~ 2.200 $\mu\text{mol/L}$ (1 ~ 1 000 ng/mL) 的范围内也显示了良好的线性关系, 线性方程为 $Y=0.0955X-0.0260$ ($r^2=0.9985$)。批内与批间的 RSD 值均 <9.0%, 甲氨蝶呤的平均回收率为 95.86% ~ 112.31%。

2.3 改良 EMIT 法与其他检测方法的结果比较

分别用改良 EMIT 法、商业化 EMIT 法及 LC-MS/MS 法对样本进行测试, 结果如图 1 所示。在 0.05 ~ 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 改良法与 LC-MS/MS 法之间的相关性方程为 (Modified) = 1.0872 (LC-MS/MS) + 0.0281, $n=80$, $r=0.9968$, 相关性显著。在 0.30 ~ 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 改

良法与商业法的相关性方程为 (Modified) = 1.008 0 (Commercial) - 0.006 4, $n=45$, $r=0.998 7$, 相关性良好。

如图 2 所示, 分别使用改良法及 LC-MS/MS 法/商业化 EMIT 法测量相同的样本, Y 轴为同一样本分别用两种方法测量后的差值, X 轴为二者之间的均值。图中的 3 条水平线分别代表了均值、均值 + 1.96SD 及均值 - 1.96SD。差值均在 $\pm 1.96SD$ 之间, 表明两组之间并无显著性差异。

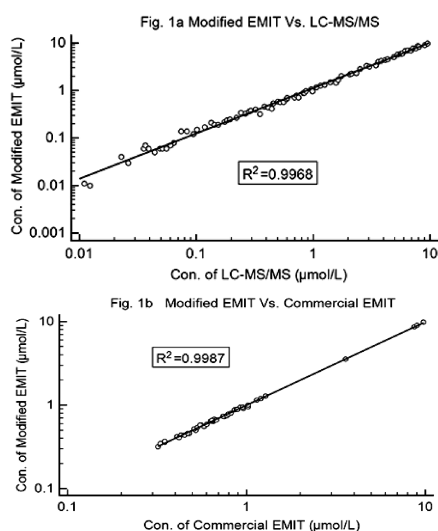


图 1 改良 EMIT 法与 LC-MS/MS 法和商业化 EMIT 法的线性回归图

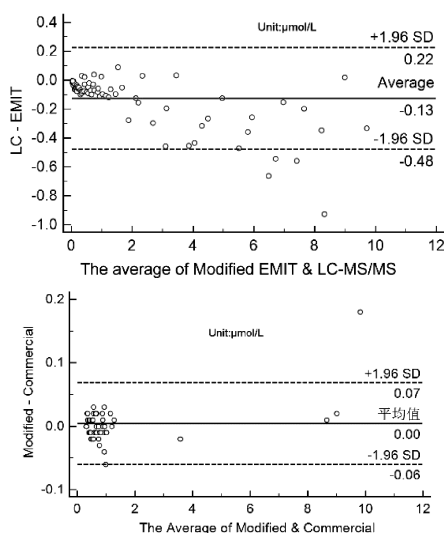


图 2 改良 EMIT 法与 LC-MS/MS 法及商业化 EMIT 法的 Bland-Altman 图

2.4 干扰性实验结果

血红蛋白、甘油三酯及胆红素实验的结果显示三组的偏倚都小于 10%。见表 3。

表 3 干扰性实验 ($n=5$)

样本	Mean	Bias	% Bias
空白	0.56		
血红蛋白	0.54	-0.02	-3.57
甘油三酯	0.61	0.05	8.93
胆红素	0.52	-0.04	7.14

3 讨论

检测甲氨蝶呤血药浓度是儿童急性白血病治疗方案中不可或缺的组成部分, 是保障患儿用药安全的重要手段之一, 其在低浓度 ($<0.1 \mu\text{mol/L}$) 时检测结果的准确性将直接影响临床治疗方案。目前国内常用的分析方法有高效液相法、荧光偏振免疫法和酶放大免疫法。高效液相法对实验室的要求较高, 操作繁琐不适合在临床作为常规检查方法。荧光偏振免疫法主要依赖于雅培公司的 TDX 仪器, 但雅培公司已经停止生产该仪器所需的试剂, 现已无法应用。酶放大免疫法主要使用西门子公司生产的 VIVA-E 生化分析仪, 该仪器在国外的测量范围在 $0.03 \sim 2600.00 \mu\text{mol/L}$, 而在我国的测量范围仅为 $0.30 \sim 2600.00 \mu\text{mol/L}$, 无法满足临床需要, 因此对现有方法进行改良是十分有必要和有价值的。

分析问题存在的原因主要是原有的测量范围过大, 与之对应的定标曲线范围同样较大 ($0.3 \sim 2.0 \mu\text{mol/L}$), 而实际工作中很少出现 $100 \mu\text{mol/L}$ 以上的结果, 从未出现 $150 \mu\text{mol/L}$ 以上的结果, 因此 $0.05 \sim 1.00 \mu\text{mol/L}$ 的曲线范围已经能够满足常规检验的需求。曲线范围缩小后, 定标液/检测样本的最大浓度也相应降低, 在机器自带的自定测量方法中将试剂 A 和 B 的用量从 $180 \mu\text{mol/L}$ 降至 $110 \mu\text{mol/L}$ 。

根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 颁布的 EP17 标准, 实验室可在现有方法上自行改良, 但需测量改良法的批内^[6]、批间精密性^[7]、相关干扰物^[8], 并与标准方法的测量结果进行对比, 结果显示线性关系良好^[9-10]。本研究结果显示改良法的测量结果在上述各项参数中均有良好的稳定性和重现性, 常见干扰物并不会影响测量的准确性。

在与不同检测方法的结果进行对比时发现, 当取样时间点 $\geq$ 给药结束后 66 h, 则 EMIT 法的结果与 LC-MS/MS 法相比有正向偏倚, 这与以往研究结果相一致^[11]。这可能与血中甲氨蝶呤的代谢物如 7-羟基甲氨蝶呤等有关, 在 EMIT 法中这些代谢物会被误认为甲氨蝶呤而使结果偏高。随着时间的延长, 代谢物所占的比例不断增加, 对浓度测定产生一定的影响, 但总体偏倚仍在可控范围内。

综上所述, 改良法将检测下限从原来的 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 提升至 $0.05 \mu\text{mol/L}$, 在低浓度范围内 ($0.05 \sim 0.30 \mu\text{mol/L}$) 精密性、准确度、重现性等方面都表现良好, 测量结果准确, 收到样品后平均 20 min 就可以得到结果, 完全能够满足临床需要。此外, 每次测试的试剂量从 $180 \mu\text{L}$ 降至 $110 \mu\text{L}$, 单个试剂盒的测量次数从 140 次提升至 210 次, 可降低检测成本, 改良 EMIT 法比商业化 EMIT 方法更适合在临床应用推广。

参考文献:

- [1] SOLDIN O P, SOLDIN S J. Therapeutic drug monitoring in pediatrics [J]. Ther Drug Monit, 2002, 24(2): 1-9.
- [2] BORGMAN M P, HIEMER M F, MOLINELLI A R, et al. Improved sensitivity for methotrexate analysis using enzyme

- multiplied immunoassay technique on the Siemens Viva-E instrument [J]. Ther Drug Monit, 2012, 34(2): 193-197.
- [3] MENDU D R, CHOU P P, SOLDIN S J. An improved application for the enzyme multiplied immunoassay technique for caffeine, amikacin, and methotrexate assays on the dade-behring dimension rxl max clinical chemistry system [J]. Ther Drug Monit, 2007, 29(5): 632-637.
- [4] CODEFROID M J, VON MEYER A, PARSCH H, et al. Multicenter method evaluation of the ARKTM Methotrexate immunoassay [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(2): 13-16.
- [5] AL-GHOBASHY M A, HASSAN S A, ABDELAZIZ D H, et al. Development and validation of LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of methotrexate, 6-mercaptopurine and its active metabolite 6-thioguanine in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia; Correlation with genetic polymorphism [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1038: 88-94.
- [6] GUO P, WANG X, LIU L, et al. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(5): 1789-1795.
- [7] BOUQUIE R, DESLANDES G, BERNALDEZ B N, et al. A fast LC-MS/MS assay for methotrexate monitoring in plasma: Validation, comparison to FPIA and application in the setting of carboxypeptidase therapy [J]. Anal Methods, 2013, 6(1): 178-186.
- [8] FOTOHI K, SKARBY T, SODERHALL S, et al. Interference of 7-hydroxymethotrexate with the determination of methotrexate in plasma samples from children with acute lymphoblastic leukemia employing routine clinical assays [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 817(2): 139-144.
- [9] BOUQUIE R, GRÉGOIRE M, HERNANDO H, et al. Evaluation of a methotrexate chemiluminescent microparticle immunoassay comparison to fluorescence polarization immunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(1): 119-124.
- [10] FDA Guidelines. Bioanalytical method validation [S]. 2013-15-18.
- [11] GUERRIERO E, SIMON N, NELKEN B, et al. Unexpected overestimation of methotrexate plasma concentrations; Analysis of a single center pediatric population [J]. Ther Drug Monit, 2014, 36(4): 499-504.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2018-02-11 修回日期:2018-05-03)

doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2019. 06. 018

• 综述 •

西罗莫司治疗婴幼儿卡梅现象的研究进展

杨家健 综述,周德凯 审校 (重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,重庆 400014)

[中图分类号]R979. 5

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2019)06-0055-04

Process of Sirolimus in the Treatment of Infant Kasabach-Merritt Phenomenon

Yang Jiajian, Zhou Dekai (Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

卡梅现象(Kasabach-Merritt phenomenon, KMP)指的是在卡波西样血管内皮瘤(kaposiform hemangioendothelioma, KHE)或者丛状血管瘤(tufted angioma, TA)基础上伴发的消耗性凝血功能障碍,导致全身血小板减少的一类疾病^[1,2],病变部位多位于躯干四肢,腹膜后及内脏器官偶见报道。初期表现为婴幼儿躯干四肢皮肤及皮下无痛性硬块,质韧,边界不清,表面紫色或者红色,皮温高。在疾病进展期由于瘤体体积增大迅速,颜色加深呈暗红色或者紫红色,在局部广泛浸润生长,血小板破坏过多过快,皮肤出现瘀点、瘀斑,严重时导致内脏器官出血而危及生命^[3]。临床研究表明,婴幼儿卡波西样血管内皮瘤发病率为0.071/100 000,发病患儿中有70%发展成KMP,而患有KMP病例中病死率达12%~30%^[1],故一经诊断需积极治疗。KMP诊断依据2001版《小儿血液病基础与临床》中的诊断标准^[4]:(1)存在体表皮肤及皮下原发性巨大血管瘤,经B超、CT或MRI影像学证实,部分患儿有病理结果支持诊断。(2)实验室检

查提示严重血小板减少,伴消耗性凝血功能障碍,具有出血倾向。(3)排除其他疾病所致的小血小板减少,如特发性血小板减少性紫癜和脾功能亢进等。临床上治疗方式多样,包括手术切除、药物、激光、放射、介入栓塞、输注血小板等。目前以药物治疗为主,包括糖皮质激素、长春新碱(vincristine, VCR)、 α -干扰素、 β -受体阻滞剂等,各种药物治疗效果各不相同,临床上首推糖皮质激素联合长春新碱治疗^[2,5]。西罗莫司靶蛋白(mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长、增殖、分化、细胞周期调控等多个方面起作用。mTOR信号通路是调控蛋白质合成、细胞增殖和血管生成的重要信号通路。西罗莫司(silimus)就是通过抑制mTOR起到治疗作用^[6]。现就西罗莫司治疗婴幼儿卡梅现象的研究进展作一综述。

1 婴幼儿 KMP 的药物治疗

糖皮质激素作为目前治疗 KMP 的首选药物,因其价格