

Toshiba 200FR NEO에서의 Syva EMIT Methotrexate Assay의 분석능 평가

Performance Evaluation of the Syva EMIT Methotrexate Assay on the Toshiba 200FR NEO

임진숙¹ · 김지명¹ · 손용학² · 구선희¹ · 권계철¹

Jinsook Lim, M.D.¹, Jimyung Kim, M.D.¹, Yong-Hak Sohn, M.D.², Sun Hoe Koo, M.D.¹, Gye Cheol Kwon, M.D.¹

충남대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 을지대학교병원 진단검사의학과²

¹Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon; ²Department of Laboratory Medicine, Eulji University Hospital, Daejeon, Korea

Background: Methotrexate (MTX) is an antifolate antagonist that is widely used for treating various malignancies and non-malignant diseases. MTX levels should be monitored when used in high concentration to determine when to start leucovorin rescue. In this study, we evaluated the analytical performance of the EMIT Methotrexate Assay on a 200FR NEO Chemistry Analyzer (Toshiba Medical System Co., Japan) and compared it with Viva-E Drug Testing System (Siemens Healthcare, Germany).

Methods: According to the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Evaluation Protocol (EP) 5-A2, three concentrations of the Liquechek Therapeutic Drug Monitoring Control (Bio-Rad Laboratories, USA) were analyzed twice a day for 20 days to monitor assay precision. The 200FR NEO and Viva-E instruments were compared using 40 patients' sera, according to CLSI EP9-A2. The linearity and carry-over rate were also evaluated.

Results: Between-run CVs for low-, medium-, and high-level controls were 4.9%, 0.9%, and 2.0%, respectively, whereas between-day CVs for low-, medium-, and high-level controls were 8.1%, 1.3%, and 3.5%, respectively. In the linearity test, the coefficient of determination (R^2) was 0.98 (0.06-1.92 $\mu\text{mol/L}$). In the comparison study, R^2 was 0.955, showing good correlation between the 200FR NEO and Viva-E instruments. The carry-over rate was 0.9%.

Conclusions: The EMIT assay showed good precision, linearity, and carry-over rate on the Toshiba 200FR. An excellent correlation was observed when comparing results obtained using the Toshiba and Viva-E instruments. In conclusion, the Syva EMIT MTX assay can be readily used for MTX monitoring on the Toshiba 200FR NEO.

Key Words: Methotrexate, EMIT, Therapeutic drug monitoring

서 론

치료 약물농도감시(therapeutic drug monitoring, TDM)는 약물의 투여용량과 용법조절에 중요한 정보를 제공해주는 도구로 그 중요성에 대한 인식이 높아짐에 따라 보편적인 검사로 자리 잡고 있다[1].

Corresponding author: Gye Cheol Kwon

Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital, 33 Munhwa-ro, Joong-gu, Daejeon 301-721, Korea

Tel: +82-42-280-7799, Fax: +82-42-257-5365, E-mail: kckwon@cnu.ac.kr

Received: July 3, 2013

Revision received: April 3, 2014

Accepted: April 7, 2014

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2014, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

치료감시 대상 약물인 methotrexate (MTX)는 엽산길항제(folate antagonist)로 피리미딘 뉴클레오티드(pyrimidine nucleotide)의 가용성을 줄여서 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA)의 합성을 방해하는 작용을 하는 약물이다. MTX는 급성림프모구백혈병(acute lymphoblastic leukemia)과 같은 혈액 종양뿐만 아니라 비혈액종양인 유방암, 설암, 인두암 그리고 고환암 및 류마티스 관절염, 건선과 같은 비종양질환에도 사용되고 있다[2, 3]. MTX의 치료약물 농도 측정은 고농도의 약물이 주입될 때 leucovorin 구조요법(rescue)을 언제 시작할지 결정하기 위해 일정한 간격으로 이뤄지며, leucovorin 구조요법은 MTX 수치가 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 이하가 될 때까지 계속되므로, 낮은 농도값을 정확하게 측정할 수 있는 것 또한 중요하다[3].

본 연구에서는 Toshiba 200FR NEO (Toshiba Medical Systems Co.; Tochigi-ken, Japan)에서의 Viva-E drug testing system (Siemens Healthcare; Erlangen, Germany)의 전용시약인 Syva EMIT

Methotrexate assay (Siemens Healthcare; Erlangen, Germany)의 MTX 측정수행능을 평가하고, 임상 유용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 장비 및 시약

Toshiba 200FR NEO 장비에서 Syva EMIT Methotrexate 시약의 수행능을 평가하였고, Viva-E drug testing system (Siemens Healthcare; Erlangen, Germany)의 결과와 비교하였다. 검사는 각 제조회사의 지침에 따라 시행되었다.

2. 방법

1) 정밀도(Precision)

CLSI EP5-A2 [4]에 따라 20일에 걸쳐 오전과 오후 2차례씩 매 검사마다 세 가지 농도(저농도, 중간농도, 고농도)의 Liquichek Therapeutic Drug Monitoring Control (Bio-Rad Laboratories; Quebec, Canada)을 두 차례씩 반복 측정하였다. 총 정밀도(Total precision), 검사내 정밀도(Within-run precision), 검사 간 정밀도(Between-run precision) 및 검사일 간 정밀도(Between-day precision)를 평가하였다.

2) 상관성(Comparison)

상관성은 CLSI EP9-A2에 따라 분석하였고[5], 충남대학교병원 외래 혹은 입원환자를 대상으로 MTX 검사가 의뢰된 검체 중 농도 범위가 0.03-14.8 µmol/L인 총 40개의 검체를 이용하였다. Toshiba 200FR NEO 장비와 Viva-E Drug Monitoring system에서 각각 두 차례 반복 측정하였고, 두 장비 간 측정은 2시간 이내에 이루어졌다. Ordinary linear 회귀분석으로 상관성을 평가하였다.

3) 직선성(Linearity)

직선성은 CLSI EP6-A에 따라 평가되었다[6]. 기존 검사실 장비로 측정된 고농도와 저농도의 환자 검체를 선정하여 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 혼합하였다. 제조된 5농도를 각각 4회 반복 측정한 뒤 계산치와 측정치 간의 회귀방정식과 결정계수(R^2)를 구하였다.

4) 검체 간 교차오염률

저농도와 고농도의 환자 검체를 고농도 검체(H1, H2, H3, H4)와 저농도 검체를 각각 4회(L1, L2, L3, L4) 반복 측정하였다. 아래의 식에 의해 교차오염률을 산출하였다.

$$\text{Carry-over rate} = \frac{L1-(L3+L4)/2}{(H2+H3)/2-(L3+L4)/2}$$

Table 1. Precision of the Syva EMIT Methotrexate Assay on the Toshiba 200FR NEO Chemistry Analyzer

Analyte	Mean methotrexate concentration (µmol/L)	Total (% CV)	Within-run precision (% CV)	Between-run precision (% CV)	Between-day precision (% CV)
Low	0.371	11.2	6.0	4.9	8.1
Medium	1.237	1.8	0.8	0.9	1.3
High	8.642	4.6	2.2	2.0	3.5

5) 통계분석

통계 분석은 Analyse-it (Microsoft; Leeds, United Kingdom)을 사용하였다.

결 과

1. 정밀도

총 정밀도, 검사내 정밀도, 검사 간 정밀도 및 검사일 간 정밀도는 Table 1과 같다.

2. 상관성

Toshiba 200FR NEO와 Viva-E Drug monitoring system에서 측정한 결과를 Ordinary 선형 회귀분석한 결과 기울기 0.96, 절편 0.16 그리고 상관계수 $R^2 = 0.955$ 로 나타났다(Fig. 1).

3. 직선성

Toshiba 200FR NEO를 이용해 낮은 농도와 높은 농도의 환자 검체로 조제한 5가지 농도의 검체를 4회 반복 측정한 결과 0.06-1.92 µmol/L의 농도 범위에서 $R^2 = 1.000$ 의 직선성을 보였다(Fig. 2).

4. 검체 간 교차오염률

고농도 물질 2.0 µmol/L과 저농도 물질 0.05 µmol/L로 검증한 검체 간 교차오염률은 0.9%였다.

고 찰

약물농도 측정방법은 크게 면역측정법(immunoassay)과 크로마토그래피법(chromatographic technique)이 있다[1]. 면역측정법에는 enzyme multiplied immunoassay (EMIT), fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 그리고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 있으며, 자동화가 쉽고 빠른 결과를 얻을 수 있어 임상에서 흔히 사용되고 있다[7, 8]. 그 중 EMIT법은 1972년 처음으로 개발된 동종면역측정법(homogeneous immunoassay)으로 세척단계가 없어 면역측정법을 자동화 분석기기에 쉽

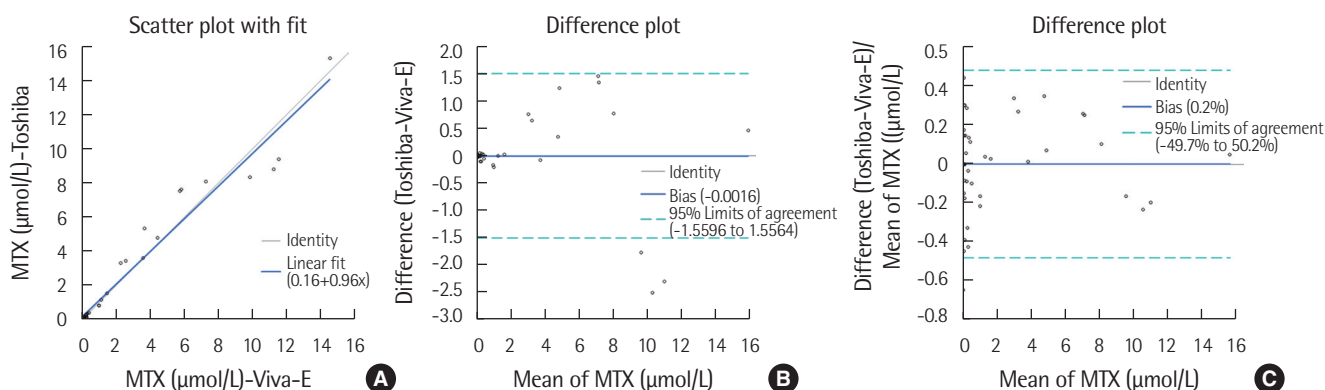


Fig. 1. Comparison of MTX level determinations measured by the Viva-E and the Toshiba 200FR NEO. Differences in results from either instrument are shown in (A) a scatter plot with an ordinary linear fit (blue line), (B) a Bland-Altman difference plot, or (C) a Bland-Altman percent difference plot.

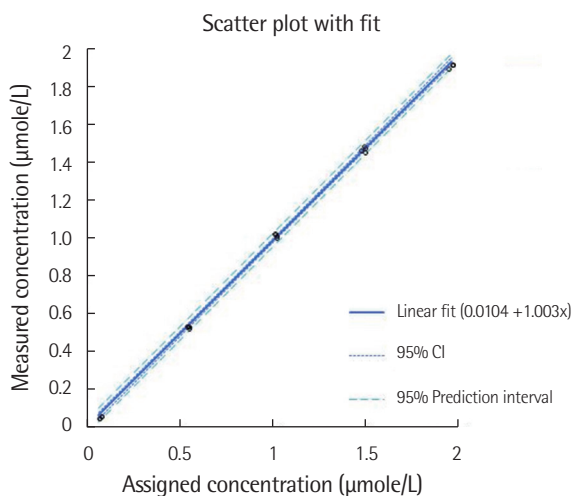


Fig. 2. Linearity of MTX values using the Syva EMIT Methotrexate Assay on the Toshiba 200FR NEO.

게 적용 가능하게 하였다. EMIT법에서는 항원이 효소와 복합체를 형성한 상태에서는 효소 활성에 영향을 미치지 않고 있다가 항원에 특이 항체가 결합하게 되면 효소 활성이 억제된다. 검체에 측정하고자 하는 항원이 존재하면 경쟁반응에 의해 효소-항체 복합체가 활성화된 형태로 되어 효소반응을 일으키며 그 활성도는 항원의 양에 비례한다. 주로 사용되는 효소는 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)이며 주로 색의 변화를 분광광도계로 측정한다[9].

본 연구에서 저자들은 Toshiba 200FR NEO 장비에서 Syva EMIT MTX assay 시약의 MTX 측정 수행능을 평가하였다. 결과에 따르면 검사 간 및 검사일 간 변이계수가 모두 5% 이하로 우수한 정밀도를 보였다. TDM은 환자의 약물농도의 변화를 지속적으로 관찰하는 것이므로 정밀도 평가가 중요하며 TDM을 위한 약물농도 측정에서는 검사차례 간 정밀계수가 5-10% 이내가 될 것을 권고함을

고려할 때[9], 적절한 정밀도를 나타낸 것으로 나타났다. 전용장비인 Viva-E로 측정한 수행능평가에서 고농도에서의 검사 간 정밀도는 2.22%로 본 연구와 크게 차이가 없었으나, 중간농도에서는 2.45%로 본 연구보다는 높게, 저농도에서는 3.86%로 본 연구보다 (4.9%) 더 낮게 나왔다[3]. 또한 Dimension (Siemens Healthcare; Erlangen, Germany)에서의 측정능을 평가한 연구에서 저농도, 중간농도 및 고농도의 검사내 정밀도가 각각 6.4%, 2.1%와 1.9%를 나타내어 본 연구와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다[10]. 2013년 대한 임상정도관리협회에서 시행하는 약물검사 외부정도관리에서 MTX에 대해 낮은 농도와 높은 농도의 값은 0.4 μmol/L와 9.03 μmol/L를 나타냈으며 총 18개 기관의 평균은 각각 0.39 μmol/L 및 8.77 μmol/L를 나타내었으며 표준편차지수(standard deviation index)는 각각 0.71 및 1.0을 나타내어 적절한 수행능을 평가받았다[11]. 직선성은 0.06-1.92 μmol/L의 MTX 농도 범위에서 $R^2=1.000$ 을 보여 우수한 결과를 나타냈고, 전용장비인 Viva-E (x)와의 비교평가에서 $y=0.96x+0.16$, $R^2=0.955$ 로 높은 상관관계를 나타내었다. 낮은 농도값에서는 bias가 크지 않으나, 높은 농도값에서는 bias가 크게 나타나 높은 농도값에서의 상관성은 낮은 값에 비해 떨어지는 것으로 나타났다. 차이의 원인으로 희석 방법에 의한 차이가 있을 수 있는데, Toshiba 장비는 2 μmol/L 이상의 검체에 대해 10배 자동희석이 들어가는 반면, Viva-E 장비에서는 6배, 36배, 216배, 1,296배의 수동 희석에 의한 차이가 나타날 수 있다. 검체 간 교차 오염률은 0.9%로 나타났다.

결론적으로 Syva EMIT MTX assay는 MTX 측정에 대해 Toshiba 200FR NEO 장비에서 우수한 정밀도와 직선성 및 낮은 검체 간 오염도와 전용장비인 Viva-E와 높은 상관성을 나타내었다. 따라서 전용장비의 추가로 구입 없이 현재 검사실에서 사용하고 있는 장비에 바로 적용이 가능하여 임상적으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각한다.

요 약

배경: Methotrexate (MTX)는 antifolate antagonist로 다양한 종양 및 비종양질환에 사용되고 있는 약물로, 치료약물농도감시의 대상이다. 본 연구에서는 MTX 측정에 있어 EMIT Methotrexate assay의 200FR NEO (Toshiba Medical System Co., Japan)에서의 측정 수행능을 평가하고, Viva-E drug testing system (Siemens Healthcare, Germany)와 비교평가를 수행하였다.

방법: CLSI EP5-A에 따라 QC 물질을 사용하여 20일간 정밀도를 평가하였다. 총 정밀도, 재현성, 검사 간 그리고 검사일 간 변이계수를 계산하였다. CLSI EP9-A2에 따라 200FR NEO와 Viva-E drug testing system에서 MTX를 측정하여 상관성을, 그리고 CLSI EP6-A에 따라 직선성을 5가지 농도에서 평가하였다. 또한 검체 간 오염률을 평가하였다.

결과: EMIT assay의 MTX 검사 간 변이계수는 저농도, 중간농도와 고농도에서 각각 4.9%, 0.9% 그리고 2.0%였으며, 검사일 간 변이계수는 8.1%, 1.3% 그리고 3.5%를 나타내었다. 직선성은 0.06-1.92 $\mu\text{mol/L}$ 범위에서 $R^2=1.000$ 으로 나타났다. Viva-E와는 상관도 $R^2=0.955$ 를 보여주었다. 검체 간 오염률은 0.9%로 나타났다.

결론: EMIT assay는 Toshiba 장비에서 우수한 정밀도, 직선성 및 낮은 검체 간 오염률을 나타냈다. 또한 Viva-E와 우수한 상관성을 나타내었다. 결론적으로 Syva EMIT MTX assay는 MTX 모니터링에 있어 검사실에서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2012년 충남대학교 연구기금의 지원을 받아 수행되었습니다. 본 연구의 수행에 큰 도움을 주신 검사실 임재실 선생님과 양석환 선생님의 노고에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Chung HS, Lee ST, Lee SY. Evaluation of Viva-E drug testing system. Korean J Lab Med 2007;27:330-7.
2. Klee GG, Westgard JO. Quality management. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th Ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012:163-203.
3. Borgman MP, Hiemer MF, Molinelli AR, Ritchie JC, Jortani SA. Improved sensitivity for methotrexate analysis using enzyme multiplied immunoassay technique on the Siemens Viva-E instrument. Ther Drug Monit 2012;34:193-7.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP5-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP9-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline. CLSI document EP6-A2. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
7. Glazko AJ. Phenytoin, chemistry and methods of determination. In: Levy RH, ed. Antiepileptic drugs. 3rd ed. New York: Raven press, 1989: 159-76.
8. Steijns LS, Bouw J, van der Weide J. Evaluation of fluorescence polarization assays for measuring valproic acid, phenytoin, carbamazepine and phenobarbital in serum. Ther Drug Monit 2002;24:432-5.
9. Armstrong VW and Oellerich M. Critical evaluation of methods for therapeutic drug monitoring. In: Evans WE, ed. Applied pharmacokinetics and pharmacodynamics. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:30-9.
10. Mendu DR, Chou PP, Soldin SJ. 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. Ther Drug Monit 2007;29:632-7.
11. Participant summary, external quality assessment in therapeutic drug monitoring and drug of abuse. <http://www.lab-qa.org> (Accessed October 2013).