

亚甲蓝/光化学法灭活病毒对血浆成分的影响**☆

焦红亮^{1,2}, 关方霞³, 杨波¹, 李建斌², 单泓², 杜英⁴, 胡祥⁵

Effects of methylene blue photochemical virus inactivation on plasma components

Jiao Hong-liang^{1,2}, Guan Fang-xia³, Yang Bo¹, Li Jian-bin², Shan Hong², Du Ying⁴, Hu Xiang⁵

Abstract

BACKGROUND: Virus inactivation to blood is one of blood transfusion safety measures. The effect of virus inactivation on human plasma by methylene blue/light has been confirmed, but the report concerning virus inactivation to plasma on plasma components is very few.

OBJECTIVE: To observe the effects of methylene blue photochemical virus inactivation to blood plasma on blood components' structure and function.

METHODS: A total of 40 blood samples were randomly selected. Fresh plasma from 400 mL whole blood within 6 hours was prepared and the quality was weighed for reserve samples, and then the filter with methylene blue virus inactivation was sterily connected. The final concentration of methylene blue was 0.9-1.3 $\mu\text{mol/L}$. Plasma added to methylene blue virus inactivation into 4 $^{\circ}\text{C}$ was put on a shelf box, with beat frequency of 60 times/minutes. 32 000-38 000 Lx intensity of 4 $^{\circ}\text{C}$ visible light was used to irradiate for 35 minutes. The residual methylene blue and white blood cells were filtered out from the plasma after illumination by the virus inactivated filters, mixed and remained sample 10 mL, and immediately placed in -80 $^{\circ}\text{C}$ refrigerator. The amount of plasma samples before and after exposure, methylene blue concentration, F VIII: C, F V: C, VWF, Fib Content was detected.

RESULTS AND CONCLUSION: After virus inactivated plasma, the recovery rate of plasma volume, F VIII: C, F V: C, VWF, Fib were (96.39 $\pm$ 1.73)%, (82.55 $\pm$ 9.25)%, (81.03 $\pm$ 15.27)%, (93.25 $\pm$ 6.17)%, (81.61 $\pm$ 14.25)%. The effect of methylene blue photochemical virus inactivation in plasma on most components of the plasma is not obvious, and meets the clinical demand for safe blood transfusion.

Jiao HL, Guan FX, Yang B, Li JB, Shan H, Du Y, Hu X. Effects of methylene blue photochemical virus inactivation on plasma components. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(1): 100-102.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 对血液进行病毒灭活是保障安全输血的措施之一, 亚甲蓝/光化学法灭活人血浆中病毒的效果已被证实, 但其对血浆成分影响的报道很少。

目的: 观察亚甲蓝光化学法病毒灭活血浆对血液成分结构和功能的影响。

方法: 随机选择 40 份采血后 6 h 内 400 mL 全血制备的新鲜血浆称质量留样, 然后与亚甲蓝病毒灭活过滤器无菌连接, 亚甲蓝的终浓度在 0.9-1.3 $\mu\text{mol/L}$ 。将加入亚甲蓝的血浆置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 病毒灭活箱的搁架上, 摆动频率 60 次/min, 利用 32 000~38 000Lx 光照强度的可见光 4 $^{\circ}\text{C}$ 照射 35 min, 将光照后的血浆通过病毒灭活过滤器滤除亚甲蓝和残余白细胞, 混匀后留样 10 mL, 立即置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。检测照射前后样品的血浆量、亚甲蓝浓度、FVIII: C、FV: C、VWF、Fib 含量的变化。

结果与结论: 血浆病毒灭活后血浆容量、FVIII: C、FV: C、VWF、Fib 的回收率分别为(96.39 $\pm$ 1.73)%、(82.55 $\pm$ 9.25)%、(81.03 $\pm$ 15.27)%、(93.25 $\pm$ 6.17)%、(81.61 $\pm$ 14.25)%。亚甲蓝光化学法灭活血浆病毒对血浆中大多数成分的影响不明显, 可以满足临床安全输血的需求。

关键词: 亚甲蓝; 输血; 凝血因子; 病毒灭活; 血浆

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011. 01.022

焦红亮, 关方霞, 杨波, 李建斌, 单泓, 杜英, 胡祥. 亚甲蓝/光化学法灭活病毒对血浆成分的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(1):100-102. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

为预防输注血液及其制品引起各种传染性病毒的感染, 对血液及其成分中的病毒进行灭活是保障输血安全的措施之一。目前, 临床用单人份血浆进行病毒灭活, 常用的方法是亚甲蓝光化学法(methylene blue photochemistry), 它在欧洲国家中应用较为普遍^[1], 该方法可有效地灭活血浆中的病毒, 其病毒滴度降低程度与所用的可见光强度和亚甲蓝浓度有直接关系^[2]。然而, 亚甲蓝光化学法灭活病毒的同时, 对血浆成分的影响究竟如何, 目前对单人份血浆病毒灭活国内外大多采用亚甲蓝光化学法, 由于此方法国家没有统一标准, 且病毒灭活过程对血液成分的结构和功能可能有一定的影响, 为了保证病毒灭活血浆质量, 采用灭活病毒处理前后的血浆进行检测分析, 实验比较了亚甲蓝光化学法病毒灭活前后血浆主要成分的变化。

响究竟如何, 目前对单人份血浆病毒灭活国内外大多采用亚甲蓝光化学法, 由于此方法国家没有统一标准, 且病毒灭活过程对血液成分的结构和功能可能有一定的影响, 为了保证病毒灭活血浆质量, 采用灭活病毒处理前后的血浆进行检测分析, 实验比较了亚甲蓝光化学法病毒灭活前后血浆主要成分的变化。

1 材料和方法

设计: 病毒灭活光照前后对比。

时间及地点: 实验于2010-01/06在河南省

Jiao Hong-liang☆, Studying for doctorate, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Henan Province Red Cross Blood Center, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
jhl7878@126.com

红十字血液中心完成。

材料:

试剂及仪器	来源
一次性血浆病毒灭活过滤器, 病毒灭活箱	上海血液技术公司
百级净化间, 高频热合机	德国
全自动血凝分析仪	CA-500series, 日本
固相萃取柱(PLB 20 g/L)	郑州英诺色普公司
	进口分装
可见-紫外分光光度计	UV-2401PC, 日本
大容量低温离心机	美国
电子天平	上海方瑞厂

实验方法:

制备方法: 利用采血后6 h内的400 mL全血制备新鲜血浆, 在百级净化间内无菌连接血浆袋和病毒灭活过滤器, 使血浆缓慢通过过滤器上的亚甲基蓝扣, 并使亚甲基蓝完全融化, 将融入亚甲基蓝的血浆流入病毒灭活过滤器的一个空袋中, 使亚甲基蓝的终浓度在0.9~1.3 $\mu\text{mol/L}$, 混匀后留样10 mL, 立即置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。然后将加入亚甲基蓝的血浆置入4 $^{\circ}\text{C}$ 病毒灭活箱的搁架上, 摆动频率60次/min, 利用32 000~38 000Lx光照强度的可见光照射35 min, 将光照后的血浆通过病毒灭活过滤器滤除残余的亚甲基蓝和白细胞, 混匀后留样10 mL, 立即置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。检测照射前后的两次样品, 用于测定血浆量、FVIII : C、Fib、VWF、FV : C含量及亚甲基蓝浓度的变化。

检测方法: 随机抽取40份制备的新鲜冰冻血浆, 利用电子天平测定血浆病毒灭活过滤前后的容量变化, 利用固相萃取柱(PLB 20 g/L)对血浆样品中亚甲基蓝进行萃取分离, 分光光度计法测定病毒灭活过滤前后亚甲基蓝含量, 利用全自动血凝分析仪(CA-500series)测定病毒灭活过滤前后因子FVIII : C、Fib、VWF、FV : C含量。

主要观察指标: 照射前后样品的血浆量、亚甲基蓝浓度、FVIII : C、FV : C、VWF、Fib含量的变化。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 治疗前后各指标的比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 病毒灭活前后血浆容量、凝血因子含量见表1。

表1 病毒灭活前后血浆容量及凝血因子成分变化
Table 1 Change of plasma volume and coagulation factors before and after virus inactivation ($\bar{x}\pm s$, $n=40$)

Item	Before virus inactivation illumination	After virus inactivation filtration
Plasma volume (g)	236.55 $\pm$ 14.30	231.07 $\pm$ 16.69
FVIII : C(%)	112.33 $\pm$ 25.18	91.08 $\pm$ 15.25
Fib(mg/L)	2 262.20 $\pm$ 322.10	1 853.00 $\pm$ 342.10
VWF	85.59 $\pm$ 6.32	83.23 $\pm$ 5.45
FV : C	73.32 $\pm$ 9.33	57.14 $\pm$ 15.76

2.2 病毒灭活后血浆容量、FVIII : C、Fib、VWF、FV : C回收率 见表2。

表2 病毒灭活后血浆容量、FVIII : C、Fib、VWF、FV : C回收率
Table 2 Recovery rate of plasma volume, FVIII : C, Fib, VWF, FV : C after virus inactivation ($\bar{x}\pm s$, $n=40$, %)

Item	Recovery rate
Plasma volume	96.39 $\pm$ 1.73
FVIII : C	82.55 $\pm$ 9.25
Fib	81.61 $\pm$ 14.25
VWF	93.25 $\pm$ 6.17
FV : C	81.03 $\pm$ 15.27

3 讨论

目前亚甲基蓝光化学方法进行血浆病毒灭活国家没有统一标准, 且亚甲基蓝加入血浆后血浆的外观色泽可能有所改变, 同时经过病毒灭活过滤后血浆成分组分会发生变化, 因此严密观察对比分析血浆病毒灭活前后各项指标变化, 对改进制备方法、验证灭活效果、规范质量控制, 保证血液安全将会有重要意义。用于亚甲基蓝光化学法灭活病毒的分子生物学机制可能主要是病毒的各种成分如包膜和核酸成为攻击目标而使病毒失去活性, 病毒的表面结构受到破坏, 这些损伤可抑制病毒感染的早期过程, 如病毒对宿主细胞的吸附和侵入^[3-8]。而病毒灭活的效力取决于光照温度、光照时间、光照强度、血袋容量、亚甲基蓝浓度等因素^[9-15]。血浆病毒灭活的方法很多, 但单份血浆病毒灭活时常用亚甲基蓝光照灭活方法^[16-17]。表2结果显示, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 病毒灭活箱光照强度为32 000~38 000Lx条件下照射35 min, FVIII : C、FV : C、VWF、Fib的回收率分别为(82.55 $\pm$ 9.25)%、(81.03 $\pm$ 15.27)%、(93.25 $\pm$ 6.17)%、(81.61 $\pm$ 14.25)%。

Correspondence to:
Yang Bo, Professor,
Doctoral supervisor,
Department of
Neurosurgery, First
Affiliated Hospital,
Zhengzhou
University,
Zhengzhou 450052,
Henan Province,
China
yangbo96@126.com

Supported by: the
Key Subject
Construction
Program of
Third-Stage 211
Engineering of
Zhengzhou
University*, the
Medical Science and
Technology
Innovation Talent
Engineering Program
of Henan Province,
No. 2005018*

Received: 2010-10-08
Accepted: 2010-11-12

¹ 郑州大学第一附属医院神经外科, 河南省郑州市450052; ² 河南省红十字血液中心, 河南省郑州市450014; ³ 郑州大学生物医学工程学系, 河南省郑州市450052; ⁴ 郑州大学基础医学院微生物与免疫学教研室, 河南省郑州市450052; ⁵ 深圳市北科生物科技有限公司, 广东省深圳市518000

焦红亮^{*}, 男, 1978年生, 河南省郑州市人, 汉族, 郑州大学在读博士, 主要从事干细胞基础和临床应用方面的研究。
jhl787878@126.com

通讯作者: 杨波, 教授, 博士生导师, 郑州大学第一附属医院神经外科, 河南省郑州市450052
yangbo96@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)01-00100-03

收稿日期: 2010-10-08
修回日期: 2010-11-12
(20101008026/WL·Q)

说明在此条件下照射对血浆中的主要凝血因子有一定的损伤, 但影响甚微, 这可能与病毒灭活过滤器活性炭吸附, 以及凝血因子在体外血浆中不稳定有一定关系。病毒灭活后凝血因子含量基本符合国家标准, 与国内外其他实验所得结果相似^[18-19]。但是检测中有2份样本照射前凝血因子含量偏低, 可能与供血者的个体差异(年龄、血型)、以及目前的户外采血冷链环节难以控制有一定关系。表1, 2结果显示过滤后血浆容量为(231.07±16.69) g, 回收率达到(96.39±1.73)%, 血浆损失量仅为8~10 mL, 不影响临床使用。文献报道亚甲蓝浓度小于一定浓度时, 病毒灭活达不到效果^[20], 本实验亚甲蓝加入浓度为(1.13±0.22) μmol/L, 基本满足了病毒灭活的要求。

研究表明, 经过亚甲蓝光化学技术病毒灭活的血浆, 对血浆成分的影响较小, 灭活后的血浆基本符合国家标准, 可以满足临床安全输血的需求。通过实际应用认为, 亚甲蓝/光化学病毒灭活血浆技术能够起到杀灭血浆中未检测病毒和弥补检测窗口期的作用, 而且对血浆主要成分的影响作用不大, 仍能确保血浆有效成分的临床应用效果, 它的应用可能构筑防止输血传染病的最后一道防线, 对提高输血安全水平有一定的作用。

4 参考文献

- [1] Mohr H, Knüver-Hopf J, Gravemann U, et al. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion*. 2004;44(6):886-890.
- [2] Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16(4):381-394.
- [3] Ni XJ, Zheng L, Qian KC. *Linchuang Shuxue yu Jianyan*. 2007;9(1): 85-87.
倪小菊, 郑岚, 钱开诚. 亚甲蓝光化学法灭活病毒的分子生物学机制[J]. *临床输血与检验*, 2007,9(1):85-87.
- [4] Depasse F, Sensebé L, Seghatchian J, et al. The influence of methylene blue light treatment and methylene blue removal filter on fibrinogen activity states and fibrin polymerisation indices. *Transfus Apher Sci*. 2005;33(1):63-69.
- [5] Huang Q, Fu WL, Chen B, et al. Inactivation of dengue virus by methylene blue/narrow bandwidth light system. *J Photochem Photobiol B*. 2004;77(1-3):39-43.
- [6] McCullough J. Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(6):945-955.
- [7] Liu J, Liu J. *Linchuang Shuxue yu Jianyan*. 2009;11(2):189-192.
刘静, 刘军. 亚甲蓝光化学法灭活血浆病毒的研究进展[J]. *临床输血与检验*, 2009,11(2):189-192.
- [8] Li XY, Li QW, Zhang XS, et al. *Shandong Yiyao*. 2007;47(13):64.
李信业, 李钦伟, 张心声, 等. MB/光化学病毒灭活对血浆内凝血因子活性的影响[J]. *山东医药*, 2007,47(13):64.
- [9] Fang JX, Liu X, Sun SQ, et al. *Hebei Yiyao*. 2010;32(15):2108-2109.
房景霞, 刘鑫, 孙绍秋, 等. 亚甲蓝光化学法血浆病毒灭活对凝血因子Ⅷ的影响[J]. *河北医药*, 2010,32(15):2108-2109.
- [10] Shen L, Li JM, Liang XH, et al. *Zhongguo Shuxue Zazhi*. 2006;19(6):474-475.
沈莉, 李建民, 梁晓虎, 等. 亚甲蓝/光化学病毒灭活法对血浆蛋白浓度及凝血因子活性的影响[J]. *中国输血杂志*, 2006,19(6):474-475.
- [11] Politis C, Kavalierou L, Hantziara S, et al. Quality and safety of fresh-frozen plasma inactivated and leucoreduced with the Theraflex methylene blue system including the Blueflex filter: 5 years' experience. *Vox Sang*. 2007;92(4):319-326.
- [12] Zhao CY. *Yixue Jianyan yu Linchuang*. 2007;18(5):67.
赵翠云. 亚甲蓝血浆病毒灭活对其主要质控指标的影响及残留亚甲蓝检测[J]. *医学检验与临床*, 2007,18(5):67.
- [13] Osselaer JC, Debry C, Goffaux M, et al. Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen. *Transfusion*. 2008;48(1):108-117.
- [14] Papin JF, Floyd RA, Dittmer DP. Methylene blue photoinactivation abolishes West Nile virus infectivity in vivo. *Antiviral Res*. 2005;68(2):84-87.
- [15] Zhuang PF, Sang LY, Jiang GJ. *Zhejiang Yufang Yixue*. 2010;22(9):90-91.
庄培芬, 桑列勇, 蒋国瑾. 亚甲蓝光化学法灭活病毒对血浆成分的影响[J]. *浙江预防医学*, 2010,22(9):90-91.
- [16] Song YH, Xin YH. *Linchuang Xueyexue Zazhi: Shuxue yu Jianyanban*. 2007;4(1):36-37.
宋玉和, 辛永红. 血液成分病毒灭活与安全输血[J]. *临床血液学杂志: 输血与检验版*, 2007,4(1):36-37.
- [17] Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci*. 2008;39(1):75-82.
- [18] Cheng YG, Bai ZR, Jia HZ. *Linchuang Xueyexue Zazhi: Shuxue yu Jianyanban*. 2007;4(4):169-170.
程玉根, 柏则蓉, 贾红志. 亚甲蓝光化学法灭活血浆病毒对血浆成分的影响[J]. *临床血液学杂志: 输血与检验版*, 2007,4(4):169-170.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 全血及成分血质量要求[S]. 中华人民共和国国家标准. GB-18469-2001, 2001:1.
- [20] Cardigan R, Philpot K, Cookson P, et al. Thrombin generation and clot formation in methylene blue-treated plasma and cryoprecipitate. *Transfusion*. 2009;49(4):696-703.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 郑州大学 211 工程三期重点学科建设项目; 河南省医学科技创新人才工程项目(2005018)。

作者贡献: 实验设计、操作实施及结果评估为全部作者, 均经过系统培训, 未采用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验得到医院和血液中心伦理委员会同意, 没有与相关伦理道德冲突的内容。

本文创新性: 检索数据库: 应用计算机检索 2007-01/2010-03 中国期刊全文数据库与万方数据库。通过实际应用认为, 亚甲蓝/光化学病毒灭活血浆技术能够起到杀灭血浆中未检测病毒和弥补检测窗口期的作用, 而且对血浆主要成分的影响作用不大, 仍能确保血浆有效成分的临床应用效果, 它的应用可能构筑防止输血传染病的最后一道防线, 对提高输血安全水平有一定的作用。这在血液系统中推广亚甲蓝光化学技术病毒灭活提供了更为科学的依据。