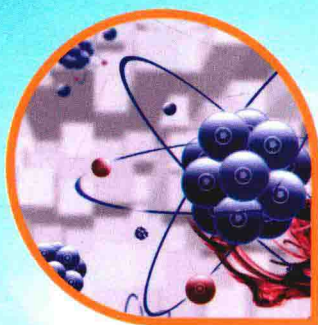


血液的 病毒灭活与过滤

主编 © 安万新 于卫建



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

血液的病毒灭活与过滤

主 编：安万新 于卫建

副主编：梁晓华 高 勇 郑井滨 范亚欣

编 委：安万新 于卫建 梁晓华 高 勇

郑井滨 范亚欣 叶 萍 孟庆丽

柏乃庆



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

血液的病毒灭活与过滤 / 安万新, 于卫建主编. —北京: 科学技术文献出版社, 2014. 5

ISBN 978-7-5023-8972-7

I . ①血… II . ①安… ②于… III . ①血液学 IV . ① R331.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 099833 号

血液的病毒灭活与过滤

策划编辑: 薛士滨 责任编辑: 薛士滨 责任校对: 张咧喏 责任出版: 张志平

出 版 者 科学技术文献出版社
地 址 北京市复兴路15号 邮编 100038
编 务 部 (010) 58882938, 58882087 (传真)
发 行 部 (010) 58882868, 58882874 (传真)
邮 购 部 (010) 58882873
官 方 网 址 www.stdp.com.cn
发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者 北京京华虎彩印刷有限公司
版 次 2014 年 5 月第 1 版 2014 年 5 月第 1 次印刷
开 本 710×1000 1/16
字 数 178千
印 张 11.25
书 号 ISBN 978-7-5023-8972-7
定 价 58.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

本书由大连市人民政府资助出版

前 言

血液的病毒灭活和血液过滤是研究血液成分（红细胞、白细胞、血小板和血浆）的病原体灭活和血液过滤的方法、机理和效果评价的一门新型学科，是现代医学的新领域，为医学发展开拓了一条新途径。

多年临床输血实践证明，输血在临床治疗和急救中发挥了重要的作用，至今仍不可替代。世界先进国家输血发展经历表明，医学越发展，临床输血用量越大。我国的临床用血量也是逐年增加，到2011年全国采血量已达二千五百多万单位（每单位为200mL）。人均均为3.8mL左右。因此血液及血液成分的安全输注越来越成为人们关注的问题。

近年来通过实施无偿献血制度和严格的血液筛查，输血后传播病原微生物的风险已大大降低，但是由于“窗口期”漏检、检测方法的灵敏度以及检测病原体种类等局限性，尚不能完全杜绝输血后病原微生物的传染风险。因此大力研究和开发血液及血液成分病原体微生物灭活和过滤技术，为临床输血安全提供了一个可行的方法。病毒灭活技术自20世纪70年代开展以来，曾先后出现了数十种采用物理方法和化学方法的灭活技术，分别用于红细胞、血小板、血浆以及其他血液成分的病原体微生物的灭活，均取得了很好的效果。目前研发出的S/D方法、S-59光化学法、亚甲蓝光化学法以及核黄素光化学法等已用于红细胞、血小板和血浆等血液成分的病毒灭活。其中亚甲蓝光化学法灭活技术最为成熟，国内外均已用于临床。

临床输血实践表明，输血后会引发多种免疫性输血反应，其主要原因是输注的白细胞引起的。早在70年代就有学者提出去除白细胞后进行输血，并取得良好效果。经过国内外学者多年的研究已研制出多种过滤器，至今已研制成第四代去白细胞过滤器，可清除白细胞99.9999%以上。此种过滤器不仅将血液中的白细胞去除，而且也将血液中的细菌、微生物碎片去除。经过滤除白细胞后的血液或血液成分，可以显著减少因输注白细胞

引起的输血反应。

1998年以后，全国大多血液中心、中心血站以及医院血库，曾先后开展血浆的病毒灭活和去白细胞过滤器的研究和临床应用取得很好的效果。为了更好地应用血液的病毒灭活和血液过滤技术，提高输血安全性，满足广大输血工作者和临床医务人员对这方面的基础理论和技术知识的迫切需求，大连市血液中心组织专家根据多年输血工作的经验以及最新的国内外血液病毒灭活和血液过滤的研究进展撰写此书。本书力求从基本概念、研究途径、方法和结果为读者做详细的介绍。

血液病毒灭活和血液过滤是输血医学中一个新的领域，在不断与其他相关学科的交叉发展中得到了深化。囿于医学发展的惊人速度，加之作者的学识水平有限，有不妥之处在所难免，恳请专家和读者批评指正。

本书获得大连市人民政府资助出版。

► 目 录

第一章 红细胞的病毒灭活	1
第一节 概况	2
第二节 红细胞的病毒灭活方法	4
一、洗涤技术	5
二、过滤技术	6
三、 γ 射线和紫外线照射处理	6
四、碘化淀粉处理	6
五、光动力学技术（多靶点的光化学技术）	7
六、以核酸为靶目标	17
第三节 血液病毒灭活机理	24
一、作用于病毒蛋白	24
二、作用于病毒核酸	26
三、同时作用于病毒蛋白和核酸	27
第四节 红细胞病原体灭活技术效果的评价	28
一、影响因素	28
二、标准	28
三、灭活效果的检测方法	29
第五节 红细胞病毒灭活检测具体方法	31
一、红细胞悬液病毒灭活效果的检测	31
二、巨细胞病毒灭活效果的检测	32
三、对红细胞膜损伤的检测	33
四、病原体灭活处理对红细胞功能影响的检测	35
五、病毒灭活的动物模型的建立	41

第二章 血小板的病毒灭活	43
第一节 输注血小板存在的问题	44
一、血小板输注中的潜在危险	44
二、现有检测技术存在的缺陷	45
第二节 血小板病毒灭活技术	46
一、光敏剂	46
二、血小板病毒灭活技术	47
第三节 血小板病原体灭活技术的评价	59
一、灭活病原体的有效性评价	59
二、血小板浓缩液测定	59
第三章 血浆的病毒灭活	64
引 言	65
第一节 单袋临床用血浆的病毒灭活	67
一、亚甲基蓝加可见光照射法 (MBR)	67
二、补骨脂类化合物/紫外线 (UVA) 照射	80
三、核黄素光化学技术	81
四、压力循环技术	82
五、去除白细胞	83
第二节 大批量血浆病毒灭活方法	83
一、巴斯德消毒法 (液态加热法): 有或无稳定剂-白蛋白	84
二、有机溶剂/清洁剂法 (S/D)-凝血因子	85
三、 β -丙内酯/紫外线 (UVA) 法	88
四、用滤膜过滤 (Amicon Milliporen)	89
五、pH 4或4.25/加或不加胃蛋白酶孵育灭活方法	89
六、UV照射	91
七、抗体介导中和病毒	91
八、血浆蛋白制品的不良反应	91
第三节 病毒灭活血浆质量检测	92
一、指示病毒	92
二、病毒滴度	92
三、血浆蛋白测定	93

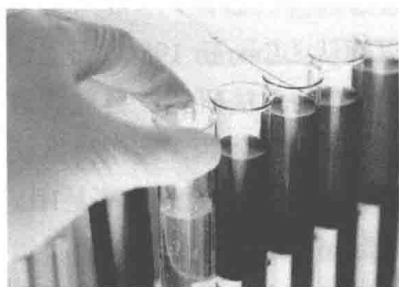
四、酶活性	93
五、抗体蛋白结构	93
六、补体C3	93
七、残余白细胞测定	94
八、动物安全试验	94
九、血浆中亚甲蓝残留量测定-固相提取法	94

第四章 血液的过滤

第一节 输血不良反应	97
一、输血不良反应和输血相关疾病	97
二、输血不良反应产生的原因	99
三、减少输血不良反应的方法	101
第二节 白细胞过滤器	103
一、概况	103
二、白细胞过滤器的类型和原理	108
三、影响过滤效果的因素	109
四、白细胞过滤器过滤时间的选择	110
五、过滤器种类	112
六、少白细胞成分的制备过程和方法	115
七、去白细胞过滤血的临床应用	115
第三节 血小板过滤器	126
一、概况	126
二、临床应用	127
第四节 白细胞滤器检测方法	132
一、凝血	132
二、血小板和血小板功能	133
三、血液学	133
四、细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α) 的测定	137
第五节 白细胞过滤器的副作用	137
一、在过滤过程中引起的溶血	137
二、白细胞过滤器对血液凝血因子的影响	138
三、白细胞过滤器对镰刀细胞特征献血员的影响	139

四、滤除白细胞成分输血的可能副作用	139
第六节 白细胞过滤器其他应用	139
一、吸附在白细胞过滤器上的白细胞再利用-制备干扰素	139
二、应用白细胞过滤器过滤脂肪颗粒	140
三、应用白细胞过滤器过滤肿瘤细胞	141

主要参考文献	143
--------------	-----



第一章

红细胞的病毒灭活

第一节 概况

近年来,随着医学科学的发展,输血在临床医学中的地位越来越重要,尤其是随着心血管外科、器官移植、肿瘤和血液学的发展,血液的需求量越来越多,促进了输血事业的发展。红细胞输注是平时、战时与重大灾害时进行急救及预防疾病的一项主要治疗措施,挽救了无数生命,并保证了许多其他治疗的安全实施。但输注同时也可能引起各种输血不良反应(指急慢性免疫性和非免疫性的非传染性输血并发症)和经血传播疾病(主要为肝炎、艾滋病毒、细菌和寄生虫)等,对受血者构成很大威胁,严重时危及生命。

20世纪80年代早期,输血引起HIV感染得以确认(Curran 1984)。促使人们更加关注血液制品病毒灭活和提高血液安全性的方法研究。目前,对献血者的筛选和血液样品的检测有效地提高了输血的安全性,经血传播疾病的发生率从2.500%降低到0.175%。每单位输血感染病毒的危险率是HIV 1:660000, HBV 1:200000, HCV 1:3000。Aubuchon等(1977)报道HCV为1/100000。HBV为1/63000, HIV为1/680000。但是输血传播疾病的危险仍然存在。因为:①现在常规检测方法的灵敏度有限,即使用核酸检测也不能保证一定能够检测出病毒;②从病毒感染到体内出现病毒标志物这段时间称谓“窗口期”,常规检测方法检测不到病毒的存在;③不断会有新的病毒出现;④对血液制品只能检测有限的几种病毒:如HIV1/2, HBV, HCV等。检测结果阴性的血液,不能排除其他病毒存在的可能。如细小病毒B₁₉感染健康的成年人,一般无症状,但可使免疫缺陷患者产生慢性贫血等症状。若检测所有已知病毒并筛除阳性血液,不仅需大量经费,还会导致血液供应严重不足,另外,约有30%以上的人,在其一生中需要输血,因而要求红细胞应尽可能地安全,解决这些问题的根本途径在于开展一种能够灭活血液细胞中病原体的有效途径。

对于灭活无细胞血液制品中的病毒已有一些成熟的方法:如加热法,有机溶剂/表面活性剂等方法。而对血液细胞成分就不一样了,因为血细胞成分较为复杂(红细胞、血小板和白细胞),除了血细胞结构比蛋白质

复杂之外,而且血细胞成分很不纯,如一个单位红细胞成分除含有大约 10^{11} 个红细胞外,还含有 $10^8 \sim 10^9$ 个白细胞, $1 \sim 7 \times 10^{10}$ 个血小板以及含有一定量的血浆。通过血细胞传播的病毒较多,如 HBV、HIV 1/2、B₁₉、HTLV 1/2 和 CMV 等。血液成分中病毒的存在形式也更为复杂,既有游离的病毒,黏附在细胞膜上的病毒,感染进入细胞的病毒,还有整合入细胞 DNA 中病毒核酸(前病毒),这都对去除和灭活带来更大难度,另外红细胞是一类具有特殊的生理功能,自营代谢的生命体,对物理化学因素的耐受性远不如血浆蛋白,为此用于红细胞病毒灭活方法困难,仍处于实验性阶段。

其关键在于:

(1) 除能灭活游离在细胞上清液中的病毒外,还必须亦能灭活黏附在细胞膜上的病毒和感染进入细胞内病毒以及整合入细胞 DNA 中的病毒核酸,如 HIV 病毒,它可以以游离形式存在于上清血浆中、也可以黏附在白细胞膜上,还可以以前病毒(pro-viral form)状态嵌合在细胞内的核酸中。

(2) 同时必须保持红细胞的完整形态、存活力和功能。

(3) 耐受理化处理的能力差。

(4) 且对人体安全无毒。

在研究一种去除或灭活病毒的方法时,首先应对血液中可能存在的病毒量做出估价,以最受关注的三种病毒,即 HIV、HBV 和 HCV 而言,其浓度约均 $< 10^3$ 感染剂量(ID)/ml,故一单位全血分离的血细胞成分中的病毒量 $< 2.5 \times 10^5$ ID。因此,一种去除或灭活病毒方法,若能使病毒感染剂量降低 99.9999 % (降低系数 $\geq 6 \log_{10}$) 相信经过处理的血细胞成分应具有安全性(wagner 1991)。

为了上述目标必须做验证试验,即把病毒接种入样品,检测处理前后样品的病毒感染剂量,然后根据下列公式,计算降低系数。降低系数 = $\log_{10}$ (处理前样品中病毒感染剂量/处理后样品中病毒感染剂量)。

HIV: 用细胞培养方法进行检测。

HBV 和 HCV: 大猩猩感染,或用单纯疱疹病毒(HSV)和脊髓灰质炎病毒(poliovirus)用于验证实验,在细胞培养中生长并得到高滴度。

第二节 红细胞的病毒灭活方法

血浆蛋白制品的病原体灭活（PI）技术成功用于产品的生产已多年。临床使用的新鲜冰冻血浆也已有多种技术，可用于其病原体灭活处理，因此发展安全、有效的血细胞成分病原体灭活技术，对输血安全具有重要的现实意义。

关于血细胞成分的病毒灭活和去除，人们尝试了许多方法，如洗涤技术、过滤技术、伽马射线和紫外线照射处理、碘化淀粉处理以及光化学技术，其中光化学技术是目前用于血细胞成分病毒灭活方法中前景看好的一种。

基于成熟红细胞没有细胞核，不含核酸，而所有的病原体（除朊病毒，prion外）都含有核酸的特点，均以核酸为靶分子。

红细胞的病毒灭活方法大多在红细胞中添加光敏物，在可见光照射下，使之发生活化作用，产生活性氧，如单态氧，破坏病毒包膜，达到病毒灭活作用。

主要的光敏物有血卟啉衍生物（HPD_s）、苯卟啉衍生物、部化菁540（MC 540）、酞菁衍生物、苯噻嗪染料如二甲基蓝（MB）、金丝蒽酮、补骨脂内酯衍生物S—59（溴化补骨脂）和核黄素（Riboflavin）等。见下表1-1，表1-2。

表1-1 浓缩红细胞中传染性病原体的灭活

名称		光照	作用大分子目标
补骨脂	8-甲氧基补脂	长波紫外线	核酸
	4'氨甲基-4, 5'三甲脂	长波紫外线	核酸
	补骨脂		
血卟啉衍生物	双血卟啉醚	630nm	脂质
苯卟啉衍生物	A环，草酸苯卟啉	692nm	脂质
花青染料	部花青540	520~550nm	脂质，蛋白质
	酞菁铝	670nm	脂质
苯噻嗪染料	亚甲基蓝	620~670nm	脂质，蛋白质
	甲苯胺蓝	640~670nm	脂质，蛋白质

表1-2 红细胞传染性病原体的病毒灭活

反应物	靶细胞
1 苯甲酰卟啉A (benzoporphyrin)	水泡性口炎病毒, 猪白血病毒 (felv)
2 双血卟啉 (dihematoporphyrin)	HIV、CMV、猴免疫缺陷病毒 (siv)、单纯疱疹病毒 (hsv)、克鲁斯锥虫 (teruzi)
3 亚甲基蓝 (methylene blue)	VSV、噬菌体 (Q_6 , M_{13})、辛德比斯病毒 (sindbis)
4 部化菁540 (merocyanine 540)	Friend 红白血病毒 (friend LV) HSV-1、pfaleiparum)
5 酞菁 (phthalocyanine)	VSV、sindbis
6 溴化补骨脂素 (PSR-Br)	Q_6
7 金丝桃素 (hypericin)	HIV
8 二亚甲基蓝 (dimethylene blue)	VSV、BVDV、 Q_6 、 R_{17} 、伪狂犬病病毒 (PRV)、脑心肌炎病毒 (EMC)
9 Inactine	猪细小病毒、BVDV、HIV-1、VSV
10 S-303	HIV、DHBV (鸭E型肝炎病毒)、BVDV、细菌
11 核黄素 (riboflavin)	HIV、BVDB、DHBV

它们的缺点是需要照射时间长, 病毒灭活不彻底, 并对红细胞有损伤, 影响红细胞寿命和红细胞定型有困难 (交叉配型)。

近来也有一些学者采用游离基清除剂、保护剂和添加红细胞的添加剂来减少光敏物/可见光照射对红细胞的损伤已取得显著效果, 有待进一步验证和进行临床试验, 其次是利用一类与核酸特异性相互作用, 并对核酸进行不可逆修饰的化合物。这类化合物不需要外部能量就能被激活, 包括 FRALE (frangible anchor-linker effector) 易分解的锚状键合效应子化合物、 SO_3 、(乙撑亚胺衍生物)、Inactine PEN 110等。

一、洗涤技术

由于血小板在洗涤过程中被激活, 产生聚集, 所以洗涤技术主要用于红细胞成分的病毒去除, 为了研究冰冻、洗涤技术是否能消除传播乙肝病

毒的危险, Alter等(1978)接种了 10^6 ID HBV 的血液经过冰冻保存、脱甘油和洗涤处理制得HB_sAg检测阴性的红细胞制品。将其输给大猩猩结果接受输注的4只大猩猩都感染了HBV。该结果也得到了临床实践的支持。Haugen等(1979)报道患者输注经冰冻保存、脱甘油和洗涤处理的红细胞制品, 仍可感染肝炎病毒。

Stromberg等(1990)将模型病毒、VSV、Sindbis等接种于红细胞成分, 观察了常规制备洗涤红细胞所采用的洗涤技术去除病毒的效果, 结果表明只能洗去 $<2 \log_{10}$ 的病毒。

二、过滤技术

使用白细胞过滤技术, 在去除白细胞的同时, 也可去除白细胞的相关病毒。Gilbert等(1989)观察到输注白细胞滤器过滤, 除去 $2 \log_{10}$ 白细胞的红细胞制品, 30名新生儿无一人感染CMV, 但在接受未经白细胞滤器过滤的红细胞成分的42名对照组的新生儿中, 有9人感染CMV, 骨髓移植患者和白血病患者输注白细胞滤器过滤的红细胞能防止CMV的感染(Verdonck 1987, Murphy 1988)。

由于HIV和HTLV病毒主要存在于白细胞的病毒, 所以白细胞滤器过滤技术也可能减少这两种病毒, 通过输注红细胞成分传播的危险。

三、 γ 射线和紫外线照射处理

该法是物理学方法, 处理后不会残留有潜在危害的物质于制品中, 研究表明经 γ 射线或290~320nm波长的 β 段紫外线(UVA)照射处理, 能有效灭活 $6 \log_{10}$ 的病毒, 但同时也将严重损伤红细胞的生物学功能。因而难以实际应用于红细胞成分的病毒灭活(Kitchen 1989, Prodouze 1987)。

四、碘化淀粉处理

Chapman等(1992)的研究表明碘(I_2)和不溶性淀粉的复合物, 可望用于红细胞成分的病毒灭活, 在灭活 $>3 \log_{10}$ HIV和VSV的条件下, 处理过的红细胞保存24小时后溶血低于1%, 对于加入红细胞成分的 $6 \log_{10}$ VSV或

5.3 $\log_{10}$ HIV, 经0.4% I_2 1小时或0.6% I_2 30分钟或0.8% I_2 15分钟处理, 可将其全部灭活。

五、光动力学技术 (多靶点的光化学技术)

由于Hb的吸收以及浓缩红细胞的黏滞度, 红细胞浓缩液中病原体的灭活较困难, 并且光动力学的方法导致的损伤, 在红细胞保存时间延长, 可进一步增加。

该法的缺点为对病原体的不完全的灭活, 损伤红细胞以至于溶血和钾渗漏, 免疫球蛋白结合增加, 处理时间延长, 并且必须在降低血细胞的容积, 或在一种薄层状态下工作, 以促进光的作用。

I. 光化学法病毒灭活常用的光敏剂

1. 吩噻嗪类化合物

吩噻嗪类化合物 (phenothiazine) 属于平面杂环化合物, 亚甲基蓝和甲基胺蓝为吩噻嗪类化合物, 亚甲蓝是一种氧化还原剂, 已用于临床多年的静脉内注射药物, 主要用于治疗亚硝酸盐、硝基苯引起的高铁血红蛋白症和氰氧化物中毒, 其最大吸收波长为670 nm, 其中亚甲蓝 (methylene blue MB) 光化学法病毒灭活的研究较多。

亚甲基蓝 + 可见光方法

早在20世纪80年代Clifton 等即已发现亚甲蓝 + 可见光可以灭活某些植物病毒 (Wallis 1965)。其后的研究证实在适当的条件下, 亚甲蓝可与病毒的核酸及脂质包膜结合, 在可见光的作用下发生光化学反应, 使病毒的包膜破坏, 核酸断裂, 能导致大多数的脂质包膜病毒和部分非脂质包膜病毒失活, 由于目前被广泛关注的经血液传播的病毒: 如 HBV、HCV、HIV及HTLV 等均为脂质包膜病毒, 故亚甲蓝光化学反应被认为是一种可取的血液成分病毒灭活方法, 并已成功用于血浆病毒灭活 (Hideki 2000)。

用MB光化学处理的新鲜冰冻血浆在德国和瑞士已被批准用于临床 (Mohr 1997)。后来将此方法用于红细胞成分的病毒灭活。

Wagner等 (1991) 用5 μ mol/L 的甲基蓝, 以600~700nm的红光照