

亚甲蓝光化学法对血浆中细菌的灭活效果初步观察*

汤龙海, 周群刚, 方敏, 全一鸣, 俞彦, 程根林, 曹谊
(江苏省苏州市中心血站检验科 215006)

摘要:目的 观察亚甲蓝光化学法灭活血浆中已知细菌的效果。方法 用高浓度的革兰阳性菌和革兰阴性菌作为指示菌株, 接种入血浆, 采用 BacT/Alert 全自动血培养仪进行细菌筛检, 观察细菌灭活效果。结果 亚甲蓝结合可见光照射后的血浆中没有检测到细菌, 而未灭活的血浆样本通过 BacT/alert 全自动血培养仪检测到细菌。结论 初步证明亚甲蓝光化学法可高效地灭活血浆中的细菌。

关键词: 血浆; 亚甲蓝; 细菌灭活

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)14-1606-02

亚甲蓝光化学法灭活病毒是最近几年才发展起来的新技术, 中国部分地区血站已推广应用, 该法灭活血浆中病毒的效果已被证实。本血站已经采用该法对血浆进行病毒灭活, 而该法除了能够灭活病毒外是否还能灭活细菌, 其效果如何, 笔者拟通过以下实验来观察亚甲蓝光化学法对血浆中细菌的灭活效果。

1 材料与与方法

1.1 材料 随机抽取苏州市中心血站无偿献血全血标本 20 份(400 毫升/份), 制备成新鲜血浆(200 毫升/份)。

1.2 仪器与试剂 标准菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)、表皮葡萄球菌(ATCC 12228)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、蜡样芽孢杆菌(ATCC 11778)及配套培养液均由上海复祥生物科技有限公司提供。BacT/Alert120 全自动血培养仪及需氧瓶(BacT/Alert Culture Bottle BPA, 法国生物梅里埃公司); Air-stream 超净工作台(美国 ESCO 公司); ZBK-YBM-01 型医用血浆病毒灭活柜及耗材(淄博中保康医疗器具有限公司); Cryofuge 6000i 大容量离心机(德国 Kendro 公司), KR4i 大容量离心机(法国 Jouan 公司); 一次性去白细胞塑料血袋(山东威高集团医用高分子制品股份有限公司); 低温血液滤器工作台(天津市正源制冷设备有限公司 LBC222); SE250 型高频热合机(深圳达科为医疗器械有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 配制菌悬液 标准菌株用自带的培养液复苏, 直接放入新鲜血浆中增菌后, 再分别配制成浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液。

1.3.2 血浆处理 用无菌注射器取 1 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液分别注入 200 mL 血浆中, 混匀后血浆中的细菌浓度约为 10^6 CFU/mL, 无菌留取 10 mL 血浆为样管 A(不加亚甲蓝), 把剩余 190 mL 血浆分为两等份, 其中一份按 1 μ mol/L 剂量添加亚甲蓝后置于医用血浆病毒灭活柜内, 摆动频率为 60 次/分, 灭活柜温度为 8 $^{\circ}$ C, 光照度为 30 000 LUX, 光照时间 30 min。将光照后的血浆通过病毒灭活过滤器滤除亚甲蓝, 然后无菌留取 3 份 10 mL 血浆分别为样管 B1、B2、B3。另一份血浆不经亚甲蓝光照灭活但经过过滤器过滤, 处理完成后混匀, 无菌留取 10 mL 血浆为样管 C。将 A、B1、C 三份样本以 BacT/Alert 血培养仪进行细菌检测, B2 室温放置 2 d 后以 BacT/Alert 血培养仪进行细菌检测, B3 室温放置 5 d 后以 BacT/Alert 血培养仪进行细菌检测。

2 结果

未经亚甲蓝处理的样管 A 12 h 后就报告检测阳性, 同时样管 C 也报告检测阳性, 样管 B1、B2、B3 则检测阴性。见表 1。

表 1 各样管检测结果

样管	大肠埃希菌	表皮葡萄球菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
A	+	+	+	+
B1	-	-	-	-
B2	-	-	-	-
B3	-	-	-	-
C	+	+	+	+

3 讨论

因输血被细菌污染的血液引起的输血反应的发生率是很高的, 超过输血相关病毒性传染病的发生率几十倍到几百倍, 所以目前血液的细菌污染已经引起广泛关注, 成为输血安全领域的一个重要问题^[1]。针对这一问题, 采供血机构也采取了相应的对策。在采血前, 体检医生在筛选过程中仔细对献血者进行询问, 可以有效地减少细菌污染的发生。在采血时, 按规范对皮肤进行消毒和进针过程的无菌操作可以显著减少在采血过程中细菌进入血袋的可能性。同时, 在采血过程中除去最初采集的 10~20 mL 的少量血液已被证明可以显著减少细菌污染血液的危险^[2]。但是上述措施只能减少而不是杜绝血液的细菌污染。

目前检测血液制品细菌污染的方法有很多, 有革兰染色法, 有通过检测 pH 值变化、CO₂ 的增加、葡萄糖浓度的变化间接检测细菌污染, 还有 BacT/Alert 3D 全自动血培养仪和分子生物学技术(实时荧光定量 PCR 技术)等等^[3]。但是到目前为止, 还没有一个方法对于血液制品的细菌检测是十全十美的。无论选择什么方法, 总会有输血相关细菌感染的危险存在。

亚甲蓝光化学病毒灭活法作为一种降低输血风险的新技术, 除能有效地灭活血液中可能存在的病毒外, 更重要的是对血液成分的功能无显著性影响, 能保证血液成分的质量^[4], 其机制主要是依靠光敏剂在光照条件下, 产生自由基(一类机制)或者单线态氧(二类机制)氧化损伤病毒核酸以及脂质包膜的分子结构, 从而使大多数的脂质包膜病毒和部分非脂质包膜病

* 基金项目: 苏州市科技计划项目(SYS201061)。

毒灭活,是目前惟一获准用于临床的光化学血浆病毒灭活技术^[5]。还有研究显示,随光照时间的延长,病毒核酸浓度逐渐下降,照射 30 min 后,乙型肝炎病毒 DNA 浓度下降为零^[6],在国内目前只是部分血站在应用,还没有达到在全国血站中推广应用。关于亚甲基蓝光化学法的研究报告很多,均已证明该法对血浆中正常成分的活性破坏不大^[7],而亚甲基蓝本身是临床上治疗氰化物和亚硝酸盐中毒的解毒剂,药典上的使用剂量比血浆消毒的剂量要大数百倍,因此在毒理学方面是很安全的。血浆中主要成分的生化指标无显著变化,凝血因子Ⅷ促凝活性在经该法处理后仍大于 80%,血浆的抗原性也无特殊变化,各种酶活性未发生明显改变^[8-9]。

亚甲基蓝光化学法的灭活过程大致分 2 步,一步是亚甲基蓝光照灭活,还有一步是灭活后的过滤(去除亚甲基蓝)。本实验过程中,选取了 4 种常见的细菌(2 种革兰阳性菌、2 种革兰阴性菌),一组标本经亚甲基蓝光照处理后再经过滤器过滤(正常灭活过程),还有一组不经亚甲基蓝光照处理只是经过滤器过滤。有研究显示,灭活的血浆白细胞含量降低 100 倍左右^[10]。通过观察发现,虽然过滤器可以一定程度过滤白细胞,但是对已知细菌却没有过滤作用,而经正常灭活过程处理的一组标本在室温放置 5 d 后检测结果还是阴性,这一结果说明亚甲基蓝光化学法除了可以用来灭活血浆中的病毒,它还对血浆中的细菌有一定的灭活作用。下一步研究准备通过更多的实验来证明该法对细菌灭活作用的普遍性,同时笔者也希望通过这一研究来提高同行对血浆细菌灭活的关注。

参考文献

[1] de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, et al. Diversion of first

• 检验技术与方法 •

手足口病血清 EV71 抗体检测分析*

季云¹,李坤¹,史伟峰^{1△},石旦¹,徐晓怡²,丁翠君³

(1. 苏州大学附属第三医院检验科,江苏常州 213003;2. 江苏省常州市疾病预防控制中心 213000;
3. 江苏省常州市儿童医院 213003)

摘要:目的 对手足口病患者血清 EV71 抗体进行检测分析,以了解常州市手足口病患者肠道病毒 EV71 的感染情况。方法 采集 272 例手足口病(其中 10 例重症病例)患者急性期的血清标本,用 ELISA 法检测其 EV71-IgM 抗体。结果 272 例血清标本中 125 例检出 EV71-IgM 抗体阳性,检出率为 46.0%,10 例重症病例均为 EV71-IgM 抗体阳性。1 岁组和 2 岁组阳性检出率高于其他年龄组($P < 0.05$);患儿男、女性之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 EV71 病毒是常州地区儿童手足口病的主要病原体,建立完善的 EV71 流行监测系统是当前预防与控制手足口病的重要环节。

关键词:手足口病; 肠道病毒 A 型,人; 免疫球蛋白 M; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1607-02

手足口病(HFMD)常见于儿童,由柯萨奇病毒 A4、A5、A8、A10、A16、B3、B7 和肠道病毒 71 型(EV71)等病毒引起,其中以柯萨奇 A16(CoxA16)和肠道病毒 EV71 为主要病原体。近年来 EV71 在亚洲地区的流行呈上升趋势,中国广东、福建及台湾等地区都有与 EV71 相关的病例报道^[1-2]。为了解常州市肠道病毒 EV71 的感染情况,现对 2009 年诊断为手足口病的 272 例血清标本,进行 EV71-IgM 抗体检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2009 年常州市儿童医院收治的临床诊断

blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections[J]. Vox Sang, 2002, 83(1):13-16.

[2] de Korte D, Marcelis JH, Soeterboek AM. Determination of the degree of bacterial contamination of whole-blood collections using an automated microbe-detection system[J]. Transfusion, 2001, 41(6):815-818.

[3] 车嘉琳,何子毅,刘赴平,等. PGD 血小板细菌污染检测系统效果的评价[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(7):517-519.

[4] 肖泽斌. 亚甲基蓝光化学病毒灭活法对血浆质量指标的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4):390-391.

[5] Solheim BG. Pathogen reduction of blood components[J]. Transfus Apher Sci, 2008, 39(1):75-82.

[6] 黄华,李小捷,徐传彬,等. 运用 FQ-PCR 技术监测亚甲基蓝光化学法对血浆乙型肝炎病毒的灭活效果[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1):1-3.

[7] 张文福,袁庆霞,王密霞. 亚甲基蓝敏法对血浆中病毒的灭活研究[J]. 中国消毒学杂志, 1999, 16(2):65-68.

[8] 张文福,钟儒波. 亚甲基蓝光化学法对临床单袋人血浆的消毒研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(1):20-22.

[9] 黄文杰,范恩勇,孙海英,等. 亚甲基蓝光化学法病毒灭活剂对凝血因子的影响[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(18):2193-2194.

[10] 王飞,路志浩,古醒辉,等. 亚甲基蓝光化学法血浆病毒灭活前后血浆成分的变化[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(2):97-99.

(收稿日期:2011-02-21)

为手足口病的 272 例患儿,按照卫生部最新发布的《手足口病预防控制指南》附件 3 手足口病实验室检测方案,采集发病 3 d 内的患儿 3~5 mL 全血,置于真空无菌采血管中,自凝后,分离血清,将血清置-20℃冰箱中冷冻保存,待测。

1.2 仪器与试剂 1575 洗板机和 680 酶标仪由美国 BIO-RAD 公司生产。EV71-IgM 抗体检测试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实验方法 采用 ELISA 法。微孔条上预包被的抗人

* 基金项目:常州市卫生局重大课题资助项目(ZD200912)。 △ 通讯作者, E-mail:swf67113@163.com。