

• 临床检验研究论著 •

# 病毒灭活血浆中主要质量指标及亚甲蓝残留量的检测分析

陈爱华, 刘永梅

(深圳市宝安区中心血站质管办 518101)

**摘要:**目的 了解亚甲蓝光化学法(MB-P)病毒灭活前、后血浆中血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量的变化,并对灭活血浆的亚甲蓝(MB)残留量进行检测,以探讨 MB-P 对血浆质量的影响。方法 对宝安区中心血站的新鲜冰冻血浆、病毒灭活新鲜冰冻血浆、冰冻血浆和病毒灭活冰冻血浆各随机抽检 20 袋,对其主要质量指标血浆蛋白浓度、凝血因子Ⅷ含量按照《血站技术操作规程》进行检测比较,并对灭活血浆的 MB 残留量进行检测。结果 MB-P 病毒灭活前、后血浆外观和色泽无明显改变,血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量的变化不大,差别无统计学意义( $P>0.05$ );血浆中 MB 残留量为  $0.05\sim0.357\ \mu\text{mol/L}$  ( $0.14\pm0.09\ \mu\text{mol/L}$ )。结论 MB-P 病毒灭活前、后血浆各项主要质量指标接近,MB 残留量符合质量要求,MB-P 病毒灭活血浆是一种安全的血液制品,可有效降低输血风险,保障受血者身体健康。

**关键词:**亚甲蓝; 病毒灭活; 光化学; 输血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)14-1811-02

## The detection and analysis of quality indicators and methylene blue residues in virus inactivation plasma

Chen Aihua, Liu Yongmei

(Shenzhen city Baoan District central blood station quality control office, 518101)

**Abstract:** Objective To understand the changes of methylene blue photochemical (MB-P) inactivated virus before and after concentration of plasma proteins and content of clotting factor Ⅷ in plasma, and detect the Residues of methylene Blue (MB) in Virus Inactivation Plasma, to investigate the influence of MB-P on the quality of plasma. Methods Random sampling fresh frozen plasma, virus inactivated fresh frozen plasma, frozen plasma and virus inactivation frozen plasma each of 20 bags in the Blood Center of Bao'an District, Detect and Compare the concentration of plasma proteins and content of clotting factor Ⅷ with the blood station technical operation, and detect the Residues of MB in Virus Inactivation Plasma. Results Appearance and color of MB-P inactivated virus before and after have no significant changes, and the concentration of plasma proteins and content of clotting factor Ⅷ change little, the difference was not statistically significant ( $P>0.05$ ); the MB residual amount is  $0.05\sim0.357\ \mu\text{mol/L}$  ( $0.14\pm0.09\ \mu\text{mol/L}$ ) in plasma. Conclusion The main quality indicators are approach in MB-P inactivated virus before and after, and MB residues meet the quality requirements. MB-P virus inactivated plasma is a safe blood products, which can effectively reduce the risk of blood transfusion and protecting body health of receptor.

**Key words:** methylene blue; virus inactivation; photochemistry; blood transfusion

输血既能够治疗疾病,又可能引起经血传播的相关病毒性感染<sup>[1]</sup>。近年来人们对输血相关病原体,特别是输血相关病毒的传染越来越重视<sup>[2]</sup>。通过加强对献血者和血液的筛选,虽然大大降低了输血相关传染病的发生,但由于检测技术的局限性、检测项目的有限性、新病毒不断出现等因素<sup>[3]</sup>,仍不能完全杜绝输血相关的病毒感染。因此,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<sup>[4]</sup>。临床应用较多的是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(MB-P)<sup>[5]</sup>。MB-P 用于血浆病毒灭活在中国血站系统已得到广泛采用,并取得了良好的临床效果<sup>[6]</sup>。为了解 MB-P 对血浆质量的影响,本文对本站的新鲜冰冻血浆、病毒灭活新鲜冰冻血浆、冰冻血浆和病毒灭活冰冻血浆各随机抽检 20 袋,进行了其血浆蛋白浓度、凝血因子Ⅷ含量的检测比较,并对灭活血浆进行了 MB 残留量的检测,现将试验结果报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 样本来源** 宝安区中心血站合格库中抽取已冰冻的新鲜冰冻血浆、病毒灭活新鲜冰冻血浆、冰冻血浆和病毒灭活冰冻血浆各 20 袋。 $37.0\ ^\circ\text{C}$  水浴复溶(小于 6 min)后取样 10 mL。

#### 1.2 仪器和试剂

**1.2.1 仪器** 可见紫外分光光度计(上海精科 722N),固相萃取装置(美国 SUPELCO),全自动生化分析仪(深圳蓝韵

LWC100 plus),全自动血凝仪(日本希森美康 CA-500),离心机(日本 2100),固相提取小柱(美国 Waters 公司 Waters OASIS)。

**1.2.2 试剂** 总蛋白试剂盒(上海科华)、凝血因子Ⅷ(日本希森美康)、MB(天津市光复精细化工研究所)、甲醇、冰乙酸(天津市致远化学试剂有限公司)和标准血清(北京康彻思坦公司提供)。所有试剂均由获得卫生部生产许可证和批准文号的厂家提供,有中国药品生物制品研究所批检合格报告并在有效期内使用。

**1.2.3 病毒灭活材料** 一次性使用病毒灭活输血器材(上海输血技术有限公司),血浆添加 MB 后,将光照袋中含 MB 的血浆在医用血浆病毒灭活箱中  $2\sim8\ ^\circ\text{C}$ 、 $30\ 000\sim38\ 000\text{LX}$  光照 35 min 后,过滤。

#### 1.3 方法

**1.3.1 血浆蛋白质浓度** 蓝韵 LWC100 plus 全自动生化分析仪检测(双缩脲比色法),按操作规程和试剂使用说明书进行。

**1.3.2 凝血因子Ⅷ含量** 日本希森美康 CA-500 血凝仪检测,按操作规程和试剂使用说明书进行操作。

**1.3.3 MB 残留量** 固相萃取比色法:(1)标准品血浆的制备:取 MB 粉末约 38 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用水溶

解并稀释至刻度。精密量取 50  $\mu$ L 置 50 mL 容量瓶中,以 1 : 100 的比例加入 50 mL 混合血浆(10 人份以上血浆混合)中,配成最终浓度约为 1.0  $\mu$ mol/L 的 MB 的标准对照血浆。(2) 30% 甲醇配制:30 mL 甲醇用蒸馏水稀释至 100 mL。(3) 洗脱液配制:1 mL 乙酸,用甲醇稀释至 100 mL。(4) 用 3 mL Waters OASIS 小柱,置于真空萃取装置上,用 6 mL 甲醇活化,加入 6 mL 受检血浆或标准品血浆,萃取 MB;用 30% 甲醇 6 mL 清洗,随后用含 1% 乙酸的甲醇溶液 2 mL 洗脱,洗脱液离心(3 500 rpm/10 min),取上清液。用含 1% 乙酸甲醇溶液作试剂空白,在 654 $\pm$ 2 nm 波长处测定吸光度。经计算得到血浆中 MB 残留量。

1.4 统计学处理 血浆病毒灭活前后变化比较,采用自身对照配对 *t* 检验,*P*<0.05 具有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 80 份血浆标本(新鲜冰冻血浆、病毒灭活新鲜冰冻血浆、冰冻血浆、病毒灭活冰冻血浆)主要质量指标血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量见表 1。从表 1 可知,MB-P 病毒灭活前、后血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量的变化不大,经比较差别无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 病毒灭活后血浆外观和色泽符合要求,血浆中 MB 残留量为 0.05~0.357  $\mu$ mol/L(0.14 $\pm$ 0.09  $\mu$ mol/L)。

| 表 1 80 份血浆血浆蛋白浓度及凝血因子Ⅷ含量( $\bar{x}\pm s$ ) |                  |                 |
|--------------------------------------------|------------------|-----------------|
| 血浆品种                                       | 总蛋白浓度(g/L)       | 凝血因子Ⅷ含量(IU/ML)  |
| 新鲜冰冻血浆                                     | 64.5 $\pm$ 5.95  | 0.88 $\pm$ 0.23 |
| 病毒灭活新鲜冰冻血浆                                 | 67.2 $\pm$ 4.82  | 0.87 $\pm$ 0.23 |
| 冰冻血浆                                       | 68.35 $\pm$ 5.19 | —               |
| 病毒灭活冰冻血浆                                   | 66.06 $\pm$ 5.65 | —               |
| —:无数据。                                     |                  |                 |

## 3 讨 论

本站目前年采血液 10 $\times$ 10<sup>3</sup> kg 左右,实现成分分离 99% 以上,仅仅依靠献血者筛选和血液检测不可能完全杜绝输血相关的病毒感染。亚甲蓝又名美蓝,是一种酚噻嗪类化合物,在临床上作为解毒药用于治疗氰化物和亚硝酸盐引起的高铁血红蛋白症和抑郁症<sup>[7]</sup>。应用 MB-P 灭活血浆病毒灭活机制:亚甲蓝可与病毒核酸的鸟嘌呤以及病毒的脂质包膜相结合,在可见光的作用下,可使病毒的核酸断裂,包膜破损,使病毒完全失去穿透、复制及感染能力<sup>[8]</sup>,从而达到灭活病毒(脂包膜病毒和一些非脂包膜病毒如甲型肝炎病毒和细小病毒 B19 等<sup>[9]</sup>)目的。因此,MB-P 处理灭活病毒的临床推广应用能大大减少病毒感染的几率,是保证输血安全的又一重要举措。

从本文结果来看,MB-P 病毒灭活前、后血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量的变化不大,经比较差别无统计学意义(*P*>0.05)。灭活后血浆蛋白浓度和凝血因子Ⅷ含量能达到国家规

定的全血和成分血质量要求,能满足临床患者补充凝血因子、维持血浆晶体渗透压、调节酸碱平衡、增强免疫力的需要。国外研究表明,病毒滴度降低程度与所用的可见光强度和 MB 浓度有直接关系<sup>[10]</sup>,但 MB 存在致突变的可能,若残留量过多,血浆的外观和色泽改变明显<sup>[11]</sup>,临床输注时易造成患者疑虑。因此,对血浆中 MB 浓度的控制有重要的意义。MB 为国家药典收录的静脉注射药物,剂量过大(>500 mg)时可出现不良反应,因此药典规定一次用量不超过 200 mg,24 h 总量不超过 500 mg。本文研究 MB 残留量浓度 0.05~0.357  $\mu$ mol/L(0.14 $\pm$ 0.09  $\mu$ mol/L),以 2 L/50(kg $\cdot$ bw)输注计算,用最大浓度输注量不超过临床较低剂量 0.5%,属于安全的剂量范围。因此,MB-P 是一种安全有效的血浆病毒灭活方法<sup>[12]</sup>。

通过实际应用认为,MB-P 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不大,仍能够确保血浆有效成分的应用效果,它的应用可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意义重大。

## 参考文献

[1] 马静瑶,徐元宏.亚甲蓝光化学法病毒灭活血浆技术及应用[J].临床输血与检验,2012,14(3):282-284.

[2] 马静瑶,徐元宏.病毒灭活血浆中亚甲蓝残留量的质量控制[J].临床输血与检验,2011,13(2):128-130.

[3] 张淑琴,温涛,赵君马,等.病毒灭活对血浆中各种成分回收率的影响[J].中国输血杂志,2009,22(3):218-219.

[4] 马改娣,张美萍,田志彬,等.血浆中亚甲蓝含量的检测[J].临床输血与检验,2010,12(1):36-38.

[5] 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.

[6] 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.医学检验与临床,2017,18(5):66-67.

[7] 齐村生,任会堂,曾凤芹.病毒灭活新鲜血浆的质控指标初探[J].临床输血与检验,2009,11(3):253-254.

[8] 房景霞,刘鑫,孙绍秋.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.

[9] 庄培芬,桑列勇,蒋国瑾,等.亚甲蓝/光化学法在血浆病毒灭活中应用[J].中国公共卫生,2008,24(11):1365-1366.

[10] WAGNER SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes[J]. Transfus Med Rew,2002,16(1):61-66.

[11] 白莉,刘蕾,赵君.固相萃取法检测病毒灭活血浆中的亚甲蓝[J].医药论坛杂志,2010,31(5):108-109.

[12] 黄宇闻,程庆文,莫琴,等.不同光源照射亚甲蓝血浆的病毒灭活试验[J].中国生物制品学杂志,1999,1(1):43-45.

(收稿日期:2012-12-08)

(上接第 1810 页)

[9] Monchek R,Wiedaseck S. Gestational trophoblastic disease:an overview[J]. J Midwifery Womens Health,2012,57(3):255-259.

[10] 陈华根,黄学斌,宋强.人绒毛膜促性腺激素定量测定及临床应用中存在的问题和对策[J].医学理论与实践,2011,24(24):2937-2938.

[11] De La Diaz MEV,et al. False-positive beta-human chorionic gona-

dotropin values in the follow-up of gestational trophoblastic disease[J]. Clin Transl Oncol,2007,9(5):332-324.

[12] 兰玲.超声诊断在临床异位妊娠诊断的准确性分析[J].现代诊断与治疗,2012,23(8):1180-1181.

(收稿日期:2013-01-08)