

- [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(5): 549-553.
- [20] Peduzzi P, Shatney C, Sheagren J, et al. Predictors of bacteremia and gram-negative bacteremia in patients with sepsis[J]. Arch Intern Med, 1992, 152(3): 529-535.
- [21] Borato DC, Parobcz GC, Ribas SR, et al. Changes of metabolic and inflammatory markers in HIV infection: glucose, lipids, serum Hs-CRP and myeloperoxidase [J]. Metabolism, 2012, 61(10): 1353-1360.
- [22] Abd TT, Eapen DJ, Bajpai A, et al. The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the Jupiter trial[J]. Curr Atheroscler Rep, 2011, 13(2): 154-161.
- [23] Kociniak T, Skiepkowski R, Zietkowski Z, et al. Significance of C-reactive protein in asthma[J]. Przegl Lek, 2010, 67(7): 472-474.

- [24] Samborska-Sablik A, Sablik Z, Gaszynski W. The role of the immuno-inflammatory response in patients after cardiac arrest[J]. Arch Med Sci, 2011, 7(4): 619-626.
- [25] Matwyoff GN, Prahl JD, Miller RJ, et al. Immune regulation of procalcitonin: a biomarker and mediator of infection[J]. Inflamm Res, 2012, 61(5): 401-409.
- [26] Tang BM, Eslick GD, Craig JC, et al. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(3): 210-217.

(收稿日期: 2015-07-10)

• 综 述 •

血液制品病毒灭活系统应用的研究进展

王 霞, 潘 彤, 李红珠 综述, 杨文玲[△] 审校

(天津市血液中心检验科, 天津 300110)

关键词: 血液制品; 病原体灭活; 亚甲蓝; 补骨脂素; 紫外线**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 19. 041**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2015)19-2872-03

筛查方法的“窗口期”问题、免疫静默感染、试剂灵敏度差异造成的漏检, 以及尚无法检测的新型病毒出现, 筛查方法本身的局限性, 导致血液制品的应用仍存在一定的风险。为了提高血液制品的安全性, 除加强无偿献血者的征询体检和病原检测外, 在不影响血液成分的结构、功能及对人体无不良反应的前提下, 对血制品进行病原体灭活处理是杜绝输血传染病的重要手段。现有的血液成分光化学病原体灭活技术主要包括亚甲蓝光化学法、补骨脂素光化学法及核黄素光化学法。但随着对病毒灭活研究的深入及科技的发展, 目前对病原体灭活方法的作用机制及使用现状有了更深入的认识。本文就各类血制品病原体灭活系统的作用机制、特点及其在基础与临床试验中存在的问题综述如下。

1 血液及血制品的病原体污染现状

减少经输血感染的方法主要包括献血者的屏蔽、血液检测及采用安全可靠的技术对血液成分进行病原体灭活, 是杜绝输血感染的重要手段^[1]。输血安全策略的应用使因输血感染所造成的病死率和感染率已有所降低。在发达国家, 传统的经血传播病毒感染(包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒)的残余风险大约是 $1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 。然而, 在一些发展中国家, 因并非对所有血制品进行病毒检测、加之未知病毒及已知病毒“窗口期”的存在, 因此经血感染的风险较高。目前开展的病毒核酸检测已明显减少病毒“窗口期”的感染, 但并未从根本上完全消除“窗口期”。细菌污染特别是浓缩血小板(因其保存条件有利于细菌的繁殖)是经血传播感染最为常见的血液制品。常规制备的血小板中有超过 0.6% 可能存在于细菌污染。因此, 细菌污染成为开展血制品病原体灭活技术(PRT)的推动力。

已知去除病原体的方法包括有机溶剂/清洁剂法、丙内酯及纳米过滤法, 已明显提高了血浆及其制品的安全性, 但这些

方法对细胞膜及功能造成损伤, 因而不适合血细胞制品病毒灭活。血细胞制品的 PRT 是基于光敏剂原理, 即在血制品制备过程中加入光敏剂, 后经可见光或紫外线照射激活产生活性氧核素或产生依赖于氧的电子转移来破坏核酸结构或形成不可逆的共价键, 从而阻止了病毒的复制、翻译和倍增。

2 血液及其制品的 PRT

PRT 被认为与 r 射线照射有同样效能的方法, 血制品 r 射线照射能预防输血相关移植物抗宿主病的发生^[2]。研究表明 PRT 对血浆和浓缩血小板的处理效果要优于对红细胞制品及全血。其原因可能是浓缩血小板制品最易于发生细菌污染, 且不含血红蛋白成分, 而红细胞制品因含有血红蛋白所以灭活效果不佳。

目前研究最为深入的有两大类, 第一类是染料光敏剂包括核黄素及吩噻嗪染料衍生物亚甲蓝。第二类是染料结合光敏剂如补骨脂素 S-59、S-303、乙炔胺 PEN-110。后者通过外部光照或提高 pH 的方法使核酸发生烷化反应从而干扰病原体核酸合成。

Intercept 处理系统是应用补骨脂素的衍生物 S-59 和 A 段紫外线光化学处理进行病毒灭活处理的系统^[3-6], 而 Mirasol 系统和 THERAFLEX MB 处理系统分别应用核黄素或亚甲蓝联合紫外线或可见光照射的光化学原理, 目前已有多种关于核黄素或亚甲蓝的试验研究报道^[7-9]。THERAFLEX 紫外-血小板处理系统仅使用 C 段紫外光照射, 而没有额外添加任何光敏剂。

2.1 Intercept 处理系统对浓缩血小板和血浆处理 目前包括德国在内的许多欧洲国家已经开始该系统的临床应用。临床上已经输注超过 700 000 单位补骨脂素-紫外线 a(UVA) 处理的血制品, 尚无意外安全事件发生的报道^[6]。且已经证明该系统有足够的灭活效能包括细菌, 对非脂包膜病毒也有很强的灭

活效力^[10]。该系统使用中需将 17.5 mL S-59 添加到血浆或浓缩血小板中,混匀后进行长波紫外线(UVA)光照(320~400 nm,4~6 min,剂量 3 J/cm²)。短波紫外线(UVC)通过产生氧核素对病原体蛋白质产生致命的损伤。在其后的光致还原过程中,补骨脂和游离的光化学产物被吸收装置所吸收,通常血浆需作用 10~20 min,浓缩血小板需 4~16 h。处理后的血制品被转移到最终的储存袋中。但由于吸附剂的吸附和血制品的转移步骤最终使血制品容量和细胞成分约损失 12%左右。

2.2 Mirasol 病毒灭活系统对浓缩血小板、血浆和全血的处理 基于核黄素的病毒灭活试验已进行多年,并且在欧洲和中东一些国家已经开始使用,已证实 Mirasol 处理系统能有效灭活多种临床相关的病原体。对引起严重输血反应细菌的灭活效力达到 98%。到目前为止,该系统被证明是唯一能灭活非脂包膜病毒如甲型肝炎病毒的处理系统。众所周知,甲型肝炎病毒对化学和加热有很强的抵抗能力^[4]。初步的研究结果显示经该系统处理过的血细胞能较好地保持其原有功能,因此,有望在不久的将来实现使用同一系统对所有的血制品进行灭活处理。该系统使用方法需将核黄素添加到血制品后进行紫外光照射(265~370 nm,4~6 min,剂量 6.2 J/mL)。大多数使用中波紫外线(UVB)范围(280~315 nm)。为达到对病毒核酸的损伤优先选择 313 nm,而且不会对细胞色素及线粒体功能和活性有损伤。作为一种基本的维生素,核黄素及其光化产物在处理不需要去除,因此避免血细胞的丢失。

2.3 UVC 对浓缩血小板和血浆的照射 目前,正在对 THERAFLEX UV-血小板系统进行处理效能及安全性的评价。该处理系统是采用波长为 200~280 nm 的紫外线光照及搅动来进行的处理方法。由于没有添加任何光敏剂,因此无不良反应的报道。UVC 光照机制是经紫外线照射后病毒核酸胞嘧啶形成环状加合物或者形成了嘧啶-嘧啶二聚体,从而阻止核酸转录和延长。核酸和蛋白质的吸收特点不同,UVC 光照主要影响白细胞和病原体,所以凝血蛋白和血小板的功能不受影响^[11]。将细胞培养的丙型肝炎病毒人工接种到浓缩血小板中再进行 UVC 光照,病毒减少 5 log₁₀。其缺点是对于丙型肝炎病毒的模型病毒-牛病毒性腹泻病毒对 UVC 光照的敏感性较低,而且不能有效灭活孢子和西尼罗河病毒,最重要的是它不能灭活人类免疫缺陷病毒^[12]。方法将重新悬浮的血小板转移到 19 cm×38 cm 的 UVC 照射专用袋中。使用特殊的 UVC 照射装置,照射时将血袋平放在石英的盘中,照射条件为 254 nm,20~30 s,剂量为 0.2 J/cm²(血浆为 1 J/cm²)。病毒去除效力显示血袋摇动频率为大于或等于 100 次/分,样品盘的摇动频率为 110 次/分。照射后,将血小板转移到储存袋中,在输注前不需要处理。

2.4 S-303 病毒灭活系统对红细胞制品的处理 S-303 处理系统是针对红细胞的处理系统,其原理基于光化学方法。其去病毒能力达到 4~6 log₁₀^[13]。S-303 是由吡啶脂受体,羟链和锚状部分组成。S-303 被设计成专门针对病毒核酸其分解产物为 S-300,S-300 与病毒核酸通过共价键结合形成嵌合体使病毒基因组信息不能被转录。S-300 可被谷胱甘肽所捕获,因此也可以将它加入到血液成分中来减少与蛋白质的非特异性反应。在已研发的第二代病毒灭活系统的临床研究中,发现在 16 例慢性贫血的患者中仅有 2 例发生意外的免疫反应^[7]。该

系统在全血的处理中也显示出应用前景^[14]。将 30 mL 的谷胱甘肽和 S-303 混合液添加到血制品中进行混合,其浓度为 200 mmol/L 谷胱甘肽和 0.2 mmol/L S-303。然后将整个混合物转移到专用的处理容器中进行病毒灭活处理 30 min,S-303 分解成 S-300 需要 6~18 h。离心后除去上清物,将处理后的红细胞转移到含红细胞添加剂的保存袋放在(4±2)°C 可保存 35 d。

2.5 THERAFLEX MB 血浆处理系统 与血小板和红细胞病毒灭活相比较,血浆病毒灭活临床应用多年,且其有效性已经得到充分证明^[15-16]。对大多数的包膜病毒杀伤力可达到至少 6 log₁₀^[17],但对于非包膜病毒的杀伤力相对较低。将含有高滴度丙型肝炎病毒的血浆制品经过 THERAFLEX MB 血浆处理系统处理后,丙型肝炎病毒灭活得十分充分,低于检测限的 1/12。但法国的血液监测预警表明对于血栓性血小板减少性紫癜的患者亚甲蓝病毒灭活的血浆效果不如检测后的未处理血浆,而且可能会引起严重甚至致命的过敏反应^[18]。THERAFLEX MB 血浆处理系统首先使用一个 0.65 μm 过滤膜去除血浆残存的白细胞、红细胞、血小板、微泡及微粒。随后,过滤后的血浆流进一干燥的含有 85 mg 的亚甲蓝容器中,以保证在 235~315 mL 的血浆中亚甲蓝的终浓度为 1 μM。最后,通过钠低压灯管或发光二极管来进行照射(590 nm,20 min,剂量 180 J/cm²)。处理后,用一种特殊的滤膜去除血浆中残存的亚甲蓝及其光化产品以保证亚甲蓝的残留量为 2 μg/L 血浆(相当于每单位血浆 0.5 μg)。

3 基础与临床试验研究

在基础研究中发现 Intercept 和 Mirasol 处理后的血小板与酸性和细胞活化程度增加有关,细胞的新陈代谢增加(葡萄糖消耗增加,乳酸产量增加),体外试验表明有一定的损伤(聚集反应、变形及低渗休克反应等)。Mirasol 灭活系统使用的光波长与线粒体酶的吸收波长(370~450 nm)不同。与补骨脂技术不同的是,Mirasol 保持了氧化磷酸化途径^[19-20],这一点对于血小板发挥凝血机制至关重要。缺少线粒体呼吸,生存力和凝血能力降低可能产生意外的不良反应^[21-22]。UVC 照射血小板体内外特性与使用其他处理系统处理后的特性具有可比性^[23-24]。UVC 照射后使热休克反应增加 20%~30%,但在储存中部分恢复^[11]。

临床研究中,病毒灭活处理的血小板其输注后血小板校正增加指数较低,因此有平均 35%的病例需多次输注^[25]。由于处理中多次的袋间转移及复合物吸附装置的应用造成 PRT 处理后血小板剂量降低,但血小板储存中发生的损伤也是其原因之一。依据出血事件发生频率来判定,PRT 处理血小板的止血效果与其未作处理的同一样品功能相同,这一点被血液监测结果所证实^[6]。鉴于输血不良反应的发生频率基本一致,PRT 处理的血小板被认为与传统的浓缩血小板是同样安全的。同位素标记的 PRT 处理的血小板回收率和残存率有所减少,但仍可以接受用于输注。然而,若想要得到更加稳固的结论尚需要大样本的研究。

在 7 个有关 S-303 处理红细胞的研究中,仅有 1 个研究使用了第二代处理程序^[13]。前者 III 期研究被暂停,其原因是在 16 例慢性输血治疗的患者中有 2 例与 S-303 处理的红细胞交叉配血出现阳性反应,产生低滴度针对 S-303 吡啶的抗体,第

二代的病原体灭活系统减少了红细胞结合吡啶的数量。初步的研究结果显示处理后的红细胞保持了足够的生存力(24 h 的回收率达到 88%),而且在任何标本中未引起交叉配血阳性反应^[26]。

4 小 结

目前各种针对血液及其血制品的病原体灭活系统存在,其灭活原理、机制及方法各不相同。但血制品广泛开展病原体灭活处理之前,应首先需要证实所用的光敏剂和光化产物是否安全、常规应用充足、成本效率最高;灭活功效是否有效、治疗功效及制品质量是否安全可控。目前仍有一些问题值得关注,如 PRT 应用的范围,病原体灭活处理后的血液成分的功效等。

参考文献

- [1] 周伟业,张博,钱开诚.血液成分光化学病原体灭活技术及其机制的研究进展[J].临床输血与检验,2013,15(3):298-302.
- [2] Fast LD, Dileone G, Marschner S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation[J]. Transfusion, 2011, 51(7):1397-1404.
- [3] Cazenave JP, Isola H, Waller C, et al. Use of additive solutions and pathogen inactivation treatment of platelet components in a regional blood center: impact on patient outcomes and component utilization during a 3-year period[J]. Transfusion, 2011, 51(3):622-629.
- [4] Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, et al. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns[J]. Transfusion, 2009, 49(6):1205-1216.
- [5] Marschner S, Goodrich R. Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light[J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1):8-18.
- [6] 谭美芳,单桂秋.血液成分病毒灭活的研究进展[J].华南国防医学杂志,2012,26(6):610-613.
- [7] 钟涛,沈继龙,许伟,等.核黄素联合紫外光灭活血小板悬液中的病毒及抑制细胞因子的实验研究[J].安徽医科大学学报,2014(1):13-17.
- [8] 葛健民,柏则蓉,梁启忠,等.亚甲基蓝光化学法病毒灭活前后血浆凝血因子等的质量分析[J].中国输血杂志,2012,25(8):750-751.
- [9] 朱立国,汪德清.核黄素光化学技术灭活血浆病原体的研究进展[J].临床输血与检验,2013,15(4):403-406.
- [10] Irsch J, Lin L. Pathogen inactivation of platelet and plasma blood components for transfusion using the INTERCEPT blood system? [J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1):19-31.
- [11] Seltsam A, Müller TH. UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma[J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1):43-54.
- [12] Mohr H, Steil L, Gravemann U, et al. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light[J]. Transfusion, 2009, 49(12):2612-2624.
- [13] Henschler R, Seifried E, Mufti N. Development of the S-303 pathogen inactivation technology for red blood cell concentrates [J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1):33-42.
- [14] Mufti NA, Erickson AC, North AK, et al. Treatment of whole blood (WB) and red blood cells (RBC) with S-303 inactivates pathogens and retains in vitro quality of stored RBC[J]. Biologicals, 2010, 38(1):14-19.
- [15] 马静瑶,徐元宏.亚甲基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.
- [16] Rock G. A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP [J]. Vox Sang, 2011, 100(2):169-178.
- [17] Seghatchian J, Struff WG, Reichenberg S. Main properties of the THERAFLEX MB-Plasma system for pathogen reduction[J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1):55-64.
- [18] Carlier M, vo Mai MP, Fauveau L, et al. Seventeen years of haemovigilance in France: assessment and outlook[J]. Transfus Clin Biol, 2011, 18(2):140-150.
- [19] Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study [J]. Transfus Apher Sci, 2009, 40(2):79-85.
- [20] Picker SM, Oustianskaia L, Schneider V, et al. Functional characteristics of apheresis-derived platelets treated with ultraviolet light combined with either amotosalen-HCl (S-59) or riboflavin (vitamin B-2) for pathogen-reduction[J]. Vox Sang, 2009, 97(1):26-33.
- [21] Picker SM, Schneider V, Oustianskaia L, et al. Cell viability during platelet storage in correlation to cellular metabolism after different pathogen reduction technologies[J]. Transfusion, 2009, 49(11):2311-2318.
- [22] Picker SM, Schneider V, Gathof BS. Platelet function assessed by shear-induced deposition of split triple-dose apheresis concentrates treated with pathogen reduction technologies [J]. Transfusion, 2009, 49(6):1224-1232.
- [23] Reikvam H, Marschner S, Apelseth TO, et al. The mirasol pathogen reduction technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution [J]. Blood Transfus, 2010, 8(3):186-192.
- [24] Mirasol Clinical Evaluation Study Group. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology [J]. Transfusion, 2010, 50(11):2362-2375.
- [25] Kerkhoffs JL, van Putten WL, Novotny VM, et al. Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction[J]. Br J Haematol, 2010, 150(2):209-217.
- [26] Cancelas JA, Dumont LJ, Rugg N, et al. Stored red blood cell viability is maintained after treatment with a second-generation S-303 pathogen inactivation process[J]. Transfusion, 2011, 51(11):2367-2376.