

• 论 著 •

病毒灭活血浆中亚甲蓝残留量超标原因的研究

张建伟,杨红梅[△]

(江苏省常州市中心血站 213004)

摘要:目的 探讨亚甲蓝光化学法病毒灭活后亚甲蓝残留量结果范围及其原因。方法 采用固相萃取法,检测不同规格的病毒灭活血浆中亚甲蓝残留量,并分析亚甲蓝残留量超标的原因。结果 统计分析不同规格病毒灭活血浆中亚甲蓝残留量,结果有差异。结论 根据亚甲蓝残留量超标存在的原因采取相应措施,加强制备过程中关键控制点的监测,减少亚甲蓝残留量超标现象,保证输血安全。

关键词:亚甲蓝; 固相萃取; 残留量; 病毒灭活血浆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)21-3019-02

Analysis of the causes of the excessive residuals of methylene blue in virus inactivated plasma

ZHANG Jianwei, YANG Hongmei[△]

(Changzhou Blood Center, Changzhou, Jiangsu 213004, China)

Abstract: Objective To discuss the results and causes of the residue of methylene blue after virus inactivation by methylene blue photochemical method. **Methods** A solid phase extraction method was used to detect residual amount of methylene blue of different specifications in the virus inactivation plasma and the reasons for the excessive residuals of methylene blue were analyzed. **Results** The residuals of methylene blue in the virus inactivation plasma in different specifications had differences, and the differences had statistical significance. **Conclusion** Corresponding measures should be taken according to different situations for the excessive residuals of methylene blue, and critical control points should be monitored in the process of preparation so as to decrease the phenomenon of excessive residuals of methylene blue and ensure the safety of blood transfusion.

Key words: methylene blue; solid phase extraction; residue; virus inactivated plasma

输血技术是现代医学不可缺少的手段,但输血时有感染相关传染性病毒的风险,因此,对血液病毒进行灭活是保障临床安全输血的措施之一。目前,采供血机构为降低临床输血感染病毒的风险,增加输血安全性,一般采用亚甲蓝光化学法灭活血浆中的病毒^[1-2]。亚甲蓝灭活血浆病毒有效水平为1.0~5.0 μmol/L(即亚甲蓝释放量)。灭活病毒后使用一次性病毒灭活过滤器滤除亚甲蓝,使最大残留量不超过0.3 μmol/L(根据2012年版血站技术操作规程),以保证大剂量输血后亚甲蓝在体内累积不超标,保证用血安全^[3];同时,亚甲蓝残留量过多将导致血浆外观和色泽发生改变,不易被临床医院所接受。因此,严格控制并检测血浆中亚甲蓝残留量有重要意义。本站按照2012年版血站技术操作规程,以固相萃取法对血浆中亚甲蓝残留量进行萃取分离,采用F4040半自动生化仪检测其水平,现将抽检质量结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本站2012~2015年共抽检病毒灭活冰冻血浆462袋,抽检规格包括75、100、125、150、175、200、250 mL。

1.2 仪器与试剂 F4040半自动生化分析仪购自Photometer,真空固相萃取装置-隔膜真空泵购自天津市津腾实验设备有限公司, Waters Oasis小柱(Waters Corporation Milford)购自Massachusetts USA公司,亚甲蓝标准品购自Sigma公司,甲醇(色谱纯)购自Sigma公司,冰醋酸(分析纯)购自上海申博,亚甲蓝测定试剂盒购自北京瑞尔达, Baso2000离心机购自台湾贝索企业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 亚甲蓝标准品的制备 亚甲蓝标准储备液:准确称取0.0374 g标准品置100 mL容量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释定容至刻度,此水平为1.00×10⁻³ mol/L。1.00 μmol/L亚甲蓝

标准工作液:准确吸取50 μL亚甲蓝标准储备液于50 mL容量瓶中用血浆稀释定容至刻度。

1.3.2 测试样品处理 将3 mL Waters Oasis小柱数支装入固相萃取装置上,用6 mL甲醇活化,每批3小柱加入1.00 μmol/L亚甲蓝标准工作液6 mL及1小柱0.30 μmol/L亚甲蓝质控液6 mL,其他各小柱加入6 mL待测血浆。萃取亚甲蓝残留量,后用30%甲醇6 mL清洗,随后用含1%冰醋酸的甲醇溶液2 mL洗脱,将洗脱液离心(3 500 r/min),取上清液作为样品溶液。

1.4 统计学处理 血浆中亚甲蓝残留量水平按照说明书公式进行计算。

2 结果

2.1 病毒灭活冰冻血浆亚甲蓝残留量区间分布 2012~2015年共质量抽检病毒灭活冰冻血浆462袋:亚甲蓝残留量0~<0.10 μmol/L有126袋,0.10~<0.20 μmol/L有191袋,0.20~<0.30 μmol/L有112袋,0.30~<0.40 μmol/L有30袋,≥0.4 μmol/L有3袋;0.30~<0.40 μmol/L的33袋中,金坛分站有11袋。按照2012年版血站技术操作规程,抽检合格率大于或等需75%符合要求,而常州地区2012~2015年病毒灭活冰冻血浆亚甲蓝残留量总合格率为92.86%(429/462),总不合格率为7.14%(33/462),其中亚甲蓝残留量0.30~<0.40 μmol/L为90.90%(30/33),≥0.4 μmol/L为9.10%(3/33)。

表1 不同规格与病毒灭活血浆亚甲蓝残留量的关系

规格(mL)	抽检数量(n)	合格数量(n)	合格率(%)
75	70	68	97.14
100	112	107	95.53

续表 1 不同规格与病毒灭活血浆亚甲蓝残留量的关系			
规格(mL)	抽检数量(n)	合格数量(n)	合格率(%)
125	86	82	95.35
150	57	49	85.96
175	43	35	81.39
200	49	44	89.79
250	45	44	97.78
合计	462	429	92.86

表 2 不同萃取小柱与亚甲蓝残留量的关系($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/L}$)		
血浆标本编号	Waters Oasis 小柱	北京瑞尔达小柱
13024942	0.322±0.020	0.308±0.020
13053711	0.377±0.040	0.356±0.060
13075504	0.335±0.020	0.314±0.030
14012219	0.351±0.030	0.339±0.040
14023362	0.318±0.010	0.327±0.050
14045401	0.382±0.050	0.375±0.060
14063839	0.311±0.010	0.318±0.010
14075104	0.362±0.020	0.334±0.030
15011772	0.379±0.040	0.351±0.030
15022521	0.336±0.030	0.316±0.020
15024106	0.359±0.030	0.335±0.020
15035101	0.326±0.020	0.302±0.010
15050226	0.315±0.010	0.305±0.020
15061811	0.306±0.010	0.292±0.020
15097109	0.345±0.030	0.310±0.020

2.2 不同规格与病毒灭活血浆亚甲蓝残留量的关系 2012~2015 年常州地区病毒灭活冰冻血浆抽检规格分别为 75、100、125、150、175、200、250 mL,以检测结果小于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 为合格。7 种规格的病毒灭活血浆亚甲蓝残留量测定结果中,规格为 150 mL、175 mL 和 200 mL 的病毒灭活血浆亚甲蓝残留量合格率较低,可能与本站根据血浆量选用相应规格的一次性病毒灭活输血过滤器材有关,见表 1。

2.3 不同萃取小柱与亚甲蓝残留量的关系 取 15 例亚甲蓝残留量为 0.30~<0.40 $\mu\text{mol/L}$ 标本,分别采用 Waters Oasis 小柱和北京瑞尔达配套耗材小柱进行固相萃取,后采用 F4040 半自动生化仪检测其水平,平均测定 3 次。检测结果表明,Waters Oasis 小柱的吸附效果显著好于北京瑞尔达小柱。见表 2。

3 讨 论

随着亚甲蓝光化学照射技术的发展,其相关应用越来越广泛,并被采供血机构中广泛采用。但是,过多的亚甲蓝进入人体内会对机体产生一定毒性作用。因此,控制过滤前血浆亚甲蓝的水平及过滤后亚甲蓝残留量成为重要质量控制标准^[5-6]。

本站使用一次性病毒灭活过滤器有 2 种规格,即 01B 和 02B。01B 对应的血浆量为 170 mL 及 170 mL 以下,02B 对应的血浆量为 170 mL 以上;容量为 170 mL 左右的病毒灭活冰冻血浆亚甲蓝残留量超标现象更为严重,建议厂家针对容量 150~200 mL,生产 1.5B 规格的一次性病毒灭活过滤器,可以有

效减少亚甲蓝残留量带来的潜在风险。本研究结合采供血机构血液质量抽检标准及本站病毒灭活冰冻血浆抽检情况,亚甲蓝残留量偏高原因可能有:(1)工作人员责任性不强造成。根据血浆量应选用相应规格的一次性病毒灭活输血过滤器材。本站使用 1B 和 2B 规格。1B 对应的血浆量为 170 mL 及 170 mL 以下;2B 对应的血浆量为 170 mL 以上。工作人员在血浆称重分类时掌握不严,可能将 170 mL 及 170 mL 以下血浆袋放入 170 mL 以上的筐内。此外,净化室截浆时,可能将 1B 的病毒灭活输血过滤器材错拿成 2B。(2)光照结束后未及时过滤。有统计显示,分别在光照结束后 0 h、2 h、3 h 进行过滤比较,亚甲蓝残留会逐渐升高,差异有统计学意义。(3)一次性病毒灭活输血过滤器材本身存在质量问题,光照结束,挤压光照袋启动过滤后,使含亚甲蓝的血浆经过滤器自然流入血浆储存袋,当出现过滤不畅的情况时,不得不人为用力去挤压光照袋。

固相萃取是 1 种试样预处理技术,采用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,使样品基体和干扰化合物分离,再用洗脱液洗脱,可分离和富集目标化合物。小柱在吸附过程中主要通过阻滞作用、表面张力、电荷排斥力来完成^[4]。

亚甲蓝光照血浆病毒灭活关键环节为:(1)新鲜冰冻血浆在 30~37 ℃ 水浴箱中融化,融化时注意不要将冰冻血浆碰到水浴箱壁,为了减少融化时间应不断轻柔摇动血浆袋,但不能剧烈摇晃,以免产生大量泡沫。(2)病毒灭活柜内温度保持 2~6 ℃,每层光照达到血浆病毒灭活的效果。(3)灭活后血浆马上滤除亚甲蓝。总之,为降低病毒灭活冰冻血浆中亚甲蓝残留量,首先需要把握成分制备的关键控制点,加强工作人员责任心;其次,在抽检过程中严格按照操作规程确保检测结果的准确性,将血液的每一步环节把握到位,才能保障血液安全。

参考文献

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

[2] 葛健民,柏则蓉,梁启忠,等.亚甲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.

[3] 周群刚,谢莲,方敏,等.基于阴离子型环糊精超分子包合物高灵敏荧光光度分光法检测血浆中残留亚甲蓝[J].中国药房,2014,6(6):519-521.

[4] 李榕,陈火玲,钱献,等.亚甲蓝/光照法病毒灭活血浆的制备及应用评价[J].临床输血与检验,2013,15(1):4-7.

[5] 黎添华,邢启明,劳丽嫦.亚甲蓝残留量在病毒灭活血浆中的限量检测方法[J].现代诊断与治疗,2014,25(7):1464-1465.

[6] 梁启忠,葛健民,程玉根,等.病毒灭活血浆亚甲蓝残留量的检测及质量标准研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2148-2149.

(收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-05-18)

(上接第 3018 页)

[10] 管改弟,李东,李向红.2012~2013 年太原市无偿献血人群 HIV 感染的流行病学调查[J].临床医药实践,2015(10):796-797.

[11] 魏彬,丰姝,罗娅,等.2013 年 HIV 抗体免疫印迹试验确证不确定结果分析[J].现代预防医学,2015,42(15):

2788-2792.

[12] 朱荣华,向信春.37 例 HIV 不确定结果随访观察及 WB 带型分析[J].皮肤病与性病,2014,36(1):46-47.

(收稿日期:2016-04-11 修回日期:2016-06-22)