



# 血液制品病原体灭活方法和效果

上海市血液中心 王迅

2017年7月 广州



# 大纲



血液安全



病原体灭活



病原体灭活技术的效果  
及临床应用





# 中国也不例外

## **With Less Blood Supply, China Seeks in the Black Market**

Feb 2015, <http://www.youthhealthmag.com/articles/9757/20150215/blood-supply-in-china-blood-heads-china-blood-supply-blood-famine.htm>

由于血液供应短缺，中国从黑市寻求血液



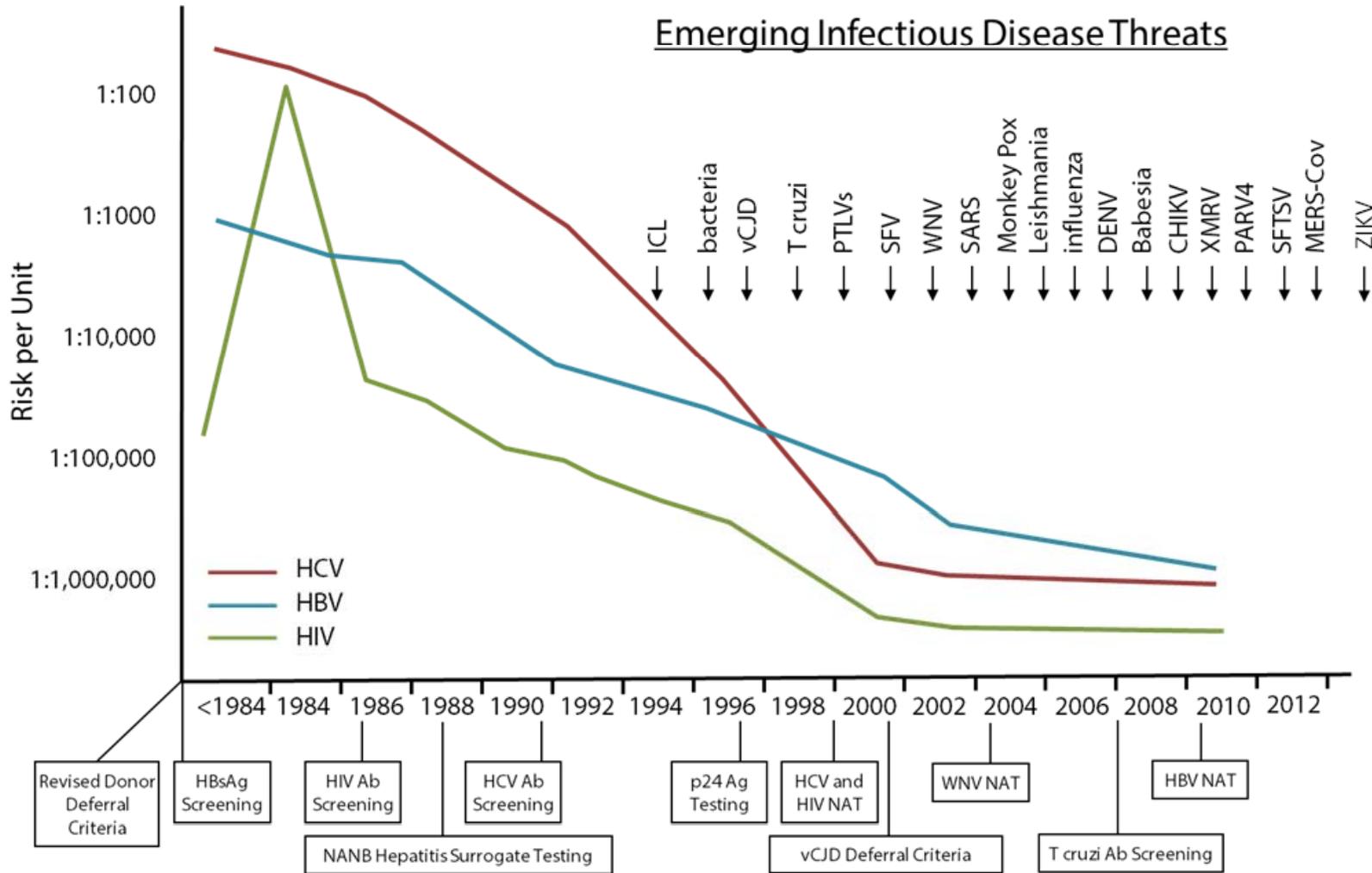
**5-year-old Fujian girl confirmed to  
have gotten HIV through blood  
transfusion**

<http://shanghaiist.com/2015/01/12/5-year-old-fujian-girl-gets-hiv-blood-transfusion.php>

5岁福建女孩确认从输血感染HIV



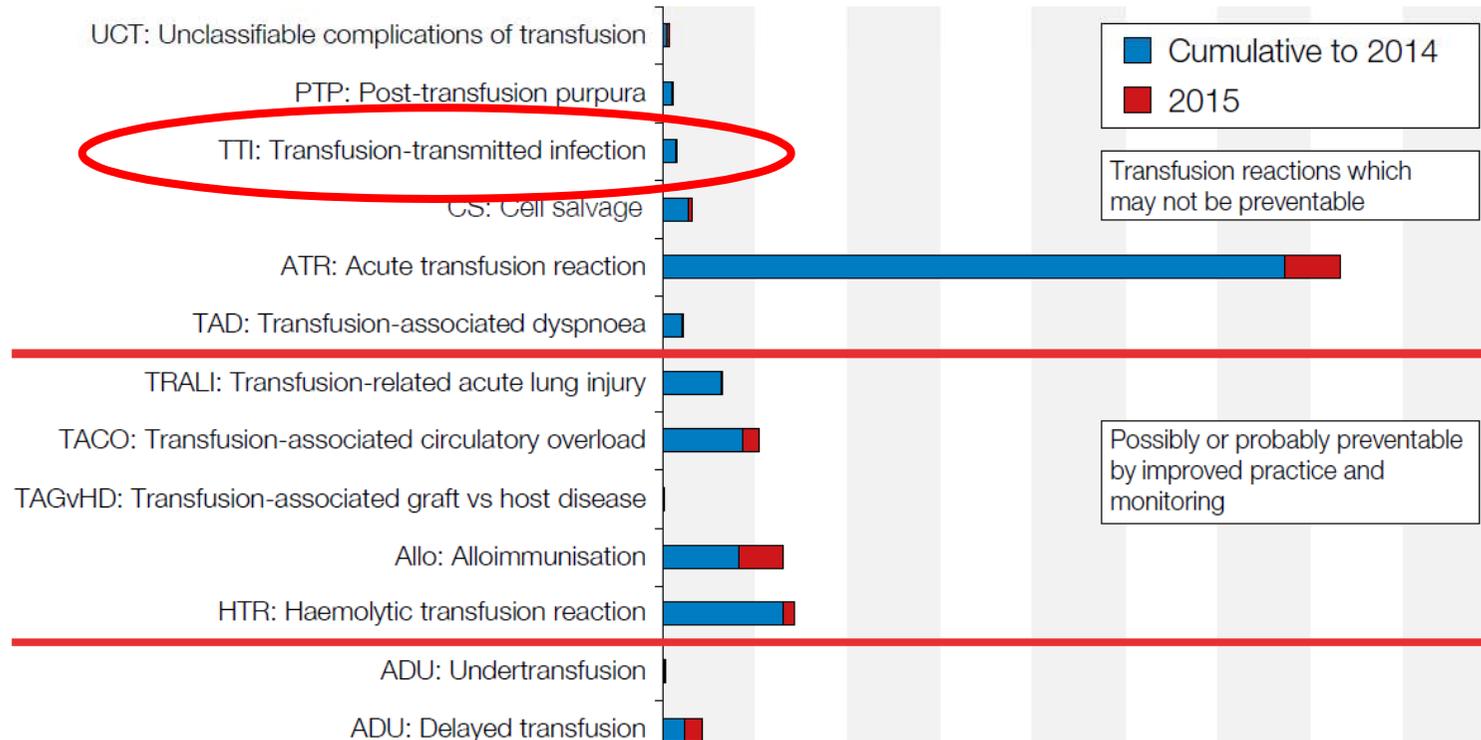
# 感染性输血风险





# 英国SHOT血液安全监测报告(2015年)

Figure 3.6:  
Cumulative data for  
SHOT categories  
1996 to 2015  
n=16677



1. 血小板细菌检测能有效降低血小板制品细菌污染的风险，但仍残留有细菌污染风险发生
2. **HBV, HCV和HIV**的感染风险已经极低
3. 近年来，输血传播的**HEV**风险上升，但对于**HEV**的输血传播，必须仔细甄别
4. **2015年**，**2例**细菌污染，**2例HEV**传播



## 为什么筛查了还有风险？ — ①漏检

- 检测技术的局限性
  - 窗口期
  - 隐匿性感染
  - 病毒变异
  - 试剂质量
- 检测条件影响及人工差错





# 为什么筛查了还有风险？

## — ② 仍有病原体没有筛查

- 我国目前筛查的病原体：**HBV, HCV, HIV, 梅毒螺旋体, HTLV**（部分地区），细菌（抽检）
- 未检测但有较大风险的病原体：**HAV, HTLV, CMV, EBV, B19, 登革病毒, 寨卡病毒, 疟原虫, HEV, 等**
- 新病原体不断被发现



# 新发感染性疾病(EID)的威胁

Drug-resistant infections

Chagas' disease

Dengue fever

*Escherichia coli* infection

Hantavirus pulmonary syndrome

Histoplasmosis

Influenza

Listeriosis

Measles

Monkeypox

Plaque

Salmonellosis

Shigellosis

Tuberculosis

West Nile virus infection

Chikungunya virus infection

Babecia

BSE / vCJD

Cholera

Ebola hemorrhagic fever

Group B streptococcal inf.

Hepatitis C

HIV / AIDS

Legionnaires' disease

Malaria

Meningitis

Pertussis

Polio

SARS

Sleeping sickness

*Staphylococcus aureus*

Tick-borne pathogens

Zika viral infection

Others



# 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China

2016年4月8日 星期五

[首 页](#) | [信息公开](#) | [政务大厅](#) | [在线服务](#) | [互动交流](#)

[English](#)

业务频道

[综合管理](#) | [人事管理](#) | [规划信息](#) | [财务管理](#) | [法制建设](#) | [体制改革](#) | [卫生应急](#) | [疾病防控](#) | [爱国卫生](#)  
[医政医管](#) | [基层卫生](#) | [妇幼健康](#) | [食品安全](#) | [综合监督](#) | [药政管理](#) | [基层计生](#) | [家庭发展](#) | [流动人口](#)  
[新闻宣传](#) | [健康促进](#) | [科技教育](#) | [国际合作](#) | [港澳台合作](#) | [精神文明](#) | [离退管理](#) | [纪检监察](#)

## 新闻发布

> [卫生计生要闻](#)

> [新闻发布会](#)

当前位置: [首页](#) > [新闻中心](#) > [新闻发布](#)

### > 新闻发布

- > [福建省新增1例输入性黄热病确诊病例](#) 2016-04-03
- > [福建省新增3例输入性黄热病确诊病例](#) 2016-04-01
- > [\[预告\]糖尿病防治早知道](#) 2016-04-01
- > [2016年世界卫生日糖尿病防治核心信息](#) 2016-03-29
- > [福建省确诊1例输入性黄热病病例](#) 2016-03-25
- > [2016年世界防治结核病日主题宣传活动在京举行](#) 2016-03-22
- > [北京市确诊1例输入性黄热病病例](#) 2016-03-20
- > [北京市新增2例输入性黄热病病例](#) 2016-03-19
- > [上海市报告一例境外输入性外来就诊黄热病确诊病例](#) 2016-03-18
- > [我国发现一例输入性黄热病病例](#) 2016-03-13
- > [\[预告\]对话人大代表](#) 2016-03-09
- > [李斌主任等就“实施全面两孩政策”答记者问文字实录](#) 2016-03-08
- > [广东省新增两例输入性寨卡病毒感染病例](#) 2016-03-07
- > [\[健康报网\]“健康中国”将引领卫生计生事业改革发展](#) 2016-03-06
- > [\[健康报网\]提高人均预期寿命体现的是重视和决心](#) 2016-03-06
- > [广东省卫生计生委：广东省在接受医学观察人员中发现一例输入性寨卡病毒感染病例](#) 2016-03-02
- > [广东省卫生计生委：广东省新增两例输入性寨卡病毒感染病例](#) 2016-02-27
- > [浙江省新发现1例输入性寨卡病毒感染病例](#) 2016-02-26
- > [2016年2月24日国家卫生计生委例行新闻发布会文字实录](#) 2016-02-24
- > [2016年2月例行发布会材料三：关于儿科医生培养的有关情况](#) 2016-02-24

首页 [1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [下一页](#) [末页](#)

第 1 页 转  页 共 535 条 共 27 页

[联系我们](#) | [网站地图](#) |





# EID在发展中/不发达国家中造成严重危害

WHO: July 22<sup>nd</sup> 2015 - total 27,705 cases 11,269 deaths  
879 cases, 510 deaths in healthcare workers



<http://www.pulitzer.org/works/2015-Feature-Photography>



Residents call attention to a man lying dead on a busy street in Monrovia, Liberia, who had died three days earlier. When no burial team came, people wearing rubber gloves dragged him into the street, stopping traffic and demanding he be taken away.

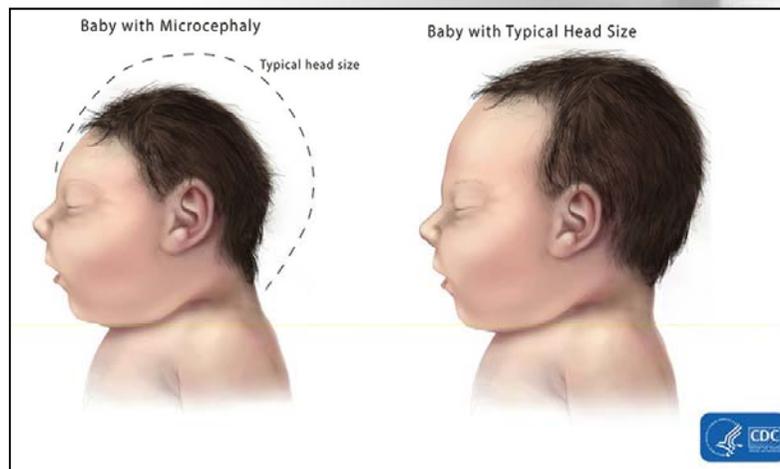
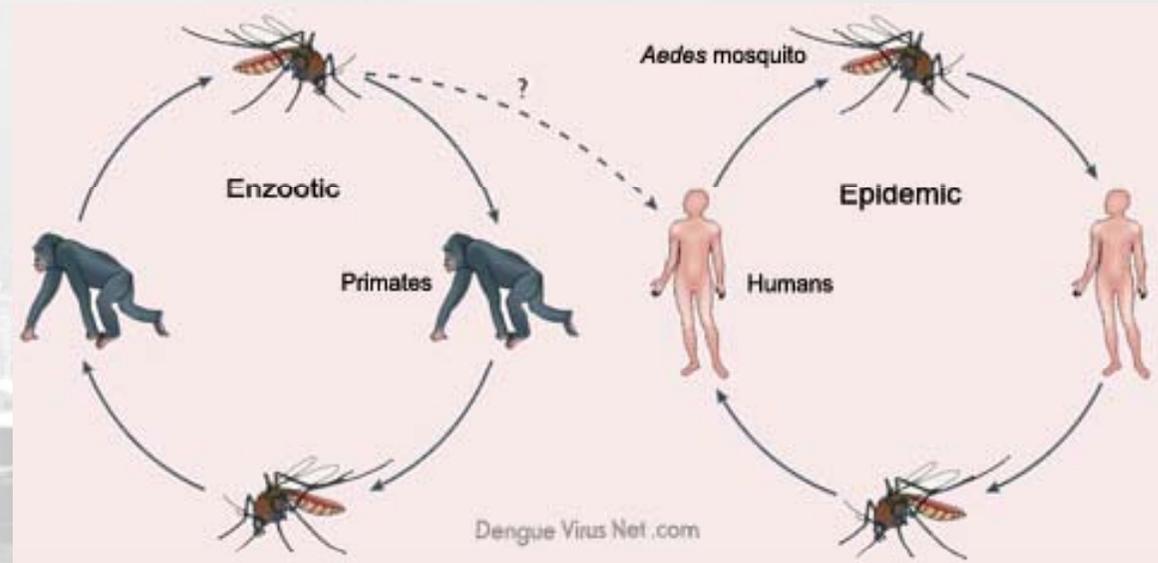
Daniel Berehulak <http://www.nytimes.com/slideshow/2015/04/20/blogs/20150420-lens->





# 虫媒病毒的威胁

- WNV
- DENV
- CHIKV
- ZIKV





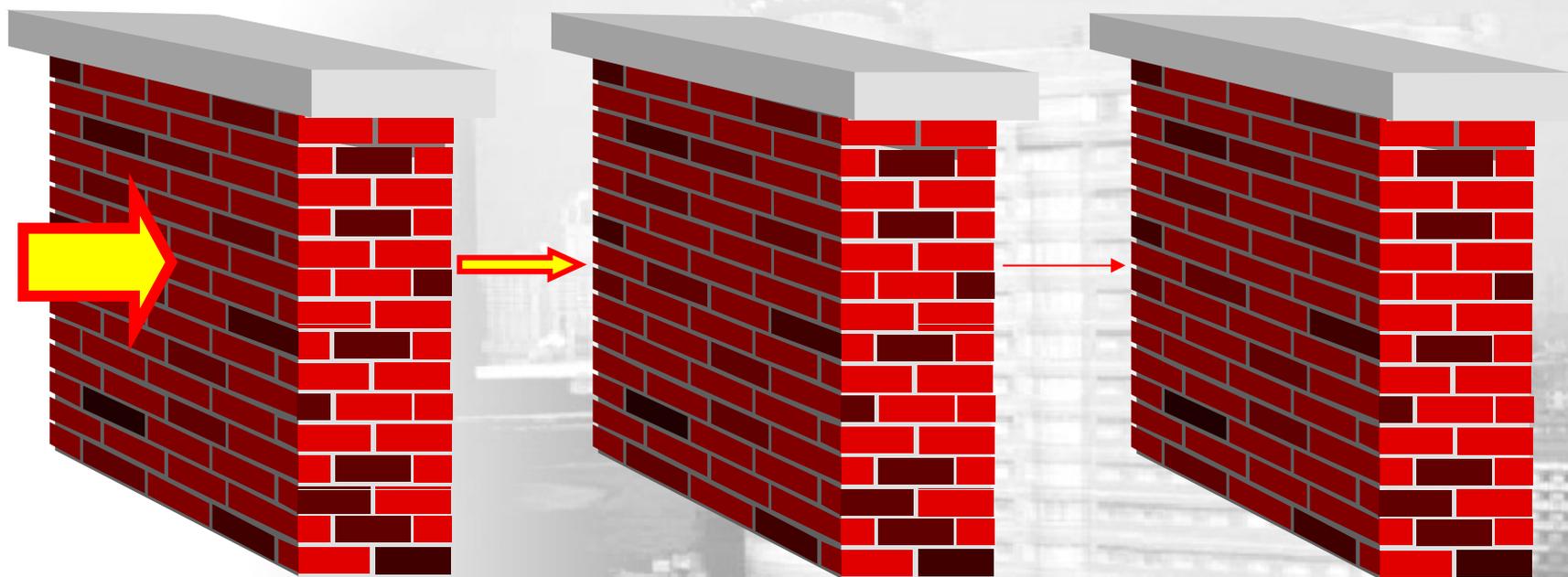
# WHO颁布预防寨卡病毒 通过血液传播的指南

The screenshot shows the WHO website interface. At the top, there is a navigation bar with the WHO logo and the text 'World Health Organization'. Below this, there is a search bar and a menu with options like 'Health topics', 'Data', 'Media centre', 'Publications', 'Countries', 'Programmes', 'Governance', and 'About WHO'. The main content area features a sidebar on the left with links to 'Home', 'Ebola outbreak', 'Alert and response operations', 'Diseases', and 'Biorisk reduction'. The main article title is 'Maintaining a safe and adequate blood supply during Zika virus outbreaks' with the subtitle 'Interim guidance'. Below the title, it lists 'Authors: World Health Organization' and provides 'Publication details' such as 'Number of pages: 4', 'Publication date: February 2016', 'Languages: English', and 'WHO reference number: WHO/ZIKV/HS/16.1'. There is also a 'Downloads' section with a link to the document. At the bottom, there is an 'Overview' section starting with 'These guidelines have been developed in recognition that infection with Zika virus may present a risk to blood safety...'

- 献血者延缓献血
- 血液筛查
- 病原体灭活



# 预防血液和血浆制品传播病原的3个原则



献血者管理

献血前检测  
血液筛查

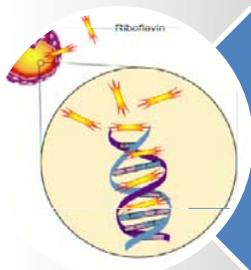
灭活  
去除



# 大纲



血液安全



病原体灭活



病原体灭活技术的效果  
及临床应用



# 病原体灭活/去除

- 随着消毒灭菌技术的进步而发展
- 包含**2**大类技术
  - 移除：过滤、吸附等方法
  - 杀灭：巴斯德法、**S/D**法、光化学法等
- 绝大多数国家，早已明文规定血浆制品的生产工艺中必须包括病原体去除步骤
- 美国从**1985**年起**FDA**批准对血浆实施**S/D**工艺处理，也曾研究使用**S/D**法处理单袋血浆
- 欧盟指令**2002/98/EC**规定了血液和血液成分的质量和安全的标准，指示欧盟成员国利用科学方法，对输血可传染的病毒载体进行检测、灭活和去除



# FDA Draft Guidance March 2016

## Bacterial Risk Control Strategies for Blood Collection Establishments and Transfusion Services to Enhance the Safety and Availability of Platelets for Transfusion

### Draft Guidance for Industry

This guidance document is for comment purposes only.

Submit one set of either electronic or written comments on this draft guidance by the date provided in the *Federal Register* notice announcing the availability of the draft guidance. Submit electronic comments to <http://www.regulations.gov>. Submit written comments to the Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, Rm. 1061, Rockville, MD 20852. You should identify all comments with the docket number listed in the notice of availability that publishes in the *Federal Register*.

Additional copies of this guidance are available from the Office of Communication, Outreach and Development (OCOD), 10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Rm. 3128, Silver Spring, MD 20993-0002, or by calling 1-800-835-4709 or 240-402-8010, or email [ocod@fda.hhs.gov](mailto:ocod@fda.hhs.gov), or from the Internet at <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

For questions on the content of this guidance, contact OCOD at the phone numbers or email address listed above.

U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Biologics Evaluation and Research  
March 2016

- 即使血小板制品细菌培养阴性，在临床使用前，仍需（2选1）：
  - 对第4和第5天的血小板制品增加细菌快速检测或再次培养检测，只有再次细菌检测阴性的血液才能发放临床使用
  - 开展血小板制品病原体灭活处理，开展病原体灭活处理的血液无须再次进行细菌检测



# 理想的病原体灭活方法

- 能有效灭活病原体(作用广谱)
  - 病原体灭活效果的验证
- 对血液成分活性及功能无明显不良影响
  - 血浆：凝血因子、血浆蛋白回收率、蛋白质免疫原性.....
  - 红细胞：溶血、K<sup>+</sup>溢出、ATP、2,3-DPG、形态积分、体内回收率.....
  - 血小板：HSR、CD40、形态积分、聚集率.....
- 对人体安全(残余毒性)
  - 无残留或可去除
  - 急慢性毒性试验无毒
  - 远期毒性试验无致突变作用
- 可用性
  - 适用于单袋血液成分处理
  - 简便快速（血小板）
  - 成本适宜
  - cGMP –全面质量管理的兼容性



# 问题

- 如何选择性地杀伤或去除各种各样的细胞内和细胞外病原体而不影响血液成份的生物学或化学特性？





## 解决方案

- 选择一个或更多病原体独特的靶位点，这些靶位点可以是血液中没有的，也可以是血液或血液成份中与治疗功能无关的位点。





# 固有的困难

- 病原微生物
  - 病原体存在于多种血液成份中
  - 微生物结构的多变
  - 致病微生物种类繁多
- 血液成分的特性
  - 血液细胞和蛋白的不稳定性/脆弱性
  - 与病原体有相似的靶位点
- 灭活剂的毒性
  - 作用靶位点
  - 天然化合物/人工合成化合物
  - 是否需要去除?



# 病原体灭活的原理

## ● 物理方法

膜吸附(白细胞滤器、膜过滤法),加热法(湿热法、巴斯德法)等

## ● 化学方法

### ● 添加化学试剂

- 破坏病原体包膜

### ● 光化学法或PH法

- 核酸打靶技术(nucleic acid targeted technology)
- 核酸特异性的加合物的形成 (nucleic acid specific adduct formation)



# 当前的方法

## ● 血浆

- 有机溶剂/去污剂
- 补骨质素 (S-59, amotosalen)
- 亚甲蓝
- 核黄素

## ● 血小板

- 补骨质素
- 核黄素

## ● 红细胞

- **FRALE (S-303)**
- **Inactine (PEN 110)**
- 核黄素
- 特异性亲和剂去除朊蛋白体





# 目前的 PI 技术

		非细胞类产品	细胞类产品	
		血浆及其衍生物	血小板	红细胞
常见PI技术和理论上合格的产品	作用靶位点为核酸的技术			
	作用靶位点为膜的技术			
目前特异性的PI技术以及可应用的产品	有机溶剂/去污剂	有	无	无
	亚甲蓝	有	无	无
	补骨质素 S59	有	有	无
	核黄素	有	有	?
	FRALE (S303)	?	?	有
	Inactine	?	?	有

来源: Roger Dodd, as in Transfusion Medicine Review 2008; 22(1):5



# 当前病原体灭活技术的特点

- 目前正在使用的方法中，SD法作用靶位点为病毒的脂质包膜，其它方法的主要靶位点为核酸
- 针对血浆，血小板和红细胞需要不同的方法
- 没有任何方法仅完全特异地只作用于病原体
- 灭活处理并不能完全清除病原体，所有的方法只是在灭活病原体和保护血液成份的完整性及功能性之间寻找一个平衡点
- 血浆病原体灭活  
建立了成熟的方法，经灭活处理的血浆已进入临床实际应用，远期效果和影响尚有待观察
- 血细胞病原体灭活  
红细胞病原体灭活虽已取得突破性进展，但仍无临床可用的产品  
血小板病原体灭活已进入临床试验



# 病原体灭活的副作用

- **SD** 和亚甲蓝病原体灭活方法, 在某种情况下降低凝血因子水平
- **Amotosalen (S-59)** 降低血小板的数量和功能
- **S-303** 和 **Inactine** 与针对处理红细胞的抗体的出现有关
  - 修饰 **S-303** 消灭其副作用
  - **Inactine** 不再积极研究



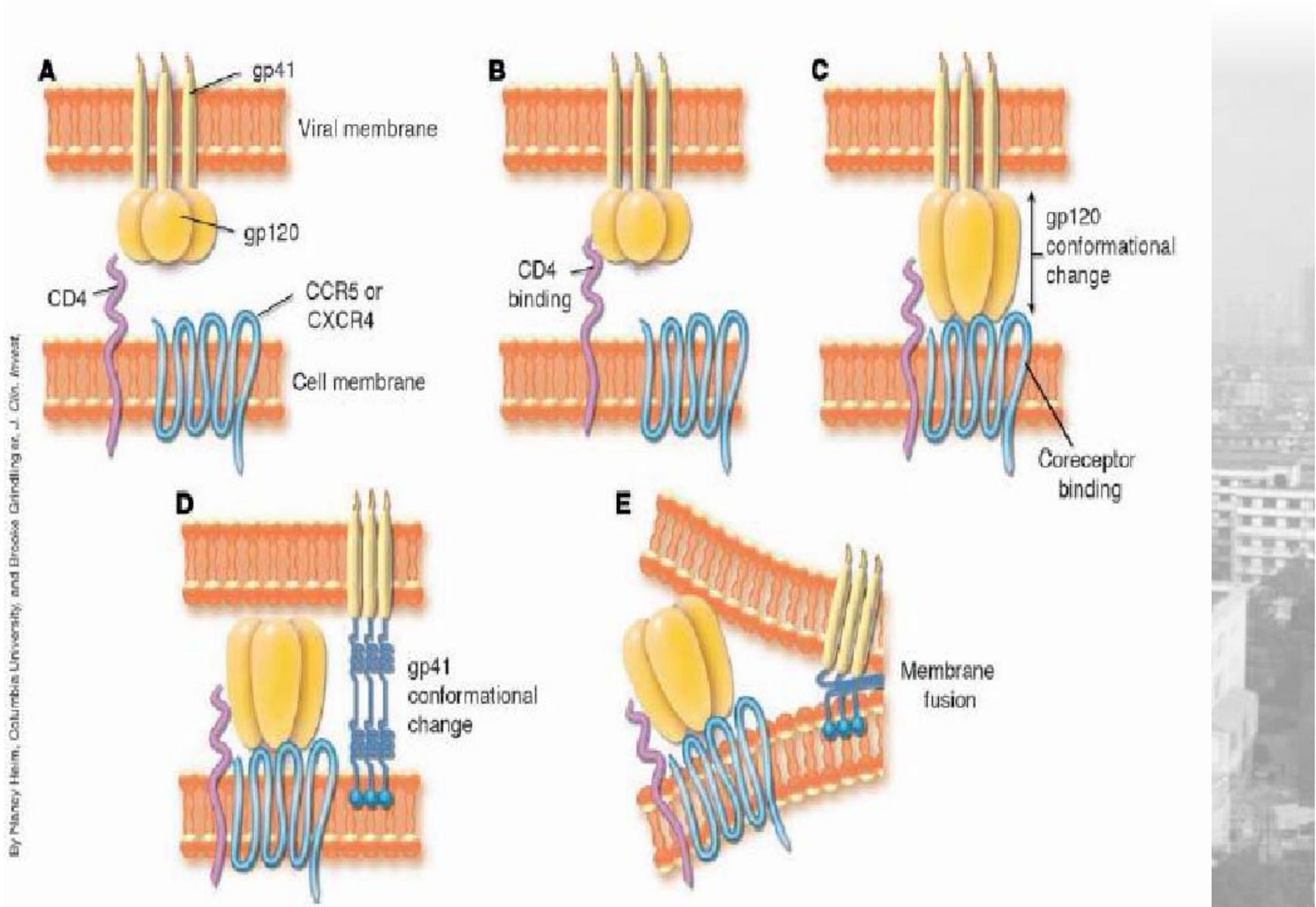
# 新的病原体灭活方法

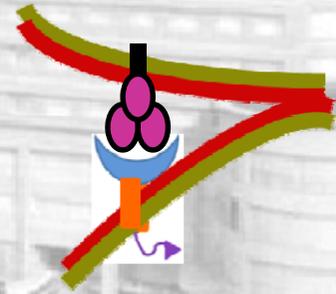
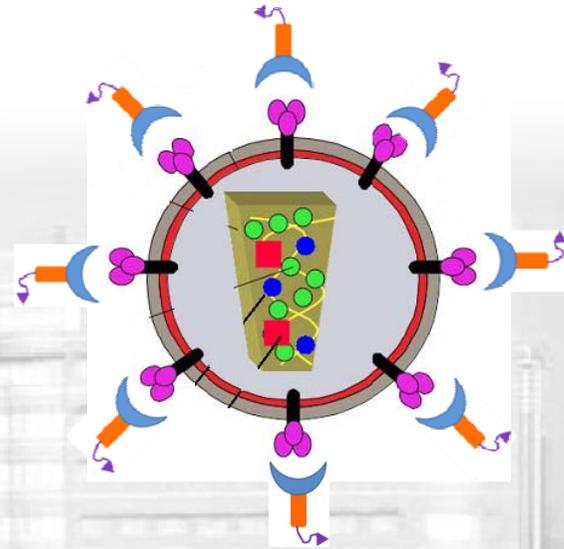
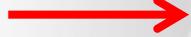
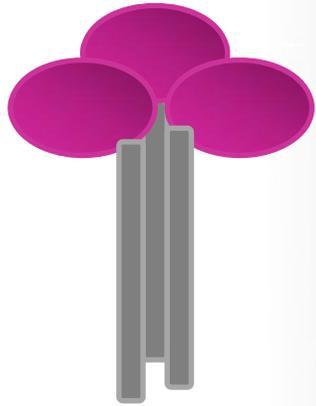
- 特异性封闭病毒侵入细胞的结合位点，阻断病毒入侵
- 在此基础上，特异性破坏病毒结构，杀灭病毒





# HIV侵入细胞原理







# 大纲



血液安全



病原体灭活



病原体灭活技术的效果  
及临床应用





# 病原体灭活技术的效果验证

- 对病原体的灭活作用
- 对血液成分有效性的影响
- 对人体的安全性
- 临床使用的可行性





# 亚甲蓝光化学病原体灭活



## 35万单位 开展“病毒灭活血浆”项目

市血液中心主任朱永明介绍，先采血后化验造成的血液浪费较说，作为全国的临床用血“大户”，对乙肝患者不必要的损伤。

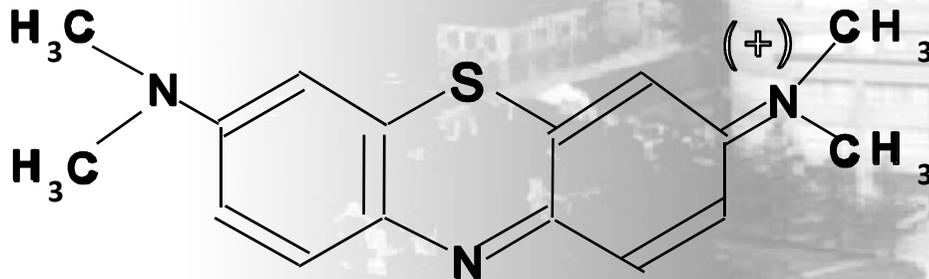
上海也是全国唯一开展“病活血浆”项目的省市，即将合格的血浆再用物理或化学法去除其可能残存的病毒，留各种血浆成分的生理活今年全市医院运用病毒灭活量占全部供应量的60%以上，临床用血的安全性进一步提高。市血液中心还率先实行辐照技术和白细胞过滤技术，避免了可能出现的输血免疫反应，杜绝了输注血浆引起病毒性疾病传播的机会。

朱永明表示，发动社会力量营造无偿献血光荣氛围，加强宣传，转变人们对血液安全的误解，仍将是明年本市献血工作的两项重要任务。



# 亚甲蓝—METHYLENE BLUE

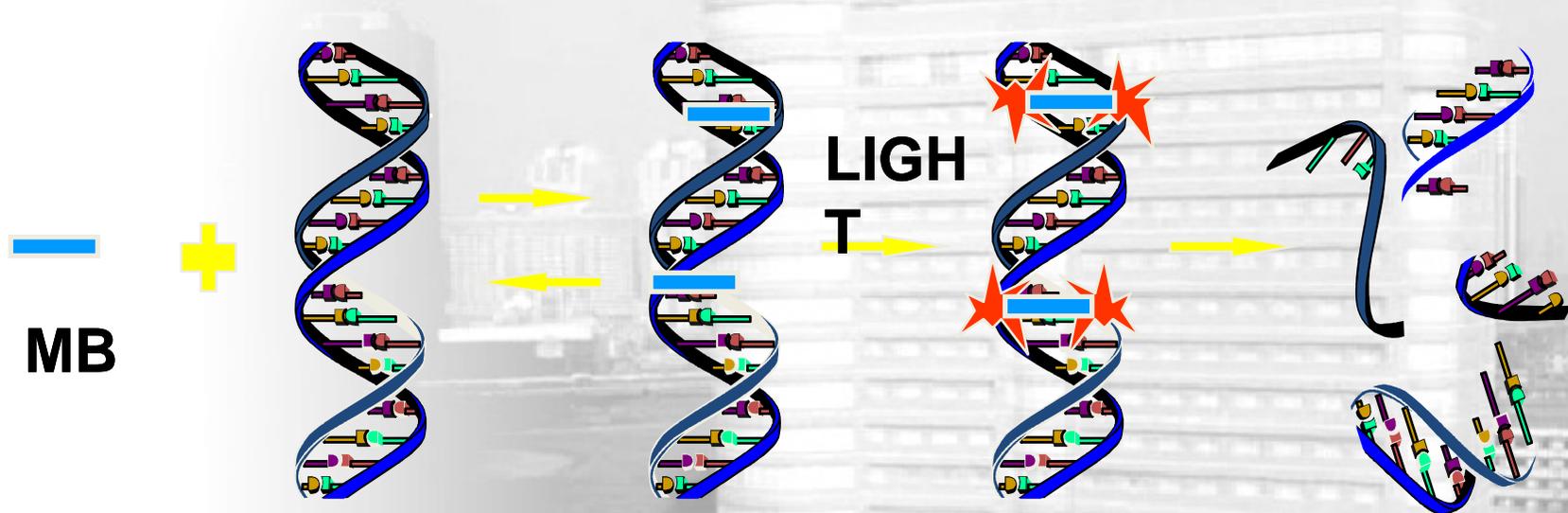
- MB — 光敏染料，吩噻嗪衍生物
- MB → 核酸G-C碱基具有亲和性 → MB分子吸收光能激发产生单态分子氧( $^1\text{O}_2$ ) →  $^1\text{O}_2$ 修饰鸟嘌呤碱基影响核酸 → 核酸链断裂碱基位点丢失 → 阻止其复制
- MB — 穿透病毒外壳 → 与病毒核酸结合





# MB-P病毒灭活机理

破坏病毒核酸



破坏病毒包膜





# MB-P病毒灭活效果验证

- 细胞培养试验，观察细胞病变，计算TCLD<sub>50</sub>
  - HIV — 脂质包膜的RNA病毒
  - VSV — 脂质包膜的RNA病毒的模型病毒
  - Sindbis病毒 — 脂质包膜的RNA病毒，HCV模型病毒，虫媒病毒
  - Dengue V — 脂质包膜RNA病毒，虫媒病毒，新发传染性病原体
  - Polio- I — 非脂质包膜的RNA病毒
- 分子生物学实验，观察RNA断裂
  - HCV RNA
- 动物实验，观察病毒的感染能力，ID<sub>50</sub>
  - DHBV — 脂质包膜的DNA病毒，HBV模型病毒

细胞病变方法参考：国药监注[2002]160号《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》



# MB-P有效性验证结果

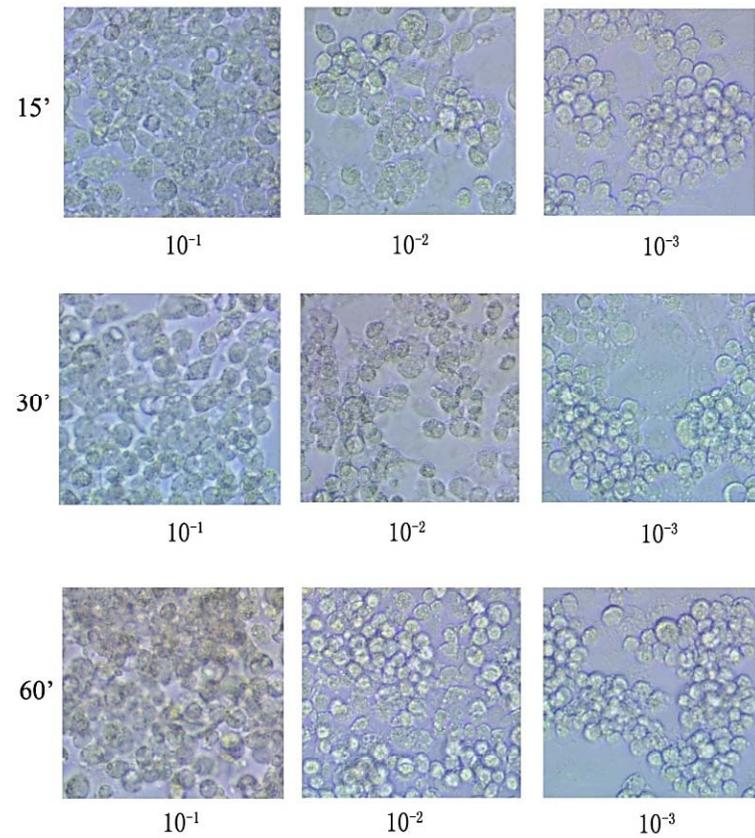
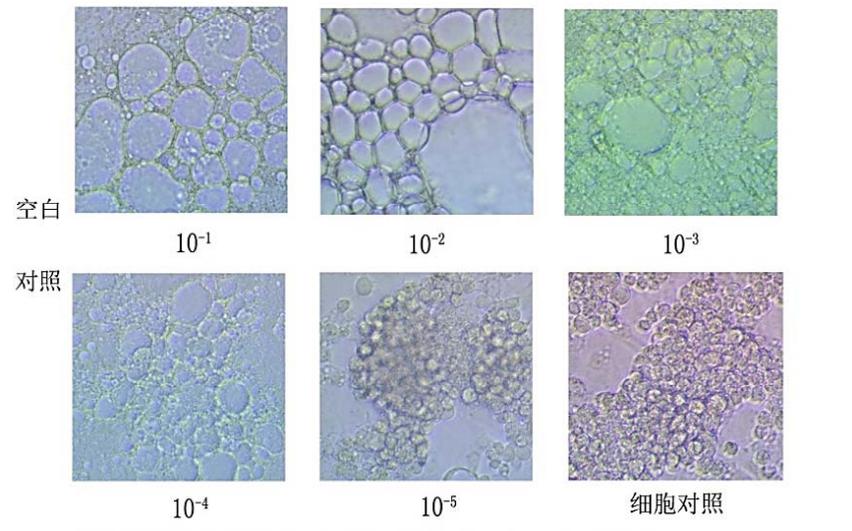
病毒名称	病毒灭活效果
<b>HIV</b>	<b><math>&gt;5.6\log\text{TCID}_{50}</math></b>
<b>VSV</b>	<b><math>&gt;8.5\log\text{TCID}_{50}</math></b>
<b>Sindbis</b>	<b><math>&gt;8.0\log\text{TCID}_{50}</math></b>
<b>DHBV</b>	<b><math>&gt;6.24\log\text{ID}_{50}</math></b>
<b>Polio- I (非脂质包膜的RNA病毒)</b>	<b><math>&gt;4.25\log\text{TCID}_{50}</math></b>

结果:能不同程度地灭活脂质包膜病毒(RNA、DNA病毒)4~6Log，对非脂质包膜病毒部分有效



# MB-P有效灭活登革病毒

- DENV病毒滴度经检测下降至检测限以下，滴度降低  $>4.77\log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ;



MB+L处理后的DENV CPE。



# MB-P引起HCV核酸断裂

MB	-	+	+	+	+	+	Marker
Light(min)	0	0	20	30	40	50	-

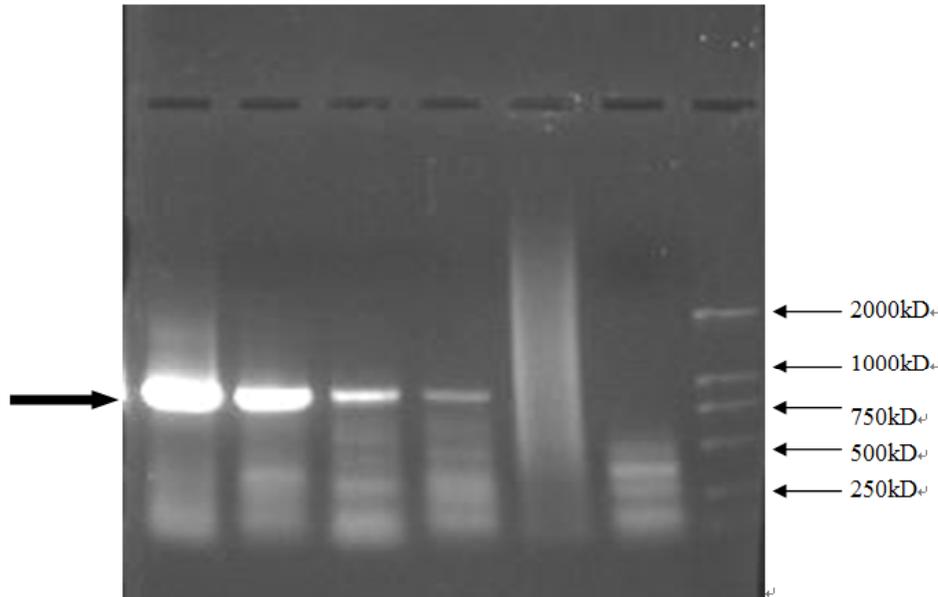
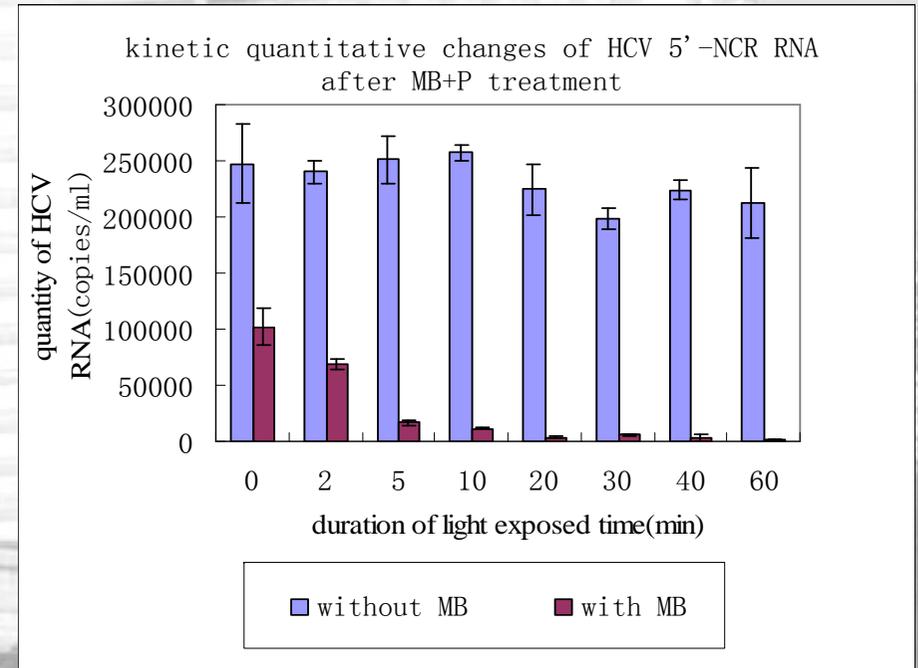


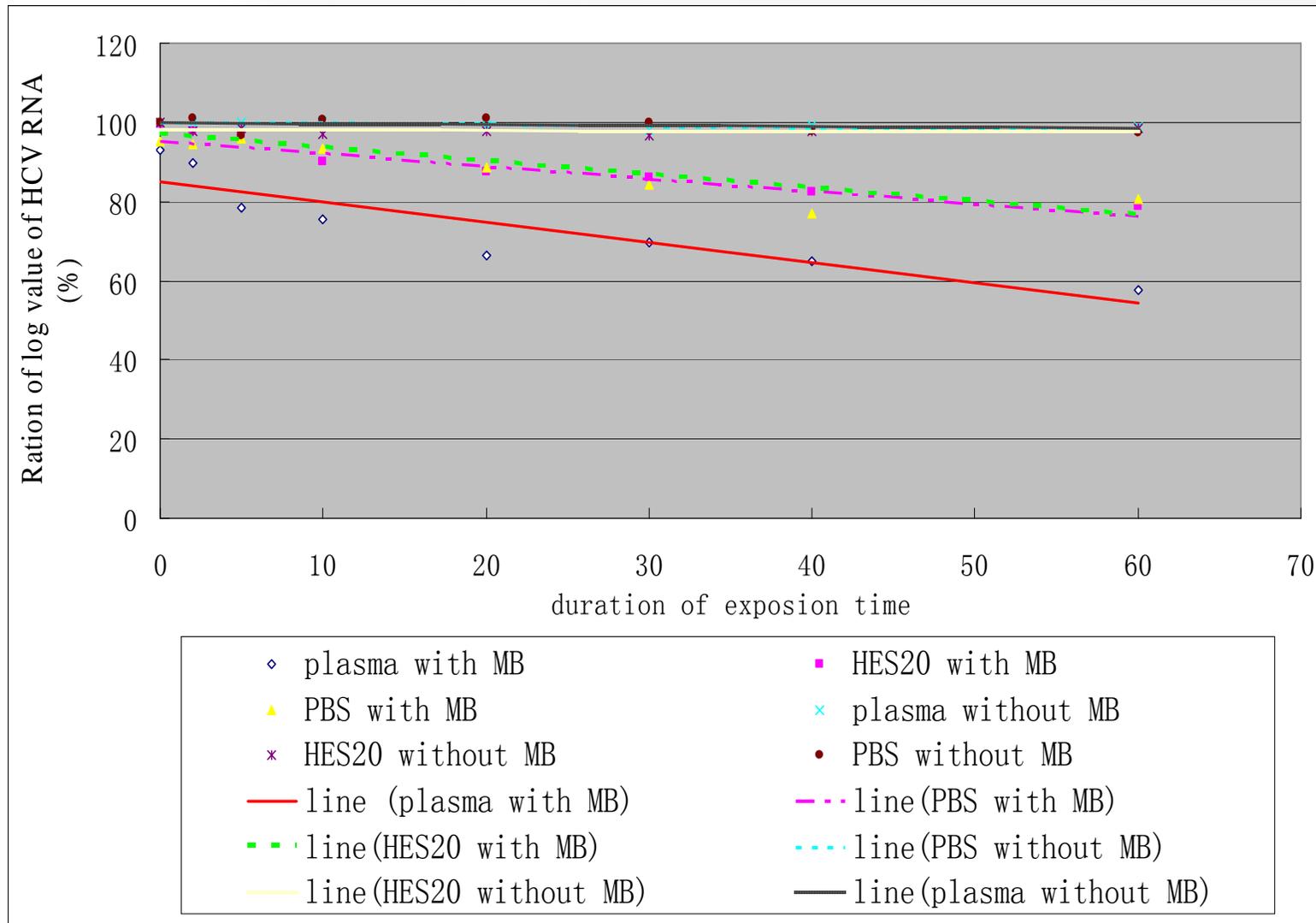
图 1. HCV RT-PCR 产物量随 MB-P 处理时间的变化

Fig1: Quantitative changes of HCV RT-PCR product after MB-P treatment





# MB-P在不同介质条件下 对HCV RNA的作用





# MB-P对血浆凝血因子及蛋白的影响

主要蛋白	回收率 (%+SD)	主要蛋白	回收率 (%+SD)
FIB	84.71 ± 9.31	FVIII	79.19 ± 9.16
FIX	71.65 ± 8.01	AT-III	91.43 ± 5.31
vwf	88.78 ± 6.01	PC	80.57 ± 4.88
TP	98.17 ± 2.84	C3	96.14 ± 3.38
C4	93.87 ± 5.66	AIB	98.11 ± 2.16
IgG	93.92 ± 5.27	IgA	93.31 ± 6.08
IgM	92.24 ± 9.84		

血浆有效成分：符合GB18469全血及成分血的质量要求。



# 亚甲蓝的药代动力学

- 亚甲蓝是国家药典收录的静脉输注药物
- 药代动力学：亚甲蓝静注后作用迅速，基本不经过代谢即随尿排出；
- 口服在胃肠道的pH条件下可被吸收。并在组织内迅速还原为白色亚甲蓝。在**6**天内**74%**由尿排出，其中**22%**为原形，其余为白色亚甲蓝，且部分可能被甲基化。少量亚甲蓝通过胆汁，由粪便排出。
- **MB**在人体中的半衰期约**60**分钟
- **MB**半致死剂量是**100mg/kg**



# 亚甲蓝治疗剂量

适应症	MB常用剂量	给药途径
高铁血红蛋白症	50~250mg/50kg	静脉
甲状腺染色	50~250mg/50kg	静脉
血浆病毒灭活（滤除前）	0.38mg/1000ml	静脉
血浆病毒灭活（滤除后）	≤0.30μmol/L（≤96ug/1000ml）	静脉

## <全血及成分血质量要求>GB 18469-2012

### 5.16 病毒灭活冰冻血浆

病毒灭活冰冻血浆质量控制项目和要求按照表 16 执行。

表 16 病毒灭活冰冻血浆质量控制项目和要求

质量控制项目	要求
外观	肉眼观察应呈黄色或淡绿色澄清液体,无色泽异常、蛋白析出、气泡及重度乳糜等情况;血袋完好,并保留注满病毒灭活冰冻血浆经热合的导管至少 10 cm
容量	标示量(mL)±10%
血浆蛋白含量	≥50 g/L
亚甲蓝残留量	≤0.30 μmol/L
无菌试验	无细菌生长



# 亚甲蓝治疗剂量的比较分析

- 病人接受剂量比较（假设病人**50kg**体重，输**1000mL**血液）
  - 治疗高铁血红蛋白血症和甲状腺染色时：**50~250 mg**
  - 病毒灭活血浆（滤除前）：**0.38mg**，为治疗剂量的**1/132~1/658**
  - 病毒灭活血浆（滤除后）：**0.096mg**，为治疗剂量的**1/521~1/2604**
- 接受药物浓度的比较（假设同上，并假设**50kg**体重病人全身血液总量为**4L**）
  - 治疗高铁血红蛋白血症和甲状腺染色时：**50~250 mg/50kg=50~250mg/4000mL=12.5~62.5mg/1000mL**
  - 病毒灭活血浆（滤除前）：**0.38mg/1000mL**，为治疗浓度的**1/33~1/164**
  - 病毒灭活血浆（滤除后）：**0.096mg/1000mL**，为治疗浓度的**1/130~1/651**



# 亚甲兰的基因安全性

- **1995年Wagner**等人报道在**MB**浓度为**30ug/ml**培养细胞时，对鼠淋巴细胞出现遗传毒性，**MB**对哺乳动物实验不会引起基因突变
- **2000年上海市血液中心**设计超大剂量毒性试验，**MB**浓度为**62ug/KgBW**（对应人有相当约**10L**血浆所含**MB**）不但做了人红细胞嗜多染红细胞微核试验，还做了生殖毒性试验。同时用更敏感的中国仓鼠肺细胞替代小鼠骨髓瘤细胞
- 实验结果
  - **MB-P**人红细胞及血浆小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验阴性，无致突变作用
  - **MB-P**人红细胞及血浆孕鼠致畸敏感期毒性试验阴性，对胚胎无致畸影响，无生殖毒性反应
  - **MB-P**人红细胞及血浆**CHL**细胞染色体畸变试验阴性，无致细胞染色体畸变作用



# 去白细胞输血过滤器 在血浆MB-P灭活中的应用

- 去除血浆中残留的亚甲蓝
  - 滤后残留量少于**15%**，相当于临床成人输注量的**1/4000**
- 去除血浆中的白细胞
  - 血浆中白细胞的含量去除率大于**99.7%**



## 第一代病毒灭活用亚甲蓝剂型

- 液体亚甲蓝的不稳定性，保存期仅为一个月
- 不利于采血-血液成分分离-血浆病毒灭活一体化的采血多联袋的开发和生产
- 液体亚甲蓝以1:10的比例稀释于血浆，降低了血浆的浓度
- 液体亚甲蓝剂型客观上限制了血浆病毒灭活技术的推广和应用。





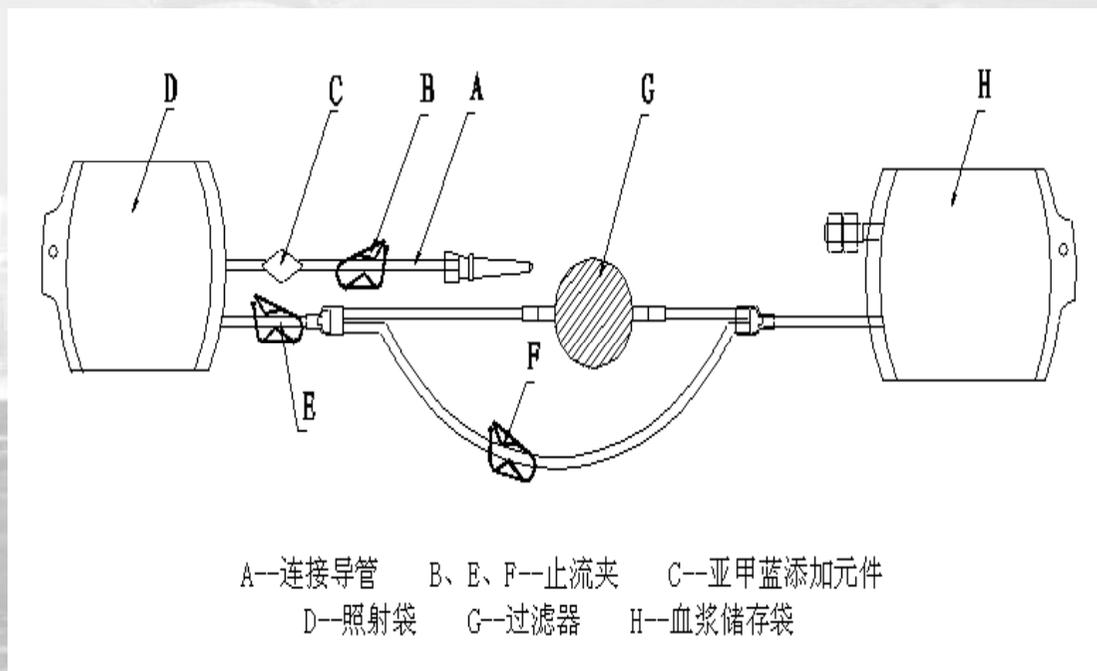
## 第二代病毒灭活用亚甲蓝剂型

- 以固体亚甲蓝替代液体亚甲蓝, 弥补缺陷
- 完成光敏剂, 光照袋, 亚甲蓝滤器以及血浆保存袋一体化系统
- 国内外首创
- 缺点: 膜吸附剂释放不稳定





## 第三代病毒灭活用亚甲蓝剂型



亚甲蓝片剂，类似泡腾片的崩解剂，能迅速完全释放



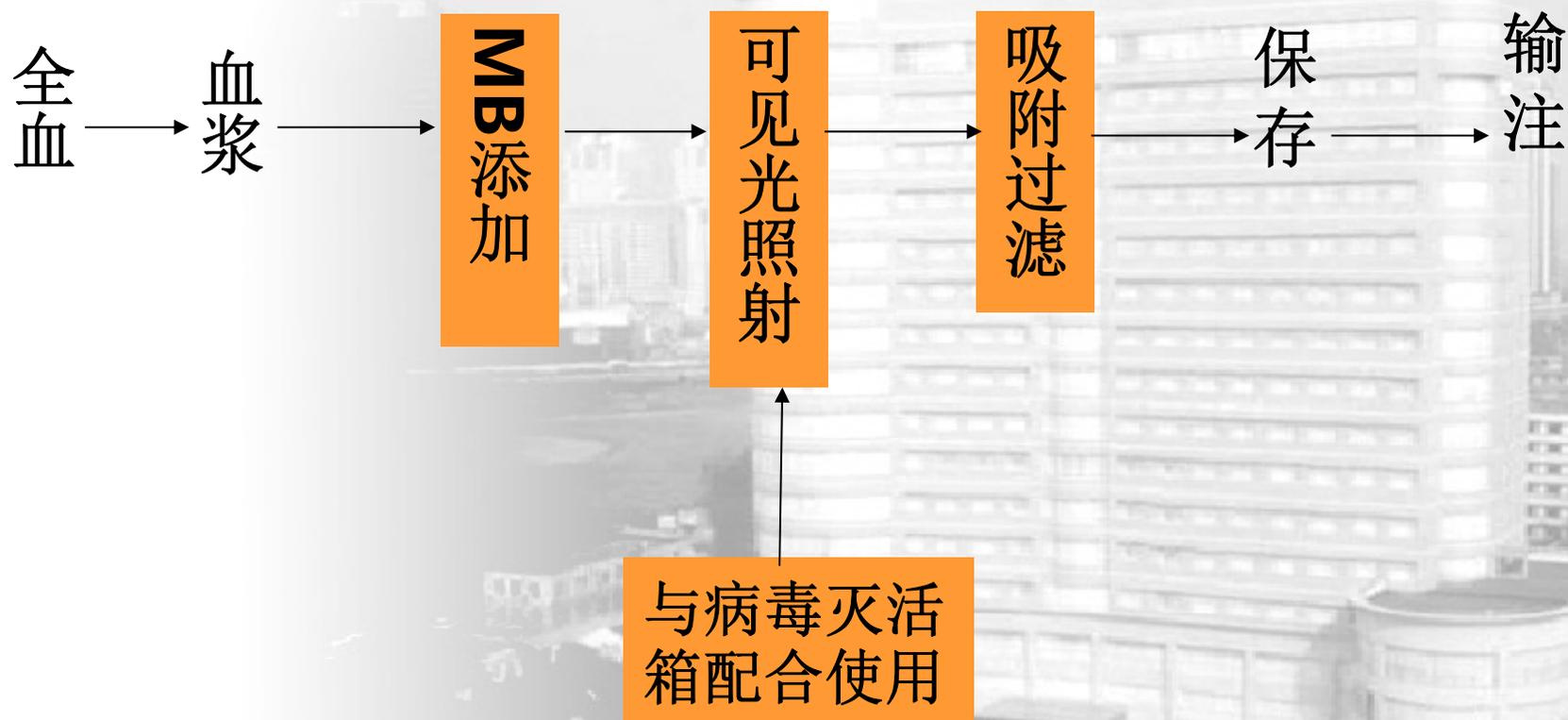
# 医用病毒灭活照射箱



照射剂量	30,000~38,000lx
照射时间	30~35min
照射温度	5±3℃
摆动频率	60±2次/分



# MB-P血浆制备的流程



# 穿刺

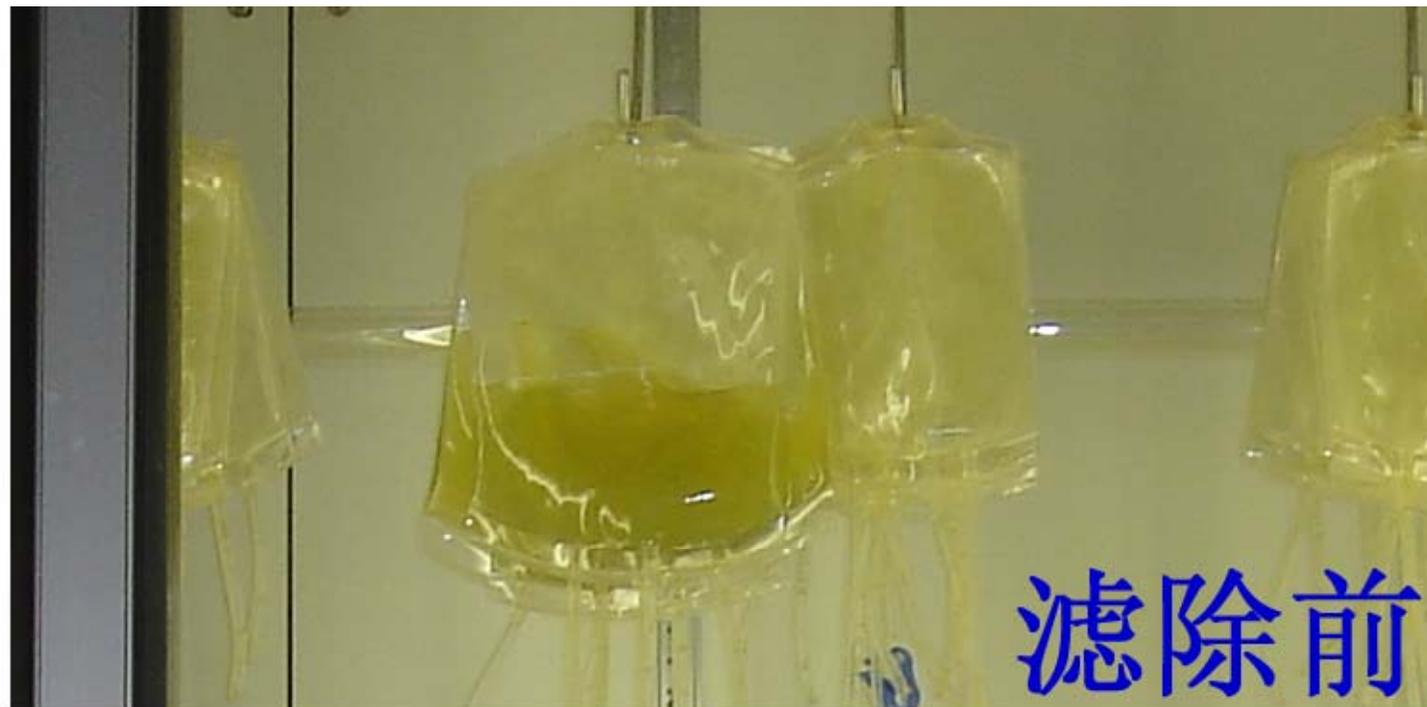


添加MB



光照







感谢：  
黄宇闻，研究员  
张博，博士  
莫琴，副主任技师  
伍晓菲，副主任技师  
贾尧，助理研究员

谢谢聆听！

