短波紫外线与交联淀粉碘消毒血浆的实验研究

熊鸿燕* 李 莉 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室) 重庆, 400038
张廷惠 (重庆药剂学校卫生检验学教研室) 重庆, 400030
李成文 (军事医学科学院流行病微生物研究所) 北京, 100071

提 要 目的: 建立一种用短波紫外线(UVC)与交联淀粉碘(CSI)联用的血浆消毒实用模型。方法: 设计并制作了血浆消毒模型。用辛德比斯病毒(SV)作为试验病毒,通过细胞感染试验测定模型的灭病毒效果。采用免疫化学技术观察被处理血浆中 IgG的活性变化。结果: 含病毒血浆首先经剂量为 9 860 J/m^{2}的 UVC照射后,再流经 CSI柱时,血浆在 CSI柱内的滞留时间越长,其病毒的滴度越低,在滞留时间为 120 min时,血浆中的病毒灭活达 6.78个对数级。而此时,血浆中 IgG的抗原和抗体活性无明显变化。结论: UVC与 CSI联用技术的血浆消毒模型能有效灭活 SV病毒,不损害血浆中抗体成分的活性。

关键词 短波紫外线;碘复合物;病毒的灭活;血浆
中图法分类号 Q55

血液及其制品的病毒污染问题已得到广泛关注,寻找能有效灭活其病毒的方法是一项迫切的任务。短波紫外线(UVC)和碘复合物(IC)对脂质包膜病毒和非脂质包膜病毒均有良好的灭活作用[1~3]。我们的研究也发现,UVC和 IC的灭细菌和灭病毒作用受蛋白成分的影响很小,当血浆经一定剂量的 UVC照射后再经 IC作用时,其中病毒的灭活可以达到最好的效果,而血浆中多数成分维持在正常范围[4~6]。根据这些结果,我们制作了 UVC与交联淀粉碘(CSI)联用消毒血浆的实用模型并测定和观察了其灭病毒效果和被处理血浆中 IgG的活性变化。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和病毒

BHK-13细胞(中国仓鼠肾细胞)和 SV(辛德比斯病毒)均由中国医学科学院病毒研究所引进。

1.2 主要器材

UVR-254型紫外线强度测定仪(日本, TOPCON公司产)
短波无臭氧紫外线灯(北京四环卫生药械厂产)
340-2型全自动酶联仪(日本, Flow Labs公司产)

1.3 主要试剂

CSI(本室制备)
人新鲜血浆(第三军医大学附属西南医院输血科和解放军输血中心提供)
麻疹病毒抗体、风疹病毒抗体、腮腺炎病毒抗体等酶联免疫试剂盒(德国 Human生物工程有限公司产品)
HBV抗体(IgG)酶联免疫试剂盒(上海科华实业生物技术有限公司产品)
羊抗人 IgG血清(军事医学科学院流行病微生物研究所产品)

1.4 细胞培养和病毒滴定

1.4.1 BHK-13细胞的培养 BHK-13细胞采用 DMEM培养液进行培养。培养箱中 CO_2浓度为 5%。正常细胞经 0.25%胰蛋白酶消化后接种传代。24~28 h后可形成单层细胞。

1.4.2 SV的增殖与滴定 ①增殖: 将 SV原液用 D-Hank液 10倍稀释。取 2 ml稀释液加入长满单层 HBK-13细胞的 40 cm^{2}细胞培养瓶内,摇匀, 37℃下吸附 2 h,弃上清液,再加入 10 ml培养液继续培养。当细胞病变效应(CPE)达卅以上时收集细胞悬液,存放于 -70℃。②病毒的浓缩和滴定: 收集的病变细胞悬液在 -20℃反复冻融 3次, -4℃下离心(5 000 r/min, 10 min)。将上清液用聚乙二醇(PEG)粉包埋,4 h后用 1 ml离心管分装浓缩的病毒悬液,置 -70℃冻存。滴定时,采用组织培养半数感染量法(Tissue culture infection dose, $TCID_{50}$),根据 Reed-Muench方法计算病毒的 $TCID_{50}$[7]。

1.5 血浆中病毒的模拟实用灭活试验

我们设计并由北京颐和园玻璃仪器厂制做了 UVC与 CSI联用的血浆消毒器,见图 1。紫外线灯灯筒内的 UVC辐照度值为 5 478 μW/cm^2。石英玻璃管管径为 0.5 mm,在石英玻璃螺旋管中心,用冰块控制温度于 18~20℃。

* 熊鸿燕,女,36岁,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

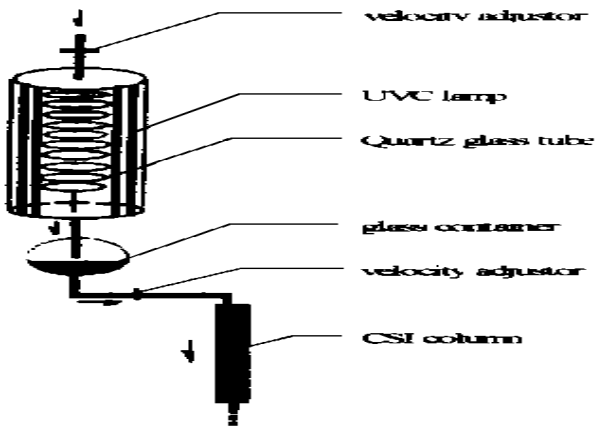


图 1 血浆消毒器示意图

Fig 1 The diagram of the device for disinfection of plasma

将 30 ml含病毒血浆以一定速度通过 UVC照射的石英玻璃螺旋管,再以不同速度通过装有 3.0 g CSI的玻璃柱 (直径 1.2 cm,高 7.0 cm)。将血浆通过石英玻璃螺旋管的速度控制在以管内某点在 3 min内通过其全程的恒定速度为准,使其被照射剂量为 9 860 J/m^2。控制血浆流出 CSI柱的速度,使其在柱内滞留时间分别为 15、20、30、60、120 min。处理前后分别收集血浆,作病毒含量测定。试验重复 3次。

结果判断: 含病毒血浆吸附细胞后,连续 7 d无 CPE者为阴性。对可疑细胞进行传代,再连续培养 7 d,无 CPE者为阴性。按 $TCID_{50}$方法计算病毒减少量对数值。

病毒减少量对数值= 对照组病毒含量对数值 - 试验组病毒含量对数值。

1.6 血浆中 IgG的变化

1.6.1 IgG微量免疫电泳分析 将经 UVC与 CSI联用法消毒的血浆作为试验样品,以未经消毒处理,在室温下放置 120 min的正常血浆作为对照样品。按微量免疫电泳方法进行实验。观察抗原抗体复合物沉淀带,以判断血浆中 IgG的聚散变化。

1.6.2 IgG火箭电泳分析 将经 UVC与 CSI联用法消毒的血浆作为试验样品,以未经消毒处理,在室温下放置 120 min的正常血浆及其稀释 2、4、8和 16倍的血浆液为对照样品。按火箭电泳方法进行实验。观察火箭沉淀峰的面积,判断血浆中 IgG的抗原活性变化。

1.6.3 ELISA测定血浆中多种 IgG抗体活性 将经 UVC与 CSI联用法消毒的血浆作为试验样品,以未经消毒处理,在室温下放置 120 min的正常血浆作为对照样品。按试剂盒说明书测定血浆中麻疹病毒、风疹病毒、腮腺炎病毒和乙型肝炎病毒等 4种 IgG抗体活性。

样品均平行测定 3个。试验同时设空白对照 2个,阴性对照 2个、阳性对照 2个。

2 结果

2.1 血浆消毒器对血浆中病毒的灭活观察

将血浆消毒器用于血浆中 SV的灭活时,30 ml含病毒血浆首先经剂量为 9 860 J/m^{2}的 UVC照射后,再流过 CSI柱。从试验结果可见,在经 CSI柱的滞留时间分别为 15、20、30、60、120 min时,血浆中病毒分别减少 4.22、5.11、5.00、6.34、6.78个对数级,即随着流速的降低 (血浆在 CSI柱内滞留时间的增长),病毒灭活程度明显增加,在滞留时间为 120 min时,血浆中的病毒基本能完全灭活 (灭活病毒达 6.78个对数级)。

2.2 血浆中 IgG的抗原活性和聚散程度分析

从免疫火箭电泳和免疫微量电泳的观察结果可见,在有效灭活病毒处理的血浆中,与正常对照的血浆相比,IgG抗原抗体沉淀带的形态和面积基本相同,说明其抗原活性分子的含量和聚散程度无明显改变,见图 2、3。

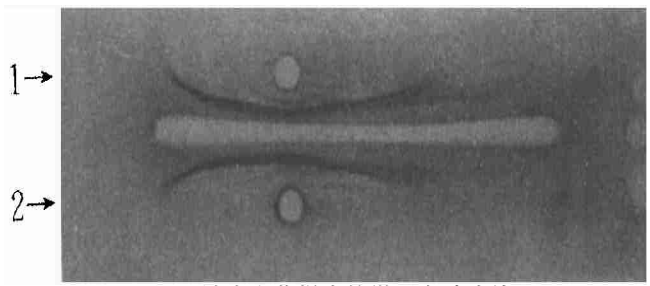


图 2 消毒血浆样本的微量免疫电泳

Fig 2 The microimmunoelectrophoresis of plasma

1: Disinfected plasma; 2 Normal plasma

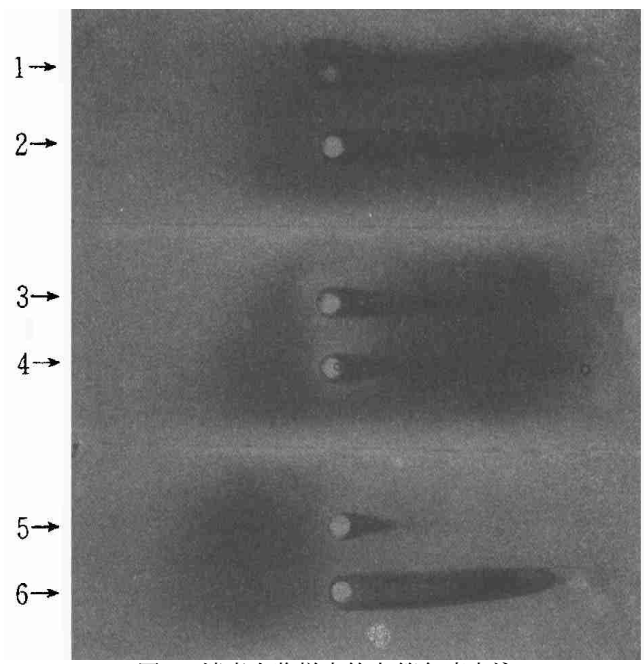


图 3 消毒血浆样本的火箭免疫电泳

Fig 3 The rocked immunoelectrophoresis

1: Normal plasma; 2 Normal plasma (1∶2 diluted); 3: Normal plasma (1∶4 diluted); 4: Normal plasma (1∶8 diluted); 5 Normal plasma (1∶16 diluted); 6: Disinfected plasma

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 血浆中 IgG抗体活性的变化分析

根据 ELISA试验分析,消毒血浆中抗-HBsAg-IgG抗麻疹病毒-IgG抗-风疹病毒-IgG和抗腮腺炎病毒-IgG的滴度与正常对照相比无下降,见表 1 相反,除抗-HBsAg-IgG外,其它抗体均有一定的增加。

表 1 血浆中各种 IgG抗体活性的变化

Tab 1 The changes of activities of IgG in plasma

Antigen	Tisters of antigenic activities	
	Control	Test
Anti-HBV-IgG	1∶256	1∶256
Anti-Measles virus-IgG	1∶156	1∶512
Anti-Rubella virus-IgG	1∶64	1∶128
Anti-Mumps virus-IgG	1∶64	1∶128

3 讨论

3.1 UVC与 CSI的灭病毒机制

UVC照射能显著提高化学因子对细菌的攻击力,因为射线使菌膜的通透性破坏,减弱了细菌对环境中化学因子的抵抗力[8]。因此,UVC与 CSI联用对血浆中病毒灭活的增效作用机制可能是病毒在经 UVC的照射后,由于核酸的破坏,一部分病毒感染活性消除。此时,残存抗性较强病毒的包膜和核酸均亦有一定程度损伤,在进一步经 CSI的表面时,由于电荷移动络合物的氧化作用,病毒活性进一步降低,以至消除。

3.2 血浆成分的变化

消毒处理往往使血浆中蛋白质含量下降、蛋白分子多聚体形成、蛋白分子降解、凝血因子活性降低、补体活性降低、IgG(IgM)活性降低,以及带来残留物质的毒性作用和新抗原产生等问题。

我们的研究结果显示,被消毒血浆中的蛋白含量、蛋白酶(除乳酸脱氢酶外)的活性[4]、免疫球蛋白的抗原和抗体活性等均无明显的变化,相反,有的 IgG抗体的滴度与正常对照相比有一定的增加(这可能是由于受理化因子处理后 IgG分子结构的变化增加了其抗体活性)。此说明 UVC和 CSI的联用在有效灭活病毒的同时能保持大部分血浆中蛋白质的含量和功能,此方法对血浆、白蛋白、球蛋白等血浆制品的消毒是有适用性的。

血液成分中抗力最弱的是凝血因子,因此,消毒研究中往往选其作为判断血液成分损害情况的指标之一。FⅧ在血液的凝集过程中起着非常重要的作用。它由两部分组成,即 FⅧ∶C主导的凝血功能和 FⅧ R∶Ag主导的血小板粘附功能,其中,FⅧ R∶Ag蛋白还是 FⅧ∶C蛋白的载体。我们的研究还证明联用消毒法对 FⅧ∶Ag的功能保存较好,但能使 FⅧ∶C活性完全破坏(另文报道)。因此,是否将此方法用于凝血因子制剂的消毒必须慎重考虑,有必要在对其它凝血因子的功能进行探讨后作出结论。

3.3 有待研究的问题

近年来,HAV和 HPV在血液制品中的检出以及所造成的流行已引起人们广泛重视[9~13]。HAV和 HPV均为非脂质包膜病毒,其蛋白包膜具有较高抗物理、化学因子作用,增加了消毒难度,目前还无有效的灭活方法。迅速建立有效灭活血液制品中脂质包膜病毒、非脂质包膜病毒和耐热病毒的方法是预防血液制品引起感染所亟待解决的问题。使用 UVC与 CSI联用消毒法有望为灭活血浆中非脂质包膜病毒打开一条通路。惜因时间限制,本课题尚未能进行对非脂质包膜病毒杀灭效果的研究。

UVC和 CSI的来源和制备较为方便,将其联用于血浆中病毒灭活,有较好的实用价值。为进一步将 UVC与 CSI应用于实际的血浆和血浆制品消毒中,还必须进行更深入的系列研究,如 CSI吸附碘的稳定性,UVC与 CSI对血液中非脂质包膜病毒灭活的作用、消毒后血浆的毒性和免疫原性作用,降低对血浆中抗力较弱蛋白质的损害,消毒血浆的保存时间及其保存后质量问题等均有待进一步得到解决。

参考文献

1 Highsmith F A, Xue H, Caple M, *et al*. Viral inactivation of vesicular stomatitis virus in normal human serum by cross-linked polyvinylpyrrolidone. J Infect Dis, 1993, 167(5): 1027

2 Hart H, Reid K, Hart W. Inactivation of viruses during ultraviolet light treatment of human intravenous immunoglobulin and albumin. Vox Sang, 1993, 64(2): 82

3 Highsmith F A, Xue H, Caple M, *et al*. Inactivation of lipid-enveloped and non-lipid-enveloped model viruses in normal human plasma by cross-linked starchiodine. Tnans-fusion, 1994, 34(4): 322

4 熊鸿燕,刘育京,涂　瀛.短波紫外线与交联淀粉碘联用法对血浆中病毒灭活的研究.中国消毒学杂志, 1998, 15(3): 134

5 熊鸿燕,张　凌,李　莉,等. DHBV的检测及雏鸭感染试验的探讨.第三军医大学学报, 1997, 19(6): 550

6 李　莉,熊鸿燕.有机物对碘复合物灭病毒效果的影响研究.中国公共卫生学杂志, 1997, (增刊): 157

7 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术.北京:科学出版社, 1990. 1304~1306

8 熊鸿燕,涂　瀛.紫外线对大肠杆菌杀灭机理的初步研究.中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

国消毒学杂志, 1991, 8(2): 76
9 Lawlor E, Graham S, Davidson F, *et al*. Hepatitis A transmission by Factor Ⅸ concentrates. Vox Sang, 1996, 71(2): 126
10 Prowse C, Follett E, Prince A. Hepatitis A virus transmission by blood product. Vox Sang, 1994, 72(Suppl): 1
11 Prowse C, Ludlam C S, Yap P L. Human parvovirus B19 and blood product. Vox Sang, 1997, 72(1): 1
12 Futo F, Saag K G, Scharosch L L, *et al*. Parvovirus B19 specific DNA in bone marrow from B19. J Infect Dis, 1993, 167(5): 1255
13 Ben-Hur E and Horowitz B. Advanced in photochemical approaches for blood sterilization. Photochem Photobiol, 1995, 62(3): 383

(收稿: 1998-10-06;修回: 1999-02-20)
(编辑 汪勤俭)

An experimental study of plasma disinfection with short wave ultraviolet rays and cross-linked starch iodine

Xiong Hongyan, Zhang Tinghui, Li Chengwen, Li Li (Department of Epidemiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To construct an effective and practical disinfector for plasma disinfection with short wave ultraviolet rays (UVC) and cross-linked starch iodine (CSI). Methods: A disinfector was designed and constructed. Sindbis virus (SV) was used to infect the blood cells. The infected plasma was treated with UVC and CSI. In order to determine the efficacy of disinfection and the viability of the virus, the changes of the IgG activity in the treated plasma was measured with immunochemistry technique. Results: After the infected plasma was irradiated with 9 860 J/m^2 UVC, the plasma flowed through a column of CSI. The longer the infected plasma stayed in the CSI column, the lower the titration concentration of SV in the plasma. When the infected plasma stayed in the CSI column for 120 min, the viability of SV was reduced to a degree of log 6.78. Simultaneously, no significant change of the molecular integrity and activity of IgG was found. Conclusion: UVC and CSI could effectively inactivation SV without affecting the antibody activity in the treated plasma.

Key words UVC; iodine complex; inactivation of virus; plasma

(上接 580页)

目前国内高压氧治疗小儿外伤性脑梗塞的报道极少[3],文献报道结果与作者的观察结果表明,高压氧对促进本病的早日康复具有独到之处,表现在两个方面:① 缩短病程,本组 4例均在 5周内恢复健康,最快 2周,而既往报道[1,2]单纯药物治疗,痊愈一般需 4周到 6月;② 恢复彻底,后遗症发生率低,本组 4例无 1例残留后遗症,既往单纯药物治疗时,少数病人遗留神经损害表现。高压氧治疗机制为:提高血氧含量与氧张力;增加血氧弥散距离;刺激病灶区域内毛细血管新生,促进侧支循环建立;减轻脑水肿,有利于改善局部缺氧状态,使濒死的脑细胞重新恢复正常功能。

采用高压氧治疗时,应注意以下问题:① 必须使患儿配合治疗,尽量采用纯氧舱、婴儿氧箱,只具备多人舱、面罩吸氧条件时,应予主动供氧;进舱前根据患儿情况适当使用镇静剂。② 文献报道高压氧可使体内自由基增多,导致神经元等结构损伤,损伤程度与高压氧压力、吸氧时间、疗程呈正相关[4,5],缺乏维生素 E饮食饲养的大鼠经高压氧处置后,视网膜电流图 a波、b波消失,中心视网膜的外核层厚度显著变薄[6]。因此,应根据患儿年龄选择适宜的压力、吸氧时间与疗程,高压氧治疗期间适当使用抗氧化剂(维生素 E、C等)。

关键词 高压氧;小儿外伤;脑梗塞
中图法分类号 R726.5

参考文献

1 杨 波,黄金钟,骆良钦,等.小儿外伤性基底节区损害的诊治.中华神经外科杂志, 1994, 10(2): 106
2 樊金陵,郭建军,马东周.外伤后基底节区腔隙梗塞 21例临床分析.中华神经外科杂志, 1993, 9(4): 200
3 於淑英,陈学新,郝鸣政.小儿脑血管梗塞性病变的高压氧治疗.高压氧医学杂志, 1994, 3(1): 45
4 葛 环,高春锦,杨捷云,等.高压氧对正常大鼠神经元超微结构的影响.高压氧医学杂志, 1995, 4(2): 90
5 高春锦,杨捷云 主编.实用高压氧医学.北京: 学苑出版社, 1997. 50~66
6 Hollis-A L, Butcher W I, Davis H, *et al*. Structural alternations in retinal tissues from rats defecient in vitamin E and selenium and treated with hyperbaric oxygen. Exp Eye Res, 1992, 54(5): 671

(收稿: 1998-12-16;修回: 1999-05-25)
(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net