

血液制品中病毒检测控制与风险管理

付瑞,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所,北京 102629)

【摘要】 20世纪80年代以来,发生多起经血液传播的病毒感染,血液制品病毒安全性倍受关注。目前我国已发布多部法规、条例以及指导原则对血液制品病毒安全性进行严格管理。本文分析了我国管理法规中关于病毒安全管理的相关要求,对血浆及其制品的病毒检测方法,生产工艺中病毒灭活/去除的相关方法及其验证进行了阐述,旨在推动血液制品中病毒风险控制与管理水平的提高及血液制品的合理应用。

【关键词】 血液制品;病毒检测;病毒灭活/去除;病毒安全性

【中图分类号】 R457;R55

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-3384(2020)01-0007-04

Doi: 10.3969/j.issn.1672-3384.2020.01.002

Virus detection control and risk management on blood products

FU Rui, YUE Bing-fei*

(Institute for Laboratory Animal Resource, National Institutes For Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

血液制品(Blood Products)是指源自人类血液或血浆的治疗产品,如人血白蛋白、人免疫球蛋白、人凝血因子等。《中华人民共和国药典》(2015年版)(以下简称《中国药典》2015版)三部中共收录18个品种^[1]。血液是人类赖以生存的命脉,血液与血液制品具有医疗产品和药品的双重特性,具有其他药物无法比拟和替代的优点^[2]。但近年来,血液制品时有病毒污染的情况出现。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 $1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ ^[3]。但是近年来的研究却表明,凝血因子、纤维蛋白原和有机溶剂/去污剂处理法(S/D)处理的血浆类制品存在传播人细小病毒B19的风险,被污染的浆池中可检出高达 1×10^8 IU/mL的B19 DNA^[4]。B19病毒通常为隐性感染,但可导致免疫功能低下的患者或胎儿发生严重贫血。为此,本文对我国血液制品法规中有关病毒的规定,血浆及其制品的病毒检测以及生产工艺的病毒灭活/去除工艺等几个方面分别进行分析和阐述,以期对病毒检测方法的优化和血液制品病毒安全性的提高提供借鉴和指导。

1 国内血液制品管理相关法规

血液制品是高风险管理产品,为了保障血液制品的质量,规范血液制品的管理,我国相继发布了多部相关法规。一方面,国务院于1996年发布了《血液制品管理条例》,并于2016年进行了部分修改。此条例对血浆的采集、供应和血液制品的生产经营活动管理进行了规范。条例中规定一个采血浆区域只能设置一个单采血浆站,单采血浆站必须对供血浆者进行健康检查,单采血浆站只能向一个血液制品生产单位供应原料血浆。对血液制品生产经营单位,条例中还规定血液制品生产单位不得向无《单采血浆许可证》的单采血浆站或者未与其签订质量责任书的单采血浆站及其他任何单位收集原料血浆。在原料血浆投料生产前,必须对每一人份血浆进行全面复检,并作检测记录。原料血浆经复检不合格的不得投料生产^[5]。

另一方面,中华人民共和国卫生部于2007年发布了《单采血浆站管理办法》,该管理办法对单采血浆站的设置审批、执业、监督管理和相关处罚进行了详

作者简介:付瑞,男,硕士研究生,副研究员;研究方向:免疫学;E-mail: furui78@nifdc.org.cn

*通信作者:岳秉飞,男,博士研究生,研究员;研究方向:动物学;E-mail: y6784@126.com

细的规定。2010年,中华人民共和国卫生部还颁发了《药品生产质量管理规范(2010年修订)》(中华人民共和国卫生部令第79号),并制定了血液制品附录,对血液制品生产包括从原料血浆接收、入库贮存、复检、血浆分离、血液制品制备、检定到成品入库的全过程进行了详细规定^[6]。除此之外,国家食品药品监督管理总局于2017年颁布了《生物制品批签发管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第39号),办法中规定血液制品及用于血源筛查的体外诊断试剂在上市前必须经过批签发^[7]。

2 血浆及其制品的病毒检测

《中国药典》2015版三部通则“血液制品生产用人血浆”和血液制品相关各论中对血浆及血液制品的检测进行了详细规定^[1]。

2.1 血浆中病毒的检测

“血液制品生产用人血浆”通则中分别规定了供血浆者、单人份血浆和合并血浆中需要对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒抗体(HCV抗体)、人类免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2抗体)或者乙型肝炎病毒(HBV-DNA)、丙型肝炎病毒(HCV-RNA)和I型人类免疫缺陷病毒(HIV-1-RNA)的核酸进行检测,并对病毒检测方法进行了规定,详见表1。

表1 不同样本中病毒检测项目及方法

检测样本	检测项目	检测方法
供者血浆	HBsAg	酶联免疫吸附试验
	HCV抗体	
	HIV-1和HIV-2抗体	
单人份血浆	HBsAg/HBV-DNA	酶联免疫吸附试验/ 核酸检测技术
	HIV-1和HIV-2抗体/ HIV-1-RNA	
	HCV抗体/HCV-RNA	
	HIV-1和HIV-2抗体	
合并血浆	HBsAg	酶联免疫吸附试验
	乙型肝炎病毒表面抗体	
	HCV抗体	
	HIV-1和HIV-2抗体	

在该通则中,同时对血浆的采集,采集后血浆的贮藏、血浆的运输以及特异性免疫血浆制备及其供血浆者免疫做出了要求。

2.2 血液制品中病毒的检测

《中国药典》2015版三部中共收录了人血白蛋白、人免疫球蛋白、人纤维蛋白原、人凝血因子、人凝血酶原以及特异性免疫血液制品等18个品种血液制品。在相关各论中分别规定了需要检测的病毒,详见表2。

表2 不同血液制品需要检测的病毒

血液制品	检测阶段	检测病毒
(冻干)人血白蛋白	成品	HBsAg
人凝血因子Ⅷ	成品	HBsAg
人纤维蛋白原	成品	HBsAg
人纤维蛋白粘合剂	成品	HBsAg
人凝血酶原复合物	成品	HBsAg

从表中可以看出,目前药典中列出的血液制品大部分仅在成品检验阶段对HBsAg进行检测。而人免疫球蛋白类制品(包括特异性免疫球蛋白类制品)由于其特殊性,仅在原料阶段对血浆进行相应病毒检测。另外,由于检测试剂的限制,无论是血浆的检测还是血液制品成品的检测,大多采用酶联免疫吸附试验方法检测抗体,而少有采用灵敏度更高,检出时限更快的核酸检测技术(nucleic acid testing, NAT)。

3 病毒灭活/去除工艺验证

为了提高血液制品的安全性,《中国药典》2015版三部中收录的18种制品中,均要求在生产过程中有病毒灭活和去除工艺,为规范该工艺,国家药品监督管理局于2002年发布了《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》。该指导原则从不同制品去除/灭活病毒方法的选择、常用的去除/灭活病毒方法评价、去除/灭活病毒的方法验证等5个方面进行了规范^[8]。指导原则中规定生产工艺要具有一定的去除/灭活部分病毒能力,生产过程中应有特定的去除/灭活病毒方法。

目前,血液制品中常用的灭活/去除病毒方法包括乙醇沉淀、巴氏消毒法、干热法、有机溶剂/去污剂处理法、膜过滤法、低pH孵放法等物理化学方法,分别针对不同的制品,各有其优缺点,详见表3。其中,乙醇沉淀法在人血白蛋白和免疫球蛋白类制品生产过程中有去除病毒的作用。由于乙醇在室温时对病

毒的灭活效果更好,而血液制品的生产大多要求低温以保证制品的活性,因此乙醇沉淀步骤主要是通过沉淀分离,获得不同成分的沉淀物质来达到去除病毒的效果。

而巴氏消毒法 60 ℃水浴 10 h,经过多年的应用,已被证明可有效灭活有囊膜病毒和部分无囊膜病毒,其病毒灭活条件已很完善,但该方法要求定期对所用设施进行验证,并且样品的浓度、灭活温度和时间都对灭活效果有影响,需在生产中进行控制。

干热灭活法可以灭活 HBV、HCV、HIV 和 HAV 等病毒。该方法将制品冻干后 80 ℃加热 72 h,由于冻干后制品的水分含量、成分(冻干保护剂、糖、氨基酸等)均对病毒灭活的效果有很大的影响,同时灭活设备的状态也会影响灭活的效果,因此应对该方法的有效性进行验证,并定期对设备进行验证。

S/D 法一般采用 N-丁基三磷酸盐(TNBP)与 Triton X-100 或 Tween 80 配合使用,该方法可有效灭活有囊膜病毒,对无囊膜病毒没有很好的灭活效果。该方法对制品的浓度、处理温度和时间较为敏感,同时在后续的生产工艺中应充分去除有机溶剂残留。

膜过滤方法采用不同孔径大小的膜,通过物理方法去除病毒,在生产过程中常使用 35 ~ 50 nm 孔径的膜去除病毒,随着制品生产过程中纯化水平的提高,目前 20 nm 孔径的膜也常有应用。该方法可去除大部分病毒,尤其对 B19 病毒可有效去除,但由于过滤膜的载量对制品的浓度、纯度、离子强度等较为敏感,

而且所有除病毒过滤膜均为一次性使用,成本较高,因此目前在国内的应用还不广泛。

低 pH 孵放法与 S/D 法类似,可有效灭活大多数无囊膜病毒,有文献表明该方法也可以灭活 B19 病毒^[9]。但该方法对产品的浓度、处理的温度敏感,在血液制品生产中处理时间较长(一般为 21 d)。

随着技术的进步,一些新的灭活病毒方法也在血液制品生产中有所应用,例如采用补骨脂素 S-59 联合使用 A 波段紫外线(UVA)处理,可灭活血浆中的病毒;254 nm 波长紫外照射在人血白蛋白和人免疫球蛋白灭活病毒中的应用,以及 γ 射线辐照等方法^[10]。

一种有效且可靠的病毒灭活/去除方法一般要求经 1 次病毒灭活/去除处理后,降低病毒滴度 $\geq 4 \log$ 。在实际生产过程中需结合产品特性选取几种方法联合使用,以最大限度地确保血液制品的病毒安全性。

4 问题与展望

从 20 世纪 80 年代至今,国内外发生过多起因输血或使用血液制品而导致的病毒感染事件,尤其是血友病患者,由于输血和使用凝血因子类制品而导致感染 HIV 和 HCV 的病例时有发生^[11]。经过数十年的努力,目前我国发布了各种法规,通过多种控制措施确保血液制品的病毒安全性,包括原料血浆的控制、生产过程中的病毒灭活/去除处理、严格遵守药品生产质量管理规范等^[12]。另外,新修订 2019 年《药品管理

表 3 血液制品不同灭活/去除病毒方法特点

灭活/去除病毒方法	特点及局限性	血液制品
乙醇沉淀	室温条件下可灭活病毒;低温条件下有去除病毒作用	人血白蛋白、人免疫球蛋白
巴氏消毒法	可灭活大部分有囊膜病毒,对部分无囊膜病毒有效;制品的组成、稳定剂及其浓度的不同,均会对灭活病毒效果有一定的影响;设施必须进行验证	血浆、白蛋白、凝血因子、免疫球蛋白
干热灭活法	可有效灭活病毒;制品成分和水分含量对灭活效果影响较大;干热箱需定期验证	凝血因子制品
S/D 法	可有效灭活有囊膜病毒;S/D 的浓度变化和制品中颗粒物对灭活效果影响大;后期需去除试剂残留	凝血因子制品与抗凝血制剂
低 pH 孵放法	可有效灭活有囊膜病毒;灭活条件可能影响病毒灭活效果	人免疫球蛋白
膜过滤法	可有效去除各种病毒;不能单独使用,应与其他方法联合使用;过滤前及过滤后应测试滤膜的完整性	人免疫球蛋白

法》的发布与实施,加大了跟踪检查、飞行检查及日常监督检查力度,可及时发现企业存在的问题,防止药品质量安全事故的发生,保证药品安全有效。

但是,我国目前对临床用血和原料血浆的病毒安全性检验采用免疫学检验方法(酶联免疫吸附法),检测的是病毒抗原或抗体,窗口期较长。而NAT能够有效缩短检疫期。所以,加快推进血液制品生产用原料血浆的NAT检测,能够有效缩短检疫期,有利于提高血液制品的安全性^[13]。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》2015年版三部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:244-280.
- [2] 王卓,赵雄,章金刚.血液制品的现状与展望[J].生物工程学报,2011,27(5):730-746.
- [3] 王霞,潘彤,李红珠.血液制品病毒灭活系统应用的研究进展[J].国际检验医学杂志,2015,36(19):2872-2874.
- [4] EMA/CHMP/BWP/706271/2010, Guideline on plasma-derived medicinal products[S].2011:8.
- [5] 国务院.血液制品管理条例[EB/OL].(2005-08-01)[2019-09-02]. http://www.gov.cn/banshi/2005-08/01/content_19125.htm.
- [6] 中华人民共和国卫生部.单采血浆站管理办法[EB/OL].(2008-02-29)[2019-09-02]. http://www.gov.cn/zhengce/2008-02/29/content_2603091.htm.
- [7] 国家药品监督管理局.生物制品批签发管理办法[EB/OL].(2017-12-29)[2019-09-02]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2174/300708.html>.
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心.血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则[EB/OL].(2008-09-04)[2019-09-02]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=34>.
- [9] Baylis S A, Tuke P W, Miyagawa E, et al. Studies on the inactivation of human parvovirus 4[J]. Transfusion, 2013, 53(10): 2585-2592.
- [10] WHO Technical Report, Series No.924, Annex 4, Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products [S]. 2004:205-208.
- [11] National Hemophilia Foundation (NHF). History of Bleeding Disorders [EB/OL]. (2014-03-04) [2019-09-02]. <http://www.hemophilia.org/Bleeding-Disorders/History-of-Bleeding-Disorders>.
- [12] 马玉媛,赵雄,尹惠琼,等.血液制品病毒安全性控制措施研究进展[J].军事医学,2015,39(3):225-228.
- [13] 杨敬鹏,徐晓楠,王元.我国血液制品企业GMP检查缺陷分析及监管思路探索[J].中国药事,2019,33(6):605-608.

收稿日期:2019-11-15

本文编辑:蒋少薇