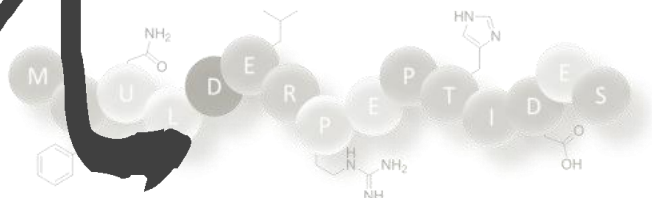


雙北



檢驗醫學雜誌

Greater Taipei Journal of Laboratory Medicine

刊

ISSN 2313-3015

台北市醫檢師公會 | 新北市醫檢師公會

雙北檢驗醫學雜誌

Greater Taipei Journal of Laboratory Medicine

宗旨

雙北檢驗醫學雜誌主要報導檢驗醫學相關的學術刊物,包含原著,綜說,臨床案例報告,檢驗新知,檢驗技術及實驗室管理等,提供檢驗醫學相關之學術交流平台

發行人 高全良 | 廖皓宏

主編 張錦標

副主編 劉兆偉 王敦仁

編輯委員 余芳蘭

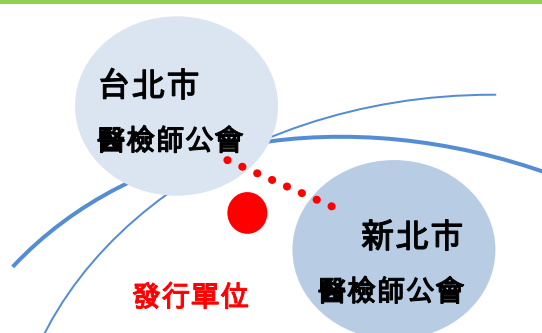
執行編輯 陳瑞川 林純娟 謝芷霖

編審委員

朱益民 呂旭峰 李詩益
林亮音 林淑華 施勇綸
胡忠怡 高全良 孫俊仁
徐慧貞 張志昇 張錦標
莊雅惠 彭成立 湯勝輝
黃仰仰 楊雅倩 鄧麗珍
鍾心怡

排版美編 黃舜煦 顏瓊姿 鄭詠慈

發行日期 2014 年 3 月 30 日



ISSN 2313-3015



97 年 6 月	創刊號	醫檢會刊	月刊
100 年 1 月	名稱改版	醫檢學術會刊	月刊
101 年 1 月	出刊改版	醫檢學術會刊	雙月刊
103 年 3 月	名稱改版	雙北檢驗醫學雜誌	雙月刊

聯絡處 台北市羅斯福路 2 段 70 號 6 樓之 2

聯絡電話 TEL:02-23944299/FAX:02-23944542

雜誌網址 <http://www.mt.org.tw/wholecountry/periodical.php>

聯絡方式 taipeimt@ms31.hinet.net

目 錄

醫檢學術專題

題目	第一作者	頁次
造成血小板輸注無效之原因與因應策略	白舜仲	4
案例報告：Pseudo-Infection of the Liver Capillariasis	邱琬玲	14
蔬果農藥殘留之檢驗	劉君豪	18

附錄

「雙北檢驗醫學雜誌」投稿須知	編輯部	21
----------------	-----	----

造成血小板輸注無效之原因與因應策略

白舜仲

醫療財團法人台灣血液基金會研究處

摘要

罹患血小板減少症的病人，常需要藉著血小板的輸注，以避免發生嚴重的出血。然而，在長期輸注血小板後，病人會發生血小板輸注無效(Platelet Transfusion Refractoriness; PTR)，使得體內血小板的數量，在輸注後無法達到預期。PTR 發生的原因相當複雜，主要可分為兩大類，第一類為免疫性因素(Alloimmunized PTR)，係由於病人過去懷孕、輸血或移植，經由 ABO 血型不合，或是人類白血球抗原(Human Leukocyte Antigen)及血小板特異性抗原(Human Platelet-specific Antigen)的刺激，所引起的同種異體免疫反應(Alloimmunization)，若病人體內產生與血小板反應的抗體，會破壞輸入體內的血小板，而造成 PTR 的發生。第二類為非免疫性因素(Non-alloimmunized PTR)，包括病人的疾病因素：如感染、急性出血、脾腫大、瀰漫性血管內凝固；藥物因素：如化學治療、抗生素和抗黴菌藥；血品因素：血小板收集及儲存品質等，均會造成 Non-alloimmunized PTR 的發生。臨床上，非免疫因素所造成的 PTR 約占三分之二，由臨床醫師診斷後，將非免疫因素排除後，便可解決 PTR 的發生。然而，因免疫因素所造成的 PTR，則需藉由實驗室診斷，並由血庫挑選合適的血小板供病患輸用，才能有效控制 PTR 的發生。本報告係針對血小板輸注無效可能之原因，及其因應策略提供綜合性說明。

關鍵詞：血小板輸注無效、人類白血球抗原、血小板特異性抗原、HLAMatchmaker

前言

罹患血液病或是血液腫瘤的病人，有時因接受藥物治療，特別是骨髓摧毁性療法，或是疾病本身的病因，會造成體內血小板數目不足，需要長期接受血小板的輸注，以預防或治療出血性的病症[1]。然而，這群需要長期血小板輸注的病人，在輸注許多捐血人的血小板後，常發生血小板輸注無效(Platelet Transfusion Refractoriness; PTR)，也就是輸注結束後體內血小板數目上升情況不如預期，這使病人發生出血不止而導致死亡機率升高。在照顧這群 PTR 的病人中，雖然已有明確的治療指引

[2-5]，但是在臨床實務以及血小板供應上，它還是有很多問題存在，因此，如何解決 PTR，仍是輸血醫學相當重要的課題。

PTR 的定義

PTR 可以簡單的被定義為，在血小板輸注後，體內血小板數目增加的量不如預期。在評估血小板輸注後的效果，可利用表一所列四種指標進行衡量，現行公認 PTR 認定標準為，若病人連續發生 2 次，在輸注 ABO 血型相容且儲存時間不超過 72 小時之新鮮血小板後，其輸血後 1 小時血小板計數增加校正指數(Corrected

通訊作者：白舜仲

連絡電話：02-23945437

e-mail: david@blood.org.tw

連絡地址：10066 台北市中正區南海路 3 號 3F

民國 104 年 1 月 14 日受理；民國 104 年 3 月 30 日受理刊登

Count Increment; 簡稱 CCI 值)少於 7.5/l, 或是輸血後 18 到 24 小時 CCI 值少於 4.5/l

表一、評估血小板輸注後體內血小板計數上升指標的計算公式

Formula	Mode of computation
Post-transfusion platelet increment (PPI)	Post-transfusion platelet count - pretransfusion platelet count
Corrected count increment (CCI)	$PPI(l) \times \text{body surface area (m}^2\text{)} / \text{platelets transfused (10}^{11}\text{)}$
Percentage platelet recovery (PPR)	$PPI(l) \times \text{total blood volume} \times 100\% / \text{platelets transfused (10}^{11}\text{)}$
Percentage platelet increment	$PPR/0.67$ (0.67 accounts for splenic pooling)

時，則判定病人發生 PTR[3]。

PTR 發生的原因

PTR 發生的原因相當複雜，主要可分為兩大類，第一類為免疫性因素(Allo-immunized PTR)，係由於病人過去懷孕、輸血或移植，經由 ABO 血型不合，或是人類白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen; HLA) 及血小板特異性抗原 (Human Platelet-specific Antigen; HPA) 的刺激，所引起的同種異體免疫反應 (Allo-immunization)，若病人體內產生與血小板反應的抗體，會破壞輸入體內的血小板，而造成 PTR 的發生 [6]。在 Alloimmunized PTR 發生原因中，有 70%-80% 病人是因產生 HLA 抗體所造成，特別是使用有白血球污染的血小板製品，引起 HLA alloimmunization 的發生 [7]。其次，HPA 抗體也會造成 2-17% Alloimmunized PTR，少部分由 ABO 血型不合所造成 [8,9]。第二類為非免疫性因素 (Non-alloimmunized PTR)，包括病人的疾病因素：如感染、急性出血、脾腫大、瀰漫性血管內凝固；藥物因素：如化學治療、抗生素和抗黴菌藥；血品因素：血小板收集及儲存品質等，均會造成非免疫性因素 PTR 的發生 [6,10]。

免疫性因素(Alloimmunized PTR)

Alloimmunized PTR 主要是因為血小板表面抗原，引起免疫反應產生抗體而發生 PTR。血小板表面抗原主要可分為兩大

群，一群為與其他血球共有的抗原，包括 ABH 及 HLA 抗原，另一類為血小板專有的特異性抗原，稱作 HPA 抗原。將分別介紹如下。

ABH 抗原也可以表現在血小板表面膜上 [11]，假如輸注 ABO 不相容血小板，大約有 25% 的血小板在輸血後立刻被清除，剩下的 ABO 不相容血小板可以躲過抗體的攻擊，還是可以在病人體內循環且存活一段時間，這與病人血清之 anti-A 或 anti-B 效價強度有關。有研究顯示，不同 ABO 血型的血小板中，以 A1 血型的血小板在輸注於 ABO 不相容病人後，其輸血後血小板恢復率較低，且血小板恢復率與病人體內產生的 ABH 抗體強度有直接的負相關 [12]。另一研究也顯示，病人輸注 ABO 不相容血小板後，病人體內 anti-A 或 anti-B 血清效價也會升高，印證了 anti-A 或 anti-B 效價強度會影響血小板輸注後的恢復率 [13]。不同 ABO 血型的血小板，其表面上的 ABH 抗原數量也不同，Laura 等人研究 166 位 A 型分離術捐血人，分析其血小板表面上 A 抗原含量的多寡，發現 A1 型捐血人，其血小板上面 A 抗原含量差異很大 (0%-87%)，而 A2 型捐血人的血小板 A 抗原含量相對較低 [14]，這對在選擇 ABO 相容血小板上面，若沒有 ABO-identical 血小板可以供應時，也可以選擇 A2 型血小板供應，但是一般捐血中心在建立捐血人血型系統時，比較少區分 A1 及 A2 型的結果，所以這個發現對實務上幫助並不大。

HLA 抗原可分為三類(HLA class I, II, III)，血小板可表現 HLA class I 抗原，也可從血漿中吸附 soluble HLA class I 抗原，使得血小板細胞表面上 HLA 抗原數量，比紅血球或顆粒球細胞上多出許多。由於 HLA 抗原性強，輸注 HLA 抗原不相合的血小板，發生同種異體免疫反應造成 PTR 的機會，就比紅血球的輸血要高出許多 [15]。HLA class I 抗原分子因基因座的不同，可產生 HLA-A，HLA-B 及 HLA-C 三種抗原分子，血小板上以 HLA-A 及 HLA-B 抗原量表現最多，HLA-C 抗原表現較少 [16]。雖然有文獻報告因輸注 HLA-C 抗原不相容血小板而造成 PTR 的個案 [17]，但是在臨床血小板輸注上，還是比較少注意 HLA-C 抗原的相容性，主要還是以 HLA-A 及 HLA-B 抗原相合的程度來決定。

HPA 抗原是分佈在血小板細胞膜上的醣蛋白 (Glycoprotein)，具有多態性，可因懷孕或是輸血引發異體免疫反應，造成新生兒血小板減少症 (Neonatal alloimmune thrombocytopenia; NAIT)，輸血後紫斑症 (Posttransfusion purpura; PTP)，或是血小板輸注無效 (Platelet transfusion refractoriness; PTR) 等病症 [18-20]。根據 2013 年 HPA 資料庫 (The Immuno Polymorphism Database, EMBL-EBI) 的統計，目前國際正式命名有 34 個 HPA 抗原 (HPA-1~ -28)，是經過確認具有抗原的特異性，其中 12 個抗原可被歸於六個遺傳系統 (Biallelic systems) [21]。由於 HPA 抗體的存在，對血小板減少症的發生，其嚴重性遠高於 HLA 抗體的作用，因此，HPA 也是血小板輸注時必須注意的問題之一。

非免疫性因素 (Non-alloimmunized PTR)

引起 Non-alloimmunized PTR 的原因，有敗血症、發燒、脾腫大、DIC (Disseminated Intravascular Coagulation)、出血及藥物引起的 PTR [6]。絕大部分 (72-88%) PTR 的發生，屬於

Non-alloimmunized PTR，另外還有血小板本身的品質，也會影響血小板輸注的效果。

血小板低下症與敗血症在 1960 年代就已經被證實有關聯性的存在 [22]，且發現病危時期的病人，血小板低下症發生與否，與病人的癒後有很關 [23]。敗血症與血小板低下症相關的作用基轉目前還不是很清楚，除了敗血症病人發生 DIC 時，可以解釋造成血小板低下原因之一，其他因素包括：敗血症病人產生血小板特異性抗原 GPIIb/IIIa 或是 GPIb/IX 的自體免疫抗體 (Autoantibody) [24]、敗血症會在骨髓地方引發血球吞噬作用 (Haematophagocytosis) [25]、病人本身血小板生產的減少 [26]、以及身體防禦作用使表皮細胞被活化造成血小板被侷限在某些組織中 [26]，這都是可能使血小板數量減少的原因。

發燒病人由於常伴隨感染或是藥物反應的發生，是否與血小板輸注後 CCI 值的減少有關，一直沒有定論 [27]。有研究觀察 HLA-alloimmunized 病人，在輸注 random donor 血小板時，病人是否發燒，會影響輸血後 CCI 值。然而，當這群病人若輸注 HLA 相合血小板時，發燒因素並不會影響 CCI 值 [28]。

根據 Slichter 等人的研究，脾腫大是影響輸血後 CCI 值最大的原因之一 [6]。脾臟會儲存大量的血小板，當脾臟腫大後，有更多血小板被侷限在脾臟裏，造成病人需要輸注更多的血小板。以放射線標示血小板的研究中，發現脾腫大的病人，在輸血後，有 85% 血小板在脾臟被破壞，而在脾臟正常的人，只有 61% 被破壞 [29]。

病人發生 DIC 時，由於大量生成 Thrombin 及 Fibrin，會堆積於小血管內，因而耗損大量的血液凝固因子，耗損的過程中，會活化血小板並限制血小板的活動力，因此，DIC 也是輸血後造成 CCI 值低的原因 [30]。

藥物可藉由免疫反應引發血小板低下的症狀，已有上百種藥物被經證實會影響血小板的壽命[31]，在診斷病人發生PTR時，用藥的種類亦須被考慮。

在體外試驗中發現，血小板大約儲存至第六天，血小板的品質或是功能會有下降的趨勢[32]，在TRAP研究中也發現血小板的新鮮度會影響血小板輸注後的CCI值[6]。所以，在判定病人是否發生PTR時，必須先輸注較新鮮(<48 hours)的血小板，將此干擾因素先與以排除，才可以做出較正確的PTR診斷。

PTR的輸血指引

臨床上，非免疫因素所造成的PTR約占三分之二，由臨床醫師診斷後，將非免疫因素排除後，便可解決PTR的發生[33]。然而，因免疫因素所造成的PTR，則需藉由實驗室診斷，並由血庫挑選合適的血小板供病患輸用，才能有效控制PTR的發生。一旦實驗室數據顯示病人是由於免疫性因素所造成的PTR，可以有三種對策來協助解決。解決策略的思考流程如圖一所示。

HLA相合血小板(HLA matched platelet)

HLA抗原分子具有多態性，在血清學分類上HLA-A抗原有21種型別，HLA-B抗原有43種型別，如何判定捐血人與受血者間HLA分型相合程度？目前有CREGs人工判定及HLAMatchmaker電腦軟體配對兩種方法，介紹如下：

CREGs配對方法

有些型別不同的HLA抗原分子，因具有相同epitopes（稱作共有或public epitopes），可與單一的異體抗體(allosera)反應，也就是在血清反應上具交叉反應(Cross-reactivity)的關聯性，透過此關聯性將HLA抗原分子進一步分群(Cross-reactivity groups; CREGs)。屬於同一CREGs的HLA抗原分子，因血清反應相似度較高，抗原彼此間引起異體免疫反應的機會較少，利用這種血清反應特性上的關係，就是CREGs配對原理。目前台灣各捐血中心均以CREGs配對原理提供HLA相合血小板，其配對等級如表二所示。然而，以CREGs進行HLA相合程度的判斷，其血小板輸注成功率只有60%左右，並不算太高，原因是有些病人會產生CREGs間的抗體，稱作Intra-CREGs抗體，造成必須同時考慮多個public epitopes，進而增加HLA配對成功的難度[34]。

表二：HLA相合配對等級表*

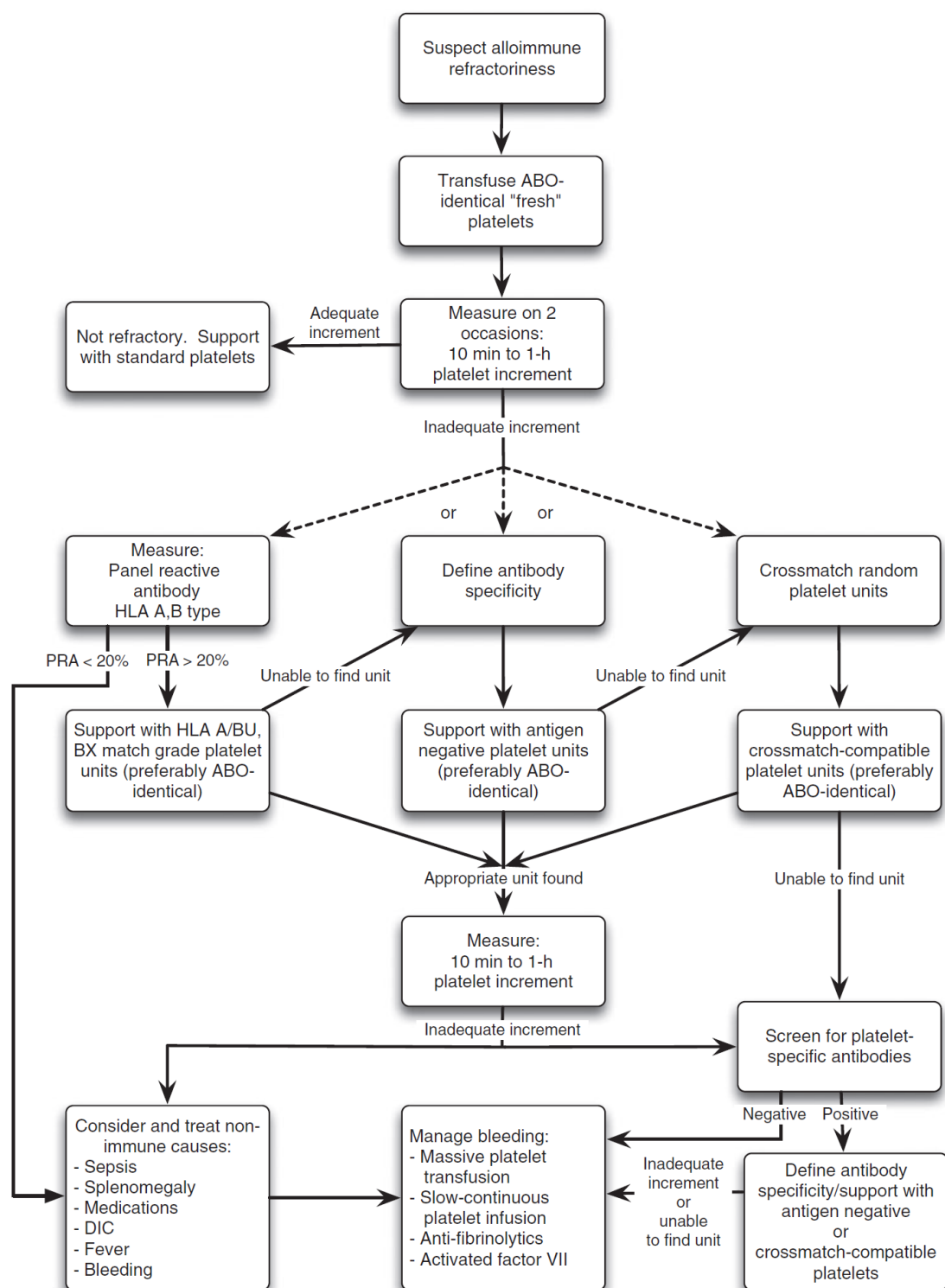
Classification of donor/recipient pairs on the basis of HLA Class I matching

A	All four antigens in donor identical to those of recipient.
B1U	Only three antigens detected in donor; all present in recipient.
B1X	Three donor antigens identical to recipient; fourth antigen cross-reactive with recipient.**
B2U	Only two antigens detected in donor; both present in recipient.
B2UX	Only three antigens detected in donor; 2 identical with recipient, third cross-reactive.
B2X	Two donor antigens identical to recipient; third and fourth antigens cross-reactive with recipient.
C	One antigen of donor not present in recipient and not cross-reactive with recipient.
D	Two antigens of donor not present in recipient and not cross-reactive with recipient.

*摘錄自台灣血液基金會標準作業文件表 SP-B2-060-6.3

**Antigen in cross-reactive groups (CREGs) which contains one of the patient's antigens.

圖一：PTR臨床處理流程圖，摘自Platelet transfusion refractoriness文章[45]



備註：PRA (Panel-Reactive Antibody) 為病人體內HLA群組反應性抗體強度指標，PRA>20%的病人，體內已含有多株HLA分型抗體，必須直接考慮使用HLA相合血小板，以進一步協助解決血小板輸注上的問題。

HLAMatchmaker 軟體配對方法

由於 HLA 抗原上的 epitope 是與抗體發生反應的部位，因此，對發生 HLA 同種異體免疫反應的病人來說，輸血前檢視 HLA epitopes 的配對，應該是比單純只檢視 HLA 特定抗原的相容來的重要[35]。2002 年 Duquesnoy[36]發展出以 structural matching algorithm 為基礎的電腦軟體 HLAMatchmaker，用來計算捐血者與受血者之間 HLA 相合程度，它是利用 HLA class I 抗原 alpha 蛋白上多態性區域，特別是 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ domain 上，依其胺基酸序列，每三個鄰近胺基酸視為一組，或以特定胺基酸為中心，將其周圍距離 3Å 區域為範圍，當作虛擬 epitopes (該軟體稱作 triplets 或 epites)，然後比較捐血者與受血者及 HLA Locus 間 HLA 抗原是否有 mismatch (Non-self) 的 epitopes 存在，以判定彼此間 HLA 相合的程度。因 HLAMatchmaker 的 algorithm 同時考慮 HLA 的 public 及 private epitopes，所以理論上判斷 HLA 相合程度會比 CREGs 方式更為精準。2006 年 Nambiar 以 16 位再生不良性貧血病人的輸血紀錄，進行回溯型研究，驗證了 HLAMatchmaker 在血小板輸注應用的可行性，其結果發現以 HLAMatchmaker 計算出少於 9 個 mismatch triplets 的血小板，其血小板輸注成功的機率較大，優於現行使用的 CREGs 配對方法[37]。

除了 HLA 相合血小板的供應，可以解決部分 Alloimmunized PTR 的問題，也有研究利用 HPA 相容血小板來解決 HPA alloimmunized PTR 的問題[38]，但是普遍捐血中心並未建立捐血人 HPA 分型資料庫，所以 HPA 相容血小板供應並未被列入標準化作業。

血小板交叉試驗

利用 Solid-phase red cell agglutination test (SPRCA)方法，可以進行血小板的交叉試驗。針對 Alloimmunized PTR 病人研究中，交叉試驗不相容的血小板，其輸注

後有 70-100% 的輸血記錄，其 CCI 值較差，也就是交叉試驗結果的 Positive Predictive Value (PPV)很高；而交叉試驗相容血小板，輸注後有 80-92% 其 CCI 值較佳[39]。利用放射線標示血小板，觀察交叉試驗相合的血小板，發現血小板可以在體內存活 3.5-8.7 天，而交叉試驗不相容血小板只存活 0.1-2.4 天[40]，顯示交叉試驗可以解決 PTR 的問題。血小板交叉試驗的執行優點，在它可以快速取得有效的血小板供病人使用，但是血小板的儲存期限只有五天，需要重複且長期輸血小板的病人來說，必須常常執行交叉試驗，不僅抽取病人的血液檢體頻率偏高，而且也會造成血庫工作人員的人力負擔[28]。

抗體特異性預測法

第三種解決 Alloimmunized PTR 的策略，是抗體特異性預測法 (Antibody Specificity Prediction; ASP)，它是比照紅血球異體免疫合血的原理進行。當病人體內 HLA 異體抗體的特異性為已知時，選擇及避開該抗體辨識的 HLA 分型血小板供病人使用。即使該 HLA 分型血小板與病人 HLA 分型不同，但不會被病人體內已產生的 HLA 抗體所辨識，而引發免疫反應，可以避開該抗體的攻擊。Petz 等人：針對 114 位 Alloimmunized PTR 的病人，進行回溯性觀察研究，收集 1,621 筆輸血紀錄，比較 HLA 相合血小板、交叉試驗相合血小板、ASP 血小板以及非選定血小板 (randomly selected)，血小板輸注後恢復比率 (Post-transfusion Platelet Recovery; PPR) 的差異，發現前三種方法 PPR 結果相近，約 21-24%，均優於 randomly selected 血小板 (PPR 只有 15%)，並且 ASP 方法可以增加更多捐血人血小板選擇的機會[28]。

其他解決策略

在治療 Autoimmune Thrombocytopenic Purpura (AITP) 時，會運用脾臟切除術或是靜脈注射 Anti-Rh(D) 兩種方式，可以讓病人得到良好的治療，但

是將兩種方法運用在 PTR 病人身上，卻沒有得到良好的效果[41,42]。也有一些利用免疫調節作用的治療方式，來克服 HLA-alloimmunized PTR，例如：Intravenous immune globulin (IVIg)、cyclosporin A、vinblastine、staphylococcal protein A，或是利用 citric acid 去除血小板表面的 HLA 抗原，這些方法在文獻上都有曾被證實，可以有效解決 Alloimmunized PTR 的問題，但是成功率在不同研究有不同結果，所以，實際運用上很少被採用。例如 IVIg 的使用研究中，針對 HLA-alloimmunized PTR 病人族群，進行 randomized, placebo-controlled trial，發現 IVIg 可以有效提升血小板輸注後 1 hour CCI 值，但是 24 hour CCI 值並未得到有效的提升 [43]，因而 IVIg 應用在 Alloimmunized PTR 病人上，並不被建議採用[44]。

結論

PTR 的發生是一個相當複雜的問題，如何預防 PTR 的發生，對需要長期輸注血小板病人來說，是相當重要的。一旦血小板輸注病人發生 PTR，更需要臨床、實驗室及捐血中心互相幫忙，找出確切的原因，以協助血小板的輸注。目前台灣並未全面使用 Leukocyte reduction components，所以，輸血引起的 Alloimmunization 發生率會稍高，捐血中心已建立約 45,000 位分離術捐血人的 HLA 分型建檔資料，已可以解決部分 HLA-alloimmunized PTR 的問題，未來，也會考慮建立捐血人的 HPA 分型資料庫，搭配 HLA 分型資料，提供 HLA/HPA 相合血小板，這使發生血小板 alloimmunization 的病人，可以得到較為合適的血小板。

參考文獻

- Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, Bernstein S, Elting LS, Goldsmith M, Goldstein M, Hume H, McCullough JJ, McIntyre RE and others. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1519-38.
- Sacher RA, Kickler TS, Schiffer CA, Sherman LA, Bracey AW, Shulman IA. Management of patients refractory to platelet transfusion. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:409-14.
- Schiffer CA. Diagnosis and management of refractoriness to platelet transfusion. *Blood Rev* 2001;15:175-80.
- Slichter SJ. Algorithm for managing the platelet refractory patient. *J Clin Apher* 1997;12:4-9.
- McFarland JG. Alloimmunization and platelet transfusion. *Semin Hematol* 1996;33:315-28.
- Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, Kickler T, Lee E, McFarland J, McCullough J and others. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005;105:4106-14.
- TRAP. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1861-9.
- Eisenberg S. Refractory response to platelet transfusion therapy. *J Infus Nurs* 2010;33:89-97.
- Sanz C, Freire C, Alcorta I, Ordinas A, Pereira A. Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. *Transfusion* 2001;41:762-5.
- Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 2008;142:348-360.
- Ogasawara K, Ueki J, Takenaka M,

- Furihata K. Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood* 1993;82:993-9.
12. Aster RH. Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelets. *Blood* 1965;26:732-43.
13. Lee EJ, Schiffer CA. ABO compatibility can influence the results of platelet transfusion. Results of a randomized trial. *Transfusion* 1989;29:384-9.
14. Cooling LL, Kelly K, Barton J, Hwang D, Koerner TA, Olson JD. Determinants of ABH expression on human blood platelets. *Blood* 2005;105:3356-64.
15. Lalezari P, Driscoll AM. Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma. *Blood* 1982;59:167-70.
16. Mueller-Eckhardt G, Hauck M, Kayser W, Mueller-Eckhardt C. HLA--C antigens on platelets. *Tissue Antigens* 1980;16:91-4.
17. Saito S, Ota S, Seshimo H, Yamazaki Y, Nomura S, Ito T, Miki J, Ota M, Fukushima H, Maeda H. Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion* 2002;42:302-8.
18. Deckmyn H, Ulrichs H, Van De Walle G, Vanhoorelbeke K. Platelet antigens and their function. *Vox Sang* 2004;87 Suppl 2:105-11.
19. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:345-54.
20. Pappalardo PA, Secord AR, Quitevis P, Haimowitz MD, Goldfinger D. Platelet transfusion refractoriness associated with HPA-1a (PlA1) alloantibody without coexistent HLA antibodies successfully treated with antigen-negative platelet transfusions. *Transfusion* 2001;41:984-7.
21. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J and others. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003;85:240-5.
22. Davis RB, Meeker WR, Mc QD. Immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood platelets. *Circ Res* 1960;8:234-9.
23. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000;28:1871-6.
24. Stephan F, Cheffi MA, Kaplan C, Maillet J, Novara A, Fagon J, Bonnet F. Autoantibodies against platelet glycoproteins in critically ill patients with thrombocytopenia. *Am J Med* 2000;108:554-60.
25. Francois B, Trimoreau F, Vignon P, Fixe P, Praloran V, Gastinne H. Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am J Med* 1997;103:114-20.
26. Warkentin TE, Aird WC, Rand JH. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:497-519.
27. Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Rohatiner AZ, Lister TA, Waters AH. Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. *Vox Sang* 1994;66:200-5.
28. Petz LD, Garratty G, Calhoun L, Clark BD, Terasaki PI, Gresens C, Gornbein JA, Landaw EM, Smith R, Cecka JM. Selecting donors of platelets for

- refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. *Transfusion* 2000;40:1446-56.
29. Hill-Zobel RL, McCandless B, Kang SA, Chikkappa G, Tsan MF. Organ distribution and fate of human platelets: studies of asplenic and splenomegalic patients. *Am J Hematol* 1986;23:231-8.
30. Bishop JF, Matthews JP, McGrath K, Yuen K, Wolf MM, Szer J. Factors influencing 20-hour increments after platelet transfusion. *Transfusion* 1991;31:392-6.
31. Visentin GP, Wolfmeyer K, Newman PJ, Aster RH. Detection of drug-dependent, platelet-reactive antibodies by antigen-capture ELISA and flow cytometry. *Transfusion* 1990;30:694-700.
32. Bessos H, Atkinson A, McGill A, Baillie J, Seghatchian J, Vickers M, Bishop D, Tandy N, Murphy WG. Apheresis platelet concentrates: correlation of day one levels of in vitro quality markers with corresponding levels on days two to five of storage. *Thromb Res* 1996;84:367-72.
33. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, Riggert J, Schleyer E, Kern W, Hiddemann W and others. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol* 1997;74:185-9.
34. Moroff G, Garratty G, Heal JM, MacPherson BR, Stroncek D, Huang ST, Ho W, Petz LD, Leach MF, Lennon SS and others. Selection of platelets for refractory patients by HLA matching and prospective crossmatching. *Transfusion* 1992;32:633-40.
35. Laundry GJ, Bradley BA, Rees BM, Younie M, Hows JM. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion* 2004;44:814-25.
36. Duquesnoy RJ. HLA Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol* 2002;63:339-52.
37. Nambiar A, Duquesnoy RJ, Adams S, Zhao Y, Oblitas J, Leitman S, Stroncek D, Marincola F. HLA Matchmaker-driven analysis of responses to HLA-typed platelet transfusions in alloimmunized thrombocytopenic patients. *Blood* 2006;107:1680-7.
38. Kekomaki R. Use of HLA- and HPA--matched platelets in alloimmunized patients. *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:359-63.
39. Heal JM, Blumberg N, Masel D. An evaluation of crossmatching, HLA, and ABO matching for platelet transfusions to refractory patients. *Blood* 1987;70:23-30.
40. Myers TJ, Kim BK, Steiner M, Baldini MG. Selection of donor platelets for alloimmunized patients using a platelet-associated IgG assay. *Blood* 1981;58:444-50.
41. Hogge DE, Dutcher JP, Aisner J, Schiffer CA. The ineffectiveness of random donor platelet transfusion in splenectomized, alloimmunized recipients. *Blood* 1984;64:253-6.
42. Heddle NM, Klama L, Kelton JG, Meyer R, Walker I, Dickson L, Chambers S, Levine MN. The use of anti-D to improve post-transfusion platelet response: a randomized trial. *Br J Haematol* 1995;89:163-8.
43. Kickler T, Kennedy SD, Braine HG. Alloimmunization to platelet-specific antigens on glycoproteins IIb-IIIa and Ib/IX in multiply transfused thrombocytopenic patients. *Transfusion* 1990;30:622-5.
44. Ratko TA, Burnett DA, Foulke GE, Matuszewski KA, Sacher RA.

Recommendations for off-label use of intravenously administered immunoglobulin preparations. University Hospital Consortium Expert Panel for Off-Label Use of Polyvalent Intravenously Administered

Immunoglobulin Preparations. JAMA 1995;273:1865-70.

45. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. Br J Haematol 2008.

案例報告

Pseudo-infection of the liver capillariasis

邱琬玲

台北市立聯合醫院陽明院區 檢驗科

前言

肝毛細線蟲 (*Capillaria hepatica*) 是屬於線蟲類。*Capillaria hepatica* 成蟲的蟲體較鞭蟲 (*Trichuris trichiura*) 成蟲的蟲體細、尾端呈鈍錐形，有一個交尾刺被鞘膜所包覆。雌蟲約長 100x0.2 mm，雄蟲約長 15~30x0.06 mm。*Capillaria hepatica* 蟲卵型態與鞭蟲蟲卵、菲律賓毛細線蟲 (*Capillaria philippinensis*) 蟲卵相似，但 *Capillaria hepatica* 蟲卵卵殼厚，分兩層，兩層間有放射狀橫紋，兩端有不突出的透明極塞 (polar plug) (註一)。

Capillaria hepatica 為有性生殖，所以有 Embryonated eggs 及 Unembryonated eggs 兩個時期，大小約在 51-67x30-35 μm 。Embryonated eggs 在潮濕的土壤中可以存活數個月。宿主被感染的原因有，因意外食入含有蟲卵的食物、土壤或飲水。感染後 24 小時蟲卵在盲腸內孵化成第一期幼蟲，在接著 6 小時內進入腸黏膜、腸繫膜靜脈、肝門靜脈，在感染 52 小時內到達肝臟。*Capillaria hepatica* 成蟲寄生在肝臟中也在肝臟中產卵，蟲卵會導致肝臟肉芽腫及膿瘍的病變，大小約 0.1~0.2cm 左右。通常伴隨著嗜伊紅性白血球上升、發燒、腹脹等等反應，嚴重可能會導致肝纖維化或肝硬化。*Capillaria hepatica* 感染通常發現在齧齒類動物、大鼠類、兔子和其他哺乳動物上。人類肝毛細線蟲病，在 1924-1996 年全世界只有 37 個病例報告，其中有 15 例發生於歐洲，但症狀輕微或是沒有明顯症狀。

Capillaria hepatica 在臨床上診斷其實是不容易的，主要還是依據蟲卵的發現還有血液肝功能檢查、肝臟超音波檢查、白血球增多症伴隨嗜伊紅白血球增加、持續性發燒、肝臟腫大作為輔助臨床上的診斷。假性感染 (Pseudo-infection) 是因為誤食了含有蟲卵的食物、土壤或飲水，蟲卵經過消化道隨糞便排出體外，雖然在糞便中發現了蟲卵，但是人體並未被真正的感染到。肝毛細線蟲的鑑別診斷還是以在糞便中發現蟲卵為主。

關鍵詞：*Capillaria hepatica*、*Capillaria philippinensis*、pseudo infectious

通訊作者：邱琬玲

連絡電話：0989066860

e-mail: mason230132@yahoo.com.tw

連絡地址：111 臺北市士林區雨聲街 105 號台北市立聯合醫院陽明院區檢驗科

民國 103 年 12 月 10 日受理；民國 104 年 3 月 30 日受理刊登

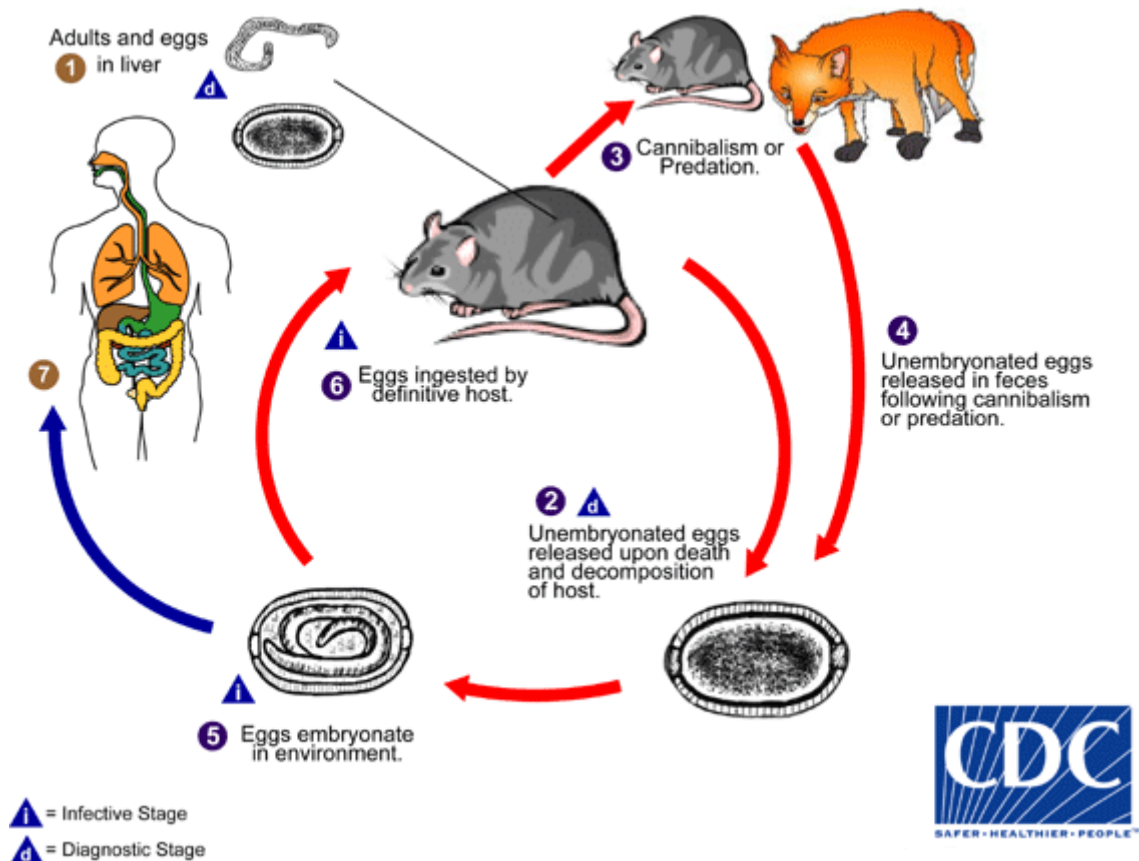
病例報告

一名 41 歲印尼籍婦女，來台 18 個月，18 個月當中沒有離開台灣過，從事老人照護工作，居住環境為台北市一般大樓公寓，飲食習慣中西式葷食（不吃豬肉），99 年 5 月做例行定期的外勞健康檢查，在糞便寄生蟲濃縮檢查法（MIF）中發現，肝毛細線蟲（*Capillaria hepatica*）蟲卵（如圖），寄生蟲陽性報告發出後，通知回診複檢。於第 7 天回診安排做腹部超音檢查、血液檢驗項目有 AST、ALT、 γ -GT 還有糞便寄生蟲濃縮法（MIF）。腹部超音波結果為皆為正常。

報告內容：

Blood test report		
	Test results	Reference value
AST	13	9-40 U/L
ALT	19	10-39 U/L
γ -GT	10	7-42 U/L

Indication Ultrasonic finding	
	Results
Liver	Mild increased in brightness & echogenicity and fatty infiltration Partially air block
Intra-hepatic duct	Negative
Common bile duct	Negative
Portal vein & hepatic vein	Negative
Gall bladder	Negative
Pancreas	Negative at body partially air block
Spleen	Negative
Left kidney	Negative
Right kidney	Negative
Suggestion	Please check hepatitis marker
Ultrasonic impression	Mild fatty liver



血液檢驗報告皆在正常值中，身體理學上也沒有發燒、疲倦、腹脹、肝臟腫大等異狀。糞便寄生蟲濃縮法（MIF）的檢查也沒有發現蟲卵。經以上檢驗數值醫生判斷為肝毛細線蟲（*Capillaria hepatica*）之假性感染（Pseudo infection）。

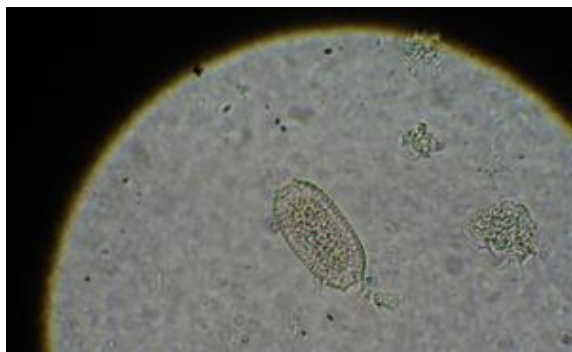


▲肝毛細線蟲卵

(*capillaria hepatica* ova)

特徵：

1. plug 和 egg shell 一體成型
2. egg shell 有凹陷，所以會呈現放射狀紋路。
3. 注意和鞭蟲的比較，其顏色較淡。



▲菲律賓毛細線蟲卵(*capillaria philippinensis* ova)

特徵：

1. 如花生米狀。
2. plug 些微突出。
3. egg shell 有放射狀條紋。
4. 注意和肝毛細線蟲的比較。



▲個案的 MIF 糞便檢體所發現之肝毛細線蟲卵(*capillaria hepatica* ova)，在 400X 下拍攝



▲肝毛細線蟲（*Capillaria hepatica*）與鞭蟲（*Trichuris trichiura*）蟲卵的比較

討論

1. 在線蟲當中和肝毛細線蟲（*Capillaria hepatica*）蟲卵相似的有鞭蟲（*Trichuris trichiura*）和菲律賓毛細線蟲（*Capillaria philippinensis*）其中鞭蟲的治療較為容易，但菲律賓毛細線蟲（*Capillaria philippinensis*）的嚴重程度就比上述二者高多了。在 1967-1990 年腸道毛細線蟲病有 1884 個確定病例記載，110 人死亡。台灣也有病例發現在台東縣 1983-2001 年間有 14 個案例（註一）。

2. 菲律賓毛細線蟲（*Capillaria*

philippinensis) 屬於東南亞菲律賓區域性流行，疾病通常拖很久才被發現，所以致死率很高。成蟲約長 4~5mm 寄生在腸道而且會自體感染 (auto-infection)，蟲卵大約為 45x21 μ m，較肝毛細線蟲 (Capillaria hepatica) 小，感染的原因為：淡水魚或鹽水魚食入蟲卵，在魚中發育成幼蟲，人類再食入未煮熟或生食的淡水魚或鹽水魚，因而被感染。診斷主要還是依據糞便中的蟲卵發現。

3. 治療毛細線蟲病急性感染的病人，必須注意水分及電解質的補充和高蛋白飲食。Mebendazole 為第一線治療用藥。每天兩次，每次 200mg，持續治療 20 天。Thiabendazole 也是有效的但需要較長的時間，每天兩次，每公斤體重 25mg，共 30 天。接著每隔一天服用 1 公克，持續 6 個月。

結論

毛細線蟲病 (Capillariasis) 對於早期的治療效果是很好的，肝毛細線蟲和菲律

賓毛細線蟲的區別也是非常重要的，因為菲律賓毛細線蟲 (Capillaria philippinensis) 的致死率較肝毛細線蟲 (Capillaria hepatica) 高，臨床上最主要還是依賴醫檢師來檢查蟲卵進一步鑑別。隨著時代進步及衛生條件增加，人類感染致病性寄生蟲已經降低很多，但還是要注意在流行的區域避免生食魚類或海中食物及飲用水必須煮沸過、避免生食蔬菜、水果要洗乾淨、吃東西前、如廁前後要洗手，養成個人良好衛生習慣，就能避免感染到寄生蟲之相關疾病。

參考資料

1. 中華民國行政院衛生署疾病管制局人畜共同傳染病資訊網第五十九章毛細線蟲病 (Capillariasis)，作者蔡睦宗、張淑美、黃建賢、張藏能，2006-12-27。(註一)

蔬果農藥殘留之檢驗

劉君豪

新北市政府衛生局

摘要

農藥殘留一直為消費者、政府、業者、及世界各國等多方關注之食品安全議題。世界各國為提升該國農產品之品質及國際農產品之貿易，農藥殘留檢測為食品安全所關注之議題。如何提升農藥檢測能力之發展一直為分析領域之焦點。目前使用 QuEChERS 前處理技術配合上液相層析串聯式質譜儀、氣相層析串聯式質譜儀為當前的主流技術，研發人員致力於縮短檢驗時間、提高檢測能力仍不斷的進行中，如導入更簡便有效的前處理技術、採用高解析質譜等，為各國對於農藥殘留檢測技術持續性的關注。

關鍵詞：農藥殘留、QuEChERS、液相層析串聯式質譜儀、氣相層析串聯式質譜儀

前言

農藥殘留一直為消費者、政府、業者等等多方關注之食品安全議題，如何提高農藥殘留檢測技術，為各個國家提升本國農產品品質與克服國際農產品貿易技術壁壘的重要途徑[1]。因此農藥殘留檢測方法如何加速檢測速度、增加檢測品項與降低檢出濃度一直為國際發展技術的熱點。

2014 年聯合國世界糧農組織(Food and Agriculture Organization of the United Nations；FAO)資料顯示：2003 年生產量為 190 億公噸、消耗量為 195 億公噸，預測至 2013 年為生產量為 250 億公噸、消耗量為 241 億公噸[2]。如果要讓產量持續符合需求，必要採取作物保護措施，使用

農藥為其中一個有效手段，如果不使用農藥協助保護作物就會產生明顯之損失[3]。

農藥管理

自第二次世界大戰後，農藥使用量持續增加，大量農藥除殘留在農作物等食物上，也造成環境之汙染；除直接噴灑之農民外，也會藉由蔬果等食物與飲水進入人體[4]。美國自 1947 年對農藥進行管理，在 1996 年要求廠商向政府登記使用農藥要訂出容許量。歐盟在 1991 年頒布 91/414/EEC 實施農藥管理。台灣農藥監控管理是由農政機關與衛生機關來執行，有一部分在環保署[5]。農政機關負責農漁畜牧產品之安全，管理田間作物栽種、生

通訊作者：劉君豪

連絡電話：02-22577155

e-mail：liuch2233@gmail.com

連絡地址：新北市板橋區英士路 192-1 號

民國 104 年 1 月 11 日受理；104 年 3 月 30 日受理刊登

產及收穫，因此附帶之農藥核准、製造、販售管理及農民輔導；衛生單位管轄食品安全與食品工業，對食品的處理流程及最後成品進行管制，不定期抽驗市面食品，包含市場端的農藥殘留檢驗，另進口產品亦由衛生單位監控[6]。農漁畜產品在進入批發市場之前，是屬於農委會管轄的；產品離開批發市場後，由衛生福利部管轄，因此在批發市場由兩單位共管，農委會所佔比率較多。

農藥最大殘留容許量

農藥殘留是指農藥使用後殘存於生物體、農產品（或食品）及環境中的微量農藥 [7]，依據 Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual-Twelfth Edition 定義[8]，包括農藥本體與具有毒理學意義的農藥衍生物，如農藥轉化物、代謝物、反應產物以及其雜質等[9]。農藥殘留是施藥後的必然現象，殘存的農藥殘留數量稱為殘留量，以每公斤食品中有多少毫克（mg/kg）或微克（ug/kg）來代表，常以 ppm 百萬分之一（ $1/10^6$ ）或 ppb 十億分之一（ $1/10^9$ ）表示之。為保護人體之健康，各種農藥定有最大殘留容許量（Maximum Residue Limits：MRL，以下簡稱 MRL），但如果超過 MRL，會產生對人畜不良影響或通過食物鏈對生態系中的生物造成毒害的風險。在 2014 年臺美經貿關係報告提及台灣制定 MRL 緩慢及繁瑣，主要因為訂定 MRL 需要三項基本資料。(1)每人每日容許攝入量值（Acceptable Daily Intake；ADI）。(2)每類作物國人平均取食量。(3)農藥在作物中之實際殘留量[10]。

在訂定合理 MRL 的過程中，需要透過實驗室監控農藥殘留，因此農藥殘留檢測除保護消費者健康與為農產品安全把

關外，所監測之數據可作為長期攝入農藥殘留食物之風險評估，提供科學之證據，缺乏 MRL 時可以協助建立 MRL，當 MRL 存在時可評估依據良好農業操作方式（good agricultural practice：簡稱 GAP）操作之作物之合理採收期（Pre-Harvest Interval：簡稱 PHI），也具有處理中毒急救突發緊急事件、解決國際貿易障礙等等之目的。因此各國對於殘留農藥都是採用最新之技術與儀器來完成此一工作。監控農藥殘留是以殘留在農作物上的農藥本體為主，具有毒理學意義的農藥衍生物在實務檢驗上仍有討論之空間。

農藥殘留檢驗方法之演進

早期農藥殘留檢驗方法是採用生物法、薄層色層分析法等。後來導入層析化學分析法使用氣相、液相層析儀配合紫外光、螢光、ECD、FPD 等檢出器。近年則以如氣相層析儀（Gas Chromatograph；GC）或液相層析儀（liquid Chromatography；LC）加上串聯式質譜儀（Tandem mass spectrometry；MS/MS）當作檢測器為主（圖 1）[11]。（表 1）為農藥殘留檢驗之變化表。（表 2）為我國農藥殘留檢驗之演變。

選擇農藥殘留檢驗方法

如何選用一個合適之檢驗方法呢？不同國家、區域都有其規定之農藥殘留檢驗方法，實驗室首先要確認檢驗目的，檢驗結果要做為貿易、執法、中毒分析、背景資料收集或風險評估等使用時，採用之方法可能就不一樣。如在台灣的衛生單位執法檢驗，就要依據食品衛生管理法第 38 條規定，檢驗方法經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定的；如未定檢驗方法的，得依國際間認可之方法執行，這

部分與醫學實驗室選擇檢驗方法是有差異的。各國國情及用藥習慣不同，所訂殘留農藥容許量亦不相同。業者輸出產品前應先行了解對方法規，以該國方法或符合

檢驗需求之國際認可方法進行檢驗。我國公告方法來源為衛生福利部、環境部、農業部等單位為主。

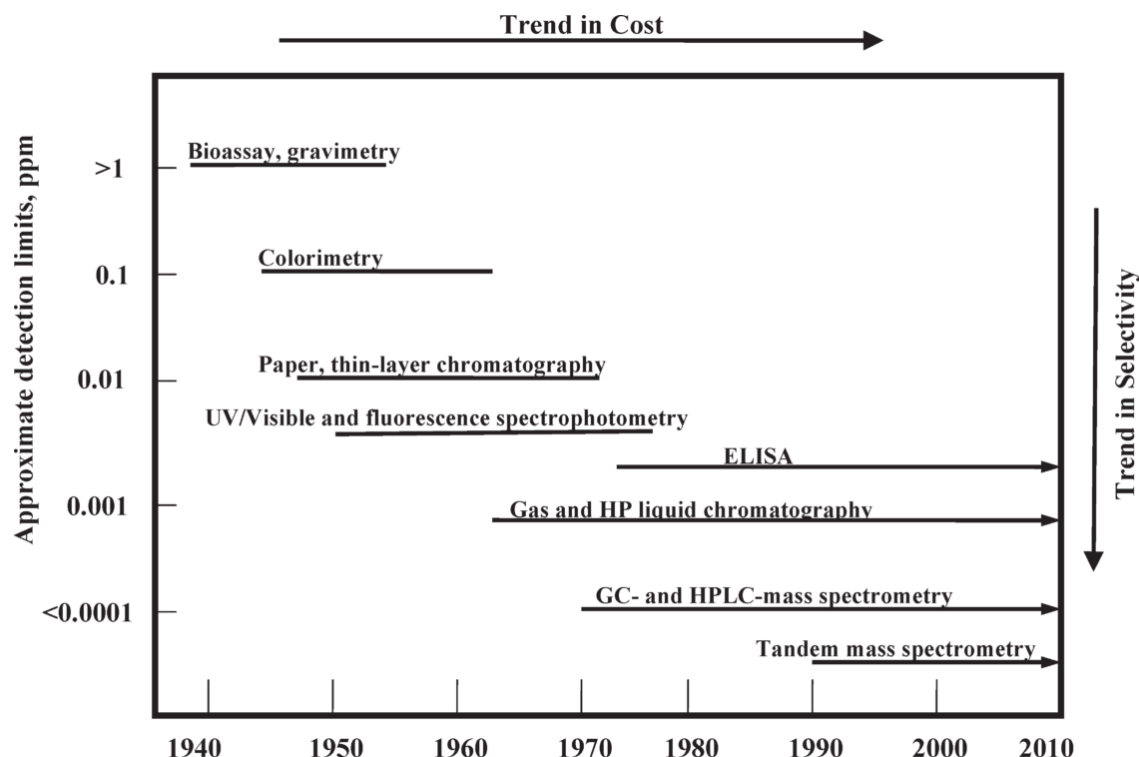


圖 1 檢出殘留物之方法演變，文獻[11]

表 1 農藥殘留檢驗之變化表

年代	檢驗方式
1950 年前	生物法與元素分析為主，以總氮量、總磷量及總鉀量來測其主成份
1950 至 1960 年	以光譜分析方法：包括紫外光、可見光及紅外光譜儀來測定，但是限制及干擾很大，只能進行單一藥劑及劑型之分析
1960 年後	以氣相層析儀為主：具選擇性（精確度）及準確度，並能以衍生物之方法，特殊層析管之設計及溫度之變化，來分析比較困難之藥劑，包括苯氧酸類殺草劑，天然物及胺基甲酸鹽類農藥
1980 年	增加高效液態層析儀：彌補氣相層析儀無法分析不易揮發或受熱易分解藥劑之缺點
2000 年後	以氣、液相層析儀附串聯式質譜儀（GC/MS/MS, LC/MS/MS）為例行檢測之定性定量之必備工具

表 2 農藥殘留檢驗方法項目變化表

多重殘留 分析方法	年度	94	98	99	100	101	103	使用前處理技術與檢出器
(三)	品項	135	114	114	114	122	廢止	液液萃取、GCECD、FPD、HPLC
(四)	品項	81	87	87	100	251	廢止	液液萃取、GC/MSMS、LC/MSMS
(五)	品項					255	311	QuEChERS 前處理 GC/MSMS、LC/MSMS

農藥殘留檢驗流程

完整的農藥殘留檢驗流程有幾個主要步驟：抽樣、運送、取樣、萃取、濃縮、淨化、層析分離、分析、確認。每一個步驟都會影響結果，例如該如何選擇具有代表性的採樣點和有效的採樣方案，如何運送才不會造成樣品汙染等等，因為牽連甚廣，以下就僅說明取樣到結果分析的流程。蔬果基質是非常複雜的，有些含水份多，有些含油多，要進行農藥殘留分析前都要經過前處理，包含萃取、濃縮及淨化，目的是將待測物由複雜系統中分離到較單純的系統，再利用層析分析法將樣品中的標的待測物與共萃取出來的干擾物分離，透過滯留時間與使用之檢測器來分析與鑑定，主要可分為氣相層析法和高效能液相層析法二種[12]。

取樣、均質、秤重

依據不同之樣品與不同國家檢驗方法要求其取樣方式不同，在台灣會依據農委會之“農藥殘留量試驗各類作物樣品前處理之取樣部位”，因農藥在農作物上的分佈不均勻，為了避免執法檢驗誤差，取樣後第一時間就是要使用均質器將樣品打成泥狀，再秤取一定之重量準備進行檢驗工作。剩餘的檢體必需保存在-20C 冷凍庫。

萃取、淨化、濃縮

後續樣品使用有機溶劑(如乙月青、丙酮、甲醇、等等)將殘留農藥萃取出來，在選擇萃取溶劑時會考量：(1)農藥的極性。(2)樣品的含水量。(3)樣品的理化性質。(4)萃取溶劑的極性。早期農藥殘留萃取是以液-液相萃取法 (liquid-liquid extraction; LLE)，其原理是利用 Nernst 分配原理，利用農藥在兩個不同相之分布進行萃取，可是 LLE 缺點包括：步驟繁多、費時、溶劑用量大萃取效率低、樣品易乳化、易污染環境等，且無法自動化分析。在綠色化學之要求下，許多新的技術正研發並應用於常規檢驗[13]，如使用固相萃取 (Solid phase extraction; SPE)、固相微萃取 (solid phase micro-extraction; SPME)、基質固相分散 (matrix solid phase dispersion extraction; MSPDE)、膠體層析 (Gel permeation Chromatography; GPC)、頂空萃取法 (headspace method extraction; HSE) 等。

QuEChERS 前處理技術

萃取時與農藥有相似性質之物質會跟著被萃取出來需要將萃取液淨化減少干擾。同時現行前處理技術以追求簡單、快速、環保、便宜和穩定為目標，又儀器分析功能愈來愈強大，在此氛圍下，

QuEChERS (Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe 的簡稱) 前處理技術於 2002 年 European Pesticide Residues Workshop (ERPW) 發表，2003 年在 AOAC(Association of Official Agricultural Chemists)期刊上發表[14]，在持續性技術改善下，在 2007 年美國分析化學家協會 (Association of analytical Communities)公告此前處理合併氣相層析串聯式質譜儀、液相層析串聯式質譜儀植行農藥殘留檢測，而歐盟在歐洲標準化委員會(European Committee for Standardization；CEN)公告為 EN 15662 檢測方法，自 103 年 7 月起，

我國之農藥殘留檢驗方法(五)已開始採用此一技術，並能檢測 314 種農藥。表 3 是各主要方法之差異。

QuEChERS 簡化以往萃取、淨化的過程：將固體檢體均質後，利用 ACN 進行液相微萃取 (Liquid phase micro-extraction)，ACN 萃取液加入含有硫酸鎂(MgSO₄)與一級二級胺(primary secondary amine，PSA)等固相吸附劑，利用用力搖晃方式去除雜質，這種方式被稱為分散式固相萃取(Dispersive Solid phase extraction；dSPE)技術。

表 3 採用 QuEChERS 前處理各主要方法之差異

樣品均質			
2003 Anastassiades Lehotay 原始方法 10g 樣品	2007 Lehotay AOAC 2007.01 15g 樣品	2008 Anastassiades CEN 15662 10g 樣品	2013 臺灣衛福部食藥署 TFDA103900615 10g 樣品
乙月青液相微萃取			
10ml + 4g 無水硫酸鎂 1gNaCl ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清	15ml 含 1%HOAc + 6g 無水硫酸鎂 1.5g 無水醋酸鈉 ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清	10ml ↓劇烈搖晃 + 4g 無水硫酸鎂 1gNa3Cit.2H2O 0.5gNa2Cit.5H2O ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清	10ml + 4g 無水硫酸鎂 1g 無水醋酸鈉 ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清
淨化，加入以下各成份			
150mg/mL 硫酸鎂 25mg/mL PSA ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清 上機	150mg/mL 硫酸鎂 50mg/mL PSA ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清 上機	150mg/mL 硫酸鎂 25mg/mL PSA ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清 上機	150mg/mL 硫酸鎂 25mg/mL PSA ↓劇烈搖晃 ↓離心取上清 上機

分析與確認

現有二硫代胺基甲酸鹽類農藥分析需要時要使用頂空 GC 外，其他農藥分析與確認，現有主流是使用 LC/MSMS 與 GC/MSMS，使得分析濃度可達到 ppb 等級，也解決早期使用 GC、LC 合併紫外光、螢光等檢測器，無法做出農藥最終判定，當有符合滯留時間的農藥需要更換另一種層析管柱才能確認是否為特定的農藥的問題。

質譜分析技術是利用高能粒子撞擊等方式讓待測物變成離子或帶電的碎片，不同待測物有機會產生特定荷質比(m/z)之離

子，使用串聯質譜儀可以得到該待測物特定之質譜圖[15](圖 2)。

常見之三段四極桿的串聯式質譜分析器具有兩個質譜分析器，中間為碰撞室，藉由兩個質譜分析器可產生四種組合[15, 16]。分別為子離子掃描(Product ion/Daughter ion scan)、母離子掃描(Precursor ion/Parent ion scan)、中性丟失(Neutral loss scan)、選擇反應偵測(Selected reaction monitoring/SRM)或多重反應偵測(Multiple reaction monitoring/MRM)(表 4)(圖 3)。

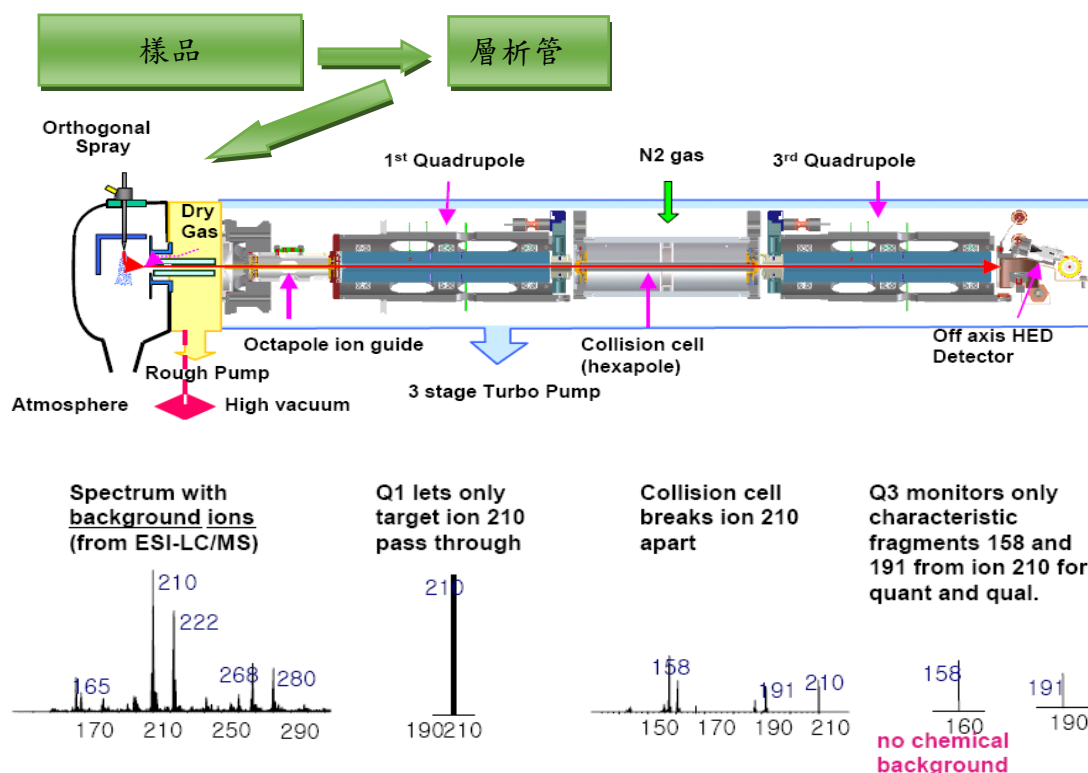


圖 2(上)樣品進入質譜檢測簡圖。樣品經由層析管柱初步分離，進入質譜儀後，被離子源產生之高能粒子撞擊產生母離子，後續透過四級桿不同模式做篩選。(下)為樣品經離子源打碎，產出許多母離子片段，藉由第一段質譜設定篩選 m/z 210 的片段，接著經由氣體撞擊產生子離子 m/z 158、191 的片段，利用最後一段質譜篩選 m/z 158、191，可以明顯下降背景干擾。來源台灣安捷倫公司

表 4 三段四極桿質譜的組合模式。文獻[15]

模式	MS1/Q1	CID/Q2	MS3/Q3	用途和特點
子離子掃描	篩選特定 m/Z 母離子	撞擊打碎	掃描所有產 生之子離子	研究母離子的結構特徵
母離子掃描	掃描所有產 生之母離子	撞擊打碎	篩選特定 m/Z 子離子	可篩選能產出特徵子離子 (相同次結構)的一類化合物
中性丟失	掃描母離子 ($m/z=x$)	撞擊打碎	掃描子離子 ($m/z=x-a$)	篩選一類化合物具有相同 官能基但會產中性裂解的 產物
選擇反應偵 測、多重反應 偵測	選擇特定母 離子 $m/z=b$	撞擊打碎	選擇特定母 離子 $m/z=c$	提高靈敏度與選擇性，適用 微量偵測，定量

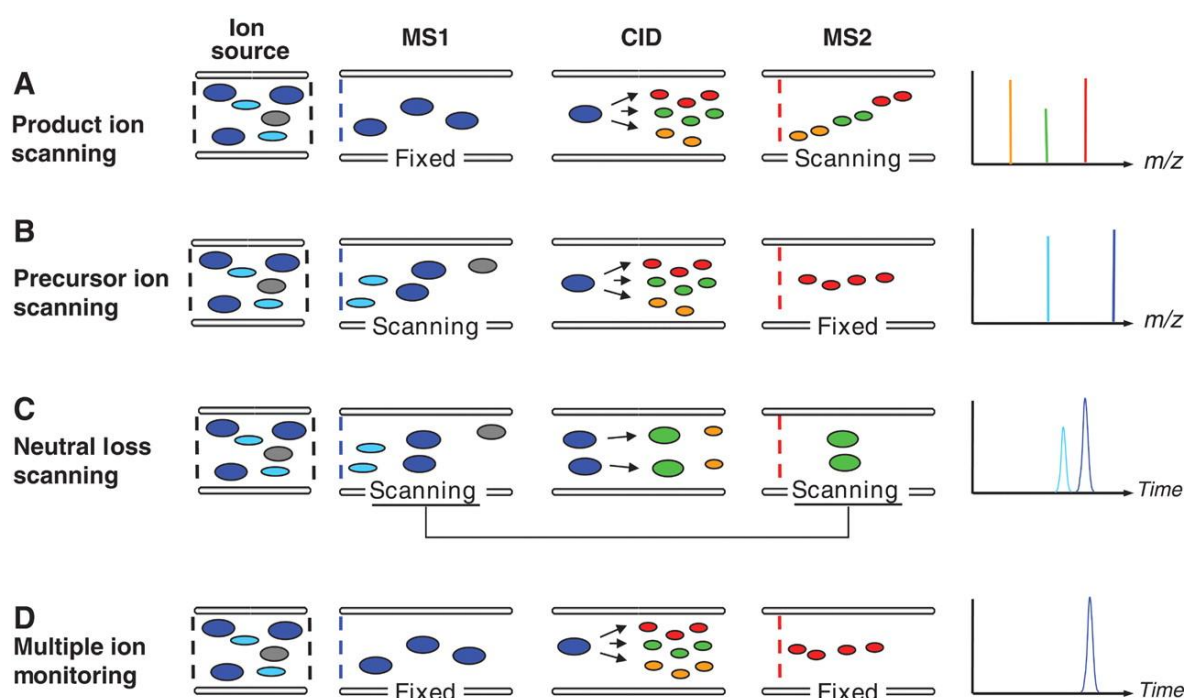


圖 3 三段四極桿質譜的組合模式示意圖。文獻[16]

在農藥殘留檢測時因種類多達 300 種以上，現有開發的方法不會單獨測一種農藥品項，優先選擇多重反應監測模式 (MRM: Multiple Reaction Monitoring) 一次監測數百種農藥為主流方向，如農藥特性無法與其他農藥一起監測才會使用特定方法去做。

現在利用下面質譜圖來說明，在

5.8-6.0 分鐘出現的一個波峰，他是由不同 m/z 離子在那段時間積分出來的，所以至少有兩個成分可以區別，在質譜中在小圖中就能看見綠色的波形，分別是 3-OH Carbofuran 與 Acetamidiprid。當使用 MRM 模式時就能以 m/z 方式區別，3-OH Carbofuran 是鎖定 238.1 母離子經撞擊後產出 163.1、181.1 子離子、Acetamidiprid 則

是鎖定 223.1 母離子經撞擊後產出 126.0、56.2 子離子，因此就算層析不能明顯區分成兩種化合物，但藉由 MRM 模式，質譜能挑選特定的離子來鑑定化合物並分辨，如此質譜儀才有能力一次區分一到二百種的化合物。三段四極柱的質譜的 MRM 模式就一個化合物監控 2 個子離子，為了更有效監控持續增加之農藥品項，其他類型之質譜型態如 TOF、Orbitrap 等開始提供相關的服務，讓一次有機會監控 400-500 種農藥(圖 4)。

針對不同的質譜型態，為了避免檢驗人員在鑑定農藥品項時做出錯誤判斷，在歐盟有規定不同質譜技術對兩母子離子對之離子強度比率 (Ion Ratio) 與要求鑑定農藥時需要的條件[17](表 5)。儘管質譜儀是一個有高選擇性的設備，但還是有其極限，歐盟對於未知物也要求需要多少 Identification Points(以下簡稱 Ips)才能當作檢出未知農藥之確認條件，同時定義一級質譜(MS)及二級質譜(MS/MS)的 Ips，並要求若未提供全質譜(full scan spectra)，推薦藥劑需有 3 Ips，禁用藥劑需有 4 Ips

表 5 不同質譜技術對兩母子離子對之離子強度比率 (Ion Ratio)

不同質譜技術對兩母子離子對之離子強度比率 (Ion Ratio) 規範		
相對強度 (% of Base Peak)	兩離子對比率的最高允許誤差	
	GC-EI-MS	LC-MSn, GCMSn, GC-CI-MS
>50%	±10%	±20%
>20% to 50%	±15%	±25%
>10% to 20%	±20%	±30%
≤10%	±50%	±50%

表 6 歐盟規範使用質譜儀鑑定未知物之計點標準

MS technique	Identification Points earned per ion
Low resolution mass spectrometry (LR)	1.0
LR-MSn Precursor ion	1.0
LR-MSn Transition products	1.5
High resolution mass spectrometry (HR)	2.0
HR- MSn Precursor ion	2.0
HR-MSn Transition products	2.5

(表 6)。當農藥經過一連串前處理、分析、確認後，所得到之結果會與 MRL 比較，判斷是否有符合法規要求。

質譜待解決的問題

採用 MRM 的質譜模式某些情況下仍無法區分化合物[18]，(圖 5) Albendazole Sulfone 與 Hydroxy Mebendazole 的結構類似，而且分子量又差異不大，加上斷裂方式為 31/107/159 時，若離子強度無法區別時，就要靠全離子掃描與高解析質譜如 TOF、Orbitrap 來協助區別，這也是未來農藥檢測要走的方向。

同分異構物也是相同情形。如動物用藥的 Sulfadoxine 與 Sulfadimethoxine 是同分異構物，在 MRM 的模式下，皆為 311.1>156.0、311.1>92.0，唯一的差別就是層析時間不同，前者是 13.4 分鐘，後者是 15.2 分鐘。這種用高解析質譜也不能區分，因此質譜雖然功能很強，但是分析數據時也要留意可能發生誤判之情形(圖 6)。

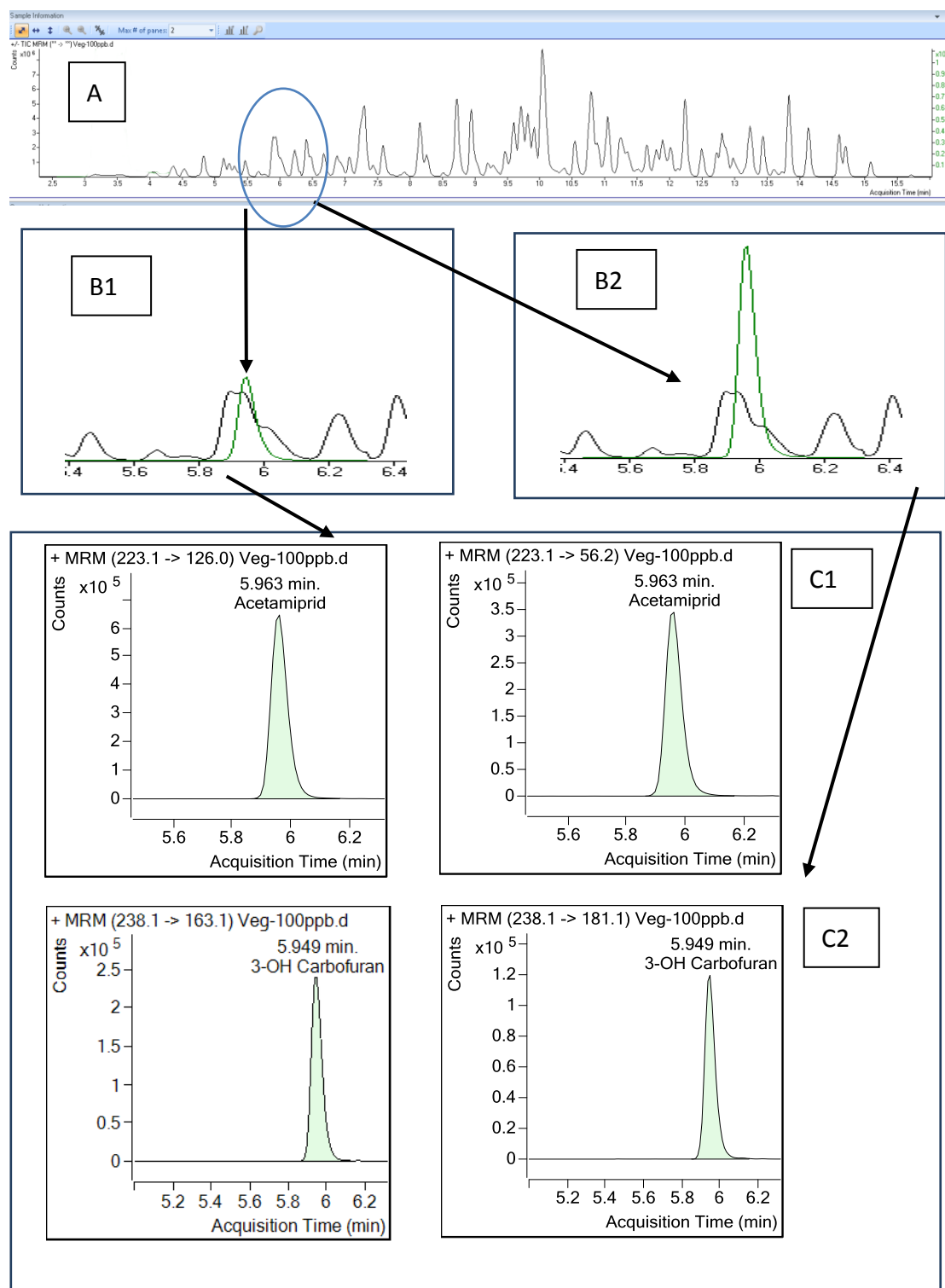


圖 4 3-OH Carbofuran 與 Acetamiprid 質譜圖說明

A、一張時間訊號圖，橫軸為滯留時間(分)，縱軸為訊號強度。

B、 在不同 m/z 的觀察下，B1、B2 呈現不同強度僅管利用滯留時間幾乎無法區分 2 種農藥，但是利用 m/z 去觀察兩種不同農藥，會看見產出物不同，如 223.1=>126.0/56.2。

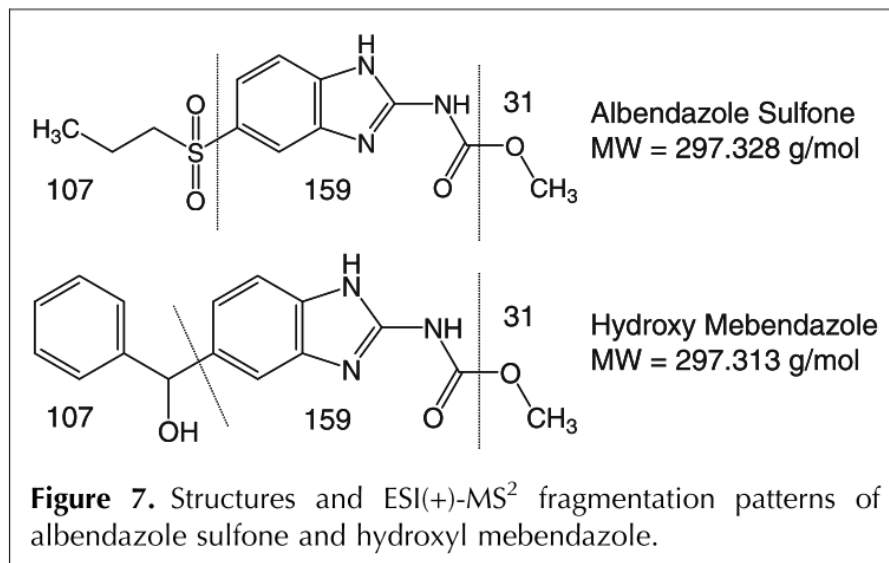


圖 5 Albendazole Sulfone 與 Hydroxy Mebendazole 的結構類似，斷裂片段 m/z 相近，無法以一般質譜儀分析確認，需要使用高解析質譜儀。文獻[18]

化學名	子離子 1	子離子 2
Sulfadoxine	<p>+ MRM (311.1 -> 156.0) STD 100.d Smo...</p> <p>13.352 min. Sulfadoxine</p>	<p>+ MRM (311.1 -> 92.0) STD 100.d Smooth</p> <p>13.352 min. Sulfadoxine</p>
Sulfadimethoxine	<p>+ MRM (311.1 -> 156.0) STD 100.d Smo...</p> <p>15.166 min. Sulfadimethoxine</p>	<p>+ MRM (311.1 -> 92.0) STD 100.d Smooth</p> <p>15.166 min. Sulfadimethoxine</p>

圖 6 同分異構物在滯留時間、子離子的差異

基質效應(matrix effect)問題

此外經過了淨化步驟後仍有很多共萃物會出，(表 7)證實 Orange、Leek 在下比 Pepper、Tomato 在不同滯留時間下有更多的基質被萃取出來[19]，所以檢測上會相對比較複雜，因此分析過程中的基質效應[20]需要解決的，尤其在液相層析質譜分析最嚴重。液相層析串聯式質譜儀(LC/MS/MS)檢驗時，高濃度基質會與待測分析物在帶電離子化時產生競爭，使待測物於基質中相較於純溶劑電離離子化下所得信號即產生明顯落差，觀測多為信號抑制效應。但在大氣壓化學離子化

(Atmospheric Pressure Chemical Ionization) 下則多為信號增強 (Signal Enhancement)，而在於氣相層析質譜上信號增強也為常見，。減低基質效可將檢體稀釋，稀釋可減少大部分蔬果基質所產生的干擾。例如柳橙、鳳梨、桃子果汁之基質匹配標準品(Matrix Matched Standard) ，經過 10 倍稀釋直接注射液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) ，只剩下 8% 的基質效應[21]。因此可以有許多方案來協助，例如採用保護劑等[20]，惟目前仍存在許多基質效應問題待克服(圖 7,8)。

表 7 LC-TOF-MS 分析使用 QuEChERS 方法萃取之 Orange、Leek、Pepper、Tomato 基質。文獻[19]

Table 2

Number co-extracted compounds (absolute height $\geq 10,000$ counts) of each matrix along all chromatogram time and in a selected retention time range. Samples were extracted with QuEChERS method and analyzed by LC-TOF-MS.

Matrix	No of co-extracted compounds	
	Rt: 0-17 min	Rt: 7-13 min
Orange	8017	2743
Leek	5870	3032
Pepper	3419	919
Tomato	2408	656
300 Pesticide-database components	912	750

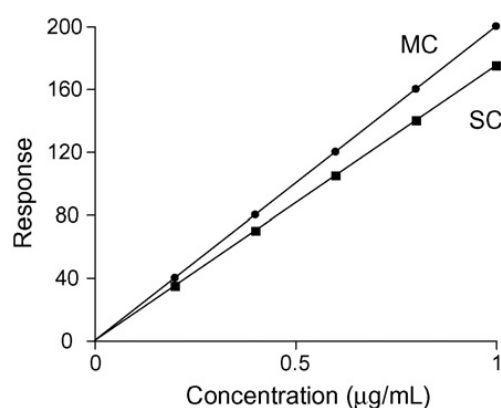


圖 7 基質效應對檢量線之影響。由圖中可以看出標準因為基質的問題發生偏差，有可能是正偏差、也有可能是負偏差。omethoate in acetone nitrile (SC) and matrix-matched milk extract (MC)。文獻[20]

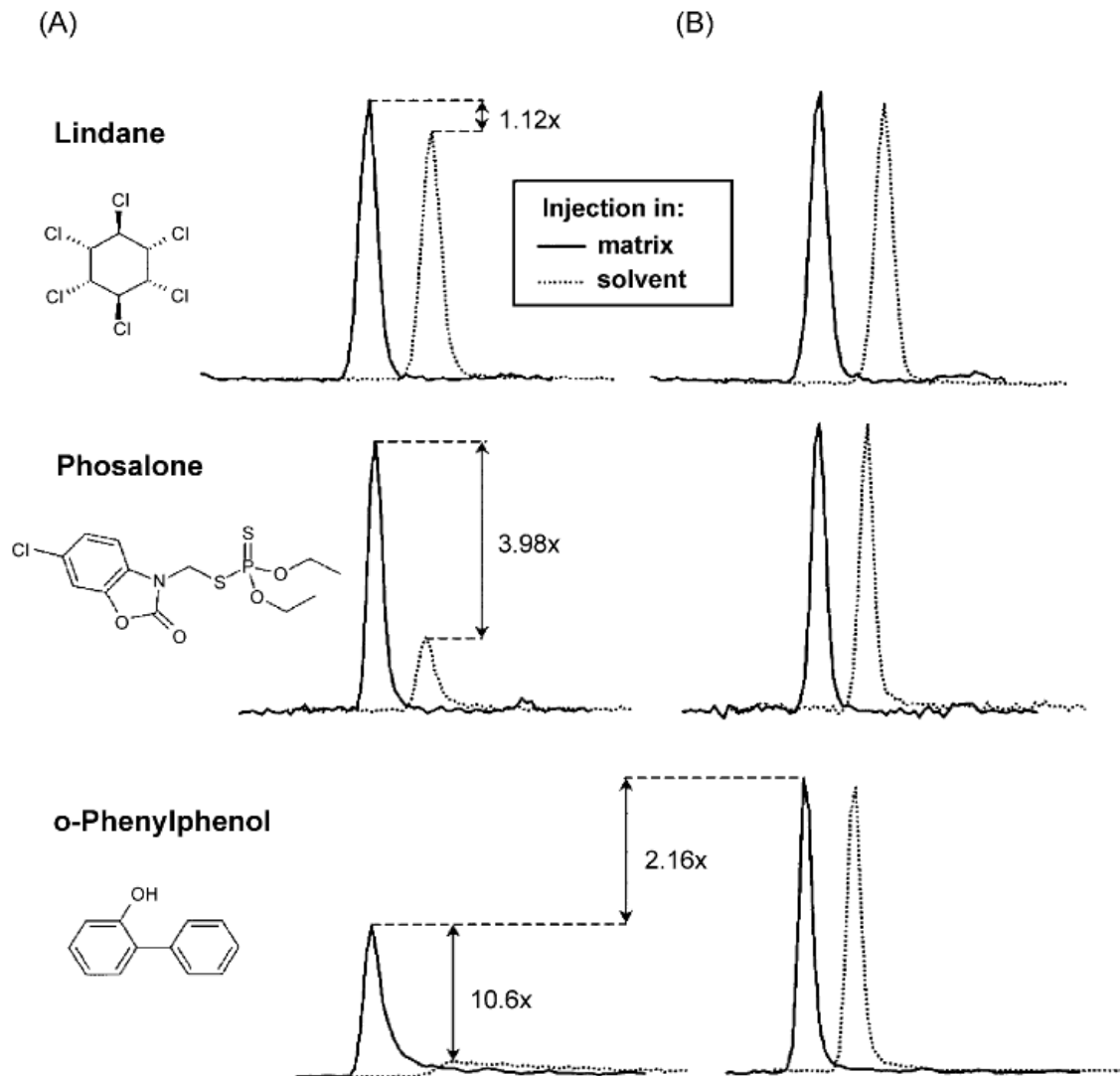


圖 8 基質效應對檢出訊號之影響。左方為基質效應對檢出物訊號產生加強或抑制，可以採用保護劑保護檢出物，使基質效應消失。文獻[20]

結論

農藥殘留檢驗是層析、質譜、分析化學、有機化學、食品化學各技術總合的發展，如何降低農藥對健康、環境之危害，農藥殘留技術不斷持續進步，只是其進展需要嚴整的確效，因殘留量數值都是 ppm 或 ppb 等級，與醫學領域的檢驗數值差異極大，且此類檢驗除健康議題外，尚與貿易、法律、規章及標準等等息息相關，故農藥殘留檢驗方法有一定的強制性，並不同於醫學檢驗方法的多樣性。如果醫檢師

有興趣往此領域發展，相關的檢驗技術研讀與訓練是必要的，如液相、氣相層析儀、質譜儀的原理與應用，分析化學、有機化學的基礎等等，此外食品方面的基礎也應有所涉獵。現今農藥殘留希望解決花費時間過長、費用高昂、分析人員入門檻高等問題。相信有更多不同領域之檢驗人員投入此範疇，對於農藥殘留檢驗的發展絕對是正向的。

參考文獻

1. 彭明輝. WTO 的食品安全檢驗與動植物防疫檢疫. 2011 4/2/2011 [cited 2015 3/11]; Available from: http://mhperng.blogspot.tw/2011/04/wto_6447.html.
2. FAO Crop Prospects and Food Situation. March 2014 No. 1.
3. OERKE, E.-C., Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 2006. 144: p. 31-43.
4. Fenik, J., M. Tankiewicz, and M. Biziuk, Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011. 30: p. 814-826.
5. 涂青宇, 參加 2013 年國際農藥殘留研討會. 2013, 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所.
6. 王宏文, 臺灣食品安全管理制度及執行之研究. 2012, 台灣大學公共政策與法律研究中心.
7. 農產品中的農藥殘留及安全問題. [cited 2015 3/11]; Available from: <https://foodsafety.gov.mo/c/sense/detail.aspx?id=f8bea06d-97f5-4931-81e9-1de2fdc761f2>.
8. WHO, F.a., Definitions for the Purposes of the Codex Alimentarius, in *Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual - Twelfth Edition*. 2001, FAO and WHO. p. 42.
9. 王大寧, 董益陽, 鄒明強, 農藥殘留檢測與監控技術. 2006: 化學工業出版社.
10. 黃慶文·李宏萍, 農產品安全管理與宣導教育-從農藥殘留檢驗談農作物安全, in *農政與農情*. 201205, 農業藥物毒物試驗所. p. 6.
11. Seiber, J.N. and L.A. Kleinschmidt, Contributions of Pesticide Residue Chemistry to Improving Food and Environmental Safety: Past and Present Accomplishments and Future Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. 59: p. 7536-7543.
12. 環境檢驗所 層析檢測方法總則. 2002. 中華民國 91 年 3 月 5 日 環署檢字第 0910014627 號公告修正為.
13. Pawliszyn, J., *Comprehensive Sampling and Sample Preparation Analytical Techniques for Scientists*. 2012.
14. 李仁傑, 王., 李茂榮, 新前處理技術—QuEChERS 之簡介. *科儀新知*, 2011-08. 183: p. 67-74.
15. 環境分析學會, 環境分析-原理與應用. 2012.
16. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. *Science*, 2006. 312(5771): p. 212-217.
17. *Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed*. 2013, EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL.
18. Lehotay, S.J., Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008. 27: p. 21.
19. Gómez-Ramos, M.M., et al., Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 2013. 1287: p. 24-37.
20. Poole, C.F., Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*, 2007. 1158: p. 241-50.
21. 楊凱智, 參加「歐洲農藥殘留研討會」報告. 2010. p. 11.

「雙北檢驗醫學雜誌」刊投稿須知

99/4/20 制定醫檢學術會刊
101/1/31 修訂醫檢學術會刊
102/4/28 修訂醫檢學術會刊
103/5/27 更名雙北檢驗醫學雜誌

「雙北檢驗醫學雜誌」主要報導檢驗醫學之相關學術刊物，包括：原著(original study)、綜說(review article)、臨床案例報告(case report)、醫檢新知、醫檢技術、及實驗室管理等。醫檢學術會刊自 103 年 5 月更名改「雙北檢驗醫學雜誌」，為雙月出刊，每月刊登 3 篇，主要以網路刊登發行。雙北檢驗醫學雜誌編輯委員對來稿有刪改權及刊載決定權，以下為本會刊之投稿須知

雙北檢驗醫學雜誌相關稿件：

1. 歡迎檢驗醫學相關報導或其他論述文章，以未曾刊登其他雜誌者為限，文稿以中文撰寫為原則。
2. 撰寫格式
 - (1) 原著：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、材料與方法、結果、討論、參考文獻。
 - (2) 綜述：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、內容(段落主題)、結論、參考文獻。
 - (3) 案例報告：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、案例報告內容、討論、參考文獻。
 - (4) 其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理等：比照綜述格式。

首頁：包括題目、作者、摘要(200~300 字內)、關鍵詞(3~5 個)、服務單位、連絡作

者姓名、服務單位、連絡地址及電話、e-mail 信箱網址。

本文（第二頁）：依上述各屬性文章撰寫格式撰寫主文。

表格及圖片說明頁：依本文順序置於本文之後。

3. 版面設定：上：2.54cm、下：2.54cm、左：3.17cm、右：3.17cm。文章內容規定：中文字體以標楷體、英文以 Times New Roman；字型大小 12，標題字型大小 14，行間距為二空格(double spaced)。
4. 「雜誌」內容以電腦打字黑白稿方式呈現，所附圖片及圖表必須清晰、圖、表備註說明以中文方式撰寫。
5. 「雜誌」內容引用他人資料要註明出處；參考資料按引用(參考)先後順序列出。
6. 參考資料的書寫方式，依照 CBE(Council of Biological Editors)手冊原則。期刊：請按(a)作者姓名。(b)發表年份。(c)篇名。(d)期刊名稱包括：卷數、號數及起訖頁數，依序撰寫。書籍：請按(a)著者姓名。(b)出版年度。題目，起訖頁數，編者姓名，(c)書名，卷數或版數。(d)出版商(發行所)，出版地。依序撰寫，五位作者以上時請列出前四位作者，後加上 et al.(斜體字)。作者人數在四位以內者，則全部列出。參考文獻必須標示於句尾[*]。

範例：

- (1) Benamer H, Steg PG, Benessiano J, Vicaute E, et al.1998.
 - (2) Comparison of the Prognostic value of C-reactive Protein and Troponin I in patients with unstable angina pectoris. Am J Cardiol. 82: 845-850.
 - (3) 何敏夫。2000。第七章醣類，250-258 頁，何敏夫著，臨床化學，第三版。合記圖書出版社，台北。
7. 一般稿件篇幅約為 3000 字內。
 8. 投稿稿件範例如附件。

附件：投稿稿件範例

首頁

投稿題目

作者

服務單位(XX 醫院 XX 科)

摘要

(200~300 字)

關鍵詞：3~5 個

通訊作者：

連絡電話：

e-mail：

連絡地址：

民國??年?月?日受理；民國??年 ? 月 ???日受理刊登


第二頁

原著：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻



材料與方法

結果

討論


參考文獻

綜述：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻



內容(段落主題)

主題一

主題二

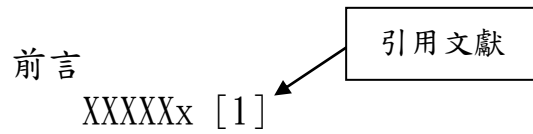
主題三

以此類推

結論

參考文獻

案例報告：依序撰寫

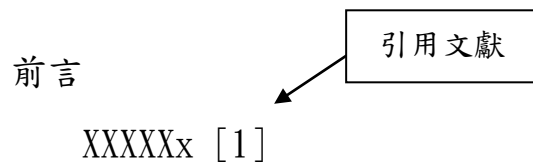


案例報告內容

討論

參考文獻

其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理：依序撰寫



內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

以此類推

結論

參考文獻