



感染症分生檢驗檢體之 收集、傳送、處理與儲存

TSLM 分 1-09A-01

台灣醫事檢驗學會 www.labmed.org.tw

Taiwan Society of Laboratory Medicine

感染症分生檢驗檢體之收集、傳送、處理與儲存

2008/07/11

前言

分子生物檢測方法越來越廣泛應用於臨床檢驗。本文件的目的是針對引起感染症的病原體在進行分生檢測時，將檢體的收集、傳送、處理及儲存等方法提供建議，希望盡量減少因檢驗前程序的因素造成檢驗結果的差異。

範圍

1. 提供感染症分生檢體收集、傳送、處理及儲存方法的建議。
2. 分生方法的品質保證，因需考量到檢驗程序的驗證等，故不包含在此文件範圍。

標準防範措施

由於不確定檢體中可能含有致病原，因此所有檢體都要依據標準防護措施(standard precautions)處理。標準防護措施包含所有致病原的傳染防範，比全面防護措施(universal precautions)強調的血液致病原(blood-borne pathogens)傳染防範更加複雜。不管是標準防護措施或全面防護措施都可以參考下列第 1 及 2 項資料。針對實驗室的儀器或相關物質的傳染防範，則可參考第 3 項資料。

1. Garner JS, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 1996; 17(1):53-80.
2. U.S. Department of Health and Human Services (BMBL), CDC, and NIH. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition, 1999, available at: <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb14/bmb14toc.htm>
3. CLSI document M29—Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections.

檢體收集

適當的檢體處理對檢體的完整性及其核酸的定性、定量檢測都非常重要。不適當的檢體處理將導致核酸的降解(degradation)，繼而錯估病人身上感染原的數量。

1. 分析物質/檢體的基值效應 (matrix effect)
不同的檢體別需考慮到其檢體本身的特性而應該有不同的處理方式。
2. 檢體標示與收集
檢驗收集、標示及處理都要考慮到病人隱私權的保障。
 - (1). 檢體核對
收集檢體時，病人身份與檢體的核對非常重要。所收集的檢體必須要有牢固的標示，其內容至少包括：一個辨識號碼、收集日期、收集時間、收集者姓名及檢體來源。
 - (2). 檢驗申請單的訊息

- ◆ 唯一的辨識號碼
- ◆ 檢體處理編號(accessioning number)
- ◆ 病人姓名
- ◆ 病人生日
- ◆ 檢體收集日期
- ◆ 性別（如果有需要）
- ◆ 種族（如果有需要）
- ◆ 檢體別
- ◆ 與臨床及實驗室有重大關係的訊息
- ◆ 醫師姓名
- ◆ 收集檢體的單位
- ◆ 收費資料（如果有需要）
- ◆ 其他需要的訊息

(3). 檢體收集

處理檢體時應戴手套，除了可以防止檢體上的感染原傳播，也可以防止工作人員的細胞掉落而污染檢體。檢體處理時要考慮到潛在的干擾物質及污染來源，因此在建立檢測系統時，必須給檢體收集人員及實驗室人員此方面的教育訓練。檢體一旦送到實驗室後，應該儘速記錄於實驗室資訊系統或醫院資訊系統中。

實驗室必須根據不同檢驗方法、不同檢體別設立退件標準，且這些資訊必須成為標準作業手冊的一部份。通常實驗室必須按照退件標準執行退件，但是在某些特殊狀況下，如檢體符合退件條件但醫師要求一定要進行此檢驗時，則需要經過實驗室負責人或指定代理人同意後才能執行檢驗。同樣的，如果實驗室接到不符合一般受理條件的檢驗要求時，也必須經過負責人同意，並留有記錄，才能執行此項檢驗。

(4). 血液與骨髓抽取物使用的抗凝劑

依不同檢體種類選擇含適當抗凝劑或添加物的容器，在選擇容器時需要注意檢體容量與添加物的比例。已知 Heparin 及 Heme 對 PCR 反應有潛在抑制影響，所以一般建議以 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 或 acid citrate dextrose (ACD) 作為收集血漿或骨髓抽取物的抗凝劑。如果要檢測的對象是細胞內的 RNA 時，則建議事先在容器內加入 RNA 穩定劑，或於檢體收集完後儘速加入 RNA 穩定劑。

(5). 組織檢體收集

通常感染原核酸只存在於組織時，才會以組織當作感染症分生檢測的檢體來源。

懷疑有感染時，醫師可能取下比較大的組織檢體（大於1-2 公克）或組織切片做顯微鏡（光學、電子或免疫螢光染色）下的觀察，如果要從這些檢體中萃取DNA或RNA，應該要小心維持檢體的濕度，建議將檢體以無菌生理食鹽水浸濕的無菌紗布或濾紙包裹。

DNA與RNA在不同組織的穩定度有所不同。通常來說，不可保存在22-25°C，最理想的狀況是將組織迅速的放入液態氮或其它核酸保存劑中保存。如果無法做到，至少應該將組織冰浴保存或傳送。檢體送到實驗室後，應該儘速放入適當的保存液中以

防止核酸的降解。

因為在手術過程中患者通常會被麻醉，且缺乏將核酸做穩定的處理步驟，故常會有組織缺氧的問題，繼而導致基因表現程度的改變。一旦組織缺氧，pH值會降低，核酸的產量會減少。

(6). 尿道拭子與子宮頸拭子

採集男性尿道檢體的拭子，棉頭材質應為 PE (polyester)，拭子握柄材質為不鏽鋼或塑膠；採集女性生殖道的拭子，棉頭材質可為 PE 或人造纖維(rayon)。採集後應放入廠商建議的傳送培養基中。

檢體傳送與儲存

檢體運送除應按照所使用之試劑廠商建議外（實驗室自行開發方法應自行規範），也應遵守相關法規規定。

實驗室有責任提供檢體採集及傳送者（包括快遞公司）相關注意事項，包括：檢體採集日期與時間、寄送日期、實驗室收到的日期與溫度等。實驗室可依據過去累積的經驗針對不同檢體別設定不同的條件。

檢體儲存要注意到不能讓檢體中的核酸發生降解情形，RNA 比 DNA 更容易發生。另外，也要注意影響定量檢驗正確性的因素，例如在檢體收集過程中，有可能會刺激而造成 mRNA 增加。

1. 檢體運送建議

檢體的包裝與運送需遵照法規的要求，每個國家、地區要求可能不同。近來在美國，檢體的運送可能會被以 gamma 射線或是粒子射出儀器進行消毒，這樣的過程是否會影響分生檢驗的結果，目前的研究很有限，還無法做出結論。

2. 純化後 DNA 的儲存

DNA 是相對穩定的大分子，甚至可以從室溫儲存 8 天之久的血液中成功萃取出來。一旦萃取之後，在 2-8°C 環境下可以至少穩定一年。一般來說，DNA 是以溶液的方式儲存。如果萃取後幾天內就要進行 PCR 或以酵素進行切割反應，可以去離子水溶開即可，但是此方法其 pH 值容易變動，DNA 有降解的可能，所以如果考量到此點，可以將 DNA 溶在 pH 7.2 的 Tris/EDTA 緩衝液中。

純化過的 DNA 放在 TE (Tris-EDTA) 緩衝液中，於室溫下可以保存 26 週，如果沒有 DNase 的污染，2-8°C 下至少可以保存一年，-20°C 可達 7 年，-70°C 以下則至少保存 7 年以上。純度有問題的 DNA 應該保存在 -20°C 或更低溫度以保持 DNA 的完整性。存放 DNA 的冰箱不應該有自動除霜(frost-free)的功能，因為冰凍解凍的溫度循環，會造成核酸的斷裂退化。DNA 長期保存要考慮到辨識的問題，一般建議將 DNA primary stock solution 保存在 -70°C 或更低的環境下，以減少 DNases 的影響。但若後續需要多次的檢測，為避免重複冷凍解凍的問題，可以將 DNA 分裝多管保存，但是要注意避免污染的問題。

存放的容器建議以疏水性塑膠試管存放，且在蓋子上最好有塑膠襯墊設計可以緊閉避免蒸發。塑膠試管的材質也要注意，Polypropylene 與 DNA 的吸附有關，特別是高張力離子濃度。Polyethylene 比 Polypropylene 更容易抓住 DNA。Polyallomer 試管與某些

特殊處理過的 Polypropylene 試管更適合作 DNA 的儲存使用。

3. 純化後 RNA 的儲存

RNA 是脆弱的大分子，純化後的 RNA 最好以乙醇沈澱後儲存在 -70°C 或更低溫的環境。RNA 的儲存，應該使用無菌、疏水性材質，且以 diethylpyrocarbonate (DEPC) 水處理過，且未被沒戴手套的手碰觸過的容器。微鹼性 (pH 7.1-7.5) 的環境較中性或酸性溶液適合儲存 RNA。純化過的 RNA 在第一次冷凍解凍後可以穩定 3 小時，但是第二次冷凍解凍後就會使 RNA 降解。

因為 RNA 容易降解及被誘導，建議抽取血液時能直接放到含 RNA 穩定劑的試管中，組織的部分立刻放到含 RNA 穩定劑的試管或直接放到液態氮中保存。已經冷凍的檢體應該以乾冰運送，且在 RNA 萃取前不要解凍。不管 RNA 要保存多久，應該都要放在 -70°C 或更低溫度保存，因為 RNase 即使在 -20°C 仍會降解 RNA。

4. 特別檢體別處理建議

分生檢驗結果的可信度常受檢體收集、傳送及儲存等因素影響，包括收集的步驟、核酸的特性 (DNA 或 RNA，人體核酸或致病原核酸) 以及要作的檢驗方法等。

本文主要內容是針對造成感染症的致病原核酸，因此需要考慮致病原的生命週期及感染複製的位置，這都是檢體別選擇、採集及處理方法要考量的部分。

(1). 全血、血清及血漿

雖然 EDTA 是收集全血或血漿比較適當的抗凝劑，但是還是有可能干擾檢驗方法，所以檢體的收集、傳送及儲存還是要遵照試劑說明書的規範。當要檢驗的標的物是 RNA，如 HIV 或 HCV 時，檢體需要儘速離心，若是使用沒有 gel 可以將血漿與血球分離的試管，需在 4 小時內將血漿分裝到另一個容器中；如果是用有 gel 的試管，則可以使用原管運送到實驗室。分裝或離心後與血球分離之血漿檢體可以在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 穩定 5 天， -20 或 -70°C 穩定更久。但如果可行，RNA 之萃取還是建議在檢體採集後 4 小時內進行，否則檢體以冷凍保存 (-20 或 -70°C 甚至更低的溫度) 為宜。

如果檢驗的標的物是 DNA 時，血液檢體在 DNA 萃取前可以在室溫擺放 24 小時， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 擺放 72 小時。

不管是 DNA 或 RNA 為檢驗標的之血清檢體，建議運送時最好以乾冰運送，若無乾冰，可在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 環境運送；血漿檢體則可以在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 環境運送，保存在 -20°C 。

(2). Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL 檢體的收集及分裝應該要根據廠商建議或方法特性而訂定，而且需要在收集後 24 小時內傳送及檢測，如果在 24 小時內無法檢測時，於 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱可以保存 72 小時， -70°C 以下冰箱保存更久。為了檢測結核菌而收集的檢體，在冷藏保存之前應該要先執行去污及消化前處理。

(3). 骨髓抽取物 (Bone Marrow Aspirate, BMA)

A、DNA

骨髓應抽到含有 EDTA 抗凝劑的針筒中 (不建議使用 Heparin)。實驗室人員應儘速處理送到實驗室的骨髓檢體。如果是為了 DNA 的萃取，骨髓檢體在處理前應先儲

存在 2-8°C，細胞 lysis 步驟應該在收到檢體後 72 小時內進行。如果需要長期保存，骨髓檢體可以先將紅血球去除後置放於-20°C 數個月之久。雖然已有報告顯示可以從冷凍含 EDTA 抗凝劑之全血中萃取出完整 DNA，但是還是不建議在萃取 DNA 前將全血冰凍保存，包括含有血球的骨髓檢體亦然，因為在冷凍解凍過程中，會有已知會抑制 PCR 反應的 heme 釋出，故建議含血球的檢體在冷凍之前應該要將紅血球去除。

B、RNA

除上述 DNA 萃取注意事項外，萃取 RNA 需再留意以下事項：骨髓檢體收集後應儘速加入 RNA 穩定劑，且立即以冰浴方式傳送到實驗室，如果檢體不穩定或無法冷凍保存時，萃取工作應該在 1-4 小時內進行。

(4). Buffy coat

如果是為了萃取 DNA 而無法在三天內進行萃取動作，則可以將 buffy coat 分離出來冰凍在-70°C 以下。如果是為了 Epstein-Barr virus 的檢測，建議檢體應該要用乾冰傳送。如果是要萃取 RNA，應該在檢體收集後 1-4 小時內進行，不然就應將 buffy coat 放入 RNA 穩定劑中暫放於室溫。對於嗜伊紅血球過多或有高度內生性 RNase 的病人，可以以 buffy coat 檢體解決血球檢體可能帶來的問題。

(5). CSF

A、DNA

CSF 檢體應該以 2-8°C 環境傳送，如果是用來檢測 DNA 病毒(如 HSV、CMV、EBV、VZV 等)且無法立即處理時，應該保存在-20°C、-70°C 或更低的溫度。

B、RNA

要檢測 RNA 的 CSF 檢體應該立即以冰浴傳送，且在 1-4 小時內萃取 RNA，如果無法及時萃取，應該要在去除紅血球之後立即冷凍保存。冷凍的 CSF 檢體建議以乾冰傳送。

(6). 細針抽取物 (Fine needle aspirate, FNA)

DNA 的萃取注意事項同 CSF 檢體。RNA 萃取部分，應該在去除紅血球後立即冰浴或放入 RNA 穩定劑，且需在檢體收集後 2-4 小時內進行萃取，如果無法在預定時間內萃取，需將紅血球去除後置放於-70°C 或更低的溫度儲存，冷凍的檢體可以穩定 2-4 星期。放入 RNA 穩定劑的檢體之穩定度則要參考廠商說明書。

(7). 組織

A、DNA

組織檢體需以冰浴傳送、保存在 2-8°C 且於 24 小時內進行 DNA 萃取，否則就要立即冷凍保存。一般說來，組織的 DNA 可以在 2-8°C 穩定 24 小時、-20°C 至少二星期，-70°C 或更低溫度至少二年，若組織檢體含有血球，冷凍之前需要先用無菌生理食鹽水沖洗。

如果組織檢體只要進行核酸分析，應該以冰浴傳送，但若還要進行 cytogenetic 或 flow cytometric 分析時，則建議以室溫傳送以保持細胞的活性。

B、RNA

注意事項同 DAN 萃取，另外要注意的有：組織檢體應該放在穩定的溶液中以 -70°C 或更低溫度保存，或是在收集後一小時內進行萃取。組織的 RNA 可以在 -70°C 或更低溫度下至少穩定二年。

(8). 痰液檢體

要進行 DNA 分析的痰液檢體，應該以無菌容器收集以室溫傳送。但是如果無法在 30 分鐘內傳送者，需要暫時冷藏保存，如果運送過程所需時間會大於 30 分鐘時，則需以 $4-8^{\circ}\text{C}$ 條件傳送。

實驗室收到檢體無法立即處理時，應該將檢體冷藏保存。要作結核菌分生檢驗的檢體，理論上可以穩定的時間更久，但是臨床上需要考慮到檢體如果同時要做培養及分生檢驗時，其穩定時間可能因此縮短（例如結核分枝桿菌群分生檢驗之檢體穩定時間可以長達 14-21 天）。如果將檢體放在 -70°C 或更低溫度至少可以保存一年。不過適當的保存方法及穩定的時間還是要以使用的萃取試劑之廠商說明書建議為主。

(9). 糞便檢體

糞便檢體的保存與傳送需視檢測方法不同而異，有些方法要求檢體需要放置在含保存液的容器內，有些方法要求放在無保存劑的容器內以 $2-8^{\circ}\text{C}$ 條件傳送。

(10). 子宮頸拭子與尿道拭子

檢體的採集與傳送方式應該要遵循檢驗試劑的要求。DNA 可以在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 環境下穩定 10 天。要檢測微生物的存在時必須注意到幾個可能干擾的因素，包括宿主細胞的比例、有無其他微生物的存在及檢體中分泌物或排出物等都可能影響後續的檢測。

(11). 尿液檢體

尿液檢體的數量、尿液留取的時間、病人有無發炎或有其他因子存在都可能影響核酸的萃取。應該要避免在室溫傳送新鮮留取未處理之尿液檢體，因為低的 pH 值及高的尿素濃度都會很快地降解 DNA，尤其在 25°C 以上的環境下。檢體處理方式應該要參照廠商試劑說明，且一旦開始處理，檢體需要儲存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 環境。

檢體準備

1. 增加病原體取得量與檢體濃縮方法

分生檢驗中通常藉由放大(amplification)步驟來增加檢測的敏感度，例如Nested PCR可視為提高敏感度的方法，另外，也可以用去除放大反應中干擾物的方法來達到增加敏感度（可以參考CLSI/NCCLS document MM3—*Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases*中”The role of inhibitory substances in PCR”）。這些方法與增加病原體取得量或檢體濃縮的方式不同。實驗室用來增加病原體取得的方法包括利用離心方式將檢體中混雜的血球、黏液、發炎細胞及其他碎片等可能干擾分析方法的物質去除，或是將病原體的DNA或RNA從檢體中分離出來並濃縮。上述幾種方式可因檢體別、病原體種類及檢測目的、檢測方法的不同等，而同時或個別使用。

(1). 不含細胞之體液檢體中的核酸濃縮(concentration of nucleic acids (DNA/RNA) in cell-free biological fluids)

將血漿及不含細胞之體液檢體以高速離心或過濾，再以較小的體積溶開核酸，以達到濃縮的目的。

(2). 高速離心提高血清及血漿中的病原體濃度

當檢體中的病原體量很低時，將檢體濃縮可以提高病原體的偵測或定量敏感度。在 HIV 及 HBV 的檢測上，通常是以定量的血漿或血清（0.5 或 1 mL）進行高速離心（24,000 xg, 60 分鐘）。高速離心可以將病毒沉降下來，然後以比原檢體小的體積溶開這些沉降物質。要注意的是，高速離心可能會將檢體中的蛋白質及其他可能干擾檢測的物質一起離心下來。

(3). 藉由過濾法提高病原體濃度

可以藉由抽真空沖洗或離心超過濾的方法來提高病原體濃度。

(4). 提高 CSF 及其他含細胞的體液中的病原體濃度

CSF、尿液、肺泡沖洗液、vitreous fluid、culture fluids 及其他體液會因為檢體中存在的干擾物質不同而需要不同的處理方法。可以使用上述的離心或過濾法來提高病原體濃度。

(5). 提高糞便檢體的病原體濃度

糞便檢體首先需要以 pH 7.4 的緩衝液稀釋之後離心、過濾去除不要的雜質，再將過濾液高速離心提高病原體濃度。

2. 病毒核酸準備

病毒核酸組成可以是雙股或單股 DNA、雙股或單股 RNA，可以是線形、圓形，其組成大小也有很多不同的變化。病毒複製生活史也各有不同，所以可能在宿主的細胞或細胞以外檢體被分離出來。

與宿主 genomes 合成一體的病毒 DNA 萃取方法與宿主 genomic DNA 純化方法相同。同樣的，其病毒 RNA 萃取方法與宿主 RNA 純化方法也相同。未與宿主 genomes 合成一體的病毒核酸萃取技術也類似，但是要注意幾個問題，包括檢體的選擇、檢體的濃縮及檢體分解等。有些病毒非常小或是與一些蛋白質緊密結合，會有分離上的困難。

萃取方法可包括 Organic Extraction Methods、Target Capture Method 及 Silica Technology。濃縮檢體方法可利用離心、過濾或使用陽離子介面活性劑處理的方法。