

計畫編號：DOH91-DC-1050

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

# 台灣山地鄉之隱孢子蟲症 與環孢子蟲症的監測

研究報告

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：蔡洪又欽

研究人員：蔡洪又欽、吳金正、李亞恬、王怡力

執行期間： 92年1月1日至92年12月31日

## 目錄

1. 封面	-----	(1)
2. 目錄	-----	(2)
3. 摘要	-----	
		(3-5)
4. 前言	-----	(6-8)
5. 材料與方法	-----	(9-16)
6. 結果	-----	(17-18)
7. 討論	-----	(19)
8. 結論與建議	-----	(20)
9. 參考文獻	-----	(21-23)
10. 圖表	-----	(24-30)



## 中文摘要

本次計畫我們利用前一年已測出合適的隱孢子蟲單次聚合酶連鎖反應，加上更具敏感性的巢式聚合酶連鎖反應，作為陽性對照；在環孢子蟲方面，則重新設計引子，使可利用艾美球蟲作為其聚合酶連鎖反應之陽性對照測試反應適宜之條件後，再以限制酶區分出人致病性環孢子蟲 (*C. cayetanensis*)。接著對山泉水或簡易自來水系統的山地鄉進行水源調查，除了利用傳統抗酸性色鏡檢外，並以目前試驗好的 PCR 條件結果來做比較。

水源調查方面，我們目前取得台北縣烏來鄉（忠治村二處）、台中縣和平鄉、南投縣信義鄉（羅娜與東埔）與仁愛鄉共六個採樣點，經由鏡檢結果可以在烏來鄉及信義鄉發現疑似之隱孢子蟲卵囊，而 PCR 的反應中於和平鄉、信義鄉（羅娜與東埔）可獲得隱孢子蟲專一性片段；另外，在和平鄉、信義鄉（羅娜與東埔）與仁愛鄉 4 個採樣點可獲得環孢子蟲與艾美球蟲之共同片段，經限制酶分析後，確認其皆非 *C. cayetanensis*。

而在烏來國小學童檢體方面的檢測，109 件檢體中，11 件抗酸性染色呈陽性，而以 PCR 方法檢測，僅有 3 件呈陽性，陽性率約為 3%。

本次實驗證實所測試出之各種聚合酶連鎖反應可成功運用於水

源檢體的檢測，並可用此方法延續執行第三年計畫。

中文關鍵詞：隱孢子蟲、環孢子蟲、山地鄉、簡易自來水、聚合酶連鎖反應、限制酶分析。

## Abstract

In addition to polymerase chain reaction (PCR) developed last year, nested PCR, a more sensitive method for detection of *Cryptosporidium* was used in this year. A new set of primers for nested PCR was redesigned for *Cyclospora*, and the restriction profiles of the PCR production were used for differentiation of pathogenic vs. non-pathogenic. Acid-fast stain technique and PCR were used for analysis of water samples collected.

One sample each was collected from Ho-Ping of Taichung county and Jen-Ai of Nan-Tao county; two samples each from Wu-Lai of Taipei county and Hsin-Yee of Nan-Tao county. Positive results were shown in the samples from Wu-Lai and Hsin-Yee by microscopy, and in the sample from Ho-Ping and Hsin-Yee by PCR. Although DNA fragments of 382 bp by nested-PCR for *Cyclospora* were shown in the water samples of Ho-Ping, Hsin-Yee and Jen-Ai, the results of RFLP shown those were not *Cyclospora cayentanensis*.

A total of 109 stool samples from students in Wu-Lai Primary School, 11 of them were positive by acid-fast stain technique, whereas only 3 (3%) of them were positive by PCR for *Cryptosporidium*.

It is shown the detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora cayentanensis* in the water system can be carried on by PCR.

Keyword : *Cryptosporidium*、*Cyclospora*、mountain area、PCR、RFLP

## 一、前言：

隱孢子蟲為一寄生性原蟲，大小在四至六微米之間，分布世界各地且可在許多動物種類包括哺乳動物，鳥類，爬蟲類，與魚類等發現本病原(1)，而現今隱孢子蟲(*Cryptosporidium*)約有二十多種 species，主要種類有九種，分別為感染哺乳動物的 *C. parvum*、感染齧齒類的 *C. muris* 和天竺鼠的 *C. wairi*、感染鳥類的 *C. meleagridis* 與 *C. baileyi*、感染爬蟲類 *C. serpentis*、感染魚類的 *C. nasorum* 和目前新發現感染狗的 *C. canis* 及感染貓的 *C. felis*。其中 *C. parvum*、*C. meleagridis*、*C. canis* 及 *C. felis* 皆有人類感染報告，只不過引起國外流行的種類主要為 *C. parvum*，其他三個種類目前只在免疫缺失之病人中發現(2)。而環孢子蟲和隱孢子蟲一樣，是一種細胞內寄生性原蟲，大小約 8-10 $\mu$ m，具雙層膜，每一個卵囊包含有二個 sporocysts (4.0 $\times$ 6.3 $\mu$ m)，每個 sporocyst 含有二個 sporozoites(1.2 $\times$ 9.0 $\mu$ m)，現今有 17 個已知的 species，但目前確定可感染人類的僅有 *C. cayetenesis*(3)。

由於隱孢子蟲與環孢子蟲能夠經由污染的水及食物傳播，因其對環境有強韌的抵抗力，甚至可在自然環境下生存數個月之久，且卵囊對加氯處理的感受性很低，一般的自來水處理系統無法殺滅此病原，

所以很有可能經由山泉水或簡易的自來水處理系統傳播(10,11,12)。以隱孢子蟲為例，1993年，威斯康辛州的密渦基市曾爆發由水而引起的流行，感染人口據估計超過四十萬人以上(4)。在過去的二十年間，隱孢子蟲症已成為常見藉由水源傳播的疾病之一。為了防止此病之發生，美國環境保護局於1998年完成了「國家主要飲食安全規則」，規定來自地表如湖泊、水庫、河流或是接近地表的地下水的供應水源，隱孢子蟲的含量必須在限制之內。根據以往文獻指出，隱孢子蟲與環孢子蟲於全世界皆有分佈，年紀尚小的兒童及老年人，其免疫系統較弱，屬於感染機會較大的族群(5,6)。

傳統檢測方法主要是利用染色和鏡檢(7,8)，然而由於偽陽性之抗酸性染色物質的存在，未受訓練之人員不易正確檢出，同時鏡檢方法也無法作種別鑑定，所以利用分子生物技術的方法如PCR技術來作診斷，故本計畫延續第一年計畫對這兩種疾病作系統性的檢測與探討(9)。

因環孢子蟲在國內並無病例發現，檢體取得不便，而且現今並無法成功培養，所以採用親緣關係相近(同屬於艾美球蟲科)的艾美球蟲(*Eimeria Tenella*)作為陽性對照，來進行巢式PCR反應；由於*E. tenella*可以人工大量培養，且之前所用之第二組引子(mCYCF3E和



mCYCR4B ) 無法區分出人致病性及其他種類之環孢子蟲，所以同時針對環孢子蟲與 *Eimeria* species 重新設計第二組引子 ( CE456 和 CE837 )，使 *E. tenella* 可作為陽性對照來測試各種 PCR 反應條件，以彌補環孢子蟲檢體不足的問題；進行 nested PCR 後，針對環孢子蟲與 *Eimeria* species 部分序列的不同，再使用限制酵素 ( *APOI* ) 將致病性環孢子蟲 ( *C. cayetenesis* ) 區分出來。

## 二、材料與方法：

### A. 檢體

#### 1. 陽性對照

##### 1) 隱孢子蟲 (*Cryptosporidium* spp.)

由病羊腸道及其糞便取得隱孢子蟲檢體後，利用倉鼠來保存隱孢子蟲。先將倉鼠以 dexamethasone 減弱其免疫力，再餵其隱孢子蟲卵囊加以感染，幾天後可由倉鼠所排出的糞便中得到所需檢體。得到的檢體置於 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  加以保存。

##### 2) 環孢子蟲 (*Cyclospora cayetenesis*)

由於環孢子蟲目前在國內尚未有陽性病例，輾轉由國外取得一小瓶檢體，經抗酸性染色及芽孢化處理，確認含有環孢子蟲，可作為陽性對照。

##### 3) 艾美球蟲 (*Eimeria tenella*)

#### 2. 水源檢體：

檢體採自於台北縣烏來鄉(忠治村)及台中縣和平鄉(南勢村)南投縣[信義鄉(羅娜、東埔)、仁愛鄉(南豐村)]山地鄉之山泉水和簡易自來水。其採集是仿效 Aldom 等人之方法，再加以修改 (13,14)。利用

原蟲採樣器採集水源檢體 50 公升並且經過孔徑 3.0  $\mu\text{m}$  之 cellulose

第 9 頁

acetate 濾紙過濾 (Millipore)。將濾紙溶解於 100% acetone，以 2300 xg 離心 15 分鐘，去上清液；沉澱物依次以 100% acetone、95% ethanol，70% ethanol 及磷酸鹽緩衝液(PBS)〔含 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Tween 80 及 0.001% Sigma Antifoam (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)〕清洗，所得之沉澱物即為待測之水源檢體，染色後可以顯微鏡鏡檢或以 PCR 方式檢驗。

### 3. 烏來國小學童糞便檢體

收取學童糞便共 109 件，將檢體加入 2.5% 重鉻酸鉀後放置於 4°C 冰箱保存。

#### B. 抽取 DNA：

使用 Mo Bio UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit 來抽取水源檢體 DNA。其方法步驟如下：

將經溶膜方法所析出之水源沉澱物置於 2 ml Bead Solution tube，加入 60  $\mu\text{l}$  之 S1 溶液混合均勻後再加入 200  $\mu\text{l}$  之 IRS(Inhibitor Removal Solution)溶液，於 Vortex 上以最大速率震動 10 分鐘後，以 10,000 xg 速率離心 30 秒，取上清液於新的 1.5 ml 離心管。取 250  $\mu\text{l}$

之 S2 溶液加入上清液中，混合均勻後放置 4°C 中 5 分鐘。以 10,000 xg 速率離心 1 分鐘，取上清液置於新的 1.5 ml 離心管，加入 900 µl 之

第 10 頁

S3 溶液充分混合。將全部溶液分成 4 次加入於 spin filter，每次溶液加入 spin filter 後需要經 10,000 xg 速率離心 1 分鐘並移除過濾液。再加 300 µl 之 S4 溶液於 spin filter 中，以 10,000 xg 速率離心 30 秒，倒去過濾液後再以 10,000 xg 速率離心 1 分鐘。將 filter 置於新的 1.5 ml 離心管，以 50 µl 之 S5 溶液加入 filter 中，以 10,000 xg 速率離心 1 分鐘後收集其過濾液即為 DNA sample。可將其直接用於 PCR 反應或置於-20°C 冰箱中保存。

## C. PCR 條件：

### 1. 隱孢子蟲

#### 1) 單次 PCR

反應是參照 Patel 等人之方法(15)，PCR 混合成分包含：(1) 10 倍緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH9.0, 500 mM KCl, 0.1%(w/v)gelatin, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100), 5µl；(2) DNA sample, 10µl；(3) 10µM forward primer(CP3R,5'- GAG GGA CTT TGT ATG TTT AAT ACA GG-3')和 reverse primer(B,5'- CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3')，各 2µl；(4) 10 mM dNTP, 0.25µl；

(5) Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ life technologies, Brazil, 5U/μl), 0.5μl; (6) 滅菌水, 30.75μl, 全部體積為 50μl 置於 0.2 ml 之 Thermo-tube

第 11 頁

中。將 tubes 於 PCR 機器(icycler™,Bio-Rad)以 94°C denaturation 3 分鐘後,再經 35 cycles(94°C denaturation 1 分鐘,63°C annealing 2 分鐘,72°C extension 1 分鐘),最後於 72°C 行完整 extension 7 分鐘達成整個 DNA 擴大效果。

## 2) 巢式 PCR (Nested PCR)

兩段式的巢式 PCR 反應是參照 Xiao 等人之方法 (16), 惟在操作條件上略有不同。如有隱孢子蟲的核酸, 此法可將其聚合出來。第一段反應中, 於 0.2 ml 之 thermo-tube 中放入 100μl 反應液, 分別為: (1) 10 倍的緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1% Triton X-100), 10μl; (2) 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 12μl; (3) DNA 檢體, 2μl; (4) 10μM forward primer (Out-1, 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3')和 reverse primer (Out-2, 5'- CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA-3')各 4μl; (5) 10 mM dNTP, 2μl; (6) Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ life technologies, Brazil, 5U/μl), 0.5μl 及 (7) 滅菌水, 65.5μl。將 tubes 置入 PCR 機器以 94°C 3 分鐘使檢體中雙股 DNA 解離, 再經 35 cycles (denaturation, 94°C 45 秒; annealing, 59°C 45 秒;

elongation, 72°C 1 分鐘)的增幅過程，在 72°C 進行完整的 elongation 7 分鐘。經聚合後得到之核酸片段長度約為 1320 bp。

第 12 頁

進一步之 PCR 反應，thermo-tube 中亦放入 100 $\mu$ l 反應液，但成分和濃度略有不同；分別為：(1) 10 倍之緩衝液，10 $\mu$ l；(2) 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 $\mu$ l；(3) 第一段 PCR 產物，2 $\mu$ l；(4) 10 $\mu$ M forward primer (All-1, 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3')和 reverse primer (All-2, 5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3') 各 4 $\mu$ l；(5) 10 mM dNTP, 2 $\mu$ l；(6) Taq DNA Polymerase, 0.5 $\mu$ l 及(7) 滅菌水, 69.5 $\mu$ l。反應條件如同第一次 PCR，經 35 cycles 擴增後，聚合出約 830 bp 之片段。

## 2. 環孢子蟲

### 巢式 PCR (Nested PCR)

第一段反應中，於 0.2 ml 之 thermo-tube 中放入 100 $\mu$ l 反應液，分別為：(1) 10 倍的緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 0.1 % gelatin, 1% Triton X-100), 10 $\mu$ l；(2) 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 $\mu$ l；(3) DNA 檢體, 10 $\mu$ l；(4) 10 $\mu$ M forward primer (CYCF1E: 5'-GGA ATT CCT ACC CAA TGA AAA CAG TTT -3')和 reverse primer (CYCR2B : 5'-CGG GAT CCA GGA GAA GCC AAG GTA GG -3')各 5 $\mu$ l；(5) 10 mM dNTP,

2 $\mu$ l ; (6) Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ life technologies, Brazil, 5U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 及(7) 滅菌水, 59 $\mu$ l。將 tubes 置入 PCR 機器以 95°C 5 分鐘

第 13 頁

使檢體中雙股 DNA 解離，再經 36 cycles (denaturation, 94°C 30 秒；annealing, 53°C 30 秒；elongation, 72°C 90 秒)的增幅過程，在 72°C 進行完整的 elongation 10 分鐘。經聚合後得到之核酸片段長度約為 651 bp。

進一步之 PCR 反應，thermo-tube 中亦放入 100 $\mu$ l 反應液，但成分和濃度略有不同；分別為：(1) 10 倍之緩衝液, 10 $\mu$ l；(2) 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 $\mu$ l；(3) 第一段 PCR 產物, 5 $\mu$ l；(4) 10 $\mu$ M forward primer (CE456：5'-TTC GAG GTA GTG ACG AGA-3')和 reverse primer (CE837：5'-ACA AAA TAG AAC CAA GGT CC-3') 各 5 $\mu$ l；(5) 10 mM dNTP, 2 $\mu$ l；(6) Taq DNA Polymerase, 1 $\mu$ l 及(7) 滅菌水, 64 $\mu$ l。反應條件如同第一次 PCR，僅 annealing 溫度更改為 56，經 36 cycles 擴增後，聚合出約 382 bp 之片段。

擴大完成之 DNA 產物可直接利用電泳方式於 2% agarose gels 以 ethidium bromide 給予染色，再用影像系統(Gel Doc 2000,Bio-Rad) 觀察。

#### **D. PCR 敏感度測試**

## 1. 隱孢子蟲

### 1) Nested PCR

第 14 頁

檢體經抗酸性染色計數後，分別以連續數目約 1、10、50、100、500 及 1000 個隱孢子蟲卵囊，各自用 Chelex-100 方法抽取 DNA 後再做 nested PCR 反應。

### 2) 單次 PCR

檢體經抗酸性染色計數後，分別以連續數目約 20、50、80、400、1000 個隱孢子蟲卵囊，如同前 nested PCR 測試方法，以 Chelex-100 抽取法取得 DNA 後，再進行單次 PCR 反應。

## 2. 環孢子蟲

以艾美球蟲取代環孢子蟲做 PCR 敏感度測試；檢體經直接鏡檢計數後沖下，分別以數目 1、2、5、10、14、30 及 122 個卵囊，各自用 Chelex-100 方法抽取 DNA 後再做 nested PCR 反應。

## E. 限制酶分析 (analysis by restriction enzyme ; RFLP)

Nested PCR 反應產物 3 $\mu$ l，10 $\times$  NEBuffer2 (100 mM NaCl，50 mM Tris-HCl，10 mM MgCl<sub>2</sub>，1 mM dithiothreitol，pH 7.9) 1 $\mu$ l，100 $\times$  BSA 1 $\mu$ l，Apo I (4U/ $\mu$ l) (New England BioLabs ; USA) 1 $\mu$ l，二次



水 4 $\mu$ l；反應總體積為 10 $\mu$ l，反應時間四小時。僅 *C. cayetanensis* 可被切成二個片段，分別為 319 及 63 bp。

第 15 頁

分別取 10 $\mu$ l 反應溶液加上 1 $\mu$ l 的 6 $\times$  dye 於 3% 洋菜膠 (3:1 Nusieve agarose gel) 上進行電泳分析，以 0.5 $\mu$ g/ml ethidium bromide (EtBr) 染色後，在紫外燈 312nm 照射下檢視增幅後的產物長度並與 50 bp 和 20 bp DNA ladder 長度指標比較判讀。

### 三、結果

陽性檢體經顯微鏡(400 x and 1000x)確認無誤後，才以此檢體試出聚合酶連鎖反應(PCR)合適條件。

PCR 實驗中，隱孢子蟲與環孢子蟲皆是以 18S rRNA gene 作為 target，以兩種形式 PCR, 單次 PCR 和巢式 PCR(nested PCR), 作為檢體之監測方法。隱孢子蟲於單次 PCR 中，可聚合出 422 bp 片段；而於巢式 PCR 則可聚合出約 830 bp 之片段。以艾美球蟲測試巢式 PCR 之合適條件後，再將此條件套用於環孢子蟲 PCR 檢測，同樣得到 382 bp 之片段。(圖一)。增幅出之 DNA 片段，皆經過定序分析，則可確認為隱孢子蟲、環孢子蟲及艾美球蟲之專一性片段。

在 PCR 敏感度測試中，隱孢子蟲之單次 PCR 之敏感度可達 20 個隱孢子蟲卵囊能被檢測出 (圖二 A)；而巢式 PCR 之敏感度，則可提高至 1 個 oocyst 即能被檢測 (圖二 B)。而以艾美球蟲取代環孢子蟲進行巢式 PCR 之敏感度方面，發現僅 1 個 oocyst 即可被檢測 (圖三)。

測試好合適條件及陽性對照之後，開始測試水源及鄉民糞便檢

體。在水源檢體方面，做了台北縣烏來鄉(忠治村二處)及台中縣和平鄉(南勢村)南投縣[信義鄉(羅娜、東埔)、仁愛鄉(南豐村)]山地鄉之山泉水和簡易自來水共六個採樣地點；結果發現，在抗酸性染色鏡檢部

第 17 頁

分，可在其中四處發現隱孢子蟲(烏來忠治村二處、南投信義鄉東埔、羅娜村)，但並無發現環孢子蟲；而在 PCR 實驗中，隱孢子蟲於 nested PCR 於台中縣和平鄉、南投信義鄉之羅娜及東埔呈陽性結果(圖四)；在環孢子蟲及艾美球蟲檢測方面，可在台中縣和平鄉、南投仁愛鄉、信義鄉之羅娜及東埔四處呈陽性結果，再以限制酶分析，結果發現其皆非致病性 *C. cayetenesis*(圖五、六)。之前烏來忠治村二處檢體抗酸性染色雖有檢出隱孢子蟲，但在 PCR 部分則是呈陰性反應；重新補做之烏來檢體卻仍未發現隱孢子蟲與環孢子蟲(抗酸性染色亦然)，之後會繼續採樣分析。

而在鄉民糞便檢體中，目前做了台北縣烏來國小學童共 109 個檢體，在抗酸性染色鏡檢結果，共有 11 個疑似隱孢子蟲陽性檢體；而在 PCR 實驗部分則僅發現 3 個隱孢子蟲陽性反應(圖七)。

#### 四、 討論

我們以之前建立好的鏡檢及 PCR 系統，應用在水源檢測及學童糞便檢體方面；鏡檢結果雖有陽性數據，但由於水源檢體具有許多泥沙和偽陽性顆粒，故仍需以 PCR 做進一步確認。在六處檢體中，除了台北縣烏來鄉還需繼續採樣分析外，其他四處地點(台中和平、南投信義與仁愛)，除了仁愛鄉外皆有隱孢子蟲陽性反應，尤其以東埔及和平兩地有較明顯之結果。在環孢子蟲方面，以艾美球蟲作為陽性對照測試巢式 PCR 條件後，可以套用於環孢子蟲的檢測，其後之限制酶分析亦能將 *C. cayetanensis* 區分出來，證實了以艾美球蟲檢測環孢子蟲的可行性；而在水源檢體方面，四處地點(台中和平、南投信義與仁愛)雖皆呈 PCR 陽性反應，但經限制酶分析結果並非為 *C. cayetanensis*。

烏來國小學童檢體中，109 件檢體中，11 件以抗酸性染色後鏡檢，雖有 11 件疑似具有隱孢子蟲卵囊，但由於數量不多且此染色不具專一性，故無法判別其為隱孢子蟲感染，而以較專一之 PCR 方法檢

測，實驗結果僅有 3 件呈陽性，陽性率約為 3%。

## 五、 結論與建議

以 PCR 方法檢測水源檢體中之隱孢子蟲，結果顯示六處地點有三處地方能夠檢測出隱孢子蟲，但卻無可感染人之環孢子蟲(*C. cayetenensis*)存在。而學童 109 件檢體中則有三個檢體呈隱孢子蟲陽性結果。

由於本次計畫中隱孢子蟲單次 PCR 之操作條件大都參照 Patel 之方式，雖然其文章說明此對引子(primers)對於 *C. parvum* 具專一性，但經 genbank 比對後發現，仍有其他 species 能被聚合出 422 bp 片段。為了更求專一性，於下一年計畫應設計出對於 *C. parvum* 具特異性之引子，如此才能證實做出之陽性結果為能造成流行性感染之種類。

在環孢子蟲巢式 PCR 方面，確定可用艾美球蟲作為陽性對照，解決環孢子蟲陽性檢體可能不足的問題，再利用限制酶酶 *Apo I* 區分出 *C. cayetanensis*；但由於其他 *Cyclospora* species 可感染人之外的靈長類、哺乳類、爬蟲類動物，是否為人畜共通尚待證實，故期望在

此片段中，根據部分序列的差異，再尋找另一限制酶來完整區分出環孢子蟲與艾美球蟲。

第 20 頁

## 六、參考文獻

1. Fayer R, Morgan U, Upton SJ, 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission ,detection and identification. *Int. J . Parasitol.* 30 : 1305–1322.
2. Lihua X, Una MM, Josef L, Ananias E, Michael A, William S, R.C.A T, Ronald F,Altat A.L,1999. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Applied And Environmental Microbiology.* 65:3386-3391
3. Shields JM and Olson BH. 2003. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int.J.Parasitol.* 33: 371-391
4. MacKenzi WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus Ms, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ,Addiss DG, Fox KR, Rose JB. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331 : 161-167.
5. O’Donoghue PJ, 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 85 : 525– 530.
6. Madico G, McDonald J, Gilman RH, Cabrera L, and Sterling CR. 1997.

- Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *Clin.Infect.Dis.* 24: 977-981
7. Visvesvara GS, Moura H, Kovacs-Nace E, Wallace S, and Eberhard ML. 1997. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. **J. Clin Microbiol.** 35 : 730–733.
8. Ma P, Soave R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147:824-828
9. Palmer A, Orland AND Kelth A, Lampel. 2000. Extraction-Free, Filter-Based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of Pathogenic Parasitic Protozoa. **J. Clin. Microbiol.** 38 : 2271–2277.
10. MacKenzi WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus Ms, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine** 331 : 161-167.
11. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling, C.R., 1997. Waterborne protozoan pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** 10 : 67–85.
12. Rabold JG, Hoge CW, Shlim DR, Kefford C, Rajah R, and Echeverria P.

1994. Cyclospora outbreak associated with chlorinated drinking water.  
Lancet 344: 1360-1361

13. Aldom JE, Chagla AH. 1995. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts  
from water by a membrane filter dissolution method. Lett. Appl.

第 22 頁

Microbiol. 20:186-187

14. Chung E, Aldom JE, Carreno RA, Chagla AH, Kostrzynska M, Lee H,  
Palmateer G, Trevors JT, Unger S, Xu R, Grandis SAD. 1999.

PCR-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water  
samples. J. Microbiol. Methods. 38:119-130

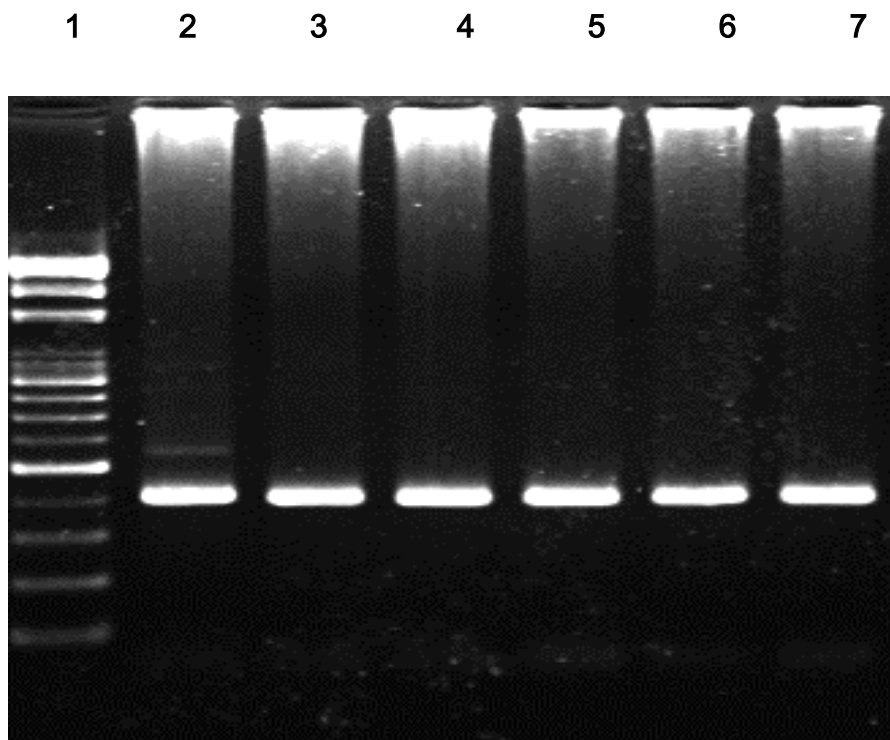
15. Patel S, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. 1999. The identification of  
*Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from  
whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and  
by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein(COWP) gene.  
Intern. J. for Parasitol. 29:1241-1247

16. Xiao L, Mprgan UM, Fayer R, Thompson RCA, Lal AA. 2000.

*Cryptosporidium* systematics and implications for public health.  
Parasitol. today. 16:287-292

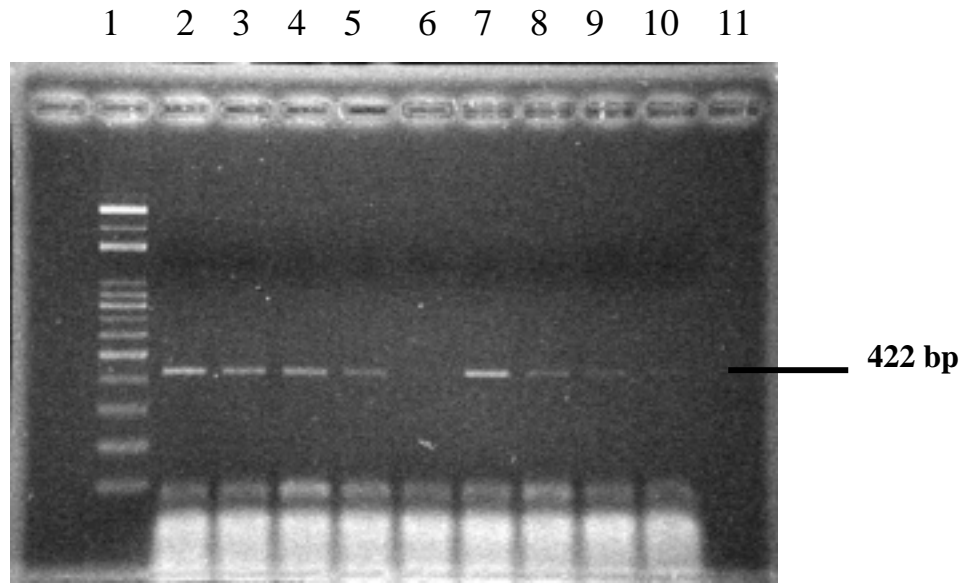


七. 圖

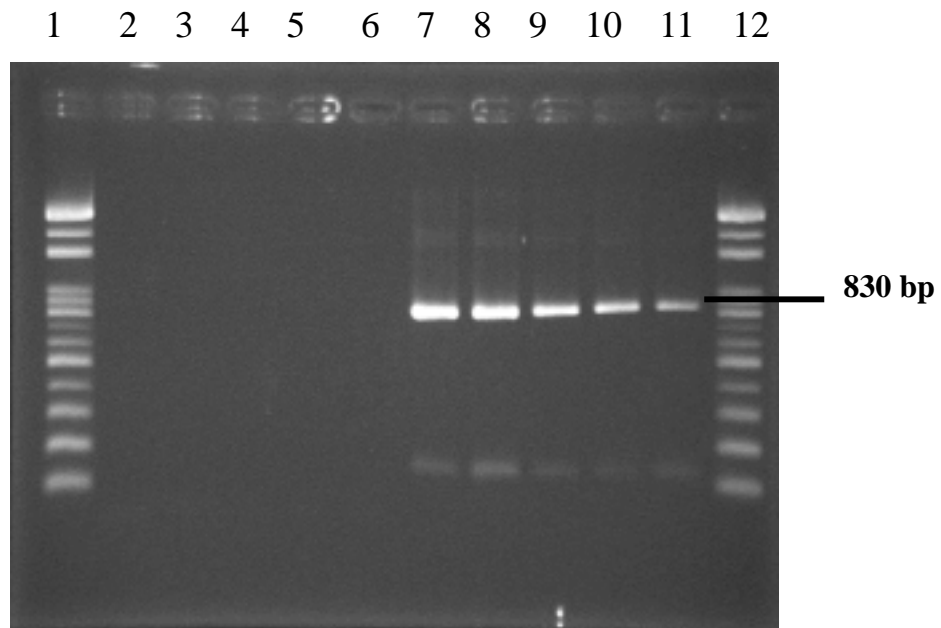


→ 382 bp

圖一、環孢子蟲與艾美球蟲之巢式 PCR 結果：lane 1 為 marker，lane 2-5 為愛美球蟲，lane 6-7 為環孢子蟲。



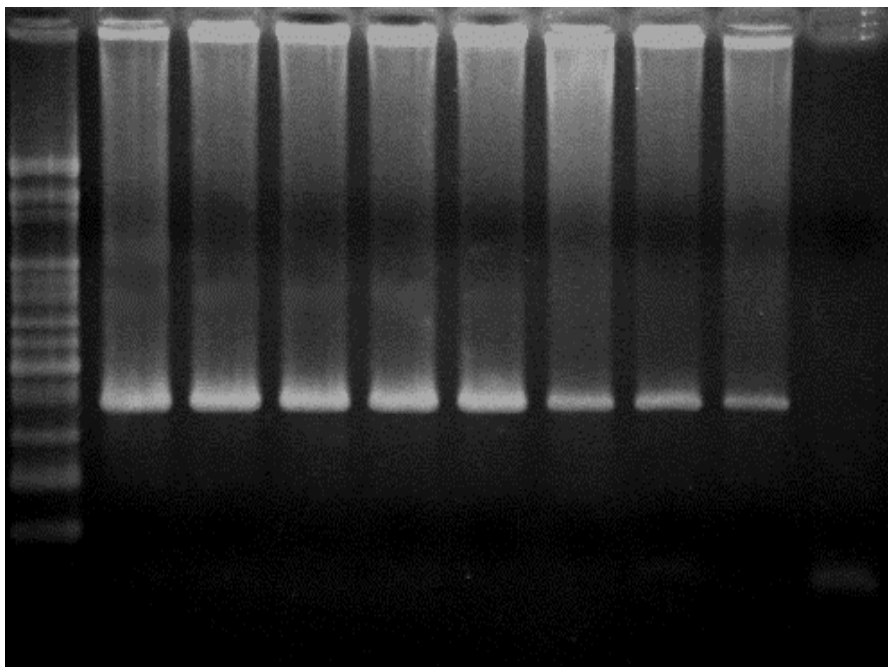
A



B

圖二、隱孢子蟲 PCR 敏感度。(A) 單次 PCR。lane 1 為 marker，oocyst 之數目在 lanes 2-4 為  $10^4$  個，lanes 5-8 為  $10^3$  個，lane 9 為  $10^2$  個，lane 10 為  $10^1$  個。(B) 巢式 PCR。lane 2-6 為第一次 PCR 結果，lane 7-11 為第二次 PCR 結果。lane 1,12 為 100 bp marker，oocyst 之數目在 lane 2,7 為 1000 個，lane 3,8 為 100 個，lane 4,9 為 50 個，lane 5,10 為 10 個，lane 6,11 為 1 個。

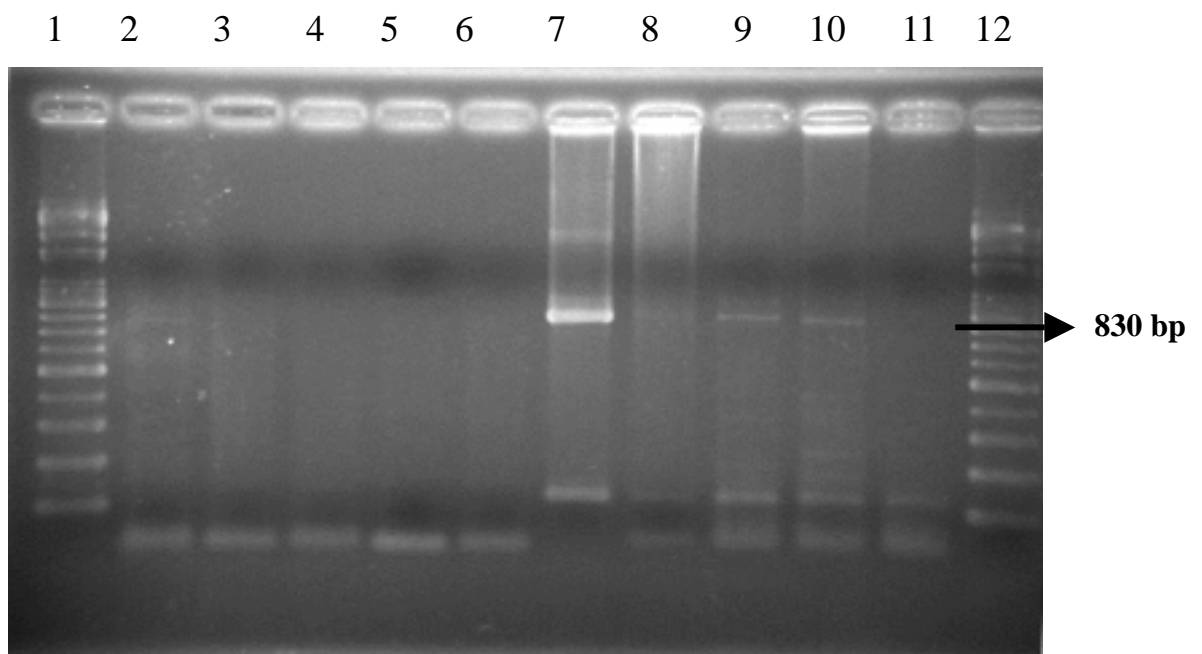
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



382 bp



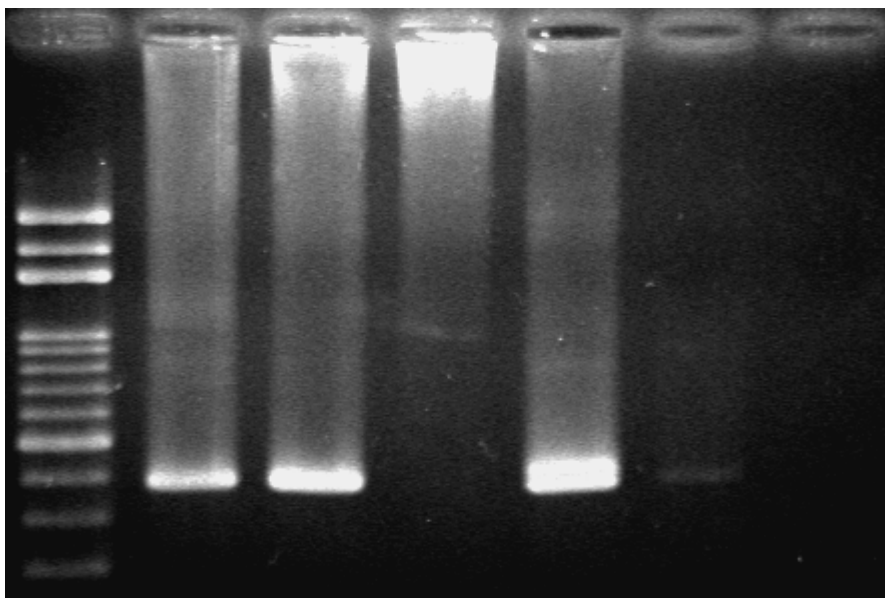
圖三、以艾美球蟲代替環孢子蟲所進行之巢式 PCR 敏感度測試：lane 1 為 marker，lane 2 為 positive control，oocyst 之數目在 lanes 3 為 122 個，lanes 4 為 30 個，lane 5 為 14 個，lane 6 為 10 個，lane 7 為 5 個，lane 8 為 2 個，lane 9 為 1 個，lane 10 為 negative control。



圖四、以巢式 PCR 檢測水源檢體之隱孢子蟲。lane 1,12 為 100 bp marker；lane 2-6 為第一次 PCR 結果，lane 7-11 為第二次 PCR 結果，lane 2,7 為陽性對照組，lane 3,8(註)為羅娜檢體，lane 4,9 東埔檢體，lane 5,10 為和平檢體，lane 6,11 為仁愛檢體。

註：lane 8 具微弱陽性反應

1 2 3 4 5 6 7



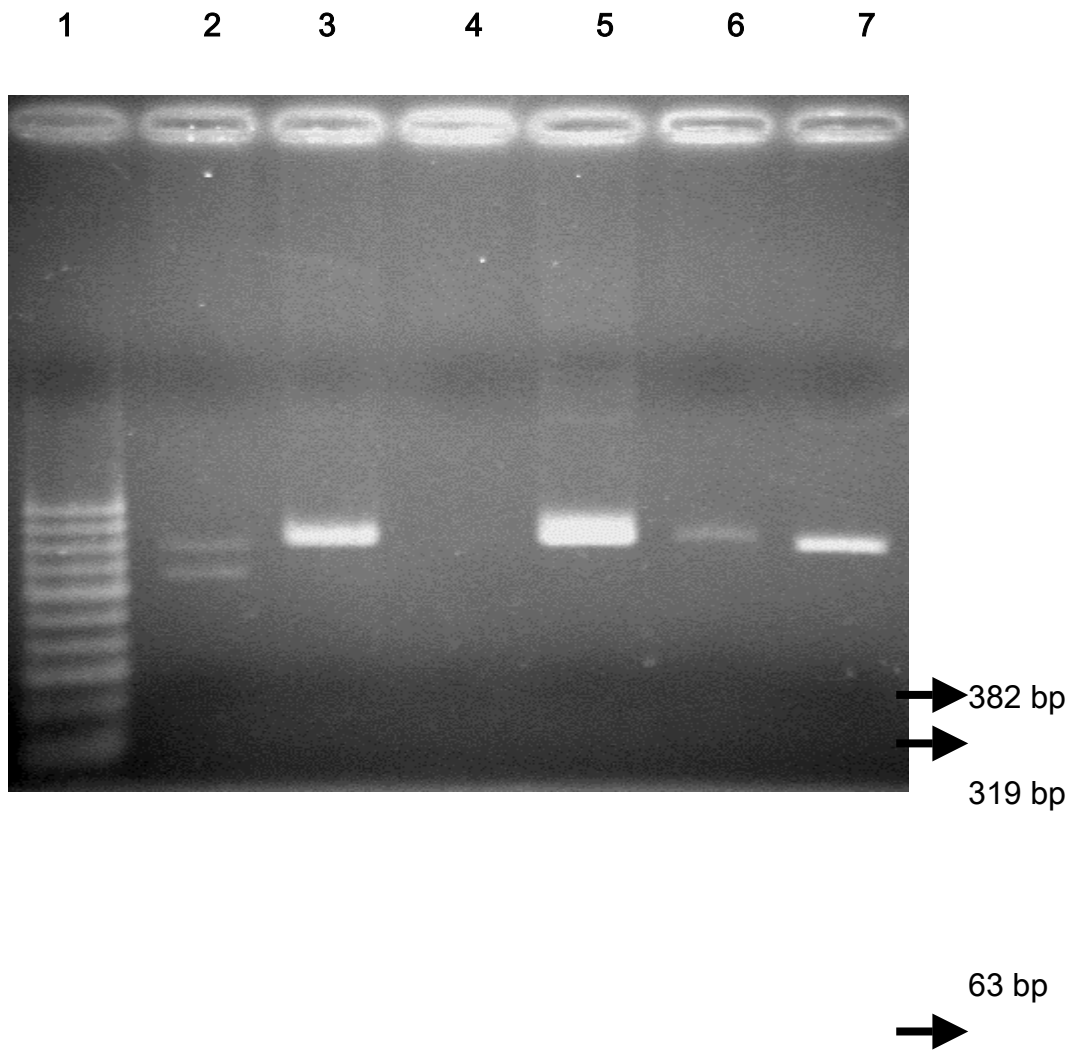
382 bp  
→

圖五、以巢式 PCR 檢測水源檢體中的環孢子蟲與艾美球蟲：lane 1 為 marker，lane 2 為 positive control，lane 3 為和平檢體，lane 4 為羅娜檢體（註），lane 5 為東埔檢體，lane 6 為仁愛檢體，lane 7 為 negative control。

註：lane 4 具微弱陽性反應







圖六、水源檢體經巢式 PCR 後，再以限制酶 (*ApoI*) 分析：lane 1 為 50 bp

marker , lane 2 為 *C. cayetenesis* , lane 3 為和平檢體 , lane 4 為羅娜檢體( 註 ) ,  
lane 5 為東埔檢體 , lane 6 為仁愛檢體 , lane 7 為艾美球蟲。

註 : lane 4 陽性反應太弱無法進行限制酶分析

第 29 頁

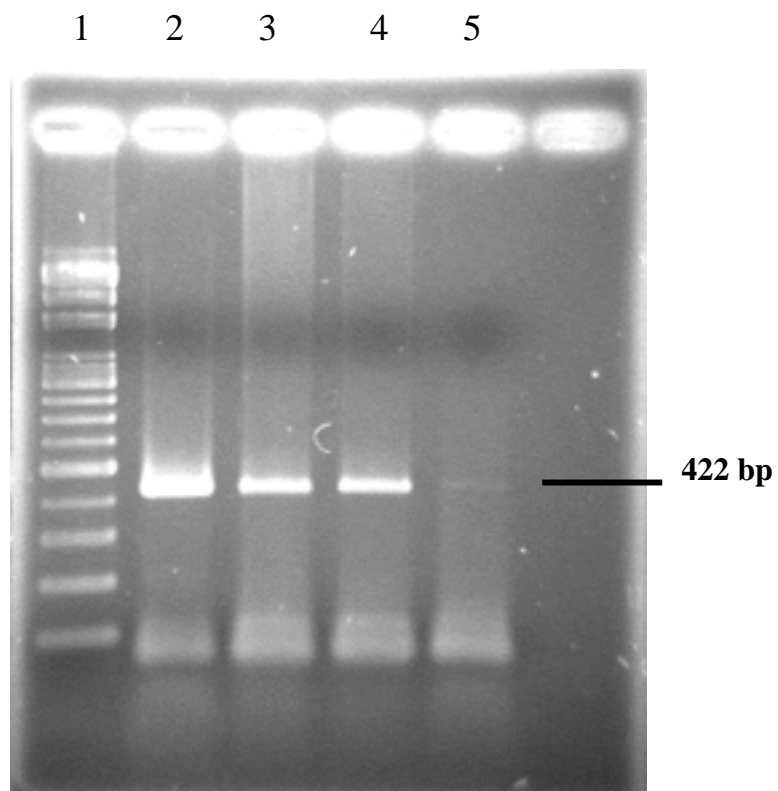


圖 7、烏來國小學童以單次 PCR 檢標子蟲結果。lane1 為 100 bp marker，lane2 為陽性對照組，lane3-5 為 3 個小朋友糞便檢體陽性結果。