

計畫編號：DOH93-DC-1008

行政院衛生署疾病管制局九十三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

三年總研究報告

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、鄧洪音、許麗卿、吳金正、李亞恬

執行期間： 91年1月1日至93年12月31日

目錄

1. 封面	-----	(1)
2. 目錄	-----	(2)
3. 摘要	-----	(3-6)
4. 前言	-----	(7-11)
5. 材料與方法	-----	(12-21)
6. 結果	-----	(22-29)
7. 討論	-----	(30-37)
8. 結論與建議	-----	(38)
9. 參考文獻	-----	(39-48)
10. 圖表	-----	(49-81)

中文摘要

隱孢子蟲 (*Cryptosporidium* spp.) 與環孢子蟲 (*Cyclospora cayetanensis*) 皆為腸道性原蟲，可抵抗自來水的加氯消毒處理，故可藉由飲用水的污染而引起流行下痢病症。其檢出的方法除了利用鏡檢方式外，亦可以較敏感且專一之聚合酶連鎖反應(PCR)及限制酶分析(RFLP)方式進行種別區分。在本研究中二蟲利用次一方法以 18S rRNA 基因為藍本，建立兩者之檢出模式。

在水源檢體採檢之四處地點：羅娜、東埔、和平及仁愛，皆檢出隱孢子蟲特異片段。將四處水源之 PCR 產物經限制酶分析，發現皆為屬 *C. parvum*，其中羅娜及和平檢體為 *C. parvum* 牛型而東埔與仁愛檢體中則具 *C. parvum* 人型的存在。而在環孢子蟲監測上，同樣四處水源檢體雖呈巢式聚合酶連鎖反應陽性，但以限制酶分析，顯示皆非致病性環孢子蟲。

自愛滋病患者取得之 341 件檢體中，4 件呈隱孢子蟲陽性，其盛行率為 1.17%。經限制酶切割分析，片段比對結果顯示 2 件為 *C. parvum* 人型，另外 2 件分別為 *C. muris* 以及 *C. meleagridis*，增加藉由動物感染之可能性。

綜合所有實驗結果，本計畫成功建立隱孢子蟲及環孢子蟲之水源及糞便檢體檢測模式，亦設計完整區分主要基因型態之方法，作為種別鑑定之用，提供日後對此二蟲調查或診斷基因型的參考。

關鍵詞：隱孢子蟲、環孢子蟲、聚合酶連鎖反應、限制酶分析、種別鑑定。

Abstract

Cryptosporidium spp. and *Cyclospora cayetanensis* are parasitic protozoa that can infect the gastrointestinal tract of human and animals, and causing diarrhea. Their oocysts/cysts show exceptional resistance to various environmental pressures and most disinfectants commonly used for water. Therefore they can cause massive waterborne outbreaks. Current routine laboratory technique for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* are by light microscopy. To further improve the means for the identification of this organism, polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), the methods with high specificity and sensitivity, are critically needed. This study was done by using nested PCR or single PCR to amplify specific fragments 18S rRNA gene of *C. parvum* and *Cyclospora*. Then we used restriction enzymes to distinguish species and genotype in PCR products.

Four water samples were collected from Lo-Na, Ton-Pu, Ho-Ping and Jen-Ai. Positive results in *Cryptosporidium* were detected by PCR. RFLP analysis of these PCR results confirmed that all of them were *C. parvum*. In Lo-Na and Ho-Ping samples, there were only *C. parvum* bovine genotypes. In Ton-Pu and Jen-Ai, *C. parvum* human genotype was also present. For detect *Cyclospora*, water samples collected from the same places showed positive in the nested-PCR but negative in restriction enzyme analysis, indicating those

were not *C. cayetanensis*.

In the 341 samples from AIDS patients, four samples are positive results in *Cryptosporidium*, the preference is 1.17%. After RFLP analysis, 2 samples are *C. partum* human genotype and another 2 samples are *C. muris* and *C. meleagridis*, increasing the possibility infected from animals.

This project constructs the models successfully in diagnosis of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* for water and fecal samples; by the way , also design the complete methods between species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Cyclospora*.

Key words: *Cryptosporidium* , *Cyclospora*, polymerase chain reaction,
restriction enzyme analysis, genotype

一、前言

隱孢子蟲類(*Cryptosporidium* spp.)為一種寄生於腸道上皮組織、大小呈3至8微米(μm)的球蟲類原蟲(Xiao et al., 2000)，同時也是人畜共通性的寄生蟲(Anderson et al., 1982；Morgan et al., 1997)。其多半經由糞口感染途徑傳染，在免疫機能正常的宿主中，多數會產生下痢症狀，但持續3至10天後可以自然痊癒；然而於免疫不全的病患中，則會產生嚴重且持續性腹瀉，而造成脫水現象，且由於水分缺失和電解質不平衡，嚴重者甚至可能造成死亡(Guerrant, 1997)。環孢子蟲比隱孢子蟲略大，型態約為8至10微米，亦屬於感染腸道細胞之球蟲類原蟲；人類為其主要宿主，引發的病症與隱孢子蟲相似，無論是免疫機能正常或缺失之病人皆會被感染。隨著社會變遷、個體遷移以及免疫缺失病人增加等情形，提高了二者發生之可能性和嚴重性(Franzen and Müller, 1999)；故泛美衛生組織〔Pan American Health Organization (PAHO)〕訂隱孢子蟲症與環孢子蟲症為近年來人類感染率快速增加之伺機性寄生蟲新興疾病。

隱孢子蟲分布於世界各地，可在許多動物中發現。原蟲種類的鑑定，多半以其地理分布、形態及其對宿主之特異性與所引起之臨床症狀為依據(Xiao et al., 2000)。隱孢子蟲遍佈於全球，各種類間卵囊形態大小差異甚少，不易區分(Koudela and Modry, 1998；Xiao et al., 2000)，所引起之病症又多為

下痢，故最初隱孢子蟲種類之決定，多半僅依據其寄生之宿主類別，參考歷史文獻後即加以定案，然有些種類因其宿主之特異性不明確，常易導致分類錯誤產生(O'Donoghue, 1995; Fayer et al., 1997)。

現今鑑定隱孢子蟲種類，除了參考形態與感染宿主之背景外，另外需根據其他參考因子來輔助，如生物性(biological bases)及基因型(genetic bases)；依據其對交叉感染宿主之能力差異來辨別(Peng and Xiao, 1997)或一些已知的特殊功能基因序列，配合聚合酶連鎖反應方法(PCR)，比對其間之序列差異，進而區分不同種類；目前已知至少有 23 個種類(species)，至今仍持續發展中(Xiao et al., 2000)。常見種類主要有 9 種，分別為感染哺乳動物的 *C. parvum*、感染齧齒類的 *C. muris*、感染天竺鼠的 *C. wrairi*、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* 牛型與人型、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. muris* 及 *C. felis* 這六種皆有人類感染報告，不過引起國外大流行的種類以 *C. parvum* 牛型與人型這二種為主，其他四個種類，目前僅於免疫缺失病人中發現(Morgan et al., 2000)。而環孢子蟲現今則有十七個已知種類，但目前確定可感染人類的僅有 *C. cayetenesis* 一種。

由於隱孢子蟲不需要中間宿主，於同一宿主體中即可完成其生活史，而糞便中的卵囊能立即感染下一個宿主，不需要時間等待成熟 (Sturbaum et al., 2001) ，且因其具有厚壁，對水的加氯處理有抵抗性，而能夠存在於飲用水或游泳池中(Korich et al, 1990；Smith and Rose, 1998) 。環孢子蟲確切的傳染途徑雖然尚未證實，但較有可能的途徑亦為糞口傳染，常因缺乏公共衛生觀念，使得水和食物受到污染，進而導致環孢子蟲症的流行；環孢子蟲因其具有 sporocyst，故必須在適宜環境中進行芽胞化後方具感染能力，也因具有 sporocysts，使得環孢子蟲抵抗惡劣環境的能力（包括對氯消毒法）更勝於隱孢子蟲。年紀尚小的兒童及老年人，其免疫系統較弱，屬於感染隱孢子蟲或環孢子蟲高危險群（O'Donoghue, 1995）。

檢測隱孢子蟲的方式有多種，腸道組織穿刺(intestinal biopsy)為早期用以診斷隱孢子蟲症的方法(Anonymous, 1980)。而自 1983 年抗酸性染色(acid-fast staining)被應用在卵囊的檢查後(Ma and Soave, 1983)，侵入性的組織穿刺法已鮮少使用。目前隱孢子蟲症的診斷以檢出卵囊為主，使用方法有 Sheather's 飽和蔗糖液檢查(Current and Long, 1983)，Percoll® 溶液(Dulski and Turner, 1988)，非特異性或特異性之螢光染色(fluorescent antibodies staining)(Garcia et al., 1983；Arrowood and Sterling, 1989)，酵素免疫連結吸附法[enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)](Ungar, 1990；Garcia and

Shimizu, 1997)，及近年來所使用的聚合酶連鎖反應[polymerase chain reaction(PCR)]或結合限制酶切位分析[polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)]等分子生物技術(Spano et al., 1997, Dalle et al., 2003)。而環孢子蟲由於檢體量不足，無法製備專一之抗體，至今大多僅能利用抗酸性染色鏡檢來做診斷(Visvesvara et al. 1997; Clarke and McIntyre 1996)。隱孢子蟲與環孢子蟲二者以抗酸性染色鏡檢之主要特徵為具多態性的染色呈色 (Visvesvara et al. 1997)，然而由於偽陽性之抗酸性染色物質的干擾，或背景雜質的遮蔽覆蓋，使得未受訓練之人員不易正確檢出，同時鏡檢方法亦無法作蟲間之種別鑑定。隨著分子生物學的進步，現今則開發分子生物技術作為診斷方法；利用聚合酶連鎖反應(PCR)或結合限制酶切割分析技術(PCR-RFLP)進行隱孢子蟲或環孢子蟲定性檢查時，由於其靈敏度高、特異性強且同時可進行種別的區分，故此一方法已漸被學界肯定(Webster et al., 1993；Leng et al., 1996)。

隱孢子蟲與環孢子蟲可在野生動物或家畜中發現蹤跡，當患者出現於水源地區時，水源則有機會遭受污染。自 1984 年至 2001 年間，各國陸續皆有流行病例報告(Smith and Rose, 1998；Dalle et al., 2003)；尤其以 1993 年，美國威斯康辛州的密爾瓦基城(Milwaukee)，發現有 40 萬 3 千人罹患隱孢子蟲症最為嚴重(MacKenzie et al., 1994)，其主要流行原因為隱孢子蟲污

染民生用水所導致，故在 1996 年，美國環保署[Environmental Protection Agency (EPA)]則訂立檢測隱孢子蟲標準方針(方法 1622/1623)，期望達到準確檢測以及提早預防之效；此方法包含 3 種主要步驟：(1)以過濾及離心方式濃縮；(2)利用磁珠分離模式[immunomagnetic separation(IMS)]將蟲體與雜質分開；(3)以 IFA 方式利用螢光顯微鏡鏡檢。不過此標準方法目前仍具有蟲體流失或其他螢光物質干擾等問題，使得檢出率下降無法準確偵測，尚待其他方法改進。

由於台灣山地鄉居民水源獲得方式，多半依靠簡易自來水處理系統及山區之山泉水，尤其偏遠地區居民甚至還有生飲泉水習慣，倘若水源遭受患者(包括野生動物)糞便污染，則有機會藉由水之傳播而造成集體感染。故本計畫期望建立水源與病患檢體之監測模式，並對台灣山地鄉之隱孢子蟲症與環孢子蟲症做完整系統性的檢測與探討。

此計畫為時三年，其分年目的分別為：

第一年：建立隱孢子蟲與環孢子蟲抗酸性染色之鏡檢系統以及聚合酶連鎖反應之檢測系統。

第二年：穩定檢測系統並建立種別分析方式；完成部分山地鄉之水源監測。

第三年：完成水源與病患檢測調查，進行資料整理。

二、材料與方法

(一) 檢體

1. 陽性對照

1) 隱孢子蟲 (*Cryptosporidium* spp.)

由病人及羊隻取得含隱孢子蟲卵囊之糞便檢體，以 2.5% 重鉻酸鉀溶液保存備用，或利用倉鼠來繁殖及保存。

自病羊取得之卵囊，經清洗後，以滴管餵食感染經 dexamethasone 減弱免疫力之倉鼠，3-4 天後即可自其糞便中取得增殖的卵囊。

2) 環孢子蟲 (*Cyclospora cayetenensis*)

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*)

由中興大學董光中老師實驗室提供。

2. 待測檢體

1) 水源檢體

檢體採自於台北縣烏來鄉(烏來村、忠志村)，新竹縣尖石鄉(梅花村、

新樂村、秀巒村)，台中縣和平鄉，南投縣信義鄉(東埔、羅娜)、仁愛鄉(南豐)之山泉水；其採集是仿效 Aldom 等人之方法，再加以修改(Aldom and Chagla, 1995; Chung et al., 1999)。利用原蟲採樣器採集水源檢體 50 公升，並且經過孔徑 3.0 μm 之 cellulose acetate 濾紙過濾(Millipore)；將濾紙溶解於 100% acetone，以 2300 x g 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 方式檢測。

2) 模擬之水源檢體

為瞭解採樣之過濾膜經上述處理後，可能對檢測造成之影響，特設計下列實驗：

取 0.05g 土壤加入 30L 之水中，透過濾膜過濾後，將濾膜放入 50 ml 離心管，再將已知數量之隱孢子蟲卵囊(800、200、80 及 20 個)加至濾膜上，經溶膜處理後，後續如同水源檢體檢測方式。

3) 糞便檢體

由台大醫院洪健清醫師提供愛滋患者(AIDS)糞便檢體共 341 件，每

個檢體約取 0.5 克新鮮糞便與 2.5 ml 之 6M guanidinium-thiocyanate 混合均勻，放置於-20 冰箱保存待抽 DNA。

(二) 抗酸性染色鏡檢

於載玻片上塗抹檢體，蔭乾後以 methanol 固定，再經過抗酸性染色 (acid-fast stain)處理。抗酸性染色步驟為：先以 modified Ziehl-Neelsen solution 染色 30 分鐘，經 3%酸性酒精 (acid-alcohol)脫色後，再以 malachite green 染色 1 分鐘，以水將多餘染劑洗去後自然風乾，即可將此玻片於顯微鏡下以 200X、400X 或 1000X 觀察。經抗酸性染色後之檢體，背景顏色呈綠色，隱孢子蟲之卵囊呈紅色，大小約為 4-5 微米，而環孢子蟲卵囊大小則為 8-10 微米。

檢體以清水洗三次後，取 20 μ l 於載玻片上如上述進行抗酸性染色；卵囊的計數以顯微鏡下 200 X 鏡檢行之。檢體經三次抹片計數並取其平均值，以代表此檢體之隱孢子蟲或環孢子蟲卵囊個數。

(三) 抽取 DNA

1.水源檢體

使用 Mo Bio UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (Solana Beach, CA)來抽取水源檢體 DNA，方法步驟如其所附。所得之 DNA 檢體可直接用於 PCR 反應或置於-20°C 冰箱中保存。

2. 糞便檢體

本法主要是參照 Boom 等人所用之方法(Boom et al.,1990)，惟稍經修飾。方法如下：將糞便檢體(含 2.5 ml 之 6M guanidinium-thiocyanate)經過冷凍(液態氮 1 分鐘)、熔解(75 °C 2 分鐘)三次循環後，放置於 95 °C 下 30 分鐘。以 12,000 xg 速率離心 5 分鐘後取上清液，加入 80 µl Celite(Merck, Germany)及 100 µl 10% Triton X-100，於室溫下搖晃 10 分鐘。以 12,000 xg 速率離心 2 分鐘後去上清液，沉澱物先以 800 µl 之 6M guanidinium-thiocyanate 清洗一次，再以 900 µl 70%冰酒精清洗，最後以 200 µl 冰丙酮清洗。將含已清洗之沉澱物之離心管置於 56 °C 下開蓋 10 分鐘使其乾燥；加 100 µl 滅菌水於 56 °C 下 15 分鐘溶出 DNA 後，以 12,000 xg 速率離心 2 分鐘，其上清液即含所要之 DNA。可將其直接用於 PCR 反應或置於-20 °C 冰箱中保存。

(四) PCR 條件

1. 隱孢子蟲

1) 巢式 PCR

兩段式的巢式 PCR 反應是參照 Xiao 等人之方法(Xiao et al.,1999)，惟在操作條件上略有不同。如有隱孢子蟲的核酸，此法可將其增幅。第一段反應中，於 0.2 ml 之 thermo-tube 中放入 100 μ l 反應液，分別為：(1) 1X 倍的緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1% Triton X-100)；(2) 6 mM MgCl₂；(3) 2 μ l 之 DNA 檢體；(4) 0.4 μ M 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')；(5) 0.2 mM dNTP (6) 2.5U 之 Taq DNA Polymerase(Invitrogen™ life technologies, Brazil, 5U/ μ l) 及(7)滅菌水。將 tubes 置入 PCR 機器中 94 3 分鐘，使檢體中雙股 DNA 解離，再經 35 cycles(denaturation, 94 45 秒；annealing, 59 45 秒；elongation, 72 1 分鐘)的增幅過程，最後於 72 7 分鐘進行完整的 elongation。

第二段之 PCR 反應， thermo-tube 中亦放入 100 μ 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 μ l；(2) 4 mM MgCl₂；(3) 2 μ l 之第一段 PCR 產物；(4) 0.4 μ 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')；(5) 0.2 mM dNTP；(6) 2.5U 之 Taq DNA Polymerase 及(7)滅菌水。反應條件如同第一次 PCR。

2) 單次 PCR

本法利用自行設計的引子對來擴增出特異片段。引子依據 GenBank 資料庫中之隱孢子蟲 18S ribosomal RNA gene 序列，經 BioEdit 軟體進行序列比對而設計，可以針對四種隱孢子蟲(*C. parvum* 牛型與人型、*C. meleagridis* 和 *C. wrairi*)進行核酸增幅作用。在 0.2 ml 之 thermo-tube 中放入總體積為 50 μ l 之反應液，分別為：(1) 1 倍之緩衝液；(2) 3 mM MgCl₂；(3) DNA sample, 4 μ l；(4) 0.1 μ M forward primer(Cpmw-1, 5'-ACT TGA TAA TCT TTT ACT TAC ATG GA -3')和 reverse primer(Cpmw-2, 5'- CGT CAT TGC CAC GGT AG-3')；(5) 0.2 mM dNTP；(6) 2.5U Taq DNA Polymerase；(7) 滅菌水。先在 94 $^{\circ}$ C 下 5 分鐘使 DNA 模板充分解離，而複製過程以 denaturation, 94 $^{\circ}$ C 30 秒，annealing, 55 $^{\circ}$ C 30 秒及 elongation, 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘為一循環，共經 40 循環後，最後以 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘行完整 elongation，達成整個 DNA 聚合反應。

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 μ l 反應液，分別為：(1) 1 倍的緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1% Triton X-100)；(2) 4 mM MgCl₂；(3) DNA 檢體, 10 μ l；(4) 0.5 μ 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') ; (5) 0.2 mM dNTP ; (6) 5U 之 Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ life technologies, Brazil, 5U/μl)及(7) 滅菌水。將 tubes 置入 PCR 機器以 95°C 5 分鐘使檢體中雙股 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 10 分鐘進行完整的 elongation。

第二段之 PCR 為自行設計之引子對擴增反應。thermo-tube 中亦放入 100μl 反應液，但成分和濃度略有不同；分別為：(1) 1 倍之緩衝液；(2) 4 mM MgCl₂；(3) 第一段 PCR 產物, 5μl；(4) 0.5μM forward primer (CE456: 5'-TTC GAG GTA GTG ACG AGA-3')和 reverse primer (CE837 : 5'-ACA AAA TAG AAC CAA GGT CC-3') ；(5) 0.2 mM dNTP ; (6) 5U 之 Taq DNA Polymerase 及(7) 滅菌水。反應條件如同第一次 PCR，僅 annealing 溫度更改為 56 °C，經 36 cycles 反應後，可得約 382 bp 之增幅片段。

所有增幅完成之 PCR 產物可於 2% agarose gels 上進行電泳，經 ethidium bromide 染色後，再利用影像系統(Gel Doc 2000,Bio-Rad)觀察。

(五) PCR 之敏感度試驗

本實驗係為得知利用 PCR 反應來檢測隱孢子蟲及環孢子蟲的存在，其可增測之最低卵囊數而設計。

1. 隱孢子蟲

含有 10^3 卵囊之陽性檢體，經連續稀釋至 10^0 後，每一濃度個別抽取其核酸，再分別以巢式或單次 PCR 測試其敏感度。

2. 環孢子蟲

以 *E. tenella* 代替環孢子蟲測試巢式聚合酶連鎖反應的敏感度。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，各自抽取 DNA 後，進行聚合酶連鎖反應。

(六) 限制酶分析 (analysis by restriction enzyme ; RFLP)

1. 隱孢子蟲

以 18S rRNA gene 為藍本所增幅的核酸，有時難以從其片段大小來鑑定 species 或基因型，此時可依據其核酸序列選用特定限制酶進行分析，可將 *C. parvum* 與 *C. meleagridis* 和 *C. wrairi* 區別出來(圖 2)；而限制酶 *Vsp* 對單次或巢式 PCR 產物進行分析，則可區分 *C. parvum* 之人型或牛型基因型(圖 1,2)。

1) 限制酶 *Taq* (Promega ; Madison; USA)

在 0.2 ml 之 thermo-tube 中放入總體積為 20 μ l 反應液，分別為：(1) PCR 產物, 5 μ l；(2) 滅菌水, 12.3 μ l；(3) 10 倍之緩衝液, 2 μ l；(4) Acetylated BSA

(10 μ g/ μ l), 0.2 μ l 及(5) 限制酶 *Taq* I (10U/ μ l), 0.5 μ l。反應於 65 下進行 1 小時。

2) 限制酶 *Vsp* (MBI Fermentas ; USA)

反應總體積共 20 μ l，其操作條件為：(1) PCR 產物, 5 μ l；(2) 滅菌水, 12 μ l；(3) 10 倍緩衝液, 2 μ l；及(4) 限制酶 *Vsp* (10U/ μ l), 1 μ l。反應於 37 進行 4 小時。

3) 限制酶 *Ssp* (New England BioLabs ; USA)

反應總體積共 20 μ l，其操作條件為：(1) PCR 產物, 5 μ l；(2) 滅菌水, 12 μ l；(3) 10 倍緩衝液, 2 μ l；及(4) 限制酶 *Ssp* (5U/ μ l), 1 μ l。反應於 37 進行 2 小時。

2. 環孢子蟲

各限制酶(圖 3)的反應條件：

1) 限制酶 *Mnl* I (New England BioLabs ; USA)

反應總體積為 20 μ l，操作條件：(1) PCR 產物, 15 μ l；(2) 10 \times NEBuffer2, 2 μ l；(3) BSA 2 μ l；(4) 限制酶 *Mnl* I (5U/ μ l) 1 μ l。於 37 反應 4 小時。

2) 限制酶 *Apo I* (New England BioLabs ; USA)

反應總體積為 10 μ l，操作條件：(1) PCR 產物 3 μ l；(2)10 \times NEBuffer2, 1 μ l；(3)100 \times BSA 1 μ l；(4)限制酶 *Apo I* (4U/ μ l) 1 μ l；(5)滅菌水 4 μ l。於 50 $^{\circ}$ C 下反應 4 小時。

所有限制酶反應產物皆取 10 μ l，加上 1 μ l 的 6 \times DNA loading dye 於 3% 洋菜膠 (3 : 1 Nusieve agarose gel) 上進行電泳分析，以 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 100 bp 與 50 bp DNA ladder 長度指標比較判讀。

三、結果

(一) 形態學之確認

1. 隱孢子蟲

倉鼠感染隱孢子蟲後，取其糞便檢體經抗酸性染色，以顯微鏡鏡檢(200X and 1000X)可見大小為 4 至 5 微米之紅色或粉紅色卵圓形卵囊，其染色不均勻且具顆粒(圖 4)。

2. 環孢子蟲

患者糞便檢體經抗酸性染色，顯微鏡下 200X 鏡檢，可見多樣性之紅色 8-10 微米圓形卵囊(圖 4)。

3. 艾美球蟲

可直接於顯微鏡下觀察到約 20 微米之卵囊(圖 4)。

(二) 分子生物學之確定

1. 隱孢子蟲

1) 巢式 PCR

A. 反應條件設定及靈敏度測試

隱孢子蟲 *C. parvum* 牛型與人型測試反應結果顯示，第一段 PCR 增幅之產物濃度並不足以在凝膠上出現(圖 5, lane 2,3)；第二段 PCR 之增幅產物則明顯呈現出牛型之 834 bp 片段(圖 5, lane 5)及人型之 837 bp 片段(圖 5, lane 6)。而反應條件以 59.3 之 annealing 溫度、0.4 μ M 之 primer 濃度及第二段 PCR 之 $MgCl_2$ 濃度為 4 mM 最為合宜(圖 6)。

巢式 PCR 靈敏度試驗中，五種數目(1000、100、50、10 及 1 個)之隱孢子蟲 *C. parvum* 牛型卵囊，皆可增幅出 834 bp 核酸片段(圖 7)，表示此方法之靈敏度可達 1 個卵囊。

B. 增幅產物之分析

a. 定序分析

產物核酸經自動定序儀(automated DNA sequencer)進行定序，所得之基因序列與 GenBank 中隱孢子蟲序列 AF222998(*C. parvum* 人型)及 AF093490(*C. parvum* 牛型)比對，發現各自相似性皆達 100%，表示所增幅的結果，確實為 *C. parvum* 人型及牛型之序列(圖 8)。

b. 限制酶分析

在限制酶 *Vsp* 作用下，可將 *C. parvum* 牛型之 834 片段分割成 102、104 與 628 bp 三條片段 (圖 9, lane 4)；而 *C. parvum* 人型之 837 bp 片段，則能被切成四條大小為 70、102、104 及 561 之片段(圖 9, lane 5)。

2) 單次 PCR

A. 反應條件設定及靈敏度測試

以單次 PCR 增幅之結果，*C. parvum* 牛型與人型產物皆明顯呈現出 220 bp 之片段(圖 10, lane 2,3)。而反應條件以 55 之 annealing 溫度、0.1 μ M 之 primers 濃度、3 mM 之 $MgCl_2$ 濃度、0.2 mM 之 dNTP 濃度及 4 μ l 之 DNA 模板最為合適(圖 11)。

單次 PCR 靈敏度試驗中，結果顯示 6 組數量(2000、800、200、80、20 及 8 個)之 *C. parvum* 卵囊，僅 8 個卵囊這組未能聚合出片段，其他數量皆能增幅出 220 bp 片段，故此方法之靈敏度約為 20 個卵囊(圖 12)。

B. 增幅產物之分析

a. 定序分析

此段 220 bp 核酸經定序後，與前述之 AF222998 及 AF093490 序列比對，發現其與 *C. parvum* 人型和牛型之基因序列相似度亦達 100% (圖 13)，確定為隱孢子蟲特異性片段。

b. 限制酶分析

在單次 PCR 中，*C. parvum* 所聚合之 220 bp 片段具有限制酶 *Taq* I 可辨識之特定序列，可被分割成 154 bp 和 66 bp 二個片段(圖 14A, lane 4,5)；而 *C. parvum* 人型之 220 bp 片段具限制酶 *Vsp* I 切位，經 *Vsp* I 作用後可切

割成兩條大小為 145 bp 及 75 bp 的片段(圖 14B, lane 5)。

3. 環孢子蟲

1) 巢式 PCR

A. 反應條件設定及靈敏度測試

以第一對引子對 (CYCF1E 及 CYCR2B) 進行第一次 PCR 的反應，環孢子蟲和 *E. tenella* 皆可得 636 bp 產物(圖 15A);而以第二對引子對(CE456 及 CE837) 進行第二次 PCR 的反應，環孢子蟲和 *E. tenella* 皆可得 382 bp 產物(圖 15B);另外，測試 PCR 之合適條件，結果顯示黏和溫度 (annealing temperature) 為 53 (第一次 PCR) 及 56 (第二次 PCR)，MgCl₂ 濃度為 4 μM，引子濃度皆為 0.5μM，dNTP 濃度為 200 μM，Taq 濃度為 5U /100μl，反應總體積為 100 μl，進行 36 個循環為最適宜之反應條件 (圖 16)。

以 122、30、14、10、5、2、1 個 *E. tenella* 卵囊抽取 DNA 後，進行巢式聚合酶連鎖反應，實驗結果皆具 382 bp 之片段，顯示僅 1 個 *E. tenella* 卵囊即可以偵測出來 (圖 17)。

B. 增幅產物之分析

a. 定序分析

以陽性蟲株抽取之 DNA 進行巢式聚合酶連鎖反應後，所增幅的 382 bp

產物經自動定序儀進行核酸定序，所得之基因序列與 GenBank 標準株的序列 (AF111183 為 *C. cayetanensis*，U40264 為 *E. tenella*) 相比，*C. cayetanensis* 相似性達 100%，而 *E. tenella* 僅在引子位置有一個鹼基之差異，相似性達 99%，表示所增幅的結果，確實為 *C. cayetanensis* 和 *E. tenella* 之序列 (圖 18)。

b. 限制酶分析

在限制酶 *Mnl* I 的作用下，可將 *C. cayetanensis* 切成大小為 86 bp 及 296 bp 之二條片段，而 *E. tenella* 可被切成大小為 86 bp、142 bp 及 156 bp 之三條片段 (圖 19A)，由此結果更進一步地證實此巢式聚合酶連鎖反應所增幅之產物，為預期中之 *C. cayetanensis* 和 *E. tenella* 的 18s rRNA 之基因片段。

而在限制酶 *Apo* I 的作用下，可將 *C. cayetanensis* 切成大小為 63 bp 及 319 bp 之二條片段，而 *E. tenella* 則無限制酶 *Apo* I 之切位，故維持原來之 382 bp 片段 (圖 19B)。

(三) 水源檢體檢測

1. 隱孢子蟲

1) 溶膜處理方法對 PCR 增幅反應之影響

四種數量卵囊(分別為 20、80、200 及 800 個)之含土濾膜，經溶膜方法處理後，以單次 PCR 反應聚合，結果皆可增幅出隱孢子蟲 220 bp 片段(圖 20)，與單次 PCR 靈敏度結果無顯著差異。

2) PCR 反應

所採取的檢體中，僅羅娜、東埔與和平三處檢體於巢式 PCR 反應中，可增幅出 830 bp 左右片段(圖 21A)；而在單次 PCR 檢測中，則中部地區四處檢體皆出現 220 bp 陽性片段結果(圖 21B)，其他地區未能增幅出隱孢子蟲特異片段。

3) 限制酶分析

將四處地點之單次 PCR 產物 220 bp 經限制酶 *Taq* 與 *Vsp* I 分析，結果顯示其皆可被限制酶 *Taq* 切割成 154 bp 和 66 bp(圖 22A)；以限制酶 *Vsp* I 作用，發現東埔及仁愛檢體具分割成 145 bp 及 75 bp 之二小片段，但仍有未分割之 220 bp 存在(圖 22 B, lane 5,7)；於羅娜與和平檢體 PCR 產物則全為 220 bp，無分割片段出現(圖 22B, lane 4,6)。

2. 環孢子蟲

1) PCR 反應

有 4 處於巢式聚合酶連鎖反應產生 382 bp 之片段，分別為南投縣信義鄉（東埔和羅娜）、仁愛鄉及台中縣和平鄉，其中羅娜的片段反應較弱，其次為仁愛鄉，而東埔及和平鄉反應最強(圖 23)。

2) 限制酶分析

將巢式聚合酶連鎖反應 382 bp 之產物，進行限制酵素 *Mnl* I 分析，皆可被切成 86 bp、142 bp、156 bp（圖 24A）；而以 *Apo* I 分析，則維持原本之 382 bp 片段（圖 24B）。

(四) 愛滋患者糞便檢體隱孢子蟲檢測

1. 巢式 PCR 反應

收集 341 個 AIDS 病患檢體中，共檢測出 4 個隱孢子蟲陽性檢體（圖 25）。將各產物經限制酶 *Vsp* 切割分析後，檢體 1 與 2 可被切割成約 70、104(含 102)及 561 bp 3 個片段(圖 26, lane 2,3)；檢體 3 被切割成約 102 及 731 bp 2 個片段(圖 26, lane 4)；而檢體 4 則是被切割成約 104(含 102)、171 及 456 bp 3 個片段(圖 26, lane 5)。將檢體 3 與 4 之巢式 PCR 產物再經限制酶 *Ssp* 切割分析，發現檢體 3 可被切割成約 385 及 448 bp 2 個片段(圖 26, lane 6)，而檢體 4 則是呈現約 108、254 及 449 bp 3 個片段(圖 26, lane 7)。

2. 單次 PCR 反應

將此 4 個隱孢子蟲陽性檢體再經單次 PCR 增幅測試，結果檢體 3 未能增幅出 220 bp 片段(圖 27, lane 5)；將 3 個增幅之 PCR 產物(檢體 1,2,4)經限制酶 *Taq* 作用後，僅檢體 1 與 2 可被切割成約 66 及 154 bp(圖 28, lane 2,3)。將檢體 1 與 2 經限制酶 *Vsp* 作用，結果二者皆可被切割成 145 bp 及 75 bp 之二小片段(圖 28, lane 5,6)。

四、討論

現今檢測隱孢子蟲與環孢子蟲，主要是將檢體經抗酸性染色後，以鏡檢方式依照外觀形態來辨別(Newman et al., 1993; Alves et al., 2000)。然有些檢體因具偽陽性物質(Rosenblatt and Sloan, 1993)，或保存檢體之方法改變卵囊外觀形態(冷凍保存等)(Ward and Wang, 2001)，而影響其檢出之準確性。在數種隱孢子蟲種類中，僅 6 個種別曾有人類病例報告發表(Gatei et al., 2002; Xiao et al., 2000; Dalle et al., 2003)，但以鏡檢方式無法準確地依外觀辨別種別，仍需利用其他方式進行種別鑑定；分子生物技術(PCR、PCR-RFLP)由於特異性強、靈敏度高，且可將聚合產物依其間序列差異區分種別，故此法已漸被運用於隱孢子蟲診斷(Spano et al., 1997)。

隱孢子蟲具多種已知之特殊功能基因序列 (Spano and Crisanti, 2000)，其中以 18S rRNA 基因序列較易從中尋得同屬間共同之核酸片段作為引子，而能同時聚合出致病性種類之核酸片段，故常成為 PCR 聚合目標之一；本次實驗亦是以 18S rRNA 基因作為藍本，進行巢式 PCR 與單次 PCR 聚合反應。然而由於此段基因同屬間差異性小，僅以 PCR 技術欲從其中區分種之類別實屬不易；現今雖多篇文章說明其以 18S rRNA gene 設計之引子能聚合出 *C. parvum* 特異片段(Morgan et al., 1997, Patel et al., 1999)，但將此引子經 GenBank 比對，則發現其亦能聚合其他種類之隱孢子蟲，且增幅片段大

小雷同無法分辨。本計畫所使用的巢式 PCR，其產物雖可利用限制酶 *Ssp* 及 *Vsp* 來區分絕大部分隱孢子蟲種別或基因型(Xiao et al.,1999)，但此方式無法將 *C. wrairi* 與 *C. parvum* 牛型二者區別開。比對兩者巢式 PCR 產物序列，發現其差異性太小(僅七個鹼基對差別)(圖 29)，且無限制酶能在這些差異點具切位，故需另求其他 PCR 片段對於此兩種類進行辨別。

以自行設計之引子對，重新進行單次 PCR 反應，限制其僅對 *C. parvum* 牛型與人型、*C. wrairi* 及 *C. meleagridis* 四個種類產生增幅反應，利用限制酶 *Taq* 則可將 *C. parvum* 牛型 與 *C. wrairi* 區分辨別(*C. parvum* 牛型 220 bp 可被切割成 66 bp 與 154 bp；*C. wrairi* 220 bp 無法被分割)；亦可以限制酶 *Vsp* 區分 *C. parvum* 牛型與人型(*C. parvum* 人型 220 bp 可被分成 75 bp 與 145 bp；*C. parvum* 牛型 220 bp 無法被分割)(圖 14B)。在定序比對上，隱孢子蟲單次 PCR 之 primer(Cpmw1)序列，*C. parvum* 人型跟牛型有一個鹼基 (basepair) 差異；然而此對 primer 設計是以人型為藍本，故在 *C. parvum* 牛型定序結果中，雖於前端 primer 位置與標準序列相差一個鹼基(圖 13)，但因其他序列與 *C. parvum* 牛型標準株相似度達 100%，故仍判別聚合之核酸片段確定為 *C. parvum* 牛型。隱孢子蟲 PCR 靈敏度試驗中，巢式 PCR 反應僅一個卵囊即可做出陽性結果；而單次 PCR 反應則需約 20 個卵囊才可偵測到

增幅訊號。實驗結果與其他文獻引子對之 PCR 反應靈敏度試驗無明顯差異 (Gibbons et al., 1998 ; Xiao et al.,1999)。

環孢子蟲亦選擇 18S rRNA 基因作為 PCR 目標基因的原因，在於目前可查詢之環孢子蟲屬序列中，5.8S rRNA 基因之完整序列太短(約 159 bp)；而較專一之 ITS-1 (internal transcribed spacer 1) 基因，僅 *C. cayetanensis* 及 *C. popionis* 具序列可查詢，長度亦僅 500-700 bp，且其在同一種別間具相當程度之差異性，故只可作為種別間之親緣關係鑑定，難以作為偵測使用之擴增基因選擇，而 18s rRNA 基因之完整序列約 1700-1800 bp，故選擇 18S rRNA 作為巢式 PCR 之目標基因。由於 *Eimeria* species 和環孢子蟲同屬艾美球蟲科 (Eimeriidae)，在 18S rRNA 基因間具有大部分之共同序列 (Pieniazek and Herwaldt 1997; Relman et al. 1996)，故可以藉此利用 *E. tenella* 作為陽性蟲株，以共同之序列作為擴增之目標基因序列，再輔以限制酶分析，而達成偵測環孢子蟲之目的。

在環孢子蟲中 PCR 引子之選擇，是參考文獻中所採用之第一對引子對 (Jinneman et al. 1998a; Pieniazek et al. 1996b)，因為引子之設計，在 3'端要求較嚴，若非絕對的吻合，則易影響黏合步驟，使得擴增結果不如預期，而文獻中之第二對引子，對於以 *E. tenella* 為模板時，在引子 3'端附近，有 3 個鹼基無法和 *E. tenella* 序列吻合 (圖 30)，故本研究重新針對環孢子蟲與

E. tenella 設計第二對引子，以期達到以 *E. tenella* 偵測環孢子蟲之目標。而此方式之 PCR 敏感度與隱孢子蟲相同，亦僅一個卵囊即可增幅出特異片段。

將巢式聚合酶連鎖反應擴增後之產物，以限制酵素 *Mnl* I 分析，在環孢子蟲可得 86 及 296 bp 二個片段，*E. tenella* 可得 86 bp、142 bp、156 bp 三個片段（圖 19A）。另外，理論上以 GenBank 之資料庫，將此巢式聚合酶連鎖反應皆可擴增之序列，作限制酵素 *Mnl* I 之切割點分析，依電泳分析可分辨之片段數及片段大小，可大致分為 3 大類（表一）。其中第一大類大略可被切割成 86 bp 及 296 bp 二個片段（環孢子蟲屬之），第二大類大略可被切割成 86 bp、142 bp、156 bp 等 3 個片段（*E. tenella* 屬之），第三大類大略可被切割成 20 bp、86 bp、122 bp、156 bp 等片段（20 bp 在電泳上亦不可見）。

以限制酵素 *Mnl* I 分析後，若歸屬第一大類，則進行限制酵素 *Apo* I 分析。限制酵素 *Apo* I 主要針對致病性環孢子蟲（*C. cayetanensis*）作分析，在此巢式聚合酶連鎖反應可擴增之產物中，僅 *C. cayetanensis* 之擴增產物可被限制酵素 *Apo* I 切割，而產生 63 bp 及 319 bp 二個片段（圖 19B），藉此偵測水源中是否存在致病性環孢子蟲。由於致病性環孢子蟲（*C. cayetanensis*）對於人類之重要性較大，故本研究利用 nested PCR-RFLP 針對此點，改善以往無法從環孢子蟲屬中區分出 *C. cayetanensis* 之缺點（Jinneman et al. 1998; Pieniazek et al. 1996; Orlandi and Lampel 2000）。使用限

制酵素 *Mnl* I 分析作為初步篩選之分析工具的目的，主要在於減少環孢子蟲檢體之浪費；在此環孢子蟲偵測系統中 (nested PCR-RFLP)，僅在限制酵素 *Mnl* I 分析出現可能為環孢子蟲之切割片段時，才需使用環孢子蟲之擴增產物，作為限制酵素 *Apo* I 分析之陽性對照，其餘步驟皆可利用 *E. tenella* 取代環孢子蟲作為陽性對照。

進行水源檢體檢測之前，將已知隱孢子蟲卵囊數目(800、200、80 及 20 個)之含土濾膜進行溶膜方法處理，以了解溶膜過程檢體損失情形及其對 PCR 增幅反應之影響；檢體經溶膜過程、DNA 抽取後，再以單次 PCR 反應聚合，其結果與單次 PCR 靈敏度極限相比並無顯著差異，皆於 20 個卵囊即可增幅出 220 bp 陽性片段，表示此方法不會對檢體蟲量引起太大損失，亦不會對 PCR 反應造成影響，對於少量卵囊數目之水源檢體具相當可行性(圖 20)。

本計畫山地水源檢體皆經原蟲採樣器過濾 50L，檢體經溶膜、DNA 抽取後，以 PCR 方法檢測，在隱孢子蟲中，四處檢體(東埔、羅娜、仁愛、和平)可增幅出明顯之 220 bp 隱孢子蟲片段(圖 21B)。但在巢式 PCR 反應中，僅羅娜、東埔及和平三處地點之檢體出現隱孢子蟲約 830 bp 特異性片段，然而三處之片段皆不明顯(圖 21A)。探討巢式 PCR 檢出率不及單次 PCR 之原因，可能由於水源檢體具多量泥沙成分，而於檢體抽取 DNA 過程時，泥

沙易對 DNA 造成機械性破壞使其斷裂；然而在巢式 PCR 反應中，其需較完整之 DNA 片段(第一次 PCR 共 1325 bp，第二次 PCR 則約為 830 bp)，使得巢式 PCR 聚合反應雖經二次 PCR 聚合，效果仍不及產物僅 220 bp 小片段之單次 PCR；亦或因水源檢體中抑制物的存在，而使巢式 PCR 之引子對降低其反應作用所致。

將四處地點之單次 PCR 產物經限制酶 *Taq* 與 *Vsp* I 分析，發現其皆可被限制酶 *Taq* 切割成 154 bp 和 66 bp 之特定片段(66 bp 太弱，不易見)(圖 22A)，顯示其皆為 *C. parvum*，而非 *C. meleagridis* 及 *C. wrairi*；而經限制酶 *Vsp* I 作用後，羅娜與和平之 PCR 產物無法被分割，表示此二處檢體之隱孢子蟲為 *C. parvum* 牛型，而柬埔寨及仁愛檢體則可切割出 *C. parvum* 人型之特定片段(145 bp 及 75 bp)(圖 22 B)，證明其中具有 *C. parvum* 人型；然而此二處亦具有清晰明顯之未分解 220 bp 片段(未分解 220 bp 之量遠多於被分解之 145 bp)，但巢式 PCR 結果太弱不足以用內切酶分析，無法進行二者比對；為了確定此二處檢體是否為單純之人型或人、牛混合型，所以將柬埔寨及仁愛檢體進行定序分析。然柬埔寨檢體單次 PCR 產物無法順利定出序列，而仁愛檢體定序結果卻發現其與 *C. parvum* 牛型標準株具 100% 相似，並未出現 *C. parvum* 人型特定序列。探討其原因可能是仁愛檢體之 220 bp 片段中，*C. parvum* 牛型佔多數而在定序時無法定出少量之 *C. parvum* 人型所致，此與

限制酶分析 220 bp 片段量遠多於被分解之 145 bp 片段結果雷同。故由限制酶 *Vsp* 分析與定序結果證實，仁愛檢體為 *C. parvum* 混合型檢體(圖 31)。在環孢子蟲檢測上，東埔、羅娜、仁愛、和平四處檢體雖皆能增幅出 382 bp，但經限制酶分析後發現，其皆非環孢子蟲(圖 24)。

在愛滋患者 341 個檢體中，4 個呈隱孢子蟲陽性，其盛行率為 1.17%。文獻研究顯示，隱孢子蟲症在國外愛滋患者中之盛行率約為 15 至 18%，而在具下痢症狀之愛滋患者則約佔 10 至 20% (Morgan et al., 2000)。探討台灣愛滋患者盛行率遠低於國外之原因，可能是愛滋患者採樣數不足(僅佔台灣總愛滋人口約 5%)，或者是因台灣罹患愛滋病毒之來源或族群與國外不同所致。

將 4 個隱孢子蟲陽性檢體以限制酶分析，切割片段經比對後發現，2 個具有 *C. parvum* 人型特殊片段(檢體 1,2)，1 個具有 *C. muris* 特殊片段(檢體 3)，另一個則具 *C. meleagridis* 特殊片段(檢體 4)。文獻指出在隱孢子蟲感染紀錄中，於免疫系統正常的患者，目前僅 *C. parvum* 牛型與人型這 2 型具感染報告；而在免疫系統缺失的患者，除了 *C. parvum* 牛型與人型外，亦能被其他隱孢子蟲種類感染(Morgan et al., 2000)。國外數據顯示，在 79 個愛滋患者隱孢子蟲陽性檢體中，*C. parvum* 人型佔多數(50.6%)，其次是 *C. parvum* 牛型(29.1%)，*C. felis* 第三佔 11.3%，其他種類則佔 8% (Xiao et

al.,2000)。本次實驗數據與資料比較，發現 *C. parvum* 人型比率相似佔約 5 成，但其他隱孢子蟲種類所佔之比率則偏高，增加藉由動物感染之可能性。

台灣隱孢子蟲水源調查，文獻多以特異性螢光染色鏡檢方式檢測(Hsu et al., 1999a, 1999b, 2001)，文章結果顯示檢測之水源檢體中，每 100 L 平均具有 22.1 個隱孢子蟲卵囊；而本次實驗中以 PCR 方式檢測亦證實水源中具有隱孢子蟲存在，且四處檢體經限制酶分析發現皆為可感染人之 *C. parvum*(無論人型或牛型)；由於每個人對此蟲感受性不同，文獻發現甚至僅一個卵囊即可造成感染(Wu et al., 2000)；所以儘管水源中蟲數不多，但的確具有造成流行之潛在危機。隨著現今社會生活趨向複雜，加上週遭許多病原蟄伏，實需小心謹慎以防流行產生。

隨著分子生物學知識與技術不斷創新發展，過去僅藉染色鏡檢診斷隱孢子蟲，已不敷分類及鑑定之精準要求。而以 PCR 方式偵測，則成為診斷學上新的發展方向。不過由於 PCR 檢驗成本高，檢驗人員需經過專業訓練及儀器設備所費不貲，無法作為第一線檢驗工具，目前僅限運用於學術研究上。綜合各項分析研究，本計畫成功以 PCR 技術診斷隱孢子蟲及環孢子蟲，並利用限制酶分析其種別，可提供未來研究所用。

五、 結論與建議

本計畫利用文獻及自行設計之引子對，以 PCR 方法對隱孢子蟲及環孢子蟲建立檢測模式。先以陽性檢體經一連串條件測試無誤後，再進行水源與糞便檢體之檢測。結果顯示僅中部山地鄉可以檢測出隱孢子蟲陽性結果，而其增幅產物與限制酶反應，所切割之片段經分析後，證實為能夠造成流行性感染之 *C. parvum* 人型或 *C. parvum* 牛型；其他山地鄉則未能增幅出隱孢子蟲與環孢子蟲之特定片段。

由於第三年颱風頻繁，重創山地鄉之交通道路，使得水源檢體採取不易，加上土石沖刷導致水質渾濁，無法得取預期之山地鄉檢體數目，只好改以愛滋檢體作為監測台灣隱孢子蟲之實驗對象。由於台灣歷年未曾有檢測環孢子蟲之紀錄，且本次計畫中所有水源檢體亦未見環孢子蟲蹤跡，基於經費考量，在愛滋檢體中僅以檢測隱孢子蟲為主。在 341 個愛滋檢體中共檢測出 4 個隱孢子蟲陽性檢體，經限制酶切割分析，片段比對結果顯示 2 個為 *C. parvum* 人型，另外 2 個分別為 *C. muris* 以及 *C. meleagridis*，增加藉由動物感染之可能性。

本計畫成功建立隱孢子蟲及環孢子蟲之檢測模式，亦設計利用限制酶切割分析，可區分其主要基因型態，作為種別鑑定之用，提供日後對此二蟲調查或診斷基因型的參考。

六、 参考文献

- Aldom, J.E., A.H. Chagla. 1995. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20:186-187.
- Anderson, B.C., T. Donndelinger, R.M. Wilkins, J. Smith. 1982. Cryptosporidiosis in a veterinary student. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180:408.
- Anonymous. 1980. Immunodeficiency and Cryptosporidiosis. Demonstration at the Royal College of Physicians of London. *Br. Med. J.* 281:1123-1127.
- Arrowood, M.J., C.R. Sterling. 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *J. Clin. Microbiol.* 27:1490-1495.
- Alves, M., O. Matos, F. Spano, F. Antunes. 2000. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected in Lisbon, Portugal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94:291-297.
- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E.W. Dillen, J.V.D. Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.*

Clin. Microbiol. 28:495-503.

Chung, E., J.E. Aldom, R.A. Carreno, A.H. Chagla, M. Kostrzynska, H. Lee, G. Palmateer, J.T. Trevors, S. Unger, R. Xu, S.A.D. Grandis. 1999. PCR-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples. J. Microbiol. Methods 38:119-130.

Clarke, S. C. and M. McIntyre. 1996. Modified detergent Ziehl-Neelsen technique for the staining of *Cyclospora cayetanensis*. J.Clin.Pathol. 49:511-512.

Dalle, F., P. Roz, G. Dautin, D.M. Palma, E. Kohli, S.C. Bidault, M.G. Fleischmann, A. Gallay, S. Carbonel, F. Bon, C. Tillier, P. Beaudou, A. Bonnin. 2003. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. J. Clin. Microbiol. 41:2690-2693.

Dulski, P., M. Turner. 1988. The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using Percoll® density gradients. Avian Dis. 32:235-239.

- Fayer, R., C.A. Speer, J.P. Dubey. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. p. 1-41. In : *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer (ed.). CRC Press. Inc.. New York. N.Y.
- Franzen, C., A. Müller. 1999. Cryptosporidia and Microsporidia- Waterborne Diseases in the Immunocompromised Host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34:245-262.
- Garcia, L.S., D.A. Bruckner, T.C. Brewer, R.Y. Shimizu. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:185-190.
- Garcia, L.S., R.Y. Shimizu. 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35:1526-1529.
- Gatei, W., R.W. Ashford, N.J. Beeching, S.K. Kamwati, J. Greensill, C.A. Hart. 2002. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV- infected adult, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 8:204-206.

Gibbons, C.L., B.G. Gazzard, M. Ibrahim, S. Morris-Jones, C.S.L. Ong, F.M.

Awad-EI-Kariem. 1998. Correlation between markers of strain variation in *Cryptosporidium parvum*: evidence of clonality. *Parasitol. Int.* 47:139-147.

Guerrant, R.L. 1997. Cryptosporidiosis: An emerging highly infectious threat .

Emerg. Infect. Dis. 3:51-55.

Hsu, B.M., C. Huang, G.Y. Jiang. 1999. The prevalence of *Giardia* and

Cryptosporidium in Taiwan water supplies. *J. Toxicol. Environ. Health. part A.* 56:149-160.

Hsu, B.M., C. Huang, C.L. Hsu, Y.F. Hsu, J.H. Yeh. 1999. Occurrence of

Giardia and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and its watershed in southern Taiwan. *Wat. Res.* 33:2701-2707.

Hsu, B.M., C. Huang, C.L. Hsu. 2001. Analysis for *Giardia* cysts and

Cryptosporidium oocysts in water samples from small water systems in Taiwan. *Parasitol. Res.* 87:163-168.

Jinneman, K. C., J. H. Wetherington, W. E. Hill, A. M. Adams, J. M. Johnson, B.

J. Tenge, N. L. Dang, R. L. Manger, and M. M. Wekell. 1998. Template

preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. Oocysts directly from raspberries. J.Food Prot. 61:1497-1503.

Korich, D.G., J.R. Mead, M.S. Madore, N.A. Sinclair, C.R. Sterling. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 56:1423-1428.

Koudela, B., D. Modry. 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. Folia Parasitol. 45:93-100.

Leng, X., D.A. Mosier, R.D. Oberst. 1996. Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. Vet. Parasitol. 62:1-7.

MacKenzie, W.R., N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addis, K.R. Fox, J.B. Rose, J.P. Davis. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N. Engl. J. Med. 331:161-167.

Ma P, R. Soave. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J. Infect. Dis. 147:824-828

Morgan, U.M., C.C. Constantine, D.A. Forbes, R.C.A. Thompson. 1997. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J. Parasitol. 83:825-830.

Morgan U, R. Weber , L. Xiao , I. Sulaiman , RCA. Thompson, W. Ndiritu ,A Lal , A. Moore , P. Deplazes . 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. 38:1180-1183

Newman, R.D., K.L. Jaeger, T. Wuhib, A.A. Lima, R.L. Guerrant, C.L. Sears. 1993. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. J. Clin. Microbiol. 31:2080-2084.

O'Donoghue P.J. 1995. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and

animals. *Int. J. Parasitol.* 25:139-195.

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

Peng, M.M., L. Xiao . 1997. Genetic polymorphism among transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.* 3:567-573.

Pieniasek, N. J., F. J. Bornay-Llinares, S. B. Slemenda, A. J. da Silva, I. N. Moura, M. J. Arrowood, O. Ditrich, and D. G. Addiss. 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg. Infect. Dis.* 5:444-449.

Rosenblatt, J.E., L.M. Sloan. 1993. Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31:1468-1471.

Shields JM and Olson BH. 2003. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int. J. Parasitol.* 33: 371-391

Smith, H.V., J.B. Rose. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol. Today* 14:14-22.

Spano, F., L. Putignani, J. Mclauchlin, D.P. Casemore, A. Crisanti . 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrarii* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Let.* 150:209-217.

Spano, F., A. Crisanti. 2000. *Cryptosporidium parvum* : the many secrets of a small genome. *Int. J. Parasitol.* 30:553-565.

Sturbaum, G.D., C. Reed, P.J. Hoover, B.H. Jost, M.M. Marshall, C.R. Sterling. 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2665-2668.

Ungar, B.L.P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of

Cryptosporidium antigens in fecal specimens. J. Clin. Microbiol.
28:2491-2495.

Visvesvara GS, H. Moura , E. Kovacs-Nace, S. Wallace, ML. Eberhard. 1997.
Uniform staining of Cyclospora oocysts in fecal smears by a modified
safranin technique with microwave heating. J. Clin Microbiol. 35 : 730–733.

Ward, L.A., Y. Wang. 2001. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA
from frozen feces for PCR. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 41:37-42.

Webster, K.A., J.D.E. Pow, M. Giles, J. Catchpole, M.J. Woodward. 1993.
Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain
reaction. Vet. Parasitol. 50:35-44.

Wu, Z., I. Nagano, A. Matsuo, S. Uga, I. Kimata, M. Iseki, Y. Takahashi. 2000.
Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high
sensitivity. Mol. Cell. Prob. 14:33-39.

Xiao, L., L. Escalante, C. Yang, I. Sulaiman, A.A. Escalante, R.J. Montali, R.
Fayer, A.A. Lal. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites
based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol.

65:1578-1583.

Xiao, L., U.M. Mprgan, R. Fayer, R.C.A. Thompson, A.A Lal. 2000.

Cryptosporidium systematics and implications for public health. Parasitol.

Today 16:287-292.

七、表

表 6. 比對 GenBank 之序列，將此巢式聚合酶連鎖反應可擴增之序列，作限制酵素 *Mnl* I 切割點分析：(A) 切割之片段；(B) 依切割片段分為三大類

	<i>Mnl</i> I			
<i>C. cayetanensis</i>	86		296	
<i>C. colobi</i>	86		296	
<i>C. papionis</i>	86		296	
<i>C. cercopithecii</i>	85		296	
<i>C. sp. Strain Gombe 40</i>	86		296	
<i>C. sp. Strain Gombe 34</i>	86		296	
<i>C. sp. Strain Gombe 22</i>	86		296	
<i>E. porci</i>	86		299	
<i>E. alabamensis</i>	86		297	
<i>E. meleagritidis</i>	86		298	
<i>E. weybridgensis</i>	85		298	
<i>E. ahsata</i>	85		297	
<i>E. faurei</i>	85		297	
<i>E. ovinoidalis</i>	85		297	
<i>E. cradallis</i>	84		296	
<i>E. chactodipi</i>	84	2	296	
<i>E. onychomysis</i>	84	2	296	
<i>Caryospora bigenetica</i>	84	2	302	
<i>E. polita</i>	86		156	143
<i>E. scholtysecki</i>	86		156	142
<i>E. nieschulzi</i>	86		156	141
<i>E. scabra</i>	86		156	141
<i>E. papillata</i>	86		156	140
<i>E. catronensis</i>	86		156	140
<i>E. pilarensis</i>	86		156	137
<i>E. falciformis</i>	83		156	144
<i>E. tenella</i>	86		156	142

表 6. 比對 GenBank 之序列，將此巢式聚合酶連鎖反應可擴增之序列，作限制酵素 *Mnl* I 切割點分析：(A) 切割之片段；(B) 依電泳可見之切割片段可大致分為三大類（續一）

(A)

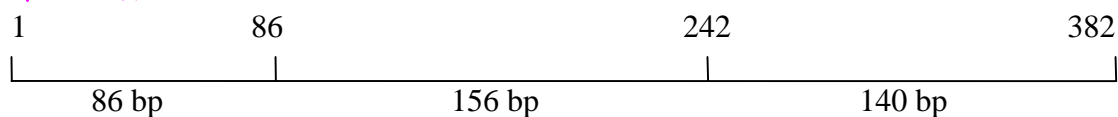
<i>E. tenella</i> 5.8s	86		156		141
<i>E. necatrix</i>	86		156		141
<i>E. adeneodei</i>	86		156		141
<i>Isospora robini</i>	86		156		140
<i>E. albigulae</i>	84	2	156		140
<i>E. rioarribaensis</i>	84	2	156		140
<i>E. reedi</i>	84	2	156		140
<i>E. antrozoii</i>	84	2	157		140
<i>E. arizonensis</i>	84	2	157		140
<i>E. peromysci</i>	84	2	156		141
<i>E. leucopi</i>	77	2	156		140
<i>E. brunetti</i>	86		121		176
<i>E. mivati</i>	86		156	20	122
<i>E. acerulina</i>	86		156	20	122
<i>E. praecox</i>	86		156	20	122
<i>E. mitis</i>	86		154	20	123

(B)

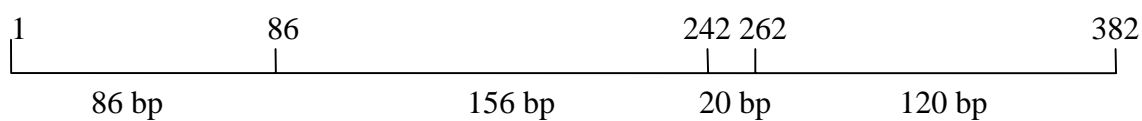
第一大類



第二大類



第三大類



八、圖

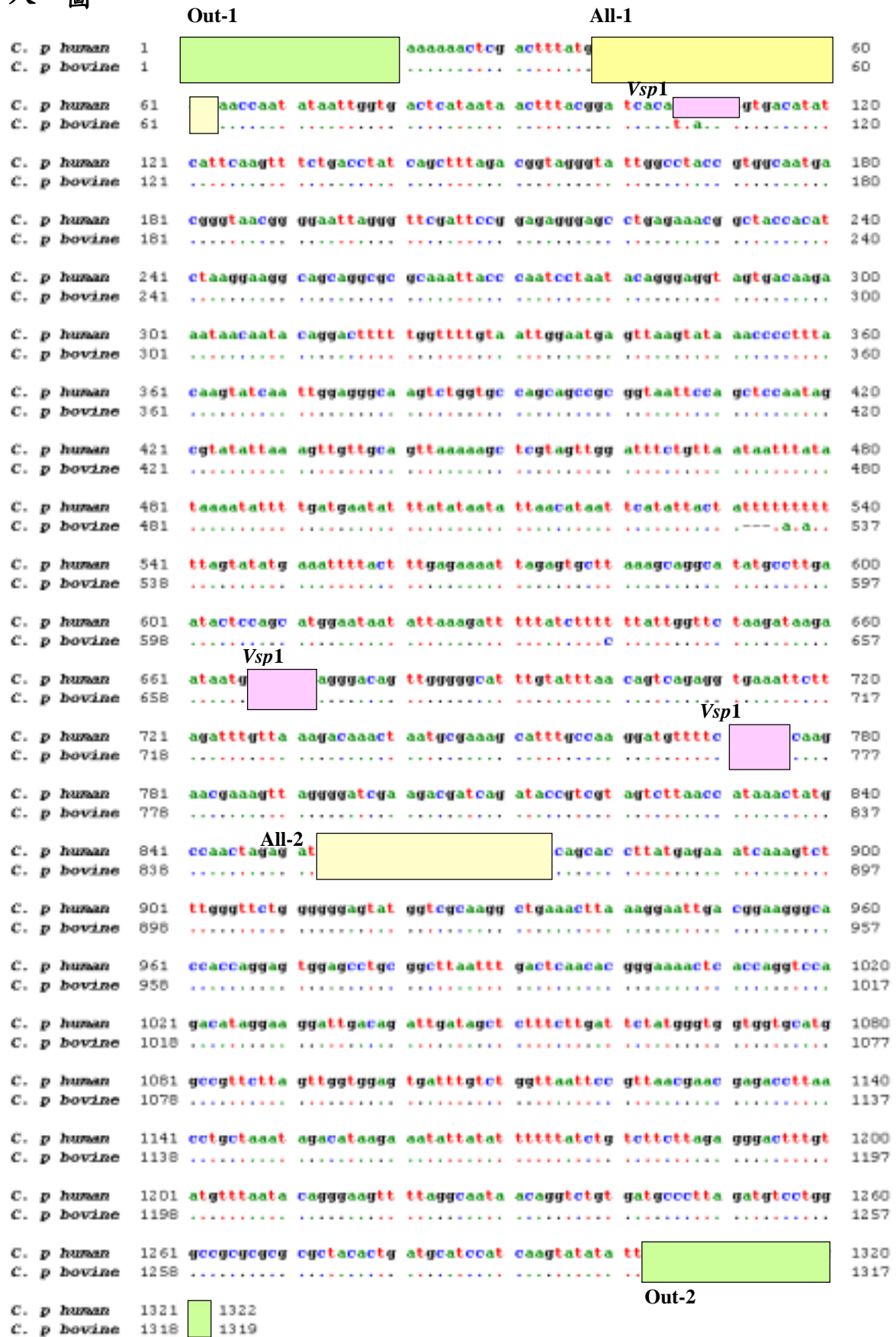


圖 2. *C. parvum* 人型及牛型 18S rRNA 序列比對及巢式 PCR 之 primers(第一段:Out-1, Out-2; 第二段: All-1, All-2)與限制酶 *Vsp* I 作用位置。

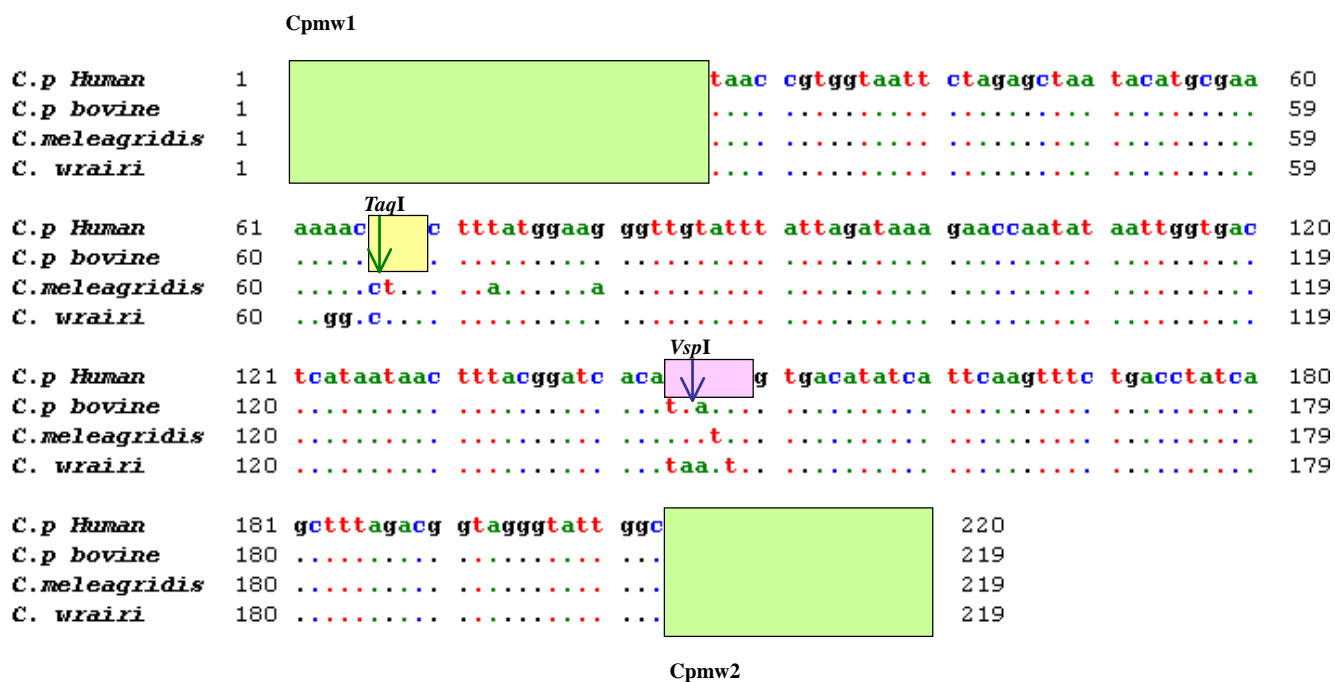


圖 2. *C. parvum* 人型, 牛型、*C. meleagridis* 及 *C. wrairi* 之 18S rRNA 序列比對及單次 PCR primers 與限制酶 *Taq* I 與 *Vsp* I 作用位置。

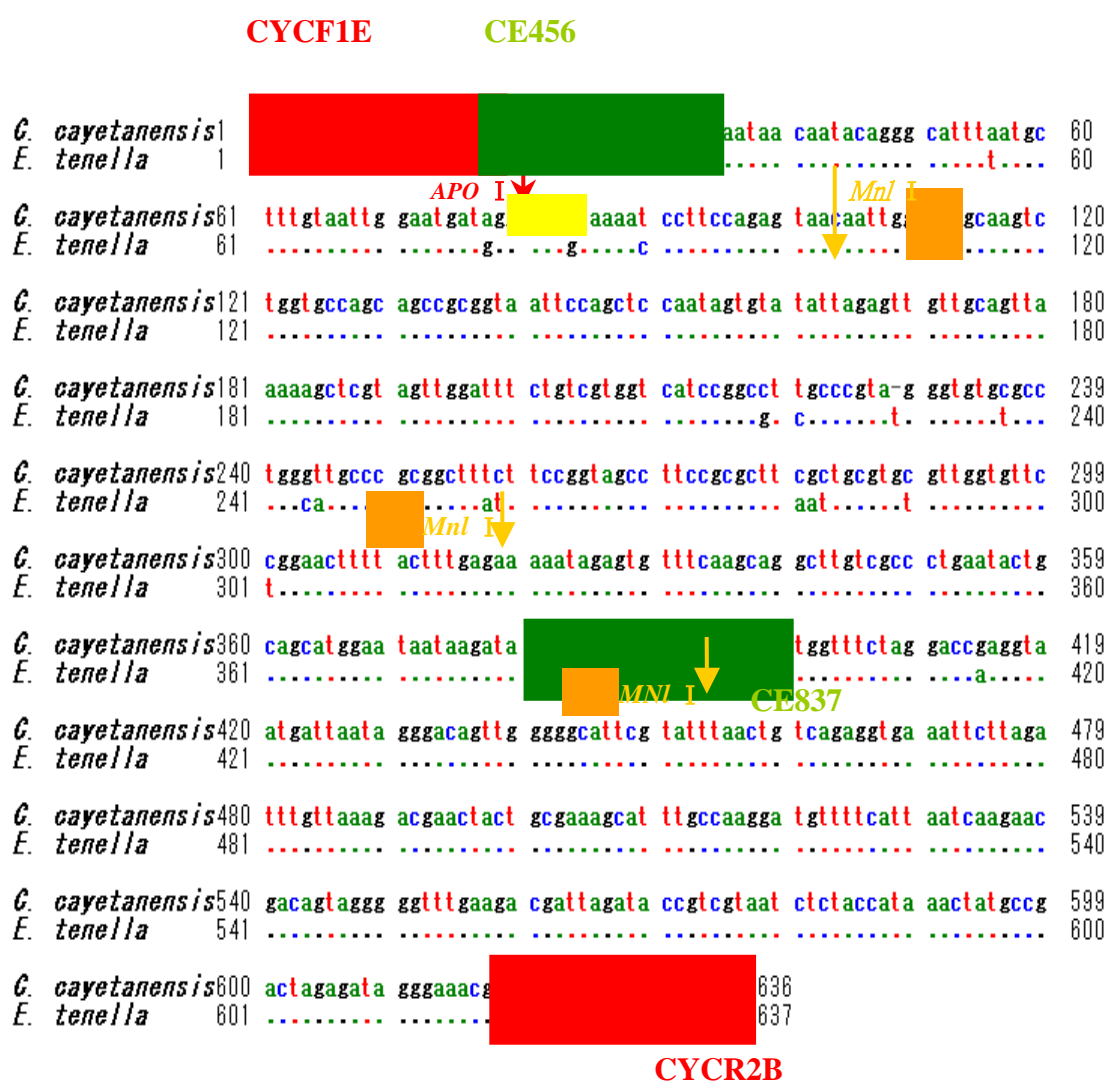
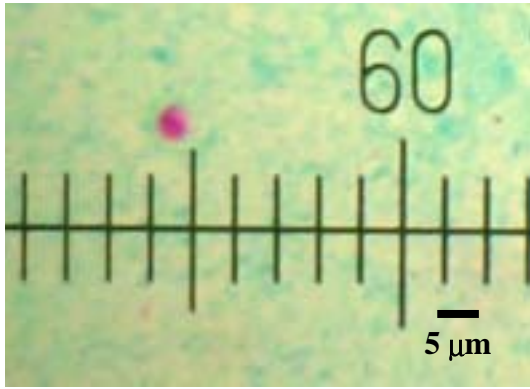
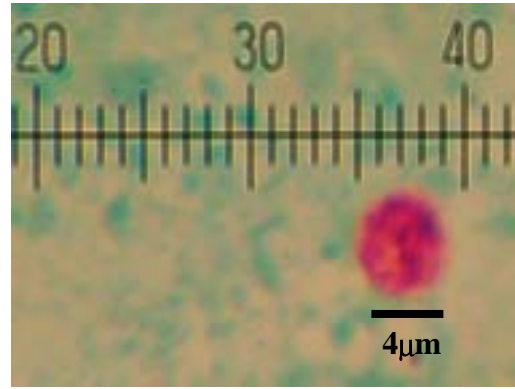


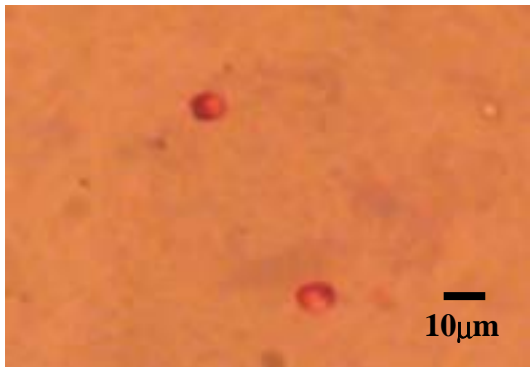
圖 3. 巢式聚合酶連鎖反應選擇之第一對及第二對引子的位置圖，及限制酵素 *Mnl* I 及 *Apo* I 作用之切點。



A



B



C



D

圖 4.陽性檢體鏡檢判別。(A)隱孢子蟲 200X ;(B) 隱孢子蟲 400X ;(C) 隱孢子蟲 1000X ;
(D) 環孢子蟲 ;(E)艾美球蟲。

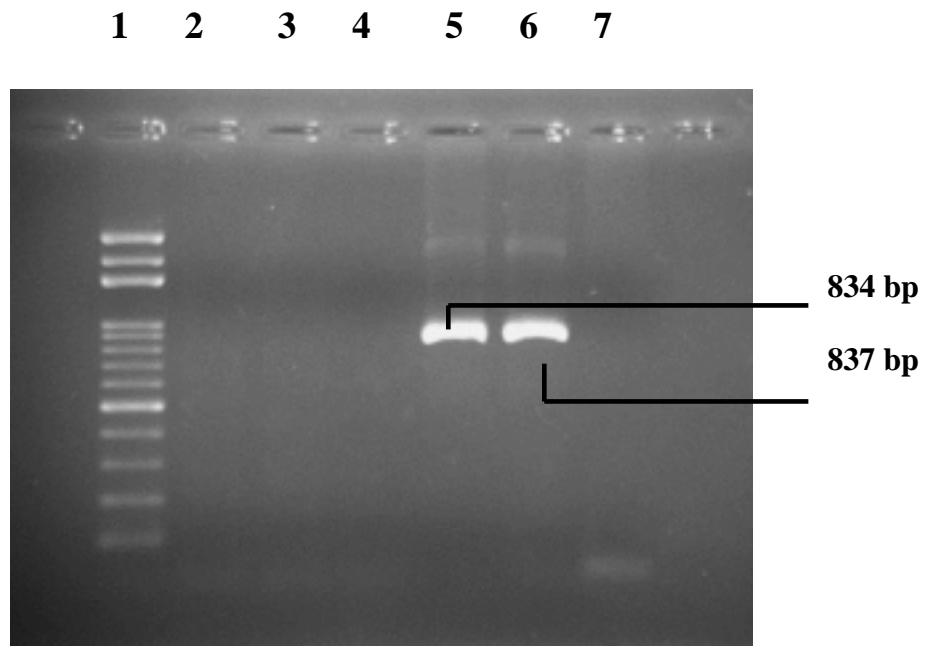


圖 5. 巢式 PCR 陽性判讀。lane 1 為 100 bp marker，lane 2-4 為第一段 PCR 結果，lane 5-7 為第二段 PCR 結果。lane 2,5 為 *C. parvum* 牛型，lane 3,6 為 *C. parvum* 人型，lane 4,7 為陰性對照。

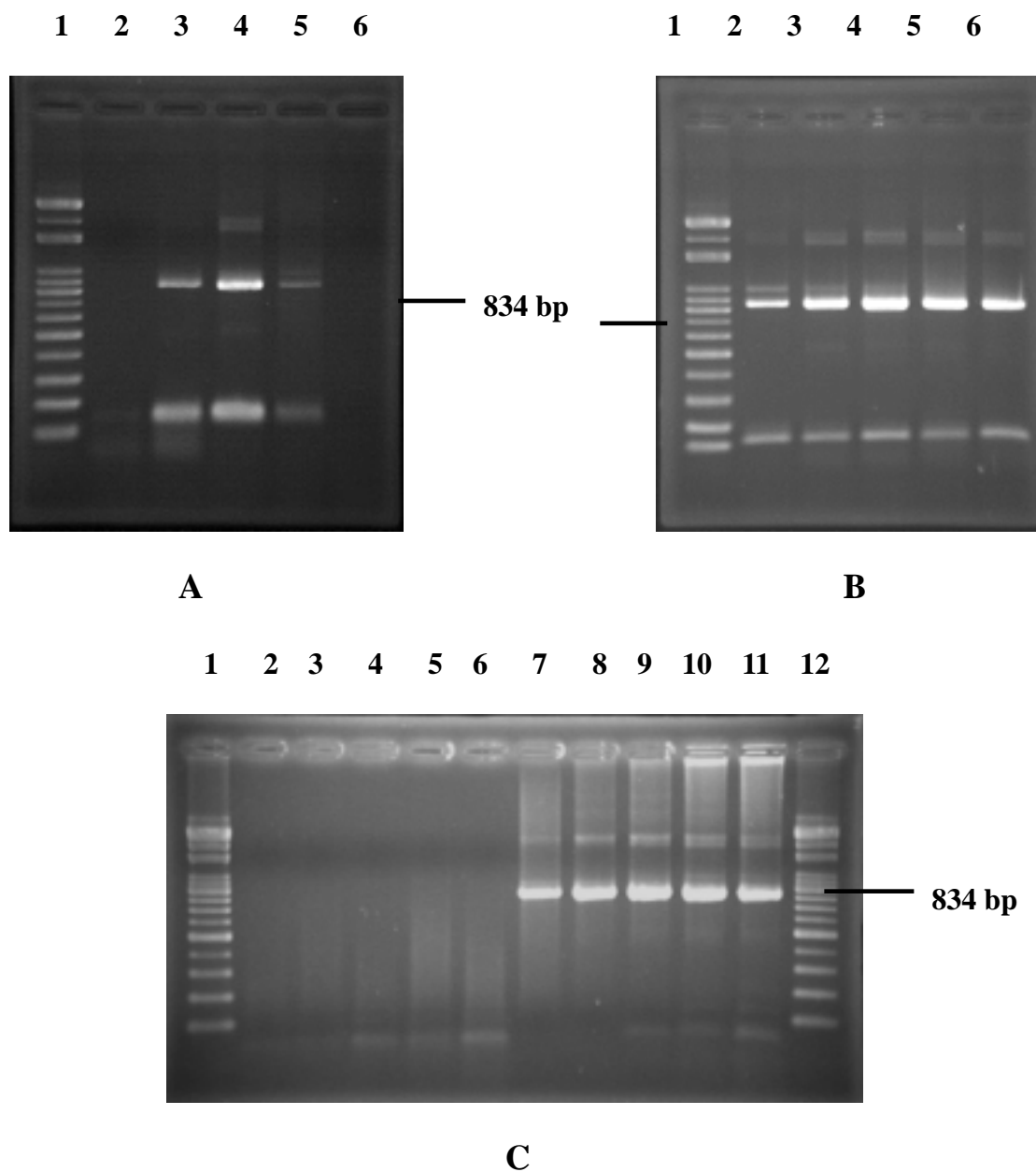


圖 6. 巢式 PCR 條件測定。(A) Annealing 溫度，lane 1-6 皆為第二段增幅結果。lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為 50°C，lane 3 為 55.5°C，lane 4 為 59.3°C，lane 5 為 62.1°C，lane 6 為 65°C；(B) 第二段 PCR 合適之 MgCl₂ 濃度測定。lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為 1 mM，lane 3 為 2 mM，lane 4 為 3 mM，lane 5 為 4 mM，lane 6 為 5 mM；(C) 合適之 primer 濃度測定。lane 2-6 為第一次 PCR 產物，lane 7-11 為第二次 PCR 產物。lane 1,12 為 100 bp marker，lane 2,7 為 0.1 μM，lane 3,8 為 0.2 μM，lane 4,9 為 0.4 μM，lane 5,10 為 0.8 μM，lane 6,11 為 1.6 μM。

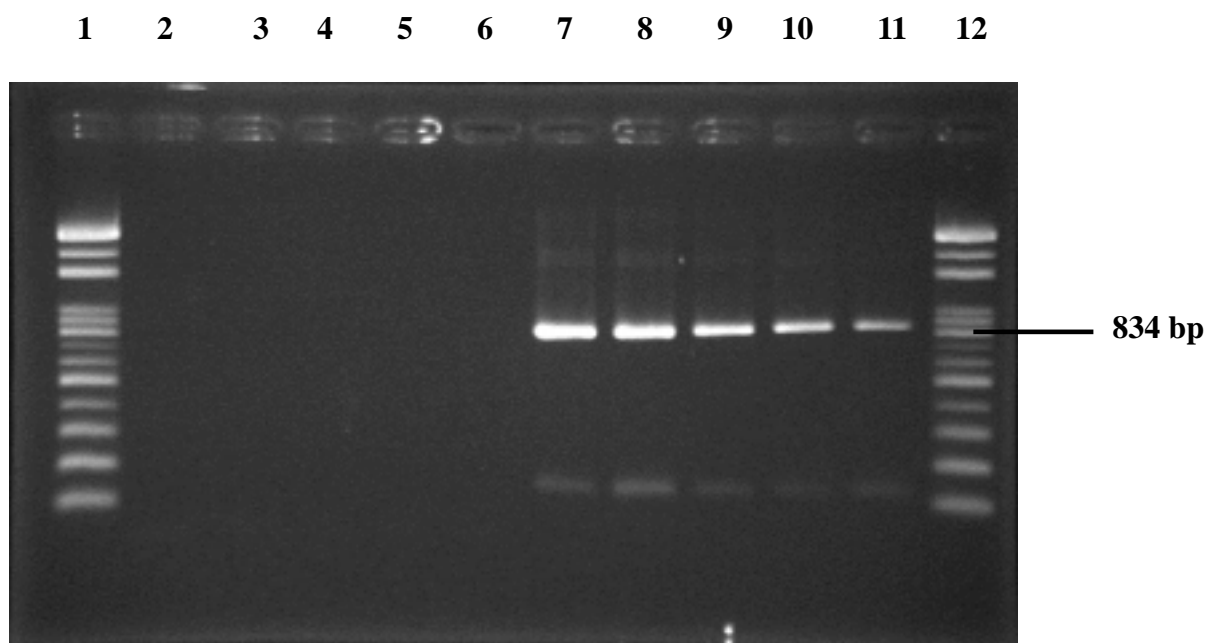


圖 7. 巢式 PCR 靈敏度測試。lane 2-6 為第一段 PCR 產物，lane 7-11 為第二段 PCR 產物。
lane 1,12 為 100 bp marker，lane 2,7 為 1000 個卵囊，lane 3,8 為 100 個卵囊，lane 4,9 為
50 個卵囊，lane 5,10 為 10 個卵囊，lane 6,11 為 1 個卵囊。

AF222998	1	ggaagggttg	tatttattag	ataaagaacc	aatataattg	gtgactcata	ataactttac	60
AF093490	1	60
<i>C. p. human</i>	1	60
<i>C. p. bovine</i>	1	60
AF222998	61	ggatcacaaat	taatgtgaca	tatcattcaa	gtttotgacc	tatcagcttt	agacggtagg	120
AF093490	61t.a.....	120
<i>C. p. human</i>	61t.a.....	120
<i>C. p. bovine</i>	61t.a.....	120
AF222998	121	gtattggcct	acogtggcaa	tgacgggtaa	eggggaatta	gggttcgatt	ccggagaggg	180
AF093490	121	180
<i>C. p. human</i>	121	180
<i>C. p. bovine</i>	121	180
AF222998	181	agcctgagaa	acggctacca	catotaagga	agccagcag	cgcgcaaat	acccaatcct	240
AF093490	181	240
<i>C. p. human</i>	181	240
<i>C. p. bovine</i>	181	240
AF222998	241	aatacagggg	ggtagtgaca	agaataaaca	atacaggact	ttttggtttt	gtaattggaa	300
AF093490	241	300
<i>C. p. human</i>	241	300
<i>C. p. bovine</i>	241	300
AF222998	301	tgagtttaagt	ataaacccct	ttacaagtat	caattggagg	gcaagtctgg	tyccagcagc	360
AF093490	301	360
<i>C. p. human</i>	301	360
<i>C. p. bovine</i>	301	360
AF222998	361	cgcggttaatt	ccagctcaa	tagcgtatat	taaagttggt	gcagttaaaa	agctcgtagt	420
AF093490	361	420
<i>C. p. human</i>	361	420
<i>C. p. bovine</i>	361	420
AF222998	421	tggatttctg	ttaataatth	atataaata	ttttgatgaa	tatttatata	atattaacat	480
AF093490	421	480
<i>C. p. human</i>	421	480
<i>C. p. bovine</i>	421	480
AF222998	481	aatteatatt	actatthttt	tttttagtat	atgaatthtt	actttgagaa	aattagagtg	540
AF093490	481a.a.....	537
<i>C. p. human</i>	481a.a.....	540
<i>C. p. bovine</i>	481a.a.....	537
AF222998	541	ettaagcag	gcatatgct	tgaaactcc	agcatggaat	aatattaag	atthttatct	600
AF093490	538	597
<i>C. p. human</i>	541	600
<i>C. p. bovine</i>	538	597
AF222998	601	tttttattgg	ttctaagata	agaataatga	ttaatagggg	cagttggggg	catttgatt	660
AF093490	598	..C.....	657
<i>C. p. human</i>	601	660
<i>C. p. bovine</i>	598	..C.....	657
AF222998	661	taacagtcag	aggtgaatth	cttagatttg	ttaaagcaa	actaatgca	aagcatttgc	720
AF093490	658	717
<i>C. p. human</i>	661	720
<i>C. p. bovine</i>	658	717
AF222998	721	caaggatgth	ttcattaatc	agaacgaaa	gttaggggat	cgaaagcagat	cagatacctg	780
AF093490	718	777
<i>C. p. human</i>	721	780
<i>C. p. bovine</i>	718	777
AF222998	781	cgtagcttta	accataaact	atgccaaacta	gagattggag	gttgthcctt	actcctt	837
AF093490	778	834
<i>C. p. human</i>	781	837
<i>C. p. bovine</i>	778	834

圖 8. *C. parvum* 人型與牛型之巢式 PCR 產物序列與 GenBank 標準株序列比對圖。AF222998

為 GenBank 中 *C. parvum* 人型之序列編號；AF093490 則為 *C. parvum* 牛型之序列編號。

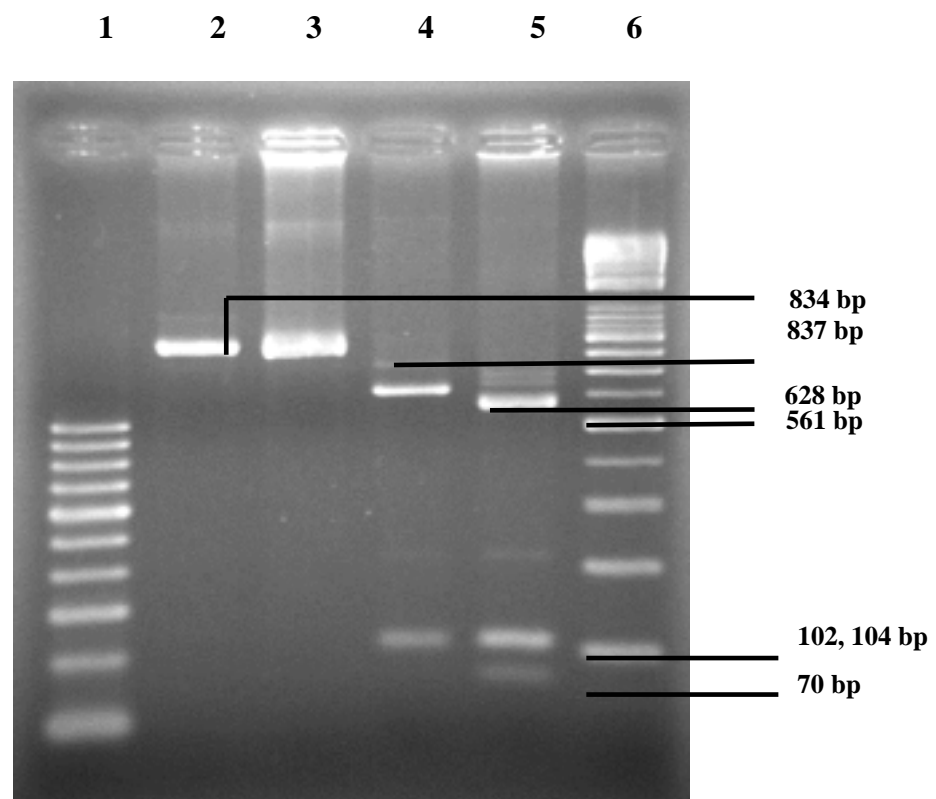


圖 9. 巢式 PCR 產物經限制酶 *Vsp* I 分析結果。lane 1 為 50 bp marker, lane 2 為 *C. parvum* 牛型未經 *Vsp* I 作用之 834 bp, lane 3 為 *C. parvum* 人型未經 *Vsp* I 作用之 837 bp, lane 4 為 *C. parvum* 牛型經 *Vsp* I 作用產生 102 bp, 104 bp 與 628 bp(102 bp 與 104 bp 無法區分), lane 5 為 *C. parvum* 人型經 *Vsp* I 作用產生 70 bp, 102 bp, 104 bp 與 561bp(102 bp 與 104 bp 無法區分), lane 6 為 100 bp marker。

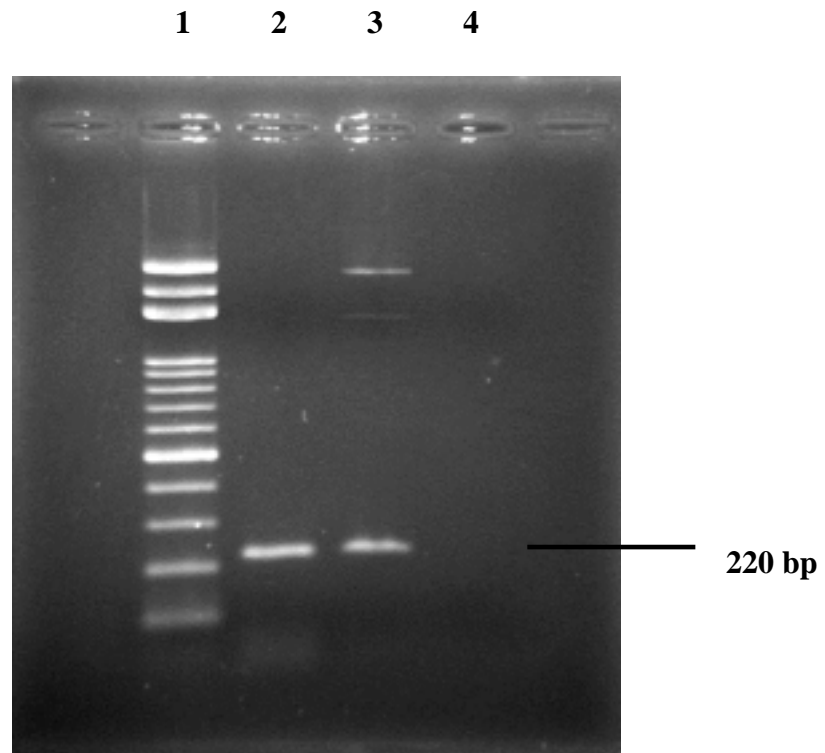


圖 10. 單次 PCR 陽性判讀。lane 1 為 100 bp marker， lane 2 為 *C. parvum* 牛型， lane 3 為 *C. parvum* 人型， lane 4 為陰性對照。

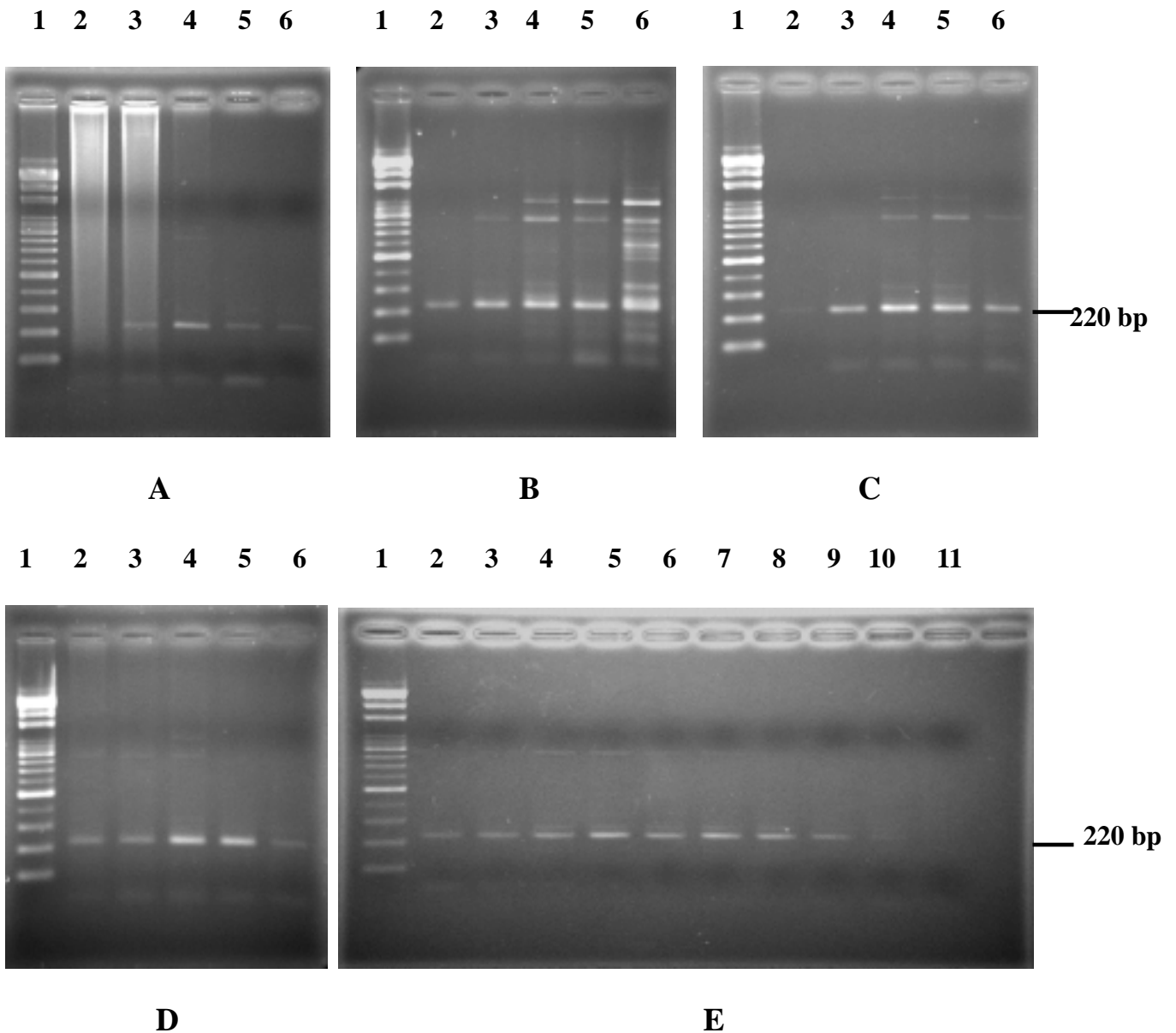


圖 11. 單次 PCR 條件測定。(A) Annealing 溫度測定。lane 1 為 100 bp marker, lane 2 為 59.1 , lane 3 為 57.2 , lane 4 為 54.7 , lane 5 為 53 , lane 6 為 51 ; (B) primer 濃度測定。lane 1 為 100 bp marker, lane 2 為 0.05 mM, lane 3 為 0.1 mM, lane 4 為 0.2 mM, lane 5 為 0.4 mM, lane 6 為 0.8 mM; (C) MgCl₂ 濃度測定。lane 1 為 100 bp marker, lane 2 為 1 mM, lane 3 為 2 mM, lane 4 為 3 mM, lane 5 為 4 mM, lane 6 為 5 mM; (D) dNTP 濃度測定。lane 1 為 100 bp marker, lane 2 為 0.05 mM, lane 3 為 0.1 mM, lane 4 為 0.2 mM, lane 5 為 0.4 mM, lane 6 為 0.6 mM ; (E) DNA 量測定。lane 1 為 100 bp marker, lane 2 為 1 μl, lane 3 為 2 μl, lane 4 為 3 μl, lane 5 為 4 μl, lane 6 為 5 μl, lane 7 為 6 μl, lane 8 為 7 μl, lane 9 為 8 μl, lane 10 為 9 μl, lane 11 為 10 μl。

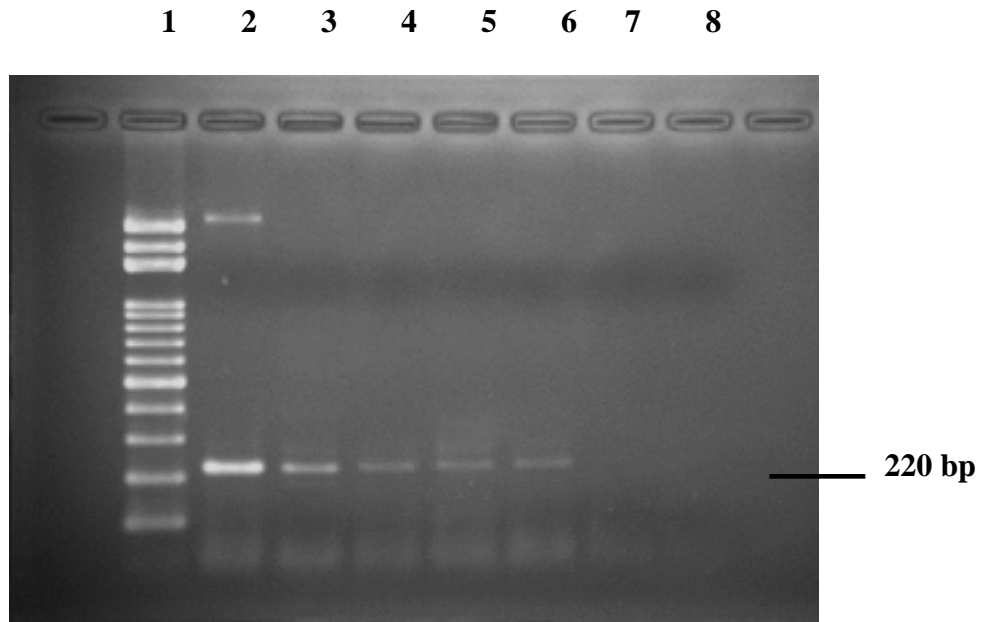


圖 12. 單次 PCR 靈敏度測定。lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為 2000 個卵囊，lane 3 為 800 個卵囊，lane 4 為 200 個卵囊，lane 5 為 80 個卵囊，lane 6 為 20 個卵囊，lane 7 為 8 個卵囊，lane 8 為陰性對照。

```

AF222998 1  aettgataat cttttactta catggataac cgtggtaatt ctagagctaa tacatggaa 60
AF093490 1  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 59
C.p Human 1  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 60
C.p bovine 1  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 60

AF222998 61  aaaactcgac tttatggaag ggttgatatt attagataaa gaaccaatat aattggtgac 120
AF093490 60  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 119
C.p Human 61  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 120
C.p bovine 61  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 120

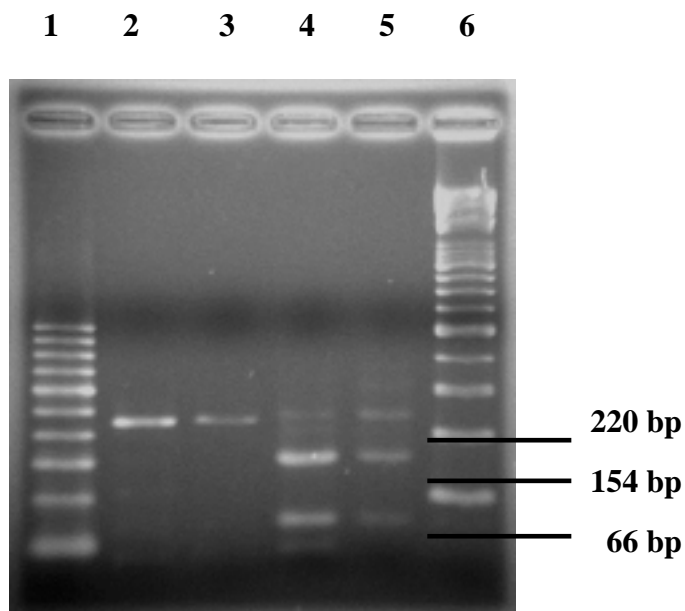
AF222998 121  tcataataac tttacggatc acaattaatg tgacatatca ttaagtttc tgacctatca 180
AF093490 120  .....  .....  ..t.a...  .....  .....  ..... 179
C.p Human 121  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 180
C.p bovine 121  .....  .....  ..t.a...  .....  .....  ..... 180

AF222998 181  gotttagacg gtagggatt ggctaccgt ggcaatgacg 220
AF093490 180  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 219
C.p Human 181  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 220
C.p bovine 181  .....  .....  .....  .....  .....  ..... 220

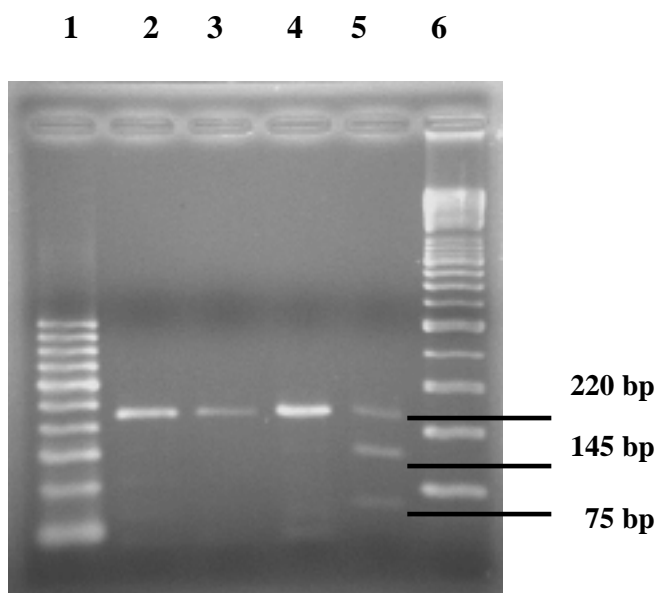
```

圖 13. *C. parvum* 人型與牛型之單次 PCR 產物序列與 GenBank 標準株序列比對圖。

AF222998 為 GenBank 中 *C. parvum* 人型序列編號；AF093490 則為 *C. parvum* 牛型序列編號。

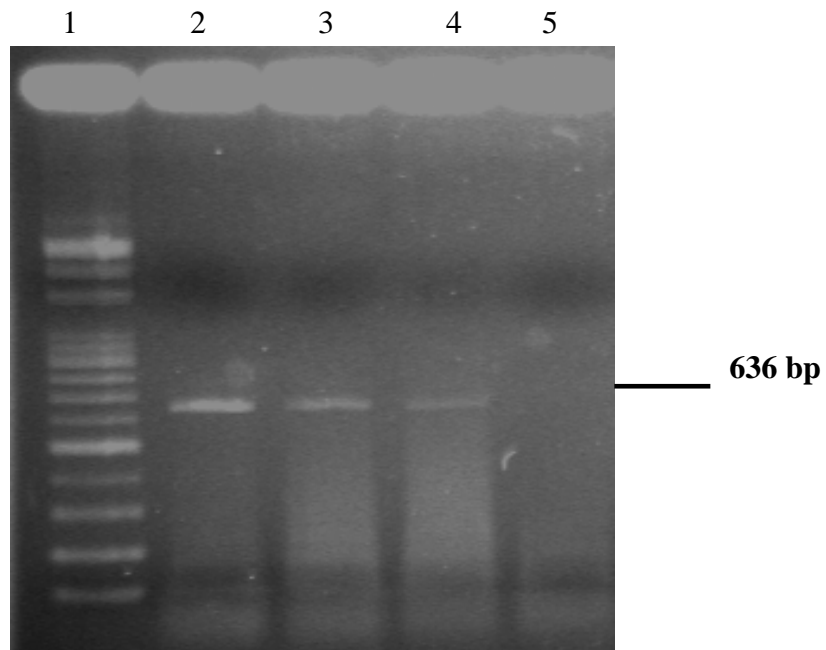


A

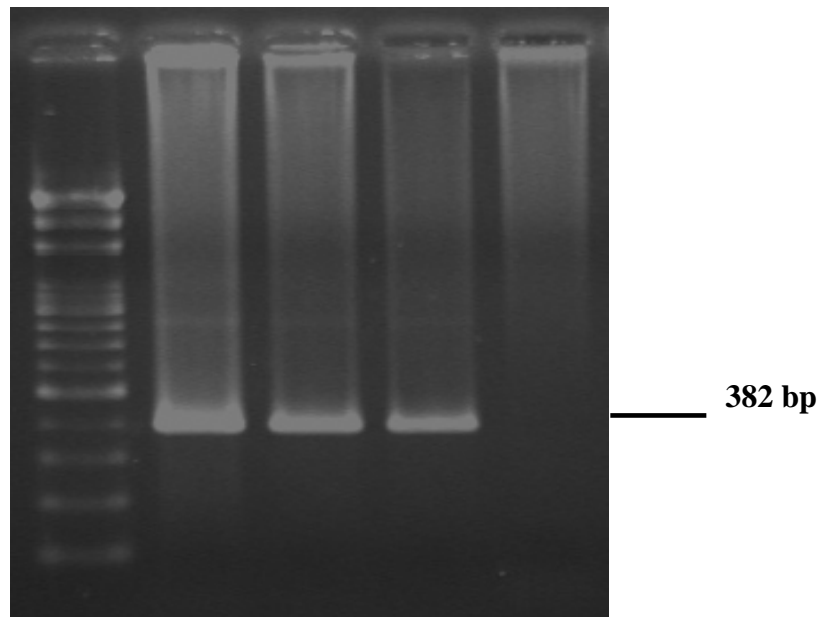


B

圖 14. 單次 PCR 增幅產物之限制酶分析。lane 1 皆為 50 bp marker；lane 6 則為 100 bp marker；lane 2,4 為 *C. parvum* 牛型；lane 3,5 為 *C. parvum* 人型。(A) *Taq* I 作用情形。lane 2,3 為未經 *Taq* I 作用之 220 bp，lane 4,5 為經 *Taq* I 作用產生 154 bp 與 66 bp；(B) *Vsp* I 作用情形。lane 2,3 為未經 *Vsp* I 作用之 220 bp，lane 4 為 *C. parvum* 牛型經 *Vsp* I 作用後仍無法被分割，lane 5 為 *C. parvum* 人型經 *Vsp* I 作用產生 145 bp 與 75bp。



A



B

圖 15. 巢式聚合酶連鎖反應結果。(A) 第一次 PCR；(B) 第二次 PCR。Lane 1 為 100 bp DNA Maker，lane 2-3 為 *E. tenella*，lane 4 為 *C. cayetanensis*，lane 5 為 negative control (以三次水取代 DNA template)。

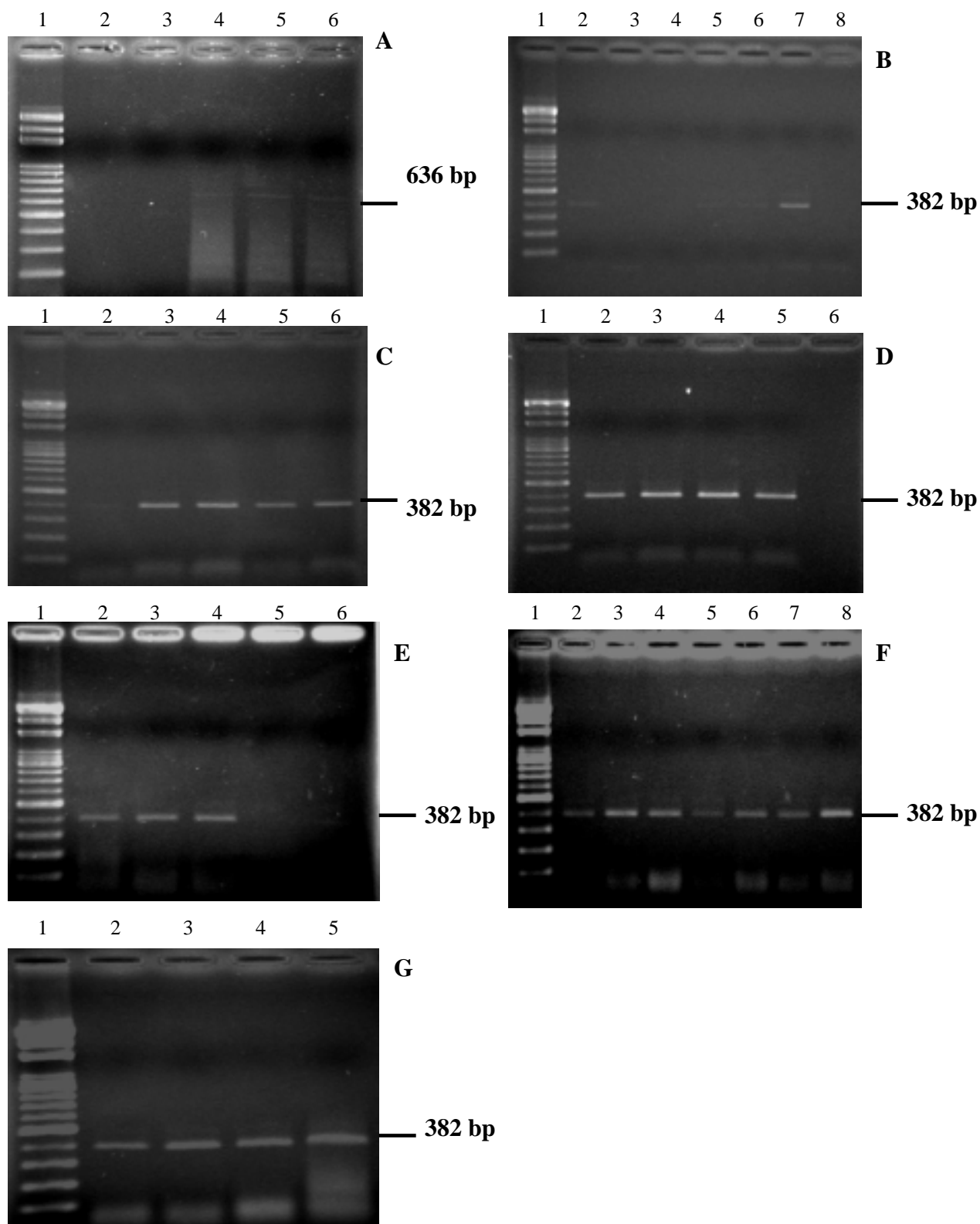


圖 8. 測試巢式聚合酶反應之合適條件。Lane 1 為 100 bp DNA Maker，(A) 第一次 PCR 之黏合溫度：lane 2-6 分別為 51、52、53、54、55°C；(B) 第二次 PCR 之黏合溫度：lane 2 為 positive control，lane 3-8 分別為 52、53、54、55、56、57°C；(C) MgCl₂ 濃度：lane 2-6 分別為 3、3.5、4、4.5、5μM；(D) 引子濃度：lane 2-6 分別為 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7μM；(E) dNTP 濃度：lane 2-6 分別為 100、150、200、250、300μM；(F) Taq 量：lane 2-4 分別為 2.5、5、7.5U；總體積量：lane 5、7 為 50μl，lane 6、8 為 100μl；(G) 進行反應之循環數：lane 2、4 為 36 循環，lane 3、5 為 46 循環。

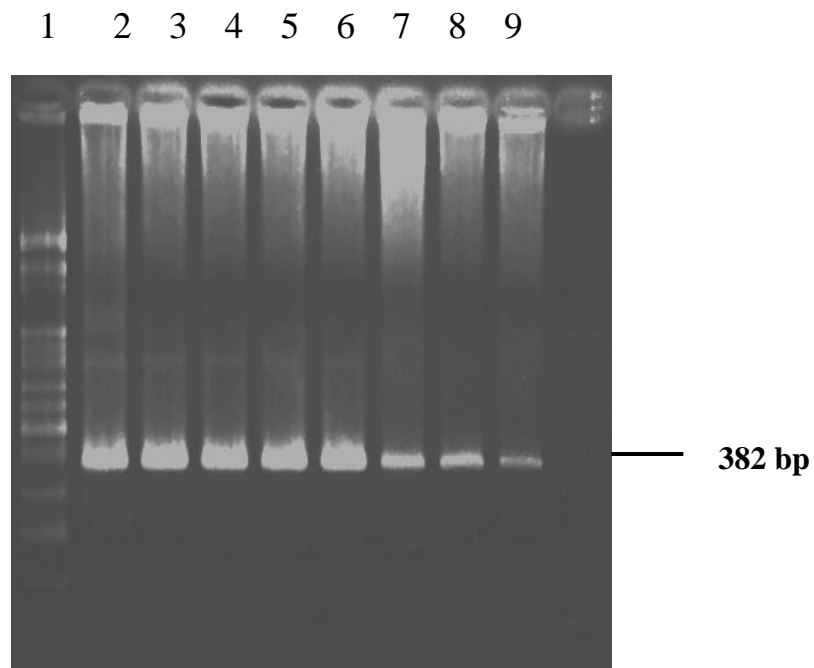


圖 17. 巢式聚合酶連鎖反應之靈敏度測試。第二次 PCR：lane 1 為 100 bp DNA Maker，lane 1 為 positive control，lane 2-8 分別為 122、30、14、10、5、2、1 個卵囊，lane 9 為 negative control。

```

AF111183      1  ttcgagstgag tgacgagaaa taacaataca gggcatttaa tgctttgtaa ttggaatgat 60
U40264       1  .....t. .... 60
C. cayetanensis 1  ..... 60
E. tenella   1  .....t. .... 60

AF111183     61  aggaatttaa aatccttcca gagtaacaat tggagggcaa gtctggcgcc agcagccgcg 120
U40264      61  g.....g... ..C..... 120
C. cayetanensis 61  ..... 120
E. tenella   61  g.....g... ..C..... 120

AF111183    121  gtaattccag ctccaatagt gatatattaga gttgttgag ttaaaaagct cgtagttgga 180
U40264     121  ..... 180
C. cayetanensis 121  ..... 180
E. tenella   121  ..... 180

AF111183    181  tttctgtcgt ggtcatccgg ccttggccgt a-ggggtgct gcctgggtg cccgcggctt 239
U40264     181  ..... -g.C..... .t.....t .....Ca.. ..t..... 240
C. cayetanensis 181  ..... -g.C..... .t.....t .....Ca.. ..t..... 239
E. tenella   181  ..... -g.C..... .t.....t .....Ca.. ..t..... 240

AF111183    240  tcttccgga gccttccgc cttgctgct tgcgttggg ttccggaact tttactttga 299
U40264     241  at..... ..aat..... .t..... .t..... 300
C. cayetanensis 240  ..... ..aat..... .t..... .t..... 299
E. tenella   241  at..... ..aat..... .t..... .t..... 300

AF111183    300  gaaaaataga gtgtttcaag caggcttctc gccctgaata ctgcagcatg gaataataag 359
U40264     301  ..... 360
C. cayetanensis 300  ..... 359
E. tenella   301  ..... 360

AF111183    360  ataggacctt ggttctatit tgt 382
U40264     361  .....C ..... 383
C. cayetanensis 360  ..... 382
E. tenella   361  .....C ..... 383

```

圖 18. 18S rRNA 序列比對圖。AF111183 和 U40264： *C. cayetanensis* 和 *E.tenella* 之 Genbank 標準序列。 *C. cayetanensis* 和 *E.tenella*：為實驗使用之陽性對照

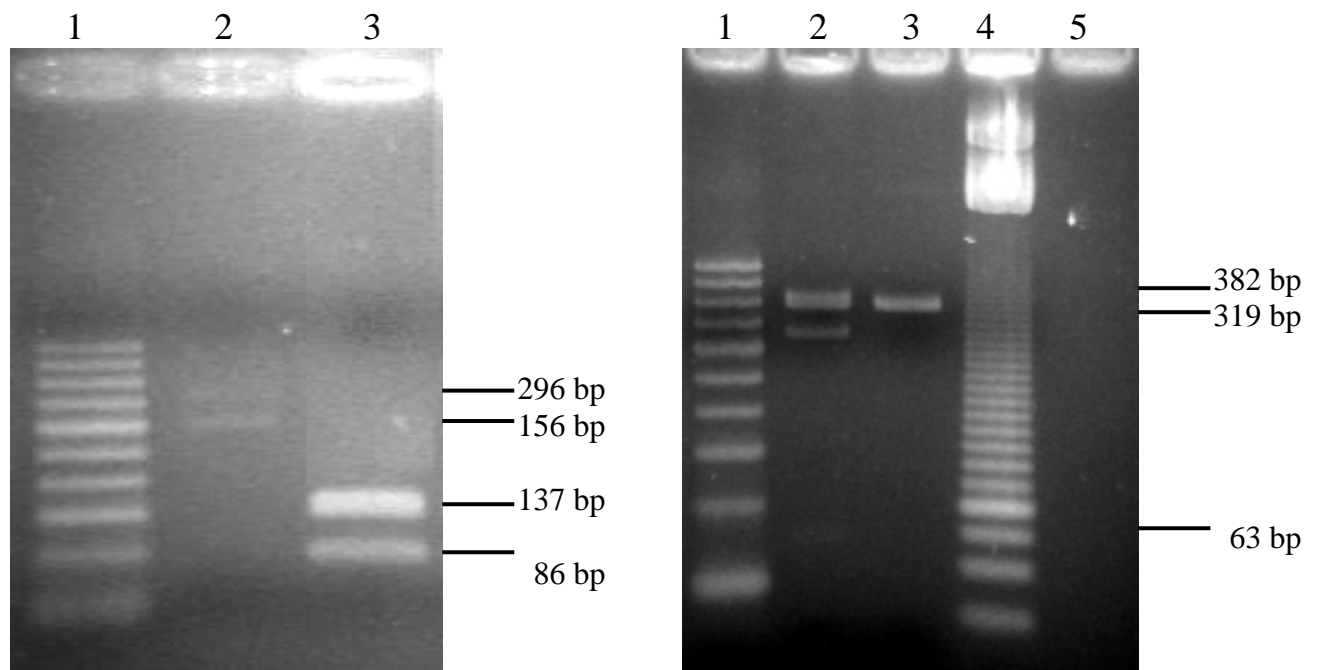


圖 19. 限制酶分析：(A) *Mnl* I ；(B) *Apo* I 。lane M50 為 50 bp DNA Maker ， lane M20 為 20 bp DNA Maker ， lane1 為 *C. cayetanensis* ， lane 2 為 *E. tenella* 。

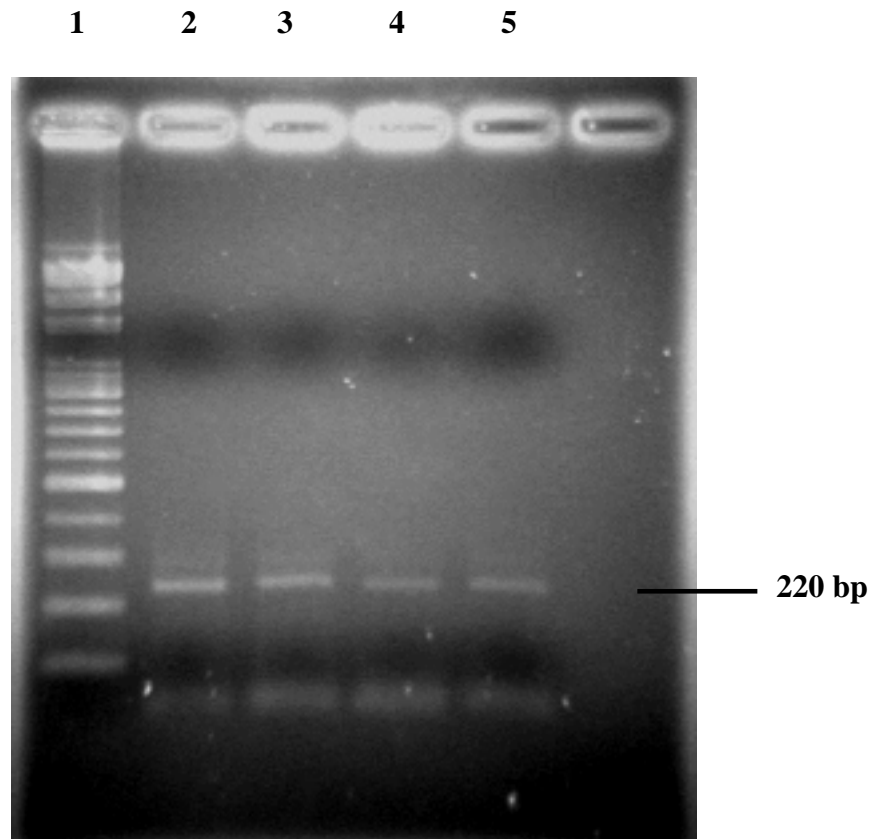
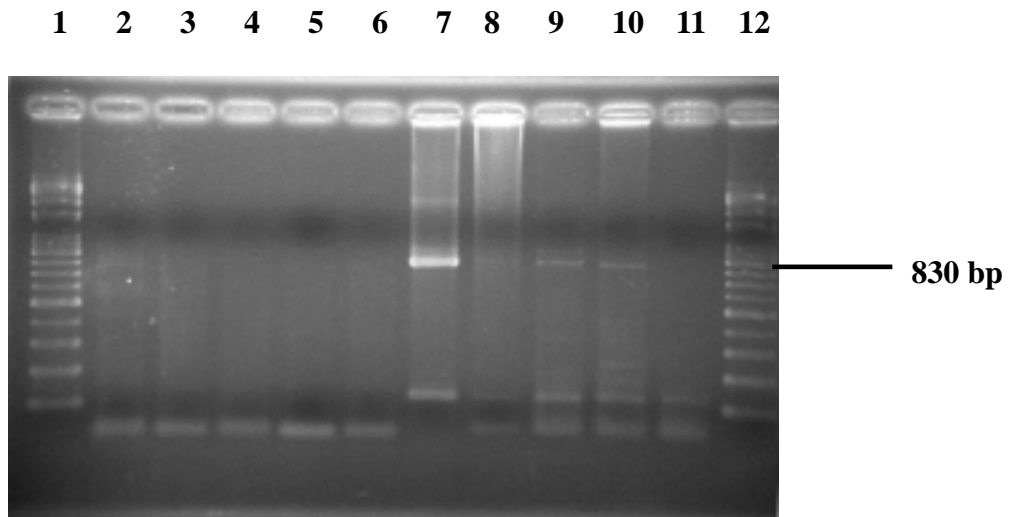
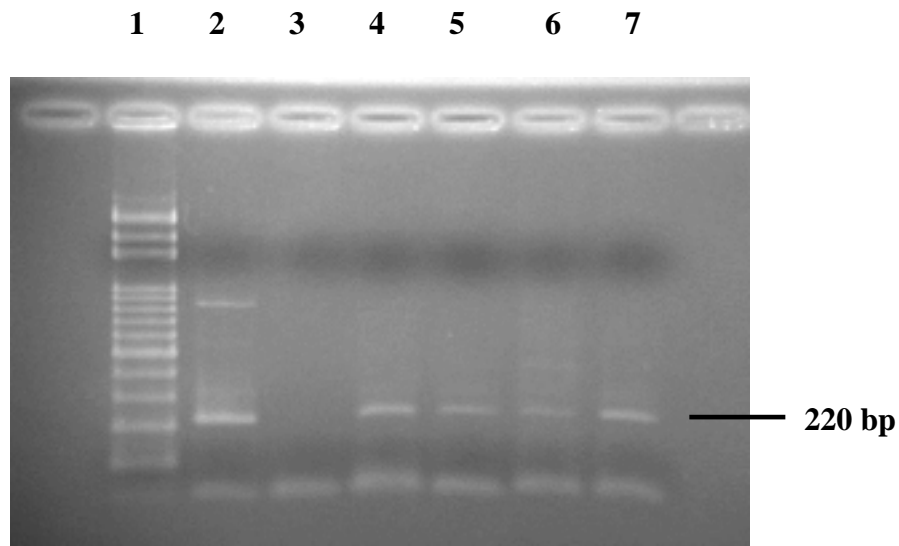


圖 20. 溶膜處理方法對 PCR 增幅反應之影響。以不同數量之卵囊進行測試； lane 1 為 100 bp marker， lane 2 為 800 個卵囊， lane 3 為 200 個卵囊， lane 4 為 80 個卵囊， lane 5 為 20 個卵囊。



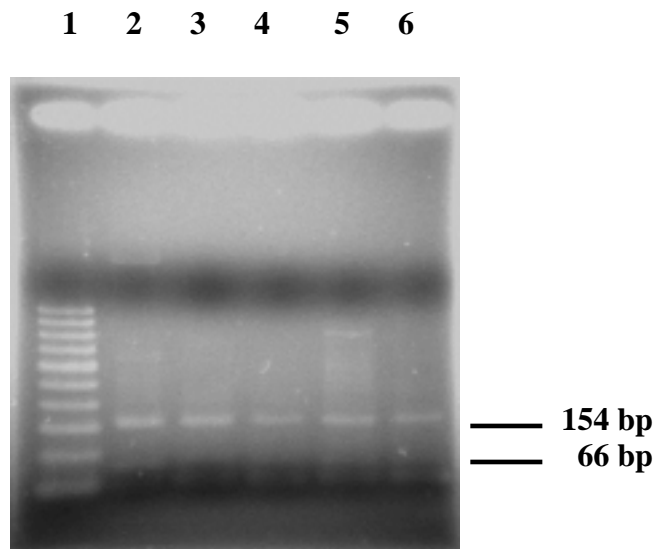
A



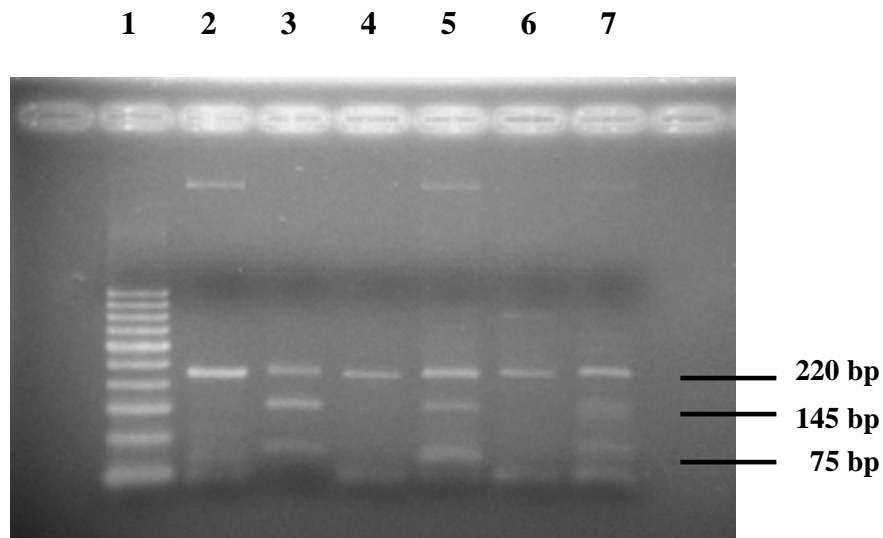
B

圖 21. 水源檢體 PCR 檢測結果。(A)巢式 PCR：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；(B)單次 PCR：lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為陽性對照組，lane 3 為陰性對照組，lane 4 為羅娜檢體，lane 5 為東埔檢體，lane 6 為和平檢體，lane 7 為仁愛檢體。

註：(A)之 lane 8 具微弱陽性反應。



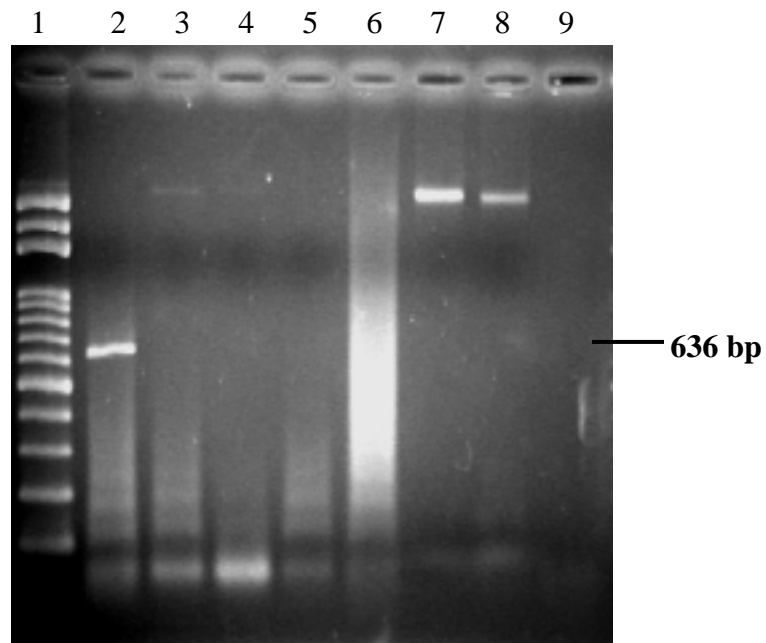
A



B

圖 22. 水源檢體單次 PCR 產物之限制酶分析。(A) 限制酶 *Taq* I : lane 1 為 50 bp marker, lane 2 為 *C. parvum* 經 *Taq* I 作用產生 154 bp 與 66 bp, lane 3 為羅娜檢體, lane 4 為東埔檢體, lane 5 為和平檢體, lane 6 為仁愛檢體。lane 3-6 皆可被切割成 154 bp 與 66 bp; (B) 限制酶 *Vsp* I : lane 1 為 50 bp marker, lane 2 為 *C. parvum* 牛型經 *Vsp* I 作用後仍無法被分割, lane 3 為 *C. parvum* 人型經 *Vsp* I 作用產生 145 bp 與 75bp, lane 4 為羅娜檢體, lane 5 為東埔檢體, lane 6 為和平檢體, lane 7 為仁愛檢體。lane 4,6 無法被分割, 確定為 *C. parvum* 牛型, lane 5,7 則可切割出 *C. parvum* 人型 145 bp 與 75bp 片段。

(A)



(B)

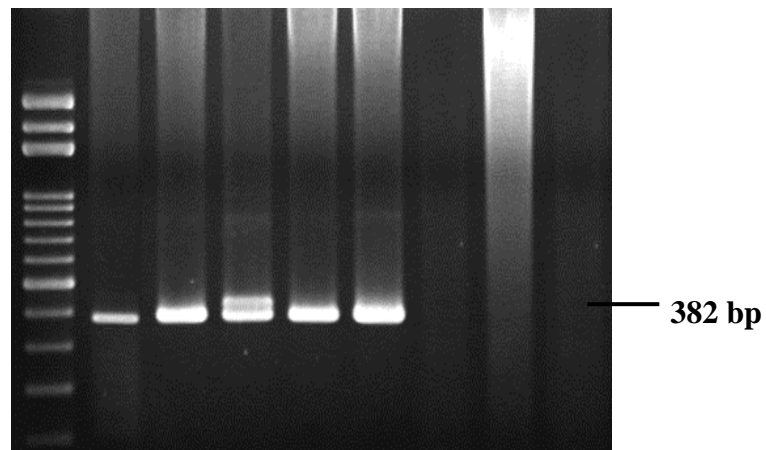


圖 23. 水源檢體之巢式聚合酶連鎖反應結果：(A) 第一次 PCR 結果；(B) 第二次 PCR 結果。lane 1 為 100 bp DNA Maker，lane 2 為 positive control，lane 3 為和平鄉檢體，lane 4 為信義鄉東埔之檢體，lane 5 為仁愛鄉之檢體，lane 6 為羅娜檢體，lane 7-8 為烏來鄉之檢體，lane 9 為 negative control。

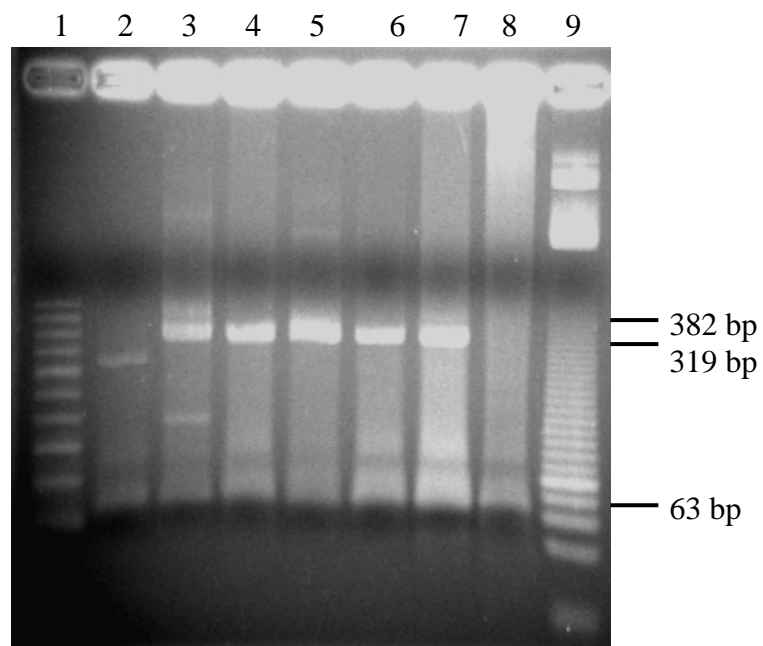
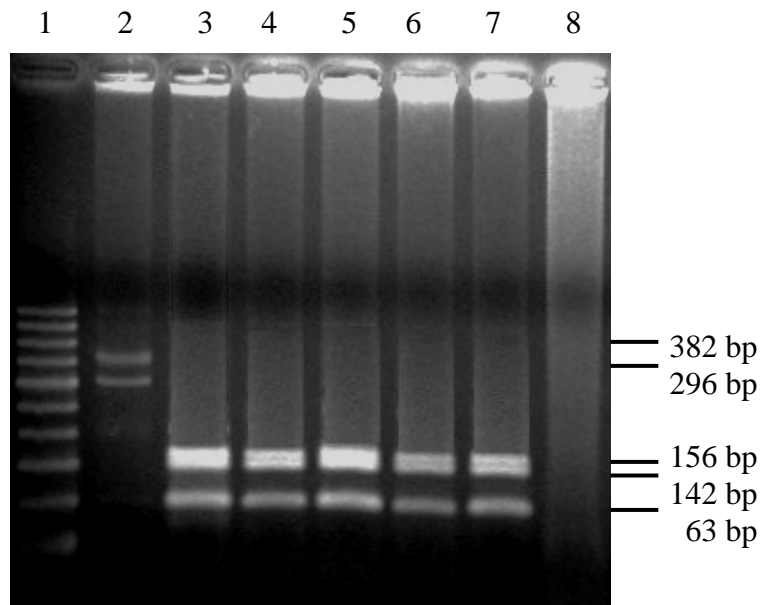


圖 24. 水源檢體之巢式聚合酶連鎖反應產物，經限制酶分析：(A) *MnI* I ；(B) *Apo* I 。 lane 1 為 50 bp DNA Maker ， lane 9 為 20 bp DNA Maker ， lane 2 為 *C. cayetanensis* ， lane 3 為 *E. tenella* ， lane 4 為和平檢體， lane 5 為東埔檢體， lane 6 為仁愛檢體， lane 7 為羅娜檢體， lane 8 為 negative control 。

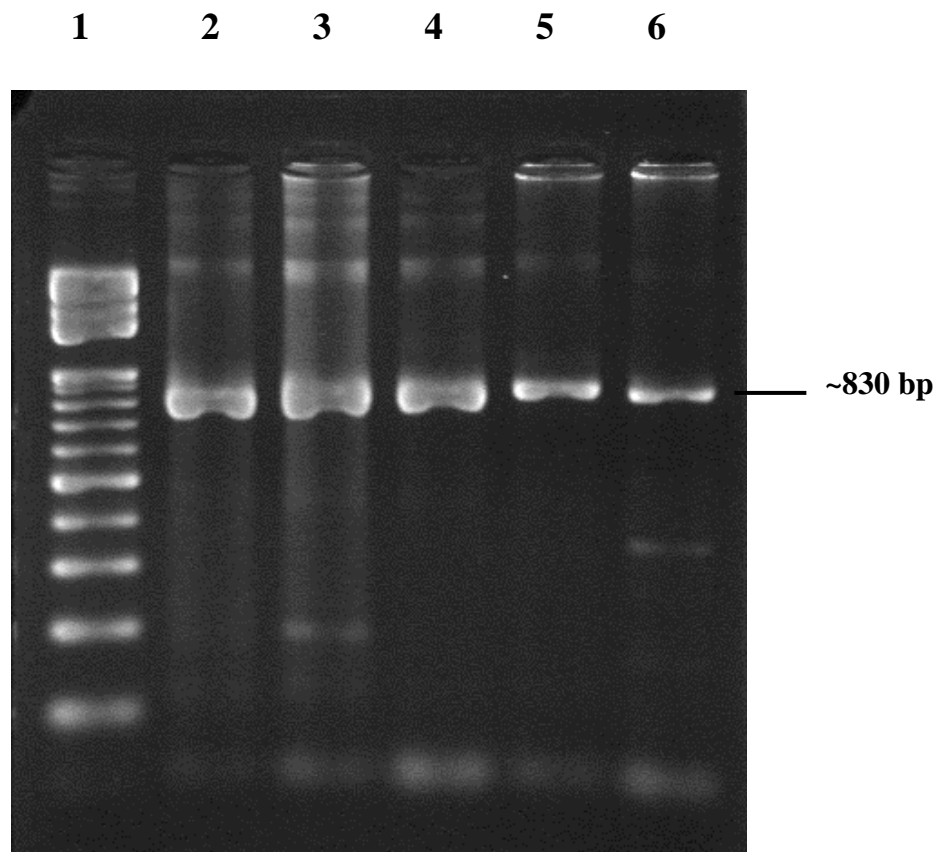


圖 25. 愛滋患者糞便檢體之巢式 PCR 隱孢子蟲陽性結果。lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為陽性對照組，lane 3-6 愛滋患者陽性檢體 1,2,3,4。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

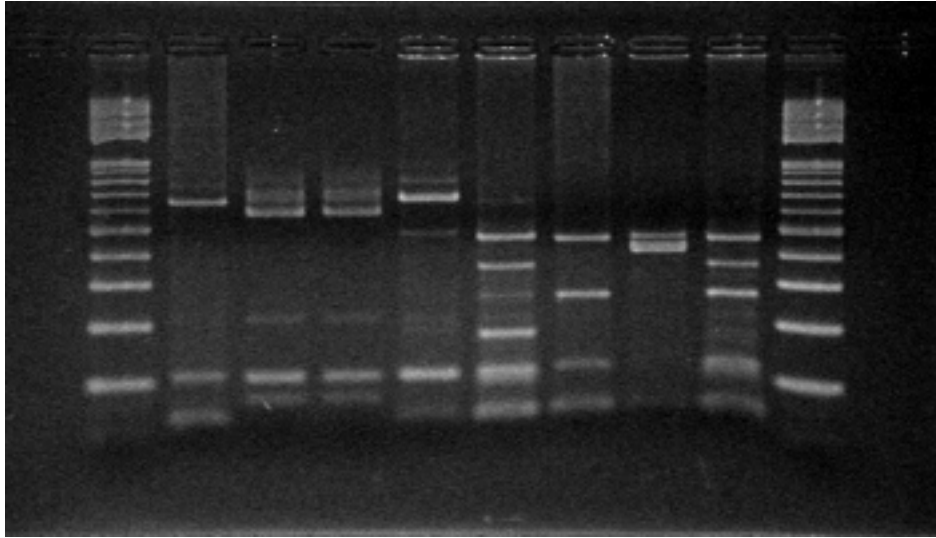


圖 26. 愛滋患者糞便檢體巢式 PCR 產物之限制酶分析。lane 1,10 為 100 bp marker，lane 2-6 為限制酶 *Vsp* I 反應結果；lane 7-9 為限制酶 *Ssp* I 反應結果。lane 2 為陽性對照(*C. parvum*)經 *Vsp* I 作用產生 102 bp, 104 bp 與 628 bp，lane 3-6 為愛滋檢體 1,2,3,4。lane 3,4 皆可被切割成 70 bp, 102 bp, 104 bp 與 561 bp；lane 5 被切割成 102 bp, 730 bp；lane 6 則被切割成 102 bp, 104 bp, 171 bp 與 456 bp(其他為未切割完全片段)。lane 7 為陽性對照經 *Ssp* I 作用反應結果，可產生 108 bp, 254 bp, 449 bp。lane 8 為愛滋檢體 3，產生 385 bp 與 448bp。lane 9 為愛滋檢體 4，產生 108 bp, 254 bp 與 449bp(其他為未切割完全片段)。

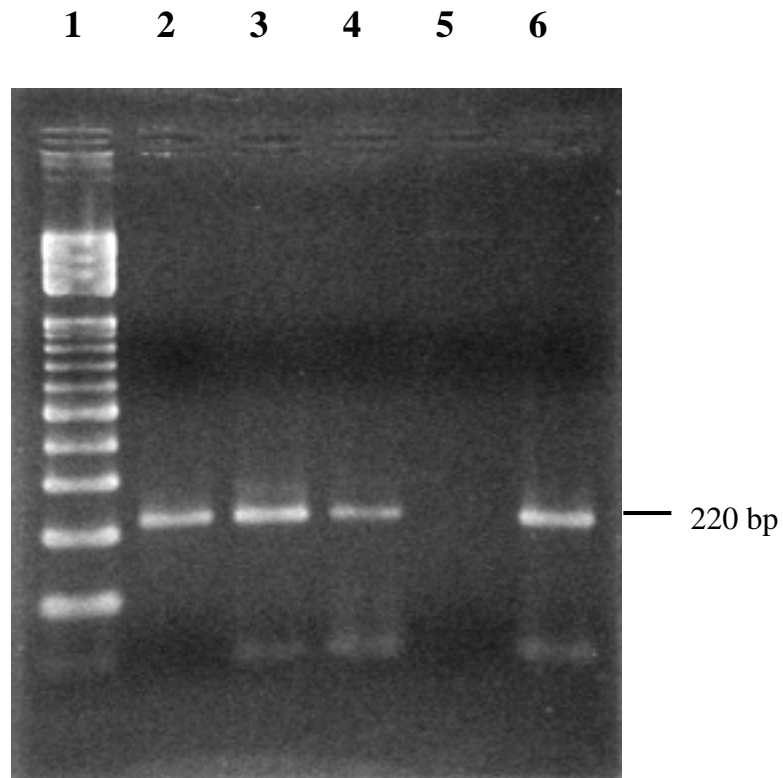


圖 27. 愛滋患者糞便檢體之單次 PCR 隱孢子蟲陽性結果。lane 1 為 100 bp marker，lane 2 為陽性對照組，lane 3-6 愛滋患者陽性檢體 1,2,3,4。

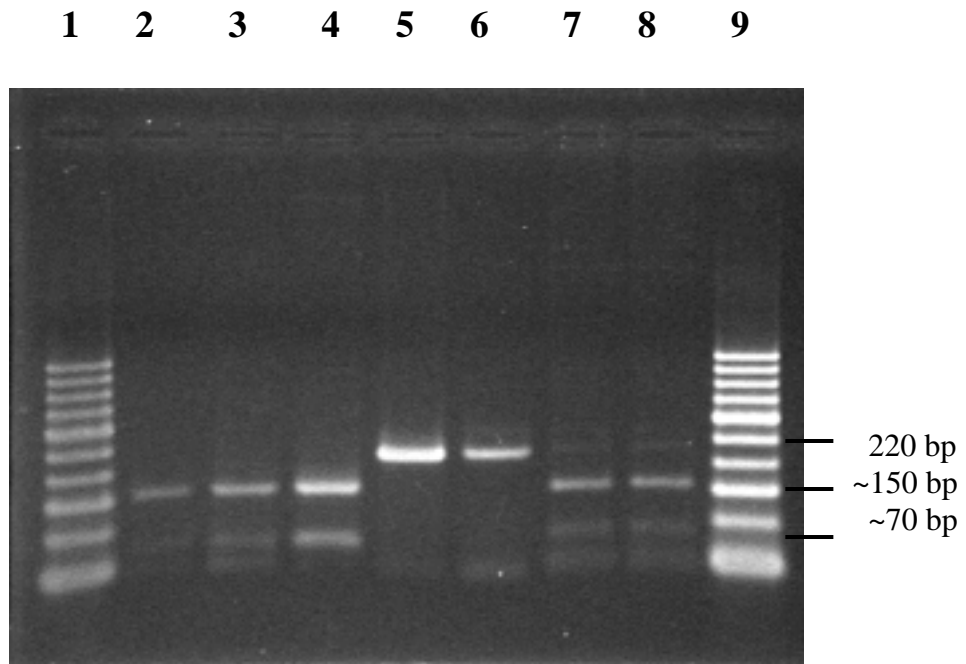


圖 28. 愛滋患者糞便檢體單次 PCR 產物之限制酶分析。lane 1,9 為 50 bp marker，lane 2-5 為限制酶 *Taq* I 反應結果；lane 6-8 為限制酶 *Vsp* I 反應結果。lane 2 為陽性對照(*C. parvum*)經 *Taq* I 作用產生 154 bp 與 66 bp，lane 3-5 為愛滋檢體 1,2,4。除 lane 5 外，lane 3,4 皆可被切割成 154 bp 與 66 bp。lane 6 為陽性對照經 *Vsp* I 作用反應結果(產物無法被分割)，lane 7,8 為愛滋檢體 1,2 經 *Vsp* I 作用產生 145 bp 與 75bp。

<i>C. p bovine</i>	1	ggaaggg	ttg	tatttattag	ataaagaacc	aatataattg	gtgactcata	ataactttac	60	
<i>C. wrairi</i>	1	60	
<i>C. p bovine</i>	61	ggatcacat	aa	tgtgaca	tatcattcaa	gtttctgacc	tatcagcttt	agacggtagg	120	
<i>C. wrairi</i>	61	120	
<i>C. p bovine</i>	121	gtattggcct	accgtggcaa	tgacgggtaa	cggggaatta	gggttcgatt	ccggagaggg	180		
<i>C. wrairi</i>	121	180		
<i>C. p bovine</i>	181	agcctgagaa	acggctacca	catctaagga	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatcct	240		
<i>C. wrairi</i>	181	240		
<i>C. p bovine</i>	241	aatacagggga	ggtagtgaca	agaaataaca	atacaggact	ttttggtttt	gtaattggaa	300		
<i>C. wrairi</i>	241	300		
<i>C. p bovine</i>	301	tgagttaagt	ataaacccct	ttacaagtat	caattggagg	gcaagtctgg	tgccagcagc	360		
<i>C. wrairi</i>	301	360		
<i>C. p bovine</i>	361	cgcggttaatt	ccagctccaa	tagcgtatat	taaagttggt	gcagttaaaa	agctcgtagt	420		
<i>C. wrairi</i>	361	420		
<i>C. p bovine</i>	421	tggatttctg	ttaataattt	atata	aata	ttttga	aa	tatttatata	atattaacat	480
<i>C. wrairi</i>	421	479	
<i>C. p bovine</i>	481	aattcatatt	actatata	tttagtata	gaaattttac	tttgagaaaa	ttagagtgt	539		
<i>C. wrairi</i>	480	539		
<i>C. p bovine</i>	540	taaagcaggc	atatgccttg	aatactccag	catggaataa	tattaaagat	ttttatcttt	599		
<i>C. wrairi</i>	540	599		
<i>C. p bovine</i>	600	cttattgggt	ctaagataag	aataatgatt	aatagggaca	gttgggggca	tttgtattta	659		
<i>C. wrairi</i>	600	659		
<i>C. p bovine</i>	660	acagtcagag	gtgaaattct	tagatttggt	aaagacaaaac	ta	tgcgaaa	gcatttgcca	719	
<i>C. wrairi</i>	660	719		
<i>C. p bovine</i>	720	aggatgtttt	cattaatcaa	gaacgaaagt	taggggatcg	aagacgatca	gataccgtcg	779		
<i>C. wrairi</i>	720	779		
<i>C. p bovine</i>	780	tagtcttaac	cataaaactat	gccaaactaga	gattggaggt	gttccttac	tcctt	834		
<i>C. wrairi</i>	780	834		

圖 29. *C. parvum* 牛型(AF093490)與 *C. wrairi*(U11440)巢式 PCR 產物序列比對。

二者具 7 個鹼基差異。



圖 30. 參考文獻中所採用巢式聚合酶連鎖反應之引子對(Jinneman et al. 1998e; Pieniazek et al. 1996d)，可針對環孢子蟲之 18s rRNA 基因做擴增，但對於 *E. tenella* 而言，第二對引子對在靠近 3'端有三個鹼基不相符。

AF222998	1	acttgataat	cttttactta	catggataac	cgtggtaatt	ctagagctaa	tacatgcgaa	60
AF093490	1	59
羅娜	1	60
仁愛	1	60
AF222998	61	aaaactcgac	tttatggaag	ggttgtat	attagataaa	gaaccaatat	aattggtgac	120
AF093490	60	119
羅娜	61	120
仁愛	61	120
AF222998	121	tcataataac	tttacggatc	acaattaatg	tgacatatca	ttcaagtttc	tgacctatca	180
AF093490	120	179
羅娜	121	180
仁愛	121	180
AF222998	181	gctttagacg	gtagggatt	ggcctaccgt	ggcaatgacg			220
AF093490	180			219
羅娜	181			220
仁愛	181			220

圖 31. 羅娜與仁愛之水源檢體定序結果。二者與 *C. parvum* 牛型標準株(AF093490)具 100

%相似。