

水樣濁度對以免疫磁性分離法進行隱孢子蟲孢囊檢測回收率之影響

研究生：張智淵

指導教授：黃志彬 博士

國立交通大學環境工程研究所

摘要

隱孢子蟲是一種寄生性之原生動物，主要寄生在人類、鳥類和多種哺乳類腸道內，當隱孢子蟲脫離宿主會成為孢囊來抵抗環境。孢囊以糞口傳染作為感染途徑，受到感染的宿主會導致隱孢子蟲症，以水作為孢囊傳播媒介，因此容易爆發大流行，美國曾經在 1993 年發生過 40 萬人遭受感染的大流行。目前水廠消毒單元並無法有效抑制孢囊生長，仍以砂濾池作為去除孢囊之最後一道防線。除了持續監測出流水中孢囊存在的可能性外，反沖洗廢水中孢囊含量亦會影響混凝之加藥量。因此，有效掌握反沖洗廢水中孢囊數目可提供水廠作為反沖洗水再利用之重要參考依據。目前普遍用來分離隱孢子蟲孢囊之方法為免疫磁性分離法 (IMS)，其利用抗體抗原之專一性反應，可有效捕捉到孢囊與雜質分離。因此，針對反沖洗廢水之濁度和高濃度孢囊存在的問題，本研究進行濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之探討。

首先在純水條件中找出 0.1N HCl 破壞鍵結之最佳操作條件，實驗結果發現，混合時間 30 秒，混合 3 次，可得到完整孢囊數目。另外，以高嶺土製備人工濁水，以純水條件所得 0.1N HCl 混合之最佳參數，進行濁度對於隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之探討。結果發現，適當的濁度 (0.5 NTU) 會促進孢囊檢測回收率，當濁度大於 0.5 NTU 後，孢囊檢測回收率隨濁度增加而逐漸下降，尤其當濁度為 10~40 NTU 最為明顯 ($R^2=0.999$)。最終利用濃縮程序之離心力、離心時間、磁珠添加劑量和原水稀釋來改善濁度水體之孢囊檢測回收率，結果發現，原水稀釋可有效將濁度水體之孢囊檢測回收率提升，表示稀釋可以降低部分濁度干擾，增加磁珠捕捉孢囊效能，尤其在低濁度狀況下較為顯著。此結果亦說明將孢囊與雜質分離，達到有效的濃縮和收集是影響檢測孢囊之相當重要目標。

關鍵字：隱孢子蟲、免疫磁性分離法、濁度

The Effect of Turbidity on Recovery of *Cryptosporidium* Oocysts from Water Sample by Immunomagnetic Separation Analysis

Student : Chihyuan Chang

Advisor : Chihpin Huang

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

Cryptosporidium spp. are protozoan parasites which are known to infect the gastrointestinal tract of vertebrates, including humans, birds and mammals. The infection causes the disease cryptosporidiosis which is a life threatening disease to immunocompromised individuals. When *Cryptosporidium* leaves the host, it forms oocysts to resist environmental hardship, which are transmitted by the fecal-oral route. There have been many waterborne outbreaks world-widely. The most severe incidence occurred in Milwaukee, WI, USA in 1993, where more than 400,000 people were infected.

Chlorine disinfection is ineffective in controlling oocysts in water treatments. Physical removal of oocysts can be accomplished by filtration of a conventional water treatment process, the last barrier to the release of particles and protozoan oocysts into the distribution system. Estimate of oocyst numbers in backwash water provides the reference for backwash water reuse in the water treatment. The currently accepted technique for oocyst isolation from water samples is immunomagnetic separation (IMS). The technique is critically interfered by high number of oocyst and high turbidity.

In this study, we examined the effect of turbidity on recovery of *Cryptosporidium* oocysts. First, the optimal condition for the bond-breaking of bead-oocyst complex by 0.1N HCl was determined. Secondly, the effect of turbidity on recovery of oocysts in synthetic turbid water was investigated. The presence of suspended particles in the water enhanced the recovery of oocyst, as shown by the highest level of oocyst recovery at 0.5 NTU. The increase in turbidity from 0.5 to 100 NTU led to decreasing oocyst recovery, especially in the turbidity range from 10 to 40 NTU with an r square of 0.999.

Experimental parameters including the force and time of centrifuge in concentration process, Dynalbeads dosage, and dilution of synthetic water were varied to improve the recovery of oocysts by IMS process. Dilution of water samples effectively lower the interference of turbidity and improved the recovery. Isolation of oocyst from water impurities and effective concentration and collection are important steps in the recovery of oocyst.

Keywords: *Cryptosporidium*, Immunomagnetic separation, and turbidity



致 謝

這頁完成也代表論文即將完成，從剛開始論文方向的尋找、嘗試錯誤的學習到現在，過程中所曾經發生的每一幕都清楚地腦海裡呈現。”如人飲水，冷暖自知”，說盡這本論文帶給自己的感受。沒有過人的智慧，只憑著一股傻勁來完成這本論文，文中沒有漂亮的數據、華麗的辭藻，只有最真實的態度。兩年來在交大研究所的生活，承蒙吾師 黃志彬教授和袁如馨教授的指導，讓我無論在學術上和處事上均受益良多。同時，感謝胡苔莉教授、李季眉教授在口試時給予的指導及提供的寶貴意見，讓學生論文能更趨完整。

由衷感謝中山醫學大學公衛系 張時獻副教授和王凱淞助理教授，不僅在我論文進行過程中所給予的指導和協助，您們大學時期的諄諄教誨才使得學生有機會可以在交大畢業。恩師 張時獻副教授，您是我跨進研究領域的啟蒙老師，讓我積極嚮往環境工程領域。如今希望用這本論文的完成來表示學生沒有辜負老師們的期望，順利完成碩士論文。

兩年在交大的生活，心情可以用”喜、怒、哀、樂”來形容，感謝陪我經歷每種心情的朋友。實驗室裡，感謝志麟、育俊、文彬、嘉蔚、和慶國學長給我在實驗上的建議和協助；感謝信杰、綉文、政倫和昌郁，很高興可以在這個實驗室與你們相聚，一起討論、報告和打拚論文，唯有你們的鼓勵我才可以堅強完成論文；感謝文善、昭瑩和淑芬，陪我吃吃喝喝度過快樂的時光。另外，感謝環工所籃球隊，和你們一起完成在大環盃三連勝的不可能任務，讓我有機會是其中的一員；感謝 94 級學弟妹們讓我在研究所的生活中增添不少趣味和娛樂，使我每天保持微笑。

感謝中山醫公衛的經棟、小摸、熠圳、宜穎、雅雯和梓芳，華江的伯勳和彥霖，陽明環衛的小丁和 mimi，你們不厭其煩地鼓勵我和支持我，成為我努力完成論文的動力。

最後，感謝我親愛的家人和品欣在這段時間對我無怨無悔的付出與支持。讓我更篤定地繼續邁進，期許自己不辜負你們的期望。只想大聲對你們說：我做到了!!

張智淵
丙戌盛夏 交大

目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
致謝.....	IV
目錄.....	V
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 隱孢子蟲之基本型態、特性及生命週期.....	3
2.2 隱孢子蟲症.....	5
2.3 各國對隱孢子蟲之法規及規範.....	6
2.4 水廠淨水程序處理隱孢子蟲.....	8
2.4.1 混凝沉澱.....	8
2.4.2 過濾.....	9
2.4.3 消毒.....	9
2.5 隱孢子蟲之檢測方法.....	10
2.5.1 過濾.....	12
2.5.2 分離.....	13
2.5.3 檢驗.....	16
2.6 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率之影響.....	22
第三章 實驗材料、設備及方法.....	25
3.1 藥品.....	25
3.2 材料.....	27

3.3	設備.....	29
3.4	實驗架構與方法	32
3.4.1	實驗架構	32
3.4.2	實驗方法	33
第四章	結果與討論	41
4.1	水樣性質.....	41
4.2	自行添加隱孢子蟲孢囊	43
4.3	鍵結試驗之最佳操作條件	45
4.3.1	0.1N HCl混合時間對孢囊數目及檢測回收率影響	45
4.3.2	0.1N HCl混合次數對孢囊數目及檢測回收率影響	47
4.4	人工濁水試驗	49
4.4.1	濁度對孢囊檢測回收率影響	49
4.4.2	改善濁度對孢囊檢測回收率之影響	52
4.4.2.1	不同離心力(G值)對孢囊檢測回收率影響	52
4.4.2.2	不同離心時間對孢囊檢測回收率之影響	54
4.4.2.3	磁性抗體劑量對孢囊檢測回收率影響	56
4.4.2.4	原水稀釋對孢囊檢測回收率影響	58
第五章	結論與建議	61
5.1	結論.....	61
5.2	建議.....	62
	參考文獻.....	63

表目錄

表2.1	DAPI/PI染色特徵	20
表2.2	隱孢子蟲孢囊之存活關係	20
表2.3	各檢測方法之特點比較	22
表2.4	濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之文獻整理要點	24
表4.1	人工濁水水質特性	41
表4.2	不同濁度下隱孢子蟲孢囊 (<i>C. parvum</i>) 檢測回收率	51
表4.3	濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率之直線迴歸分析結果	51



圖目錄

圖2.1	隱孢子蟲之生命週期	4
圖2.2	隱孢子蟲孢囊檢測方法之流程圖	11
圖2.3	免疫磁性分離法之原理和操作步驟	15
圖2.4	免疫螢光法之概念流程圖	17
圖2.5	血球計數盤俯視及側視圖	18
圖2.6	流式細胞儀之偵測流程圖	19
圖2.7	PCR原理之流程圖	21
圖3.1	研究架構圖	32
圖3.2	顯微鏡視野下進行計數之觀察路線圖	34
圖3.3	本研究之操作流程圖	39
圖3.3	本研究之實驗流程圖	40
圖4.1	高嶺土顆粒配製人工濁水之粒徑分布	42
圖4.2	隱孢子蟲孢囊標準品稀釋體積與孢囊數目之關係	44
圖4.3	隱孢子蟲孢囊儲備體積與所含孢囊數目之關係	44
圖4.4	0.1N HCl與已結合孢囊之磁珠混合時間對孢囊數目及檢測回收率之關係	46
圖4.5	0.1N HCl與已結合孢囊磁珠之混合次數對孢囊數目關係 ..	48
圖4.6	濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響關係	50
圖4.7	無添加高嶺土顆粒水樣和40 NTU下之相同離心時間不同離心力 (G值)對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響	53
圖4.8	無添加高嶺土顆粒水樣和40 NTU下之不同離心時間相同離心力 (G值)對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響	55
圖4.9	無添加高嶺土顆粒水樣和40 NTU下之不同磁珠劑量對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響	57

圖4.10 不同濁度水樣稀釋前後濁度水體之隱孢子蟲孢囊檢測回收率.....59

圖4.11 隱孢子蟲孢囊之正控制組60

