

# 梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲檢測方法

## — 過濾濃縮/免疫磁珠分離/免疫螢光抗體分析法

中華民國 97 年 12 月 23 日環署檢字第 0970102006B 號公告

自中華民國 98 年 4 月 15 日起實施

NIEA E232.51C

### 一、方法概要

本方法應用於水中梨形鞭毛蟲囊體 (*Giardia cyst*) 及隱孢子蟲卵囊 (*Cryptosporidium oocyst*) 之檢測。取 10 至 20 L 水樣以過濾或連續離心方式將梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲濃縮收集後，經免疫磁珠分離法 (immunomagnetic separation, IMS) 純化，所得之卵囊及囊體再以 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光標記之單株抗體及 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色，在具有微分干涉差 (Differential Interference Contrast, DIC) 功能的螢光顯微鏡下觀察計數。鏡檢作定量計數時必須就蟲體之形狀、大小、顏色與螢光特性與標準品作比對。

### 二、適用範圍

本方法適用於地表水、地下水、飲用水、水源水質等水樣中梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲之檢測。但不適用於高濁度及含干擾物質水樣之檢測。

### 三、干擾

- (一) 水樣濁度 (包含無機及有機微粒) 會在過濾、分離及鏡檢時造成各種程度的干擾；黏土會影響鏡檢之觀察；淨水處理系統中添加的化學物質如鐵鋁等混凝劑及高分子物質也會造成干擾。
- (二) 可產生非特異螢光或自發性螢光之物質 (如藻類及酵母菌等)，常會在螢光顯微鏡的觀察時造成偽陽性的誤判。
- (三) 溶液、試劑、實驗器材可能會因操作時導入干擾而在鏡檢觀察時造成誤判，因此必須利用方法空白分析以監測是否有干擾存在。檢驗中如有更換試劑水或檢測試劑時，亦應考慮進行方法空白分析。
- (四) 水樣、濾管、流洗液、離心濃縮及玻片可能含有影響卵囊及囊體鑑別之因子。

(五) 所有實驗設備都應依據製造商建議之方式徹底清潔，且應儘量使用拋棄式耗材以避免交叉污染。

#### 四、設備及材料

(一) 塑膠儲水桶：盛裝水樣用，10 至 20 L。

(二) 磁石攪拌器。

(三) 水樣過濾及流洗：

1. 濾管：Envirochek™ 濾管、Envirochek™ HV 濾管或其同級品。
2. 採樣器連接管：玻璃、PTFE、HDPE 材質，或其他不易使原蟲附著之材質（如 Tygon R-3603）。
3. 流量控制裝置：可將流速控制在每分鐘 2 L。
4. 幫浦：可使用蠕動幫浦（peristaltic）、離心幫浦（centrifugal）、葉輪幫浦（impeller）或隔膜幫浦（diaphragm）。建議裝置在濾管之出水端以避免造成水樣交叉污染。
5. 流量計：用於量測過濾水樣體積。亦可使用有體積標示之空桶代替。
6. 懸臂式震盪器：含有側棒可以固定濾管，用於濾管中原蟲之震盪分離。

(四) 水樣連續離心及流洗：

1. 連續離心機：可在流速為 700 mL/min、離心轉速為 10000 rpm 之狀態下連續離心 15 分鐘以上（Scientific Methods 公司之 VelPro CFC 200 系統或同級品）。
2. 離心杯：拋棄式，體積為 275 mL 之塑膠材質離心杯，搭配連續離心機使用（Haemonetics 公司產品或同級品）。
3. 連接管：Tygon R-3603 材質或同級品。
4. 懸臂式震盪器：含有側棒可以固定離心杯，用於離心杯中原蟲之震盪分離。

(五) 水樣離心：

1. 離心機：懸籃式 (swinging bucket)，可以容納 250 mL 錐底離心管，離心力可達 1500 g。
2. 離心管：錐底、有刻度，容量 250 mL。

(六) 免疫磁珠分離：

1. 10 mL 試管用磁珠濃縮磁座：用於 10 mL 側邊扁平試管之磁珠濃縮 (Invitrogen 公司之 Dynal MPC<sup>®</sup>-1、MPC<sup>®</sup>-6 或其同級品)。
2. 側邊扁平試管：16 × 125 mm，側邊扁平區域為 60 × 10 mm (Invitrogen 公司之 Dynal<sup>®</sup> L10 試管或其同級品)。
3. 微量試管用磁珠濃縮磁座：用於微量試管之磁珠濃縮 (Invitrogen 公司之 Dynal MPC<sup>®</sup>-M、MPC<sup>®</sup>-S 或其同級品)。
4. 旋轉式混合器：用於混合磁珠與樣品，可以 18 rpm 的速率旋轉試管。

(七) 免疫螢光抗體分析：

1. 顯微鏡：具有微分干涉差 (DIC) 裝置之螢光顯微鏡，須具有 10 倍接目鏡、20 倍 (N.A. = 0.4) 至 100 倍 (N.A. = 1.3) 接物鏡，並具有 FITC 螢光濾鏡組及 DAPI 螢光濾鏡組。
2. 玻片 (Well slides)：用於樣本之螢光抗體染色，玻片上之小孔直徑為 12 mm (Invitrogen 公司之 Spot-On well slides 或同級品)。
3. 蓋玻片：玻璃材質，22 × 50 mm。
4. 保濕箱 (Humid chamber)：可密封之塑膠容器，內部放置濕紙巾，用於玻片染色過程之保濕。

(八) 可調式微量吸管：0 至 10- $\mu$ L、10 至 100- $\mu$ L 或 20 至 200- $\mu$ L、及 100 至 1000- $\mu$ L。

(九) 吸管：玻璃或塑膠材質，體積為 5、10、25 mL。

(十) 巴斯德 (Pasteur) 吸管：塑膠或玻璃材質，可拋棄式。

- (十一) 天平：分析天平，可以精稱至 0.1 mg。；上皿天平，可以精稱至 10 mg。
- (十二) pH 測定計。
- (十三) 試管振盪器。
- (十四) 量筒：10 至 1000 mL 之量筒。

## 五、試劑

### (一) pH 調整試劑 (註 1)：

1. 氫氧化鈉 (NaOH) 溶液：6.0 及 1.0 N。
2. 鹽酸 (HCl) 溶液：6.0、1.0 及 0.1 N。

### (二) 甲醇：試藥級。

(三) 試劑水：導電度在 25 °C 時小於 2  $\mu\text{mho/cm}$  ( $\mu\text{S/cm}$ ) 之蒸餾水或去離子水，不含卵囊、囊體及其他磁性干擾物質。

### (四) Envirochek™ 流洗試劑：

1. 10% Laureth 12 溶液：稱取 10 g 的 Laureth 12 (Pall 公司之 PN 4820 或同級品) 加入 90 mL 的試劑水中，以加熱板或微波爐加熱溶解後，分裝 10 mL 至無菌小瓶或試管中，室溫下可儲存 2 個月，冷凍可保存一年。
2. 1 M Tris 溶液 (pH 7.4)：稱取 121.1 g 的 Tris base 溶於 700 mL 的試劑水中，以 1 N 的 HCl 溶液或 NaOH 溶液調整 pH 為 7.4 後，加試劑水至總量為 1000 mL，再調整 pH 至 7.4。在無菌狀態下過濾除菌 (以孔徑約 0.22  $\mu\text{m}$  之無菌濾膜過濾至無菌塑膠瓶)，室溫保存。亦可使用已配妥之市售品。
3. 0.5 M EDTA 溶液 (pH 8.0)：稱取 186.1 g 含二個結晶水之 EDTA 二鈉鹽 (ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt dihydrate) 溶於 800 mL 的試劑水中，以 6.0 N 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液調整 pH 至 8.0 後，加試劑水至總量為 1000 mL，再以 1.0 N 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液調整 pH 約 8.0。亦可使用已配妥之市售品。

4. 消泡劑 Y-30 乳狀液：內含 30% 消泡劑 A 之水溶性乳狀液 (Sigma 公司之 A5758 或同級品)。
5. 流洗緩衝液：取 10 mL 之 10% Laureth 12 溶液、10 mL 之 1 M Tris 溶液 (pH 7.4)、2 mL 之 0.5 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 及 150  $\mu$ L 之消泡劑 Y-30 乳狀液，以試劑水稀釋至總量為 1000 mL。室溫下保存期限為 7 天，但是如明顯混濁即不可繼續使用。

#### (五) 連續離心流洗試劑

1. 10 倍磷酸緩衝溶液 (10X PBS)：取 80 g 氯化鈉 (NaCl)、2 g 氯化鉀 (KCl)、11.5 g 無水磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 及 2 g 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 溶於 800 mL 試劑水，再加試劑水至總量為 1000 mL。亦可使用已配妥之市售品。
2. 1% Tween 80：取 1 g Tween 80 溶於 99 mL 試劑水。
3. 消泡劑 Y-30 乳狀液：內含 30% 消泡劑 A 之水溶性乳狀液 (Sigma 公司之 A5758，或同級品)。
4. 50 倍流洗液：取 25 mL 10X PBS、25 mL 1% Tween 80 及 25  $\mu$ L 消泡劑 Y-30 乳狀液，混合均勻 (50 倍流洗液之最終濃度為 5X PBS、0.5 % Tween 80 及 0.05 % Antifoam Y-30)。

(六) 免疫磁珠分離 (immunomagnetic separation, IMS) 試劑組：Dynabeads<sup>®</sup> GC-Combo 或同級品。

(七) 隱孢子蟲卵囊/梨形鞭毛蟲囊體之免疫抗體標記試劑組：可選用 Meridian 公司之 MeriFluor<sup>®</sup> Cryptosporidium/Giardia 試劑組、Waterborne 公司之 Aqua-Glo<sup>™</sup> G/C Direct 試劑組、BTF 公司之 EasyStain<sup>™</sup> C&G 試劑組或同級品。避光儲存於 1 至 10 °C (不能冰凍)，使用前應回復至室溫，使用完畢立即冷藏。試劑稀釋之後保存期限為 48 小時。

(八) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染劑：

1. 儲備液：溶解 2 mg DAPI 於 1 mL 絕對甲醇中，避光保存於 1 至 10 °C (不可冰凍)。如染色正控制組染色失敗，就必須重新配製。

2. 染液：以 PBS 稀釋 DAPI 儲備液，依據免疫抗體標記試劑組之操作說明進行。使用當天配製，使用前避光儲存於 1 至 10 °C（不可冰凍），不得隔天使用。

(九) 隱孢子蟲卵囊及梨形鞭毛蟲囊體標準品：建議使用經流式細胞儀定量並以輻射去活性之標準品 (BTF 公司之 EasySeed™ 或同級品)，不可使用福馬林去活性。保存在 1 至 10 °C（不可冰凍）。以手動計數定量之標準品，必須在計數後 24 小時之內使用完畢。以流式細胞儀計數定量之標準品，則依據供應商規定之期限保存。

## 六、採樣與保存

(一) 水樣可直接在現場過濾或連續離心，也可以塑膠儲水桶採集 10 至 20 公升水樣，運送至實驗室再進行濃縮流洗等步驟。樣品運送及保存應保持在 1 至 10 °C。但不得冰凍。

(二) 水樣在採樣後（如採取水樣運送至實驗室）或濃縮後（如在現場直接濃縮）96 小時之內應開始進行流洗程序，且流洗、離心、淨化至樣本玻片開始風乾之程序必須在 1 個工作天內完成。

(三) 樣本玻片開始風乾的 72 小時之內，應進行染色程序。

(四) 已染色之樣本玻片最好能立即鏡檢觀察，至遲在染色後 168 小時之內要完成觀察計數。但是如鏡檢時發現螢光抗體或 DAPI 染色有消退或擴散之狀況，則必須縮短保存期限或者提高 DAPI 染劑之濃度。

## 七、步驟

(一) 水樣之濃縮與流洗：可使用 Envirochek™ 濾管、連續離心及其他符合品質管制要求之方式進行樣品濃縮。

### 1. Envirochek™ 濾管（註 2）：

(1) 調節樣本的流量，將採樣器的管線連結妥當（先不接上濾管），然後開動馬達，先以 2 至 10 L 的試劑水沖洗所有的管線，並調整流速為每分鐘為 2.0 L。

(2) 將濾管接上管線，並將出水及進水端以工具鎖緊。

- (3) 記錄樣品編號、樣品濁度、樣品種類，及開始過濾的日期時間等。
- (4) 將水樣搖晃均勻後加入磁石攪拌子，在攪拌器上持續攪拌，速度應維持在可讓水樣均勻混合的最低轉速。
- (5) 將管線排水端接至一個 15 L 左右的空桶中，桶子於 9.0、9.5、10.0、10.5 及 11.0 L 處作上刻度記號。此桶將用於量測過濾水樣之體積。也可直接以流量計量測過濾水樣之體積。
- (6) 將管線及濾管充滿待過濾的水樣，按下濾管上方的排氣閥排出殘餘空氣，使所有的管路系統完全充滿水樣。開動馬達開始過濾水樣，注意水的流量維持在每分鐘 2 L。
- (7) 當水樣完成過濾之後，關掉馬達並停止攪拌。盛裝水樣的塑膠儲水桶以 1L 的試劑水沖洗後，再開啟馬達過濾沖洗水，過濾完畢後將馬達關閉。
- (8) 解開濾管之進水端，並保持進水端在出水端之上方，以免水樣回流將濾管上的卵囊與囊體沖出來。再開啟馬達，將濾管內的水樣儘量排乾。
- (9) 記錄過濾水樣的實際體積。
- (10) 解開濾管之出水端，將進水及出水端套上套子後，保存於 1 至 10 °C。
- (11) 配製足量的流洗緩衝液，每支濾管約須 275 mL 的流洗緩衝液。另外每個樣品須準備至少一個 250 mL 的錐底離心管，標上樣品編號。
- (12) 記錄樣品進行流洗的日期時間。
- (13) 使用架子或固定裝置，將濾管豎立，並使進水端朝上。
- (14) 將進水端之蓋子旋開，倒入適當的流洗緩衝液，須完全淹過白色濾心，再將蓋子蓋上。
- (15) 將濾管固定在振盪器上，讓排氣閥位於 12 點鐘方向，開動振盪器以最大速率（約 900 rpm）振盪 5 分鐘。

- (16) 振盪完成後，將濾管取下，旋開進水端之蓋子將流洗水樣倒入 250 mL 的錐底離心管中。再重複步驟(14)至(16)進行振盪，但是讓濾管排氣閥的方向先位於 4 點鐘方向震盪 5 分鐘，再轉向 8 點鐘方向震盪 5 分鐘（中間不須更換流洗緩衝液）。完成之後再將流洗水樣一併收集在離心管中。
- (17) 以少量試劑水沖洗濾管內壁，再將沖洗液一併收集在離心管中。

## 2. 連續離心

- (1) 將離心杯之出水端與進水端接上管線，並將離心杯放入連續離心機後，將進水管線固定在蠕動幫浦上。
- (2) 記錄樣品編號、樣品濁度、樣品種類，及開始離心的日期時間等。
- (3) 將水樣搖晃均勻後加入攪拌子，在攪拌器上持續攪拌，速度應維持在可讓水樣均勻混合的最低轉速。
- (4) 將管線排水端接至一個 15 L 左右的空桶中，桶子於 9.0、9.5、10.0、10.5 及 11.0 L 處作上刻度記號。此桶將用於量測過濾水樣之體積。也可在離心前先量測水樣之體積。
- (5) 啟動連續離心機之離心裝置，當離心轉速達 10000 rpm 且維持穩定後，啟動連續離心機之蠕動幫浦，以 700 mL/min 之流速濃縮水樣。
- (6) 當水樣完成連續離心之後，關掉蠕動幫浦（不要停止離心裝置）。盛裝水樣的塑膠儲水桶以 1 L 的試劑水沖洗後，再開啟蠕動幫浦離心沖洗水，完成後先將蠕動幫浦關掉，再停止離心。
- (7) 記錄過濾水樣的實際體積。
- (8) 將離心杯由連續離心機中取出，解開進水端與出水端之管線並套上套子後，保存於 1 至 10 °C。
- (9) 配製足量的 50 倍流洗液，每個離心杯約須 5 mL。另外每個樣品須準備至少一個 250 mL 的錐底離心管，標上樣品編號。
- (10) 記錄樣品進行流洗的日期時間。



- (11) 將進水端及出水端之套子取下，由進水端注入 5 mL 之 50 倍流洗液，再將套子套上。
- (12) 將離心杯直立固定在振盪器上，開動振盪器以最大速率（約 900 rpm）振盪 5 分鐘。
- (13) 振盪完成後，將離心杯旋轉 120 度後震盪 5 分鐘，再旋轉 120 度震盪 5 分鐘。完成之後再將流洗水樣收集在 250 mL 離心管中。
- (14) 以少量試劑水沖洗濾管內壁，再將沖洗液一併收集在離心管中。

(二) 樣品之離心與分離：流洗水樣經過離心再次濃縮，然後以免疫磁珠分離的方法將卵囊及囊體與其他雜質分離。

#### 1. 離心與沉澱物體積調整

- (1) 將含流洗水樣之 250 mL 的離心管，以 1500 g 離心 15 分鐘（不可設離心剎車）。記錄沉澱物之體積。
- (2) 使用吸管將上清液小心吸掉，約留高於管底沉澱物 5 mL 的上清液。此步驟要小心以避免擾動底層的卵囊及囊體。
- (3) 如果沉澱物的體積不大於 0.5 mL，則直接以試管振盪器劇烈振盪至沉澱物完全懸浮並均勻混合。記錄懸浮液總體積，接著進行免疫磁珠分離。
- (4) 如果沉澱物的體積大於 0.5 mL，則必須進行試劑水添加及分樣，使每一分樣樣品內含之沉澱物體積不大於 0.5 mL：

A. 如欲檢驗完整水樣（即每一分樣均分別進行分離、染色等檢驗步驟，最後將鏡檢結果加總），則依據下列公式進行試劑水添加後，以試管振盪器劇烈振盪至沉澱物完全懸浮並均勻混合，再進行分樣（每個分樣體積均為 5 mL）：（註 3）

$$\text{分樣數量} = \text{沉澱物體積} \div 0.5 \text{ mL} \text{（無條件進位至整數）}$$

$$\text{試劑水添加後總體積（mL）} = 5 \text{ mL} \times \text{分樣數量}$$

B. 如欲檢驗部分水樣（即只取部分分樣進行分離染色，最後依

檢驗比例推算檢驗之水樣體積)，則依據下列公式進行試劑水添加：(註 4)

$$\text{試劑水添加後總體積 (mL)} = \frac{\text{沉澱物體積}}{0.5 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL}$$

添加完畢後，以試管振盪器劇烈振盪至沉澱物完全懸浮並均勻混合，再取 1 至 數管 5 mL 懸浮液，分別進行分離、染色等檢驗步驟。檢驗比例及水樣體積依據下列公式計算：

$$\text{檢驗比例 (\%)} = \frac{5 \text{ mL} \times \text{進行後續檢驗步驟之分樣管數}}{\text{試劑水添加後總體積}} \times 100\%$$

$$\text{檢驗之水樣體積 (L)} = \text{實際過濾水樣體積} \times \text{檢驗比例}$$

## 2. 免疫磁珠分離

- (1) 準備免疫磁珠分離 (IMS) 的試劑：將 IMS 試劑組回溫後，視樣品量多寡進行 1X SL-buffer-A 配製，每個樣品或分樣需要 1.5 mL 之 1X SL-buffer-A (取 150  $\mu$ L 10X SL-buffer-A 加 1350  $\mu$ L 試劑水)。
- (2) 在側邊扁平的試管內，加入 1 mL 的 10X SL-buffer-A 及 1 mL 的 10X SL-buffer-B。
- (3) 將 10 mL 吸管，以流洗緩衝液潤洗後，將樣本懸浮液或分樣懸浮液轉移至上述含有 10X SL-buffer-A 及 10X SL-buffer-B 之側邊扁平試管內，並將原先盛裝懸浮液之錐底試管以 2.5 mL 試劑水沖洗 2 次，沖洗液併入側邊扁平試管內，最終體積為 12 mL。如因分樣程序無原試管可沖洗，則直接添加 5 mL 試劑水，使側邊扁平試管內的最終體積為 12 mL。在側邊扁平試管上標上樣本編號。
- (4) 將 IMS 試劑組之 Dynabeads<sup>®</sup> Crypto-Combo 的小瓶以試管振盪器振盪 10 秒鐘，並檢查磁珠是否完全懸浮。如果仍有沉澱則繼續振盪至完全懸浮為止。
- (5) 取 100  $\mu$ L 的 Dynabeads<sup>®</sup> Crypto-Combo，加至側邊扁平試管中。

- (6) 將 IMS 試劑組之 Dynabeads<sup>®</sup> Giardia-Combo 小瓶以試管振盪器振盪 10 秒鐘，並檢查磁珠是否完全懸浮。如果仍有沉澱則繼續振盪至完全懸浮為止。
- (7) 取 100  $\mu$ L 的 Dynabeads<sup>®</sup> Giardia-Combo，加至側邊扁平試管中。
- (8) 將側邊扁平試管固定於旋轉式混合器上，以 18 rpm 的速率旋轉一個小時。
- (9) 一小時之後，取下試管，放置於磁座 (MPC<sup>®</sup>-1 或 MPC<sup>®</sup>-6) 上，並將試管的扁平面與磁鐵面接觸。
- (10) 固定好之後，不要再移動試管，先將試管的扁平面朝下，輕輕的將整個磁座拿起旋轉搖晃約 90 度，以每秒約一次的速率搖晃 2 分鐘。
- (11) 將磁座擺正讓試管直立，迅速打開蓋子，在試管扁平面朝上的狀態下將液體的部分傾到出來，此時試管與磁座不能分開，並且儘量不要震動。液體倒完後將試管直立，待剩餘液體流至底部，再以吸管吸除 (過程中不可讓試管與磁座分開)。
- (12) 將試管由磁座取下，加入 0.5 mL 的 1X SL-buffer-A，輕輕晃動使磁珠懸浮。此步驟不可使用試管振盪器。
- (13) 將上述磁珠-樣本懸浮液全部轉移至 1.5 mL 的微量離心管中，再取 0.5 mL 的 1X SL-buffer-A 將側邊扁平試管潤洗 2 次，潤洗液併入微量離心管中 (最終體積為 1.5 mL)。然後將微量離心管放入微量試管用磁座 (MPC<sup>®</sup>-M 或 MPC<sup>®</sup>-S) 內。
- (14) 將磁座拿起旋轉搖晃約 180 度，以每秒一次的速率搖晃 1 分鐘。此步驟終了時，磁珠會附著在離心管壁，呈現出一條褐色的條斑。
- (15) 不要將微量離心管與磁座分開，迅速打開微量離心管上蓋將上清液傾倒出來。過程中避免擾動管壁上的磁珠或震動微量離心管。儘量將殘餘的液體吸除。
- (16) 將磁條由微量試管用磁座取出。在微量離心管內分別加入 50  $\mu$ L 的 0.1 N HCl (註) 後，將微量離心管由磁座取下，以試管

振盪器之最高速率振盪約 50 秒鐘，然後放回磁座，靜置 10 分鐘。

- (17) 將微量離心管劇烈振盪約 30 秒。確認所有的液體都在離心管底部後，再將微量離心管放回磁座。
- (18) 將磁條插入磁座，讓微量離心管靜置至少 10 秒鐘。
- (19) 準備一片玻片，加入 10  $\mu$ L 的 1.0 N NaOH。不要將微量離心管由磁座取下，將樣本完全轉移至玻片上的小孔中（不要吸到或擾動管壁上的磁珠）。
- (20) 重複步驟(16)至(19)，但是將第二次解離之液體併入原有樣本之玻片小孔中。
- (21) 在室溫下讓玻片上的樣本溶液慢慢風乾，也可置於 35 至 42  $^{\circ}$ C 的環境下風乾，或放在冰箱內隔夜風乾。記錄開始風乾之日期時間。
- (22) 玻片風乾後，如不立即染色，應儲存在 1 至 10  $^{\circ}$ C。

### (三) 樣品染色

#### 1. 染色正控制組及負控制組之準備

- (1) 染色正控制組：取 200 至 400 個卵囊及 200 至 400 個囊體至玻片上風乾，作為正控制組。
- (2) 染色負控制組：取 50  $\mu$ L PBS 至玻片上風乾，作為負控制組。

#### 2. 免疫螢光抗體染色

- (1) 玻片染色前應先回溫，待玻片完全乾燥才可進行染色步驟。
- (2) 免疫螢光抗體之染色程序依試劑組而有所不同，請依試劑組之說明進行。
- (3) 完成封片後，依據八、結果處理章節之規定進行鏡檢並計數。如果無法馬上觀察計數，樣本玻片必須保存在 1 至 10  $^{\circ}$ C 的暗處，同時要注意保濕，不能使玻片乾燥（註 5）。

## 八、結果處理

## (一) 顯微鏡鏡檢與計數

1. 染色正控制組及負控制組：每次進行顯微鏡鏡檢時，必須先進行染色正控制組及負控制組之鏡檢，結果如可接受（註6），才可進行樣品之鏡檢。
2. 隱孢子蟲卵囊之鏡檢與計數

- (1) FITC 螢光鏡檢（放大倍率至少須為 200 倍）：隱孢子蟲卵囊在顯微鏡下是有亮度的蘋果綠顏色，大小約 4 至 6  $\mu\text{m}$ ，卵形或圓形，周圍有一圈明亮的蘋果綠色光環。

發現具有上述特徵之物體後，必須將放大倍率增至 400 倍確認 DAPI 染色特徵，接著將放大倍率增至 1000 倍，以微分干涉差（DIC）功能確認相關特徵。

- (2) DAPI 螢光鏡檢（放大倍率至少須為 400 倍）：隱孢子蟲卵囊會有下列特徵之一：

- A. 1 至 4 個清晰、天藍色的細胞核
- B. 細胞質明顯染上藍色
- C. 細胞質為淡藍色，邊緣一圈綠色

特徵符合 A. 或 B. 記錄為「DAPI +」；符合 C. 則記錄為「DAPI -」。

如果具有非典型特徵，如細胞核超過 4 個、細胞核大小不典型、不具有細胞壁構造、顏色不符等，皆判定為非隱孢子蟲卵囊。

- (3) DIC 鏡檢（放大倍率至少須為 1000 倍）：使用顯微鏡之 DIC 功能，觀察目標物之型態是否具有與隱孢子蟲卵囊不符之特徵，如棘狀物（spikes）、柄狀物（stalks）、附屬構造（appendages）、空泡（pores）、1 或 2 個大細胞核充滿整個細胞、紅色螢光葉綠體、結晶或孢子等。

如果沒有發現上述特徵，則將螢光蘋果綠之物體逐一分類，類別如下：

- A. 內部空洞之隱孢子蟲卵囊

B. 不具明確構造 (amorphous structure) 之隱孢子蟲卵囊

C. 內部具有 1 至 4 個孢子體 (sporozoites) 之隱孢子蟲卵囊

- (4) 綜合(1)至(3)之鏡檢結果，目標物如經免疫螢光抗體染色後具有典型之特徵，大小與形狀典型，且在 FITC、DAPI、DIC 鏡檢時均未發現與隱孢子蟲卵囊不符之特徵，則判定為隱孢子蟲卵囊。針對鏡檢時發現的隱孢子蟲卵囊，必須逐一記錄其大小、形狀、DAPI 鏡檢及 DIC 鏡檢分類結果，以及內部孢子體的數量。

### 3. 梨形鞭毛蟲囊體之鏡檢與計數

- (1) FITC 螢光鏡檢 (放大倍率至少須為 200 倍): 梨形鞭毛蟲囊體在顯微鏡下為具亮度的蘋果綠顏色，卵形或圓形，長為 8 至 18  $\mu\text{m}$ ，寬為 5 至 15  $\mu\text{m}$ ，周圍有一圈明亮的蘋果綠色光環。

發現具有上述特徵之物體後，必須將放大倍率增至 400 倍確認 DAPI 染色特徵，接著將放大倍率增至 1000 倍，以微分干涉差 (DIC) 功能確認相關特徵。

- (2) DAPI 螢光鏡檢 (放大倍率至少須為 400 倍): 梨形鞭毛蟲囊體會有下列特徵之一：

A. 2 至 4 個清晰、天藍色的細胞核

B. 細胞質明顯染上藍色

C. 細胞質為淡藍色，邊緣一圈綠色

特徵符合 A. 或 B. 記錄為「DAPI +」; 符合 C. 則記錄為「DAPI -」。

如果具有非典型特徵，如細胞核超過 4 個、細胞核大小不典型、不具有細胞壁構造、顏色不符等，皆判定為非梨形鞭毛蟲囊體。

- (3) DIC 鏡檢 (放大倍率至少須為 1000 倍): 使用顯微鏡之 DIC 功能，觀察目標物之型態是否具有與梨形鞭毛蟲囊體不符之特徵，如棘狀物 (spikes)、柄狀物 (stalks)、附屬構造 (appendages)、空泡 (pores)、1 或 2 個大細胞核充滿整個細胞、紅色螢光葉綠體、結晶或孢子等。

如果沒有發現上述特徵，則將螢光蘋果綠之物體逐一分類，類別如下：

- A. 內部空洞之梨形鞭毛蟲囊體
- B. 不具明確構造 (amorphous structure) 之梨形鞭毛蟲囊體
- C. 具有 1 種典型內部構造 (細胞核、中體 (median body) 或軸絲 (axonemes)) 之隱孢子蟲卵囊。
- D. 具有超過 1 種內部典型構造之隱孢子蟲卵囊
- E. 綜合(1)至(3)之鏡檢結果，目標物如經免疫螢光抗體染色後具有典型之特徵，大小與形狀典型，且在 FITC、DAPI、DIC 鏡檢時均未發現與梨形鞭毛蟲囊體不符之特徵，則判定為梨形鞭毛蟲囊體。針對鏡檢時發現的梨形鞭毛蟲囊體，必須逐一記錄其大小、形狀、DAPI 鏡檢及 DIC 鏡檢分類結果，以及內部細胞核數量、是否具有中體或軸絲。

## (二) 複雜樣本的分析

1. 如果樣品的蟲數過高 (超過 1000/L)，或是水中濁度過高，導致濾心阻塞以致於無法過濾 10 L 水樣，可以考慮降低水樣體積，以試劑水稀釋後再行過濾。
2. 某些樣品會黏附在離心管管壁上。使用經矽處理 (siliconized) 或低吸附之離心管也許可降低吸附，或是在使用前用流洗液先潤洗離心管。

## 九、品質管制

(一) 依本方法執行原蟲檢測之實驗室，必須有完整之品保品管程序，包括起始能力確認 (initial precision and recovery (IPR) test)、方法空白、執行期間能力確認 (ongoing precision and recovery (OPR) test)、染色控制組 (staining controls)。

### 1. 起始能力確認：

- (1) 檢測 4 件試劑水添加樣品，內含 100 至 500 個隱孢子蟲卵囊及 100 至 500 個梨形鞭毛蟲囊體。4 件樣品之檢測程序須完全相同，檢測時須伴隨 1 件方法空白。

- (2) 4 件試劑水添加樣品不須在同一天進行檢測，但是檢測順序必須連續。
  - (3) 分別計算隱孢子蟲及梨形鞭毛蟲之平均回收率及回收率之相對標準偏差。結果必須符合表一之允收標準。如果與標準不符，必須重新檢討檢驗流程後，再次進行起始能力確認，直至符合標準為止。
2. 方法空白：每 20 個樣品應執行 1 個方法空白樣品分析。若樣品檢測期間每 7 天之樣品數少於 20 個，則每 7 天仍應執行 1 個方法空白樣品分析。方法空白中不得檢出隱孢子蟲卵囊及梨形鞭毛蟲囊體。
3. 執行期間能力確認：
- (1) 每 20 個樣品應進行 1 次執行期間能力確認樣品分析。若樣品檢測期間每 7 天之樣品數少於 20 個，則每 7 天仍應執行次執行期間能力確認樣品分析。
  - (2) 執行方式：檢測 1 件試劑水添加樣品，內含 100 至 500 個隱孢子蟲卵囊及 100 至 500 個梨形鞭毛蟲囊體。
  - (3) 分別計算隱孢子蟲及梨形鞭毛蟲之平均回收率，結果必須符合表一之允收標準。如果與標準不符，必須將與能力確認樣品同批檢測之樣品廢棄，並停止分析後續樣品，重新檢討檢驗流程後，再次進行執行期間能力確認，直至符合標準為止，才可繼續分析樣品。

(二) 由於分析技術及試劑組仍不斷演進，檢驗人員可適當變更樣品之濃縮、分離等程序，以增加原蟲回收率、降低檢驗成本或縮短檢測所須時間，但是樣品染色必須使用免疫螢光抗體分析法不可更動。如變更方法程序，必須重新執行起始能力確認及基質添加/基質重複添加測試，且檢測結果之數據品質不能低於本方法之品管規範。對於變更之檢測方法，實驗室必須保留相關之資料。

## 十、精密度與準確度

略。

## 十一、參考文獻



- (一) U. S. EPA, Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, EPA 815-R-05-002, 2005.
- (二) Zuckerman, U., Armon, R., Tzipori, S., and Gold, D.,. Evaluation of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 955-961, 1999.
- (三) Zuckerman, U. and Tzipori, S., Portable continuous flow centrifugation and method 1623 for monitoring of waterborne protozoa from large volumes of various water matrices, *Journal of Applied Microbiology*, 100(6): 1220-1227, 2006

註 1：因 pH 值對磁珠解離及螢光抗體試驗之影響極大，用於上述程序之 pH 調整試劑須購買當量濃度固定之市售商品，不可自行配製或調整當量濃度。

註 2：過濾 10 L 以下水樣可使用 Enviochek™ 濾管，而過濾高濁度水樣或超過 10L 之水樣可使用 Enviochek™ HV 濾管。

註 3：例如沉澱物體積為 1.2 mL，計算所得的分樣數量為 3 個，則於離心管內添加試劑水至總體積為 15 mL，劇烈震盪將沉澱物懸浮後，再分為 3 個 5 mL 的分樣。

註 4：例如沉澱物體積為 1.2 mL，計算所得的試劑水添加後總體積為 12 mL，則於離心管內添加試劑水至總體積為 12 mL。劇烈震盪將沉澱物懸浮後，可取 2 管 5 mL 懸浮液進行後續檢測步驟，則檢驗比例為 83.33%。如實際過濾水樣體積為 10 L，則換算之檢驗水樣體積為 8.33 L。

註 5：可將玻片存放在有蓋塑膠盒內，下墊以水潤濕之紙巾。

註 6：染色正控制組上之卵囊及囊體數量必須落於預期範圍，且 FITC 抗體染色及 DAPI 染色之螢光強度必須適中。染色負控制組不可觀察到卵囊或囊體。

表一、品質管制之允收範圍

品質管制項目	允收範圍	
	隱孢子蟲	梨形鞭毛蟲
起始能力確認		
平均回收率 (%)	24 – 100	24 – 100
回收率相對標準偏差 (%)	55	49
執行期間能力確認 (%)	11 – 100	15 – 118