

免疫荧光法测定水中贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊

余素华, 陈贻球, 严锦玲

(东莞东江水务有限公司监测站, 广东 东莞 523109)

摘 要: 采用滤囊过滤、振荡洗脱、离心浓缩、免疫磁珠分离、荧光染色和微分干涉相衬镜检计数等技术, 检测水体中贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊, 介绍了其显微特征, 方法加标回收率 $>35.0\%$, 相对标准偏差 $\leq 13.0\%$ 。

关键词: 贾第鞭毛虫; 隐孢子虫; 免疫荧光法; 水质

中图分类号: Q93 - 33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2009)01-0033-03

The Determination of Giardia Theca and Cryptosporidium Capsule in Water by Immuno-fluorescence Method

YU Su-hua, CHEN Yi-qiu, YAN Jin-ling

(Dongguan Dongjiang Water Company Monitoring Stations, Dongguan, Guangdong 523109, China)

Abstract: The number of Giardia and Cryptosporidium in the water was detected with the aid of filter-purse filtration, the oscillate elution, the centrifugal concentration, the immunomagnetic beads separation, the fluorescence dyeing and the differential interference microscopy. The microscopic characters were described. The recovery of the method was $>35.0\%$. The RSD was $\leq 13.0\%$.

Key words: Giardia; Cryptosporidium; Immuno-fluorescence method; Water quality

贾第鞭毛虫和隐孢子虫 (以下简称“两虫”) 是寄生于人和动物体内的肠道原虫, “两虫” 孢囊或卵囊在水中能存活长达半年, 饮用受其污染的水, 会引起严重的消化道感染, 甚至导致死亡^[1]。相关调研表明中国也面临“两虫” 分布广泛的问题^[2], 《生活饮用水卫生标准》(GB 5750 - 2006) 已将其列为微生物监测项目。目前水中“两虫” 的检测方法主要有免疫荧光法 (1623 法)^[3]、酶联免疫法^[4]和 PCR 法^[5]。酶联免疫法与 PCR 法检测成本高, 操作复杂, 周期长, 回收率较低^[6], 而免疫荧光法具有灵敏度较高、成本较低的优势^[7]。今采用免疫荧光法测定南方某市水源水、饮用水和污水中的“两虫”, 获得了满意结果。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Pall Envirochek 囊式滤器、Pall Shaker 洗脱振荡器, 美国 Pall 公司; 离心机, 湖南湘仪公司; Dynal MPC - 1 型磁性粒子浓缩器、Dynal MPC - S 型磁性

粒子浓缩器、Dynal Sample Mixers 样品混合器、Dynal L10 侧平壁试管、涡旋混合器, 美国 Dynal 公司; OLYMPUS BX51 型显微镜, 日本奥林巴斯公司。

淘洗缓冲液, 由 1 mol/L Tris (pH 值 = 7.4)、0.5 mol/L EDTA - 2Na (pH 值 = 8.0)、Laureth - 12 组成; Dynal 免疫磁珠分离试剂盒; Dynal G - C 质控试剂盒 [贾第鞭毛虫孢囊 (99 $\pm$ 1.2) 个/管、隐孢子虫卵囊 (98 $\pm$ 0.8) 个/管]; Sigma 染色剂 DAPI 染色试剂盒 (包括 Easy Stain 染色液、冰固定缓冲液和封片胶)。

1.2 试验步骤

1.2.1 水样采集与过滤

取样有两种方式, 一种是现场过滤采样, 即在取样处连接过滤系统直接采集水源水和出厂水, 过滤流量为 2 L/min; 另一种是现场采水, 试验室过

收稿日期: 2008 - 09 - 23; 修订日期: 2008 - 11 - 27

作者简介: 余素华 (1981—), 女, 广东东莞人, 助理工程师, 大专, 从事水质分析与监测工作。

滤,需严格满足取水量、保存条件、时间等要求。

1.2.2 洗脱与离心浓缩

将配制好的洗脱缓冲液从滤囊进水口缓慢加入,使液面略高于白色滤膜。将滤囊固定于摇臂振荡器上,以 900 r/min 振荡 5 min 后,将洗脱液迅速转移至锥形离心管中,用同样方法再洗脱一次。调节离心管中溶液体积,使各管总质量一致后放入离心机,在 1 500 g 条件下离心 15 min,吸去上清液。

1.2.3 免疫磁分离 (MS)

向盛有浓缩样品的侧平壁试管中加入 100 μL 贾第鞭毛虫孢囊分离磁珠 Dynabeads Giardia - Combo 和 100 μL 隐孢子虫卵囊分离磁珠 Dynabeads Crypto - Combo 后,置于 Dynal 反应混合器上,以 18 r/min 的转速在室温下混合转动 1 h,保证磁珠与孢囊和卵囊充分结合。反应结束后,用磁珠收集器 (MCP - M) 收集磁珠,弃去上清液。

用 1 mL 缓冲液悬浮磁珠,并将其全部转移至微量离心管中,用另一个磁珠收集器收集磁珠,并立即用吸头吸去上清液。向离心管中加入 50 μL 0.1 mol/L 盐酸溶液,使孢囊和卵囊与磁珠解离,再用 MPC - S 将孢囊、卵囊与磁珠分开,并将前者全部转移至并形载玻片上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥约 40 min。

1.2.4 免疫荧光染色

向载玻片中心加入 50 μL DAPI 溶液,放置 2 min 后,用滤纸吸去多余溶液。再向载玻片中加入 50 μL Easy StainTM 荧光染色液,于室温下孵育 30 min,或在装有湿纸的盒中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min,倾斜有孔载玻片,用滤纸吸去多余的染色液。在载玻片中心缓慢加入 300 μL 冰固定缓冲液 Fixing Buffer,放置 2 min 后用滤纸吸去多余的缓冲液。最后向载玻片中心加入 5 μL Easy StainTM 封片胶 Mounting Medium,盖上盖玻片,准备镜检观察。

1.2.5 显微镜检测

在 20 倍物镜下扫描整个样品,开启荧光激发滤光块观察,长 8 μm ~ 18 μm 、宽 5 μm ~ 15 μm 呈苹果绿色的是贾第鞭毛虫孢囊,直径 4 μm ~ 6 μm 呈苹果绿色的是隐孢子虫卵囊。在 40 倍物镜下扫描整个样品,开启紫外荧光激发滤光块观察,可见贾第鞭毛虫孢囊中有 2 ~ 4 个天蓝色的核,隐孢子虫卵囊中有 4 个明显的天蓝色的核。用荧光和微分干涉相衬法 (DIC) 对着色样本检验,观察每个载玻片,对符合贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊大小、形状、荧光特性的对象定性、定量分析。在 100

倍油镜下开启 DIC 相差配件观察孢囊和卵囊,能看到突起、茎、褶皱等内外部形态结构。

2 结果与讨论

2.1 显微特征

在蓝光激发下,贾第鞭毛虫孢囊呈带有明亮苹果绿的椭圆形 (长径为 8 μm ~ 18 μm ,短径为 5 μm ~ 15 μm)。经 DAPI 染色,在紫外激发下可观察到孢囊中有 2 ~ 4 个天蓝色的核或内部呈较深的蓝色。利用 DIC 观察时,可发现孢囊中诸如刺突、柄、附属物、孔、细胞内一二个大核、红色荧光叶绿素、结晶体、孢子等典型特征结构。贾第鞭毛虫孢囊的显色特征见图 1。

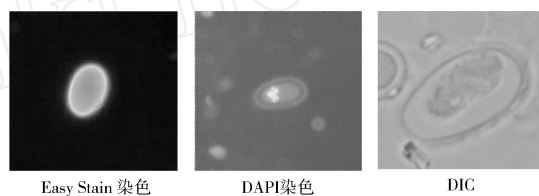


图 1 贾第鞭毛虫孢囊的显色特征

在蓝光激发下,隐孢子虫卵囊呈带有明亮苹果绿荧光的卵圆形或圆形,边缘明亮,直径为 4 μm ~ 6 μm 。经 DAPI 染色,在紫外激发下可观察到卵囊中有 4 个明显的天蓝色核或内部呈较深的蓝色。利用 DIC 观察时,可发现卵囊中诸如刺突、柄、附属物、孔等典型特征结构,大多数情况下可观察到卵囊表面有皱褶。隐孢子虫卵囊的显色特征见图 2。

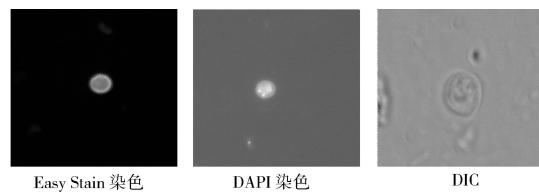


图 2 隐孢子虫卵囊的显色特征

2.2 精密度与加标回收试验

向 5 份 10 L 蒸馏水中各加入一管标样,其中贾第鞭毛虫孢囊 (99 $\pm$ 1.2) 个/管,隐孢子虫卵囊 (98 $\pm$ 0.8) 个/管,用该方法检测,回收率分别达到了 38.8% 和 40.2%,符合 10% ~ 100% 的国标要求。精密度与加标回收试验结果见表 1。

表 1 精密度与加标回收试验结果

指标	贾第鞭毛虫孢囊					隐孢子虫卵囊				
镜检计数 $n/\text{个}$	31	37	40	39	45	36	42	35	43	41
平均回收率 /%	38.8					40.2				
RSD /%	13.0					9.0				

2.3 实际样品测定

用该方法于 2008 年 5 月—7 月对南方某市 3 家自来水厂和 2 家污水处理厂水中“两虫”污染状况作调查,自来水厂的水源水和出厂水均采用现场过滤方式,污水厂出水为采样抽滤,样品测定结果见表 2。

表 2 实际样品测定结果

样品	水样 体积 V/L	浊度 $/\text{NTU}$	余氯 $\rho/$ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	贾第鞭毛 虫孢囊 / $(\text{个} \cdot 10\text{L}^{-1})$	隐孢子虫 卵囊 / $(\text{个} \cdot 10\text{L}^{-1})$
A 厂水源水	20	20.6	<0.01	—	—
A 厂出厂水	100	0.230	0.70	—	—
B 厂水源水	20	15.3	<0.01	—	—
B 厂出厂水	100	0.190	0.80	—	—
C 厂水源水	20	18.1	<0.01	—	—
C 厂出厂水	100	0.200	0.75	—	—
1#污水厂	10	7.52	0.15	9	8
2#污水厂	10	4.65	<0.01	2	4

3 结语

采用滤囊过滤、振荡洗脱、离心浓缩、免疫磁珠分离、荧光染色和微分干涉相衬镜检计数等方法,检测水体中贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊,精密度与加标回收率均符合要求,可用于城市水环境中“两虫”污染状况调查。

[参考文献]

[1] ALEXANDER A. Disinfection of cryptosporidium parvum with polychromatic UV light[J]. Journal AWWA, 2001, 93(6): 95 - 109.

[2] 宗祖胜,胡洪营,卢益新. 隐孢子虫和贾第鞭毛虫的成套分析方法介绍[J]. 给水排水, 2005, 31(6): 8 - 11.

[3] EPA-821-r-99-006, Method 1623, Cryptosporidium and giardia in water by filtration/MS/FA[S].

[4] DEERE D. Evaluation of fluorochromes for flow cytometric detection of cryptosporidium parvum oocysts labelled by fluorescent in situ hybridization[J]. Lett Appl Microbiol, 1998(27): 352 - 356.

[5] MACKENZIE W R. Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in milwaukee Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission[J]. Clinical Infection Disease, 1995(21): 57 - 62.

[6] 宋宏,钟赛贤,余淑苑,等. 饮用水中肠贾第鞭毛虫和隐孢子虫卫生标准的研究[J]. 环境与健康杂志, 2004, 21(6): 417.

[7] 孙媛媛. 荧光光谱法在环境监测中的应用[J]. 环境监测管理技术, 2000, 12(3): 12 - 16.

(上接第 7 页)

在长三角区域构建由 EOS - MODIS、Landsat/TM/ETM+、车载 DOAS^[6]、气象卫星及航空遥感、地基遥感监测(如太阳辐射计、气溶胶雷达、风廓线仪等)多平台、多时空及高光谱分辨率遥感资料所组成的遥感信息平台。这对掌握污染物时空分布规律、跟踪污染物在边界层内的迁移输送、反映污染物分布与化学动力学扩散迁移具有相当的优势,可协助突发性污染事故的跟踪监测。

4.3 建立长三角区域大气复合污染监测体系

上海市空气污染类型正由单一型局地性污染向复合型区域性污染转变,长江三角洲地区城市密集,又常处于同一天气条件下,空气污染变化具有很强的同步性。目前,珠江三角地区已建立区域环境空气质量监测体系,建议在条件成熟时建立长三角区域监测网络,包括城市空气监测子站、区域空

气监测子站、超级站、移动监测子站、数据中心和质控中心,具有对当地污染深入监测分析的功能,以及对污染物时空分布的跟踪监测功能。

[参考文献]

[1] 陈明华. 上海市环境空气质量改善措施研究[J]. 上海建设科技, 2006, (3): 31 - 32.

[2] 唐雅萍,陈宝琳,张丹宁. 构建南京市现代环境监测体系的思考[J]. 环境监测管理技术, 2008, 20(3): 6 - 8.

[3] 郑晓红. 上海市酸雨污染状况及成因分析[J]. 仪器仪表与分析监测, 2007, (1): 63 - 64.

[4] 赵金平. 广州市灰霾期间大气颗粒物中无机元素的质量浓度[J]. 环境化学, 2008, 27(3): 324 - 325.

[5] 陈建江. 对我国环境自动监测发展的思考[J]. 环境监测管理技术, 2007, 19(1): 1 - 3.

[6] 杜晓勇. 车载激光雷达探测低层大气中的 NO_2 [J]. 大气与环境光学报, 2006, 1(2): 99 - 100.

本栏目责任编辑 陈宝琳