

病例報告：赤腹松鼠弓蟲感染症

涂央昌*、許偉誠、陳彥彰、官南綾、黃子鳴、胡書佳

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 弓蟲 (*Toxoplasma gondii*) 是一種細胞內寄生的原蟲，它可以感染大部份溫血動物及人類，本病普遍存在全世界，貓科動物是唯一的終宿主。本病例報告以肉眼病變、組織病理學、免疫組織化學及分子生物學呈現一松鼠致死性全身性弓蟲感染症。患畜剖檢可見肺臟有多發黃白色斑狀病灶及心臟左心房心外膜有一黃白色團塊。組織學下可見壞死性腦膜腦炎、肺炎、心肌炎、肝炎及腎上腺炎，壞死病灶區及其周圍可見大量的原蟲速殖體，經弓蟲免疫組織化學染色，這些蟲體都可被標示呈現陽性，而分子生物學檢測，亦能增幅出弓蟲專一性基因片段。本病例弓蟲感染症在赤腹松鼠為臺灣首次發現。

關鍵詞：弓蟲、赤腹松鼠、免疫組織化學染色、分子生物學檢測

前言

弓蟲 (*Toxoplasma gondii*) 是一種屬於絕對細胞內寄生之原蟲，分佈於世界各地，幾乎可感染所有溫血動物。貓科動物是弓蟲唯一的終宿主 (definitive host)，弓蟲只會在貓科動物的小腸上皮中行有性生殖，在雌、雄配子結合形成卵囊 (oocyst) 後，隨脫落的小腸上皮細胞排出體外 [4]。貓科動物以外的動物感染弓蟲都是中間宿主 (intermediate host)，在這些中間宿主的動物體內，弓蟲只能行無性生殖，破壞組織，形成組織囊胞 (tissue cyst)，糞便中不會有卵囊 [4]。

弓蟲有三種不同傳染型態：速殖體、緩殖體、孢子體 [4]。(1) 速殖體 (tachyzoites)：發生於急性感染時，蟲體轉變成快速分裂的速殖體，會造成組織嚴重的破壞，速殖體可轉變為緩殖體；(2) 緩殖體 (bradyzoites, in tissue cyst)：為緩慢分裂的型態，常以組織囊胞型態存在腦、視網膜、橫紋肌和肝臟細胞，組織囊胞內有數百個緩殖體；(3) 孢子體 (sporozoites, in oocysts)：只會在貓科動物的小腸行有性生殖產生卵囊 (oocyst)，隨糞便排出後，卵

囊內孢子體需經過 2~4 天的芽孢化 (sporulation) 才具有感染力，卵囊在適當條件下可存活 1 年以上。絕大多數的溫血動物都可以藉由食入芽孢化的卵囊或吃到其它動物組織中的速殖體和緩殖體而被感染。

已有多篇松鼠感染弓蟲的報告，包括美洲紅松鼠 (*Tamiasciurus hudsonicus*)、歐亞紅松鼠 (*Sciurus vulgaris*)、隱紋花松鼠 (*Tamias swinhoei*)、灰松鼠 (*Sciurus carolinensis*)、狐松鼠 (*Sciurus niger*)、西伯利亞花栗鼠 (*Tamias sibiricus*) [2, 3, 5, 6, 7, 8]。荷蘭在 2014 年曾發生松鼠爆發弓蟲感染事件，推測是家貓糞便中的卵囊污染堅果、莓果等松鼠的食物所致，由於在荷蘭有超過 300 萬隻家貓、流浪貓，此事件顯示弓蟲在公共衛生上的重要性 [7]。

赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus taiwanensis*) 感染弓蟲的病例在臺灣尚未有文獻報告，本病例以肉眼病變、組織病理學、免疫組織化學及分子生物學檢測報導一松鼠致死性全身性弓蟲感染症。

病例來源

某南部校園內發現一成年、雄性的赤腹松鼠，發

現時該松鼠呈現虛弱、癱軟無力，但人員捕捉時仍有掙扎動作，救傷時發現該松鼠有呼吸用力及四肢呈划水狀，當日經急救無效死亡。

外觀檢查

送檢赤腹松鼠基本資料：吻 - 肛長約 20 公分，尾長約 23 公分，體重 258 公克 (圖 1)。無明顯外傷，外觀體態消瘦，肌肉及腹腔脂肪含量略少 (圖 2)。

肉眼病變

剖檢可見肺臟有多發大小不一的黃白色斑狀病灶，其表面呈凹陷狀 (圖 3)。左心房的心外膜可見附著一個堅實的黃白色乾酪樣團塊，約 1 x 0.8 cm (圖 4)，其餘內臟呈死後變化 (圖 2)。

組織病理學檢查

各臟器經 10% 中性福馬林固定後，組織進行修整、脫水、石蠟包埋及切片，再進行蘇木紫 - 伊紅常規染色供組織病理學判讀。

大腦、小腦、腦幹：腦實質內可見多發局部壞死及廣泛性腦膜炎 (圖 5、6)，並且伴隨出血 (圖 7)，壞死區有以淋巴球為主的炎症細胞，以及少量嗜酸性球浸潤，壞死區內及其周圍可見細胞質內的速殖體，內含無數呈新月型 (crescent) 的蟲體，蟲體約 2 - 5 μm ，病灶中亦可見游離 (free form) 的速殖體蟲體 (圖 7、8)。此外，亦可見微神經膠質細胞結節 (microglial nodules) 及圍管 (cuffing)，血管內皮細胞可見增生及肥大 (圖 7、8)。

心臟：肺動脈及左心房心外膜周圍有一局部廣泛性的壞死灶 (圖 9)，壞死灶周圍有淋巴球及嗜酸性球浸潤，亦可見細胞質內及游離的速殖體 (圖 10)，左心房的心肌細胞內可見速殖體 (圖 11)，周圍有淋巴球及漿細胞等單核炎症細胞浸潤。

肺臟：實質呈多發壞死 (圖 12)，肺泡壁及肺泡腔有大量淋巴球、巨噬細胞、滲出液，以及少量嗜酸性球浸潤，巨噬細胞內可見速殖體及游離的蟲體 (圖 13、14)，血管周圍可見大量單核炎症細胞圍繞。

肝臟：實質呈瀰漫性肝炎，並且可見多發壞死，

炎症細胞以淋巴球為主，並有少量嗜酸性球及漿細胞浸潤，亦可見細胞質內及游離的速殖體 (圖 15)，門脈區的血管周圍可見大量單核炎症細胞圍繞。

腎上腺：實質呈多發局部壞死 (圖 16)，壞死區可見淋巴球及嗜酸性球浸潤，壞死區周圍可見細胞質內及游離的速殖體 (圖 17)。

免疫組織化學 (Immunohistochemistry; IHC)

石蠟包埋組織切片先經脫蠟、再水合 (rehydration) 及抗原修復 (antigen retrieval)。抗原修復係採用 heat-induced epitope retrieval (HIER) 方式，HIER 是將脫蠟及再水合後的組織切片以 citrate buffer (pH 6.0) 於 decloaking chamber (Biocare Medical) 設定 121°C 浸泡 10 分鐘。一級抗體為 rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody (LifeSpan Biosciences, Inc.)，偵測系統為商品化 Super Sensitive™ Polymer-HRP (BioGenex Laboratories, Inc.) 套組，呈色系統採用 Romulin AEC Chromogen Kit (Biocare Medical)，最後以蘇木紫進行背景染色。

各壞死組織內，不論是細胞質內或游離的速殖體，均可被弓蟲的專一性抗體標示呈現陽性訊號 (圖 18~22)。

微生物學檢測

分子生物學檢測

利用聚合酶鏈反應 (PCR) 檢測各組織臟器之弓蟲核酸，弓蟲的引子由本所李敏旭博士設計，Toxo-50f : 5'-TCTGTTCGCTGTCTGTCTAG-3' 及 Toxo-260r : 5'-AGGCAGCACAAGAATGTTGC-3'，針對弓蟲的 B1 基因進行增幅，預期增幅產物為 211 bp。

各臟器，包括腦、肝臟、脾臟、肺臟、胃、小腸、膀胱及睪丸等，均可增幅出 B1 基因專一性片段 (圖 23)，將產物進行定序並與 NCBI 基因資料庫進行 BLAST 比對，本病例之基因片段與基因庫之 *Toxoplasma gondii* 基因序列相似度高達 99.43%。

細菌分離及鑑定

肺臟組織以血液培養基及 MacConkey agar 進行細菌分離，分離到的細菌以 VITEK® 2 COMPACT 微生物生化性狀鑑定系統進行細菌鑑定。肺臟分離得 *Pasteurella mairii*、*Acinetobacter baumannii* complex 及 *Stenotrophomonas maltophilis*。

農藥檢測

胃內容物以氣相層析質譜儀 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry · GC-MS)，安捷倫 (Agilent) 公司型號 7683B 自動注射器搭配型號 6890 氣相層析儀與型號 5973 質譜儀檢測有機磷類農藥，及以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography · HPLC)，Waters 公司型號 2695 分層模組與型號 2475 螢光偵測器檢測氨基甲酸鹽類農藥，結果皆為陰性。

討論

松鼠感染弓蟲的病例在國外已有多篇報告 [2, 3, 5, 6, 7]，但臺灣的赤腹松鼠目前尚未有弓蟲感染的報告，本病例於南部某校園內發現虛弱松鼠，因急救無效而送至本所進行檢驗，最終確診為致死性全身性弓蟲感染症。

本病例肉眼病變最顯著是在肺臟有多發表面凹陷黃白色斑狀病灶，以及左心房心外膜有一黃白色團塊，這些病變在組織學下都呈現壞死，於壞死區及其周圍都可見細胞質內 (巨噬細胞及心肌細胞) 或游離的速殖體，蟲體呈新月型，約 2 - 5 μm 。組織病變除心臟及肺臟外，還可見壞死性腦膜腦炎、肝炎、腎上腺炎等，壞死區亦可見細胞質內或游離的速殖體，本病例赤腹松鼠感染弓蟲的病變與文獻發表的其他松鼠感染弓蟲病變相似 [2, 3, 5, 8]。依據蟲體的形態需要與 *Neospora caninum*、*Sarcocystis* sp.、*Leishmania* sp.、*Hammondia hammondia* 等做區別診斷。利用專一性的抗弓蟲抗體以免疫組織化學染色進行標示，病灶中的細胞質內或游離的弓蟲蟲體均可被標示呈現陽性。以分子生物學檢測，在腦、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟、胃、小腸、膀胱及睪丸等多個臟器亦均可增幅出弓蟲專一性基因片段。本病例最終確診為赤腹松鼠

致死性全身性弓蟲感染症。

松鼠感染弓蟲的途徑目前仍不明確，依據弓蟲生活史，貓科動物為終宿主，中間宿主為非貓科及貓科動物，僅有終宿主會排出蟲卵，而動物感染的途徑包括：(1) 食入受感染的動物；(2) 食入貓科動物排出的蟲卵；(3) 先天性感染 (胎盤垂直感染) [4]，依據松鼠習性，本病例推測可能為食入貓科動物排出的蟲卵而導致感染。

弓蟲為重要人畜共同傳染病，而人類的弓蟲感染症為我國衛生福利部疾病管制署公告之第四類法定傳染病，當醫療機構檢出病人感染弓蟲症須在 1 週內通報該署。大多數人感染弓蟲並不會出現明顯症狀，但孕婦在懷孕期間急性感染，可能導致流產、胎兒畸形、死亡等後遺症。國內懷孕年齡婦女血清抗體調查發現，弓蟲感染率大約是 10% 左右，而 30% 的婦女感染後，產生可以保護胎兒不被感染的抗體，但在沒有抗體的懷孕婦女則可能出現胎兒死亡和先天性畸形 [1]。



圖 1、送檢松鼠外觀。



圖 2、肌肉及腹腔脂肪含量略少，消化道及脾臟呈死後變化。

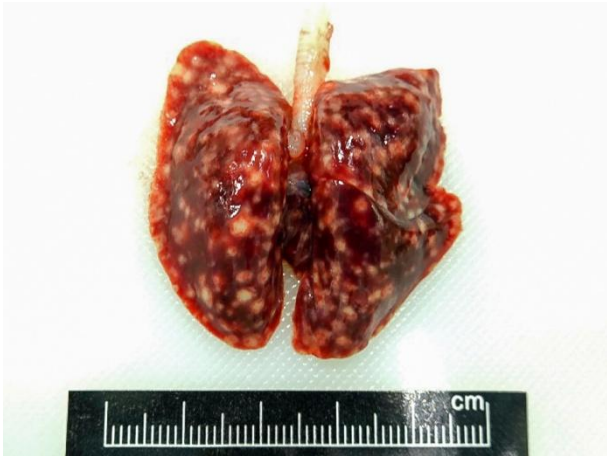


圖 3、肺臟有多發大小不一的黃白色斑狀病灶，其表面呈現凹陷。



圖 4、左心房的心外膜可見附著一個堅實的黃白色酪樣團塊，約 1 x 0.8 cm。

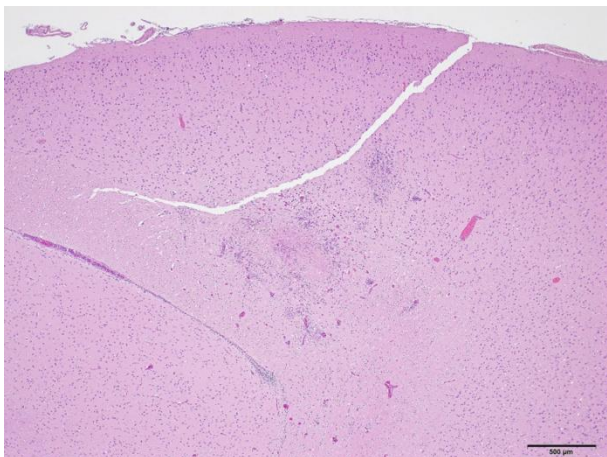


圖 5、大腦，腦實質有多發壞死。

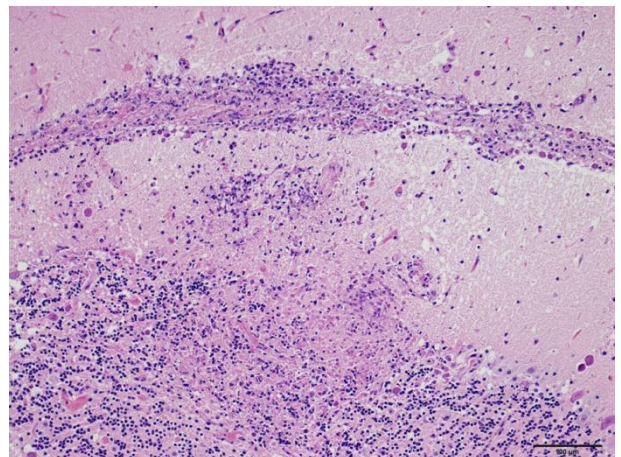


圖 6、小腦，腦實質有多發壞死及廣泛性腦膜炎。

病例報告：赤腹松鼠弓蟲感染症

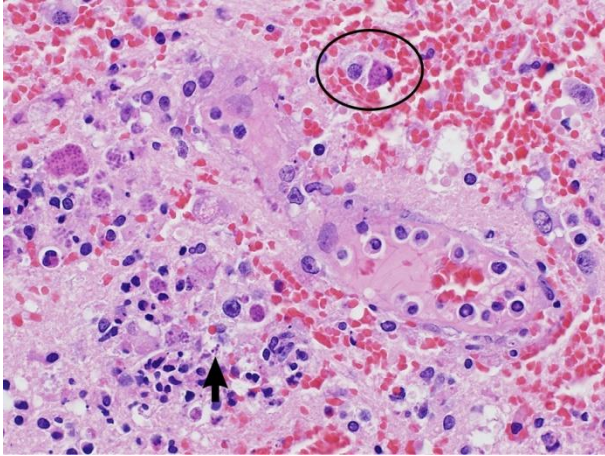


圖 7、大腦·壞死伴隨出血及炎症細胞浸潤·病灶內可見細胞內(圓圈)及游離的(箭頭)速殖體。

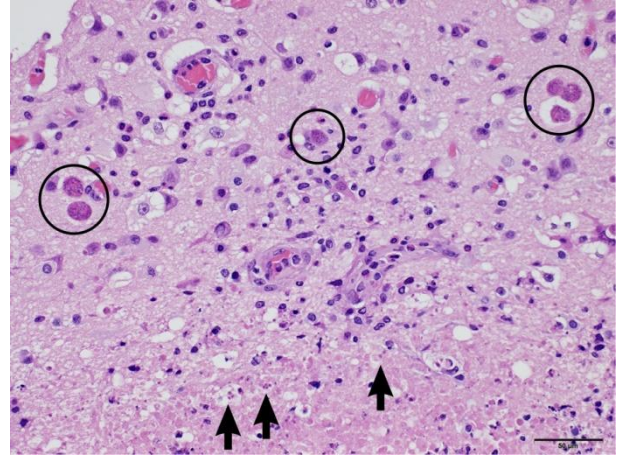


圖 8、大腦·壞死灶周圍可見細胞內(圓圈)及游離的(箭頭)速殖體。

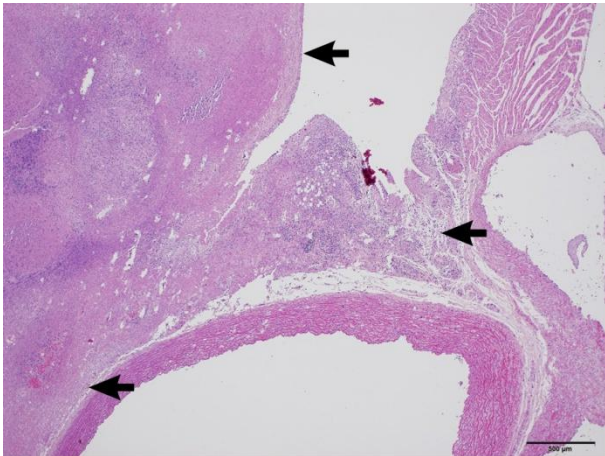


圖 9、心臟·左心房心外膜有一局部廣泛性壞死(肉眼病變的團塊物·箭頭)。

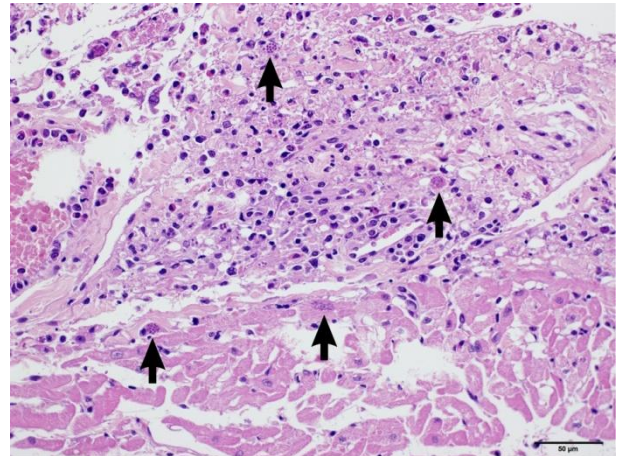


圖 10、心臟·左心房心外膜壞死區及附近的心肌細胞內可見速殖體(箭頭)。

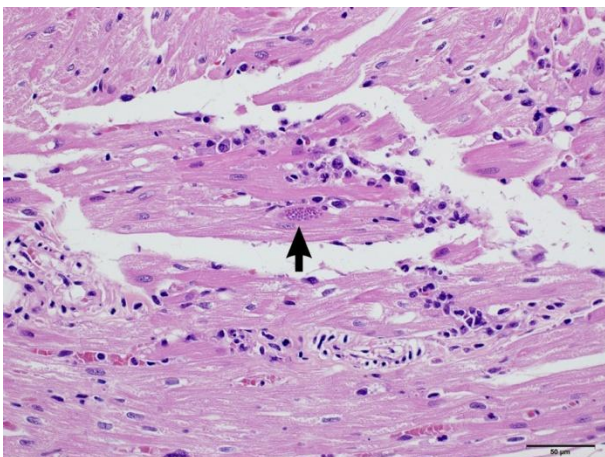


圖 11、心臟·左心房的心肌內有多發小區域的淋巴球及漿細胞浸潤·心肌細胞內可見速殖體(箭頭)。

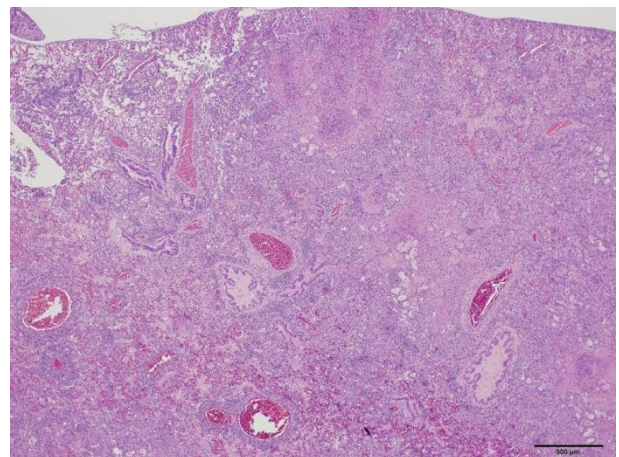


圖 12、肺臟·多發壞死及間質性肺炎。

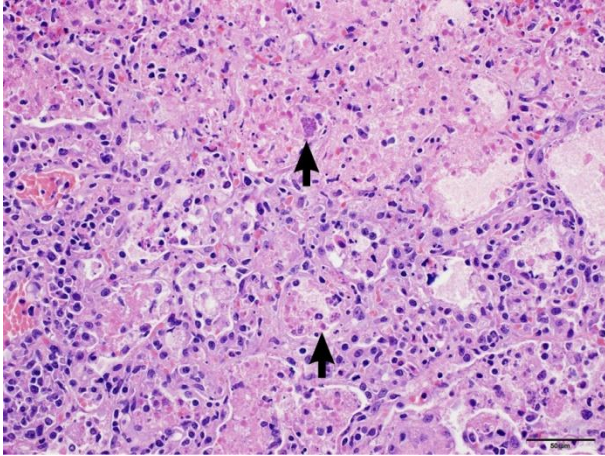


圖 13、肺臟·壞死區可見速殖體(箭頭)。

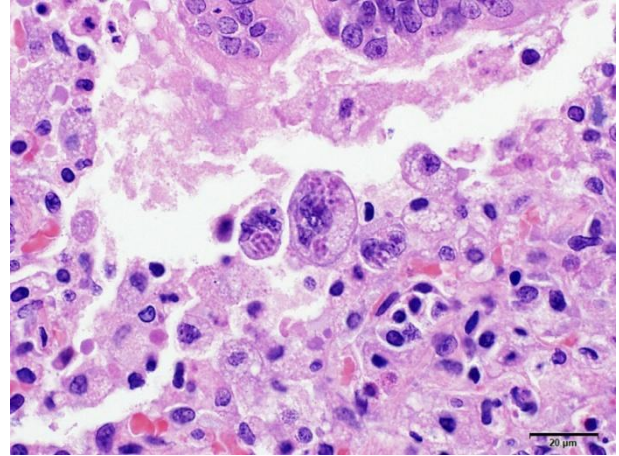


圖 14、肺臟·巨噬細胞細胞質內可見呈現新月型的速殖體。

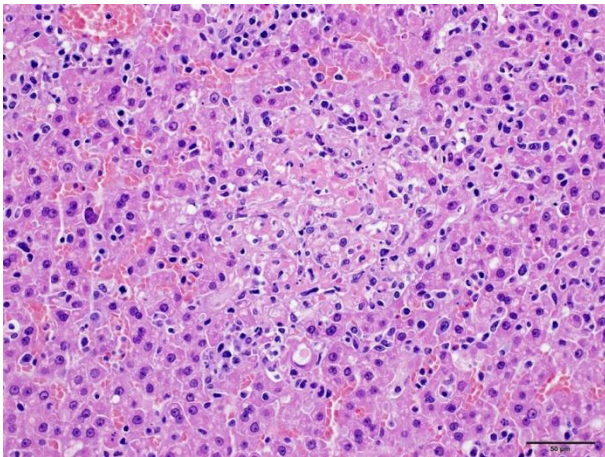


圖 15、肝臟·壞死灶及單核炎症細胞浸潤。

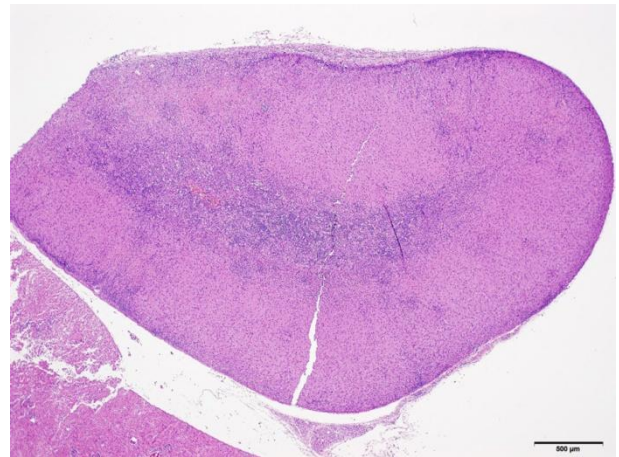


圖 16、腎上腺·多發壞死。

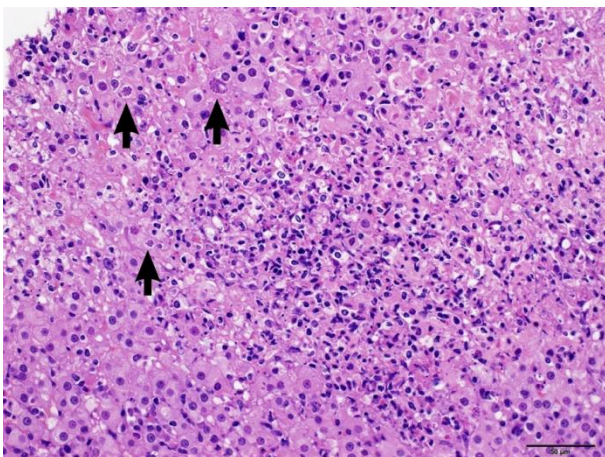


圖 17、腎上腺·壞死區可見速殖體及單核炎症細胞浸潤(箭頭)。

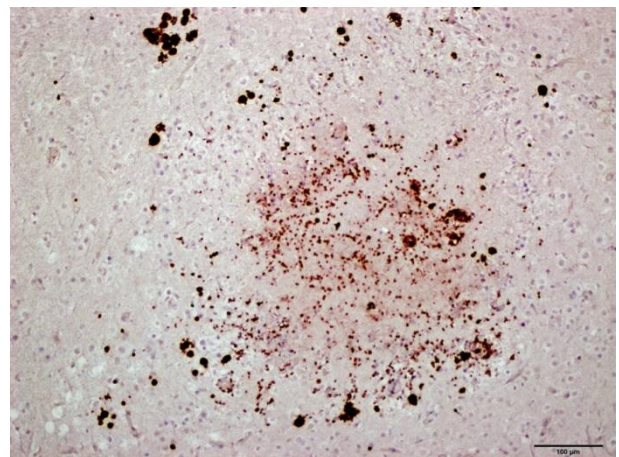


圖 18、大腦·IHC·rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody·AEC chromogen。

病例報告：赤腹松鼠弓蟲感染症

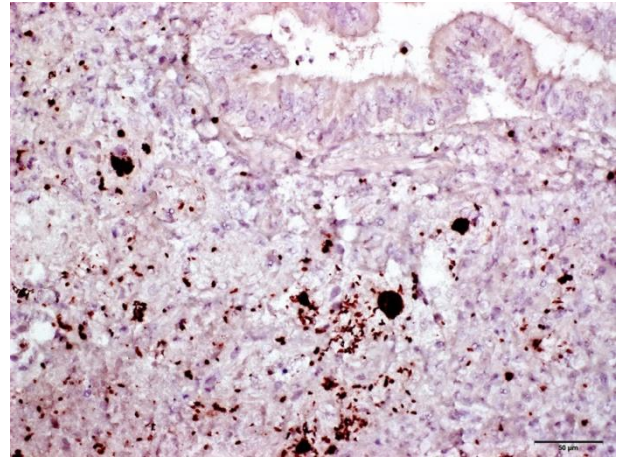
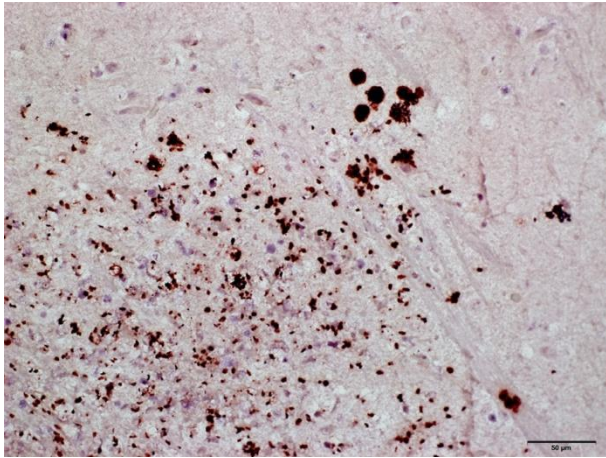


圖 19、大腦·IHC·rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody·AEC chromogen。

圖 20、肺臟·IHC·rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody·AEC chromogen。

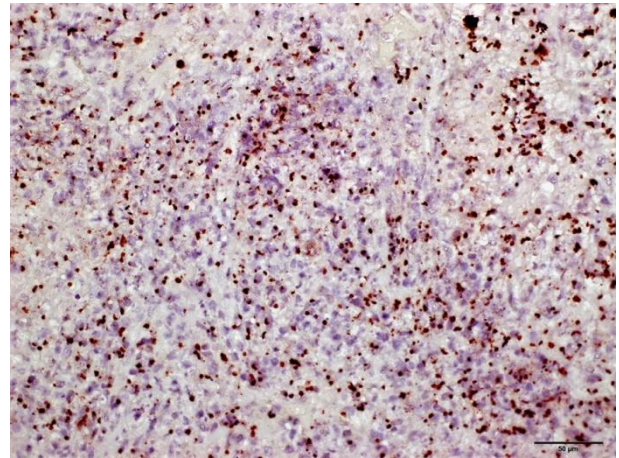
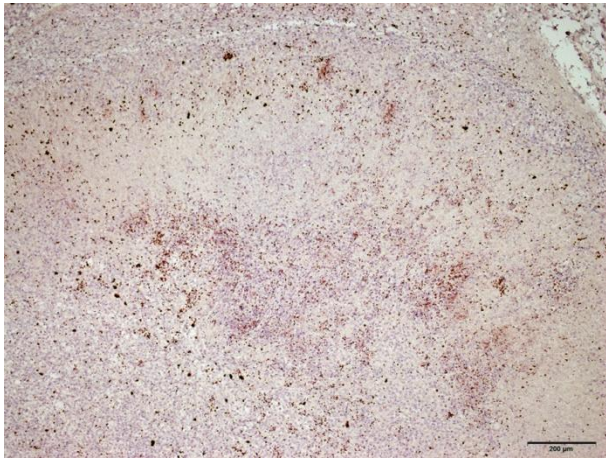
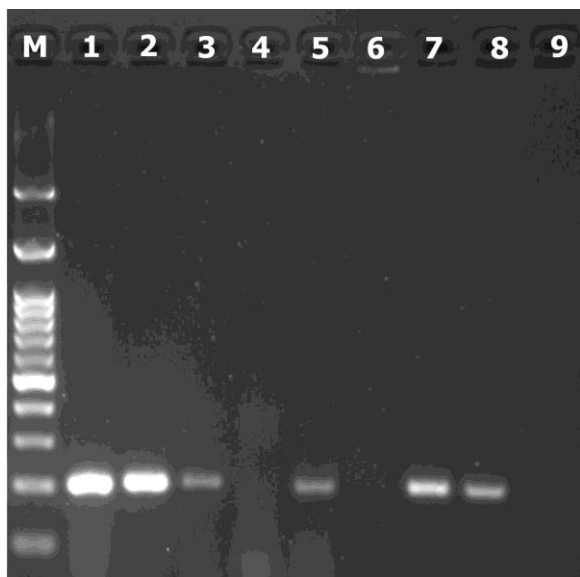


圖 21、腎上腺·IHC·rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody·AEC chromogen。

圖 22、腎上腺·IHC·rabbit anti-*Toxoplasma gondii* polyclonal antibody·AEC chromogen。



M: Marker
 L1: brain
 L2: liver
 L3: spleen
 L4: heart
 L5: stomach
 L6: kidney
 L7: lung
 L8: testis
 L9: negative control

產物片段大小約為 211 bp。

M : 100 bp Marker ·

Lane 1 : 腦 ·

Lane 2 : 肝臟 ·

Lane 3 : 脾臟 ·

Lane 4 : 心臟 ·

Lane 5 : 胃 ·

Lane 6 : 腎臟 ·

Lane 7 : 肺臟 ·

Lane 8 : 睪丸 ·

Lane 9 : 陰性對照

圖 23、聚合酶鏈反應增幅弓蟲 B1 基因之瓊膠電泳分析結果。

參考文獻

1. 衛生福利部疾病管制署。第四類法定傳染病。弓形蟲感染症疾病介紹。
2. Carrasco L, Raya AI, Núñez A, Gómez-Laguna J, Hernández S, Dubey JP. Fatal toxoplasmosis and concurrent *Calodium hepaticum* infection in Korean squirrels (*Tamias sibericus*). Vet Parasitol. 137:180-183, 2006. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.026.
3. Dubey JP, Hodgins EC, Hamir NA. Acute fatal toxoplasmosis in squirrels (*Sciurus carolinensis*) with bradyzoites in visceral tissues. J Parasitol. 92:658-659, 2006. doi: 10.1645/GE-749R.1.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 11: 267-299, 1998. doi: 10.1128/cmr.11.2.267.
5. Fayyad A, Kummerfeld M, Davina I, Wohlsein P, Beineke A, Baumgärtner W, Puff C. Fatal systemic *Toxoplasma gondii* infection in a red squirrel (*Sciurus vulgaris*), a Swinhoe's striped squirrel (*Tamias swinhoensis*) and a new world porcupine (*Erethizontidae* sp.) J Comp Pathol. 154:263-267, 2016. doi: 10.1016/j.jcpa.2016.02.002
6. Jokelainen P, Nylund M. Acute fatal toxoplasmosis in three Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) caused by genotype II of *Toxoplasma gondii*. J Wildl Dis. 48:454-457, 2012. doi: 10.7589/0090-3558-48.2.454.
7. Kik M, Ilzer J, Opsteegh M, Montizaan M, Dijkstra V, Rijks J, Gröne A. *Toxoplasma gondii* in wild red squirrels, the Netherlands, 2014. Emerg Infect Dis. 21:2248-2249, 2015. doi: 10.3201/eid2112.141711.
8. Kumar A, Melotti JR, Cooley TM, Fitzgerald SD. Mortality due to toxoplasmosis in suburban eastern fox squirrels (*Sciurus niger*) in Michigan, USA. J Wildl Dis. 55:213-217, 2019. doi: 10.7589/2018-02-059.

Case report: *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging red-bellied squirrel (*Callosciurus erythraeus taiwanensis*)

YC Tu*, WC Hsu, YW Chen, NL Kuan, TM Huang, SC Hu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract *Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoan parasitic disease that affects warm-blooded animals and humans worldwide. Felids are the only definitive hosts. This report describes a fatal toxoplasmosis in a red-bellied squirrel (*Callosciurus erythraeus taiwanensis*), presented by gross, histopathology, immunohistochemistry, and molecular analysis. Grossly, multiple yellowish spots in the lung and a yellowish mass located on the epicardium of the left atrium were noted. Microscopically, multifocal necrotizing meningoencephalitis, pneumonia, myocarditis, hepatitis, and adrenalitis were observed. Numerous tachyzoites were identified within and adjacent to the lesions. The diagnosis of toxoplasmosis was confirmed by immunohistochemistry and molecular analysis. This is the first report of toxoplasmosis in a red-bellied squirrel in Taiwan.

Keywords: *Toxoplasma gondii, Red-bellied squirrel, Immunohistochemistry, Molecular analysis*

