

核定本

臺北市立動物園 109 年動物認養保育計畫

提案日期：108 年 10 月 15 日

|              |   |
|--------------|---|
| 主 持 人        | 國立臺灣大學獸醫學系廖泰慶副教授  |
| 計畫編號/<br>名 稱 | 10905_台北市動物園動物弓蟲( <i>Toxoplasma gondii</i> )感染的血清流行病學研究   |
| 計畫期程         | 109 年 02 月 05 日至 109 年 12 月 31 日  |
| 計畫屬性         | <input type="checkbox"/> 族群管理__% <input type="checkbox"/> 保育繁殖__% <input type="checkbox"/> 域內保育__%<br><input type="checkbox"/> 國際交流__% <input checked="" type="checkbox"/> 動物醫療 100 % <input type="checkbox"/> 照養管理__%<br><input type="checkbox"/> 行為豐富化__% <input type="checkbox"/> 教育推廣__% <input type="checkbox"/> 人才培訓__%<br><input type="checkbox"/> 動物營養__% <input type="checkbox"/> 其他：_____   |
| 經費需求         | 認養經費 390,000 元  |
| 計畫摘要         | <p>一、<u>計畫目標</u></p> <p>瞭解動物園中動物弓蟲症(<i>Toxoplasmosis</i>)血清陽性的盛行率，搭配分子診斷的結果，作為動物園治療及防治動物弓蟲症的參考。</p> <p>二、<u>擬解決問題</u></p> <p>弓蟲(<i>Toxoplasma gondii</i>)是一種廣泛分布於全球的細胞內寄生原蟲，也是一種人畜共通的傳染病，唯一的終宿主是貓科動物，而幾乎所有溫體動物(包括鳥類及哺乳類)都可以是該蟲的中間宿主(附圖一)。弓蟲感染後只能在貓科動物的腸道上皮細胞完成有性生殖，而大量的成熟卵囊(Oocytes)則可藉由糞便排出體外，在環境中卵囊經 1-5 天後即芽孢化成為具感染力的孢子體(Sporozoites)，廣泛的存在水、土壤及植物中，在被中間宿主不慎食入後，會很快轉化成速殖體(Tachyzoites)，行無性生殖，之後寄生在中間宿主的神經或肌肉組織中形成囊孢緩殖體(Cyst bradyzoites)；貓科動物(或其它中間宿主)在食入感染的中間宿主或環境中的孢子體後，又再造成感染。中間宿主感</p> |

染後通常是沒有症狀的，只有免疫力下降時才會發病；另外，懷孕的母體會透過胎盤傳染給胎兒，造成胎兒傷害甚至流產<sup>2,9</sup>。

目前檢測弓蟲症的方法主要有分子檢測及免疫學檢測兩大類；分子檢測主要用於感染後發病個體的檢測，潛伏或隱性感個體不一定可以檢測得到，曾感染的個體則應該檢測不到，其優點是檢出的陽性檢體可以藉由基因序列比對追尋可能的感染源；免疫學檢測的部分，目前以檢測檢體中抗體的力價為主，尤其是 IgG 的力價，缺點是無法確認該個體是感染中或已經痊癒的個體，但卻是目前較常被作為流行病學調查或評估是否存在感染源的主要工具。

弓蟲會造成全球廣泛的感染主要原因是卵囊對環境的抵抗力強，不易被清除，以及中間宿主感染後大多沒有任何症狀，無法被即時診斷出來進行治療。台北市動物園於今(2019)年 6 月有 4 隻雌性環尾狐猴因感染弓蟲造成死亡，其中兩隻在未以 PCR 確診前即已死亡，另兩隻在 PCR 確診後用藥一至兩天後仍死亡；推斷這次為急性感染，用藥時病況已較嚴重，未能及時挽救最後兩隻罹病動物。後續有再以 PCR 進行其它動物的篩檢，雖然許多動物族群陽性比率很低或都呈陰性，但有部分動物族群有極高的陽性率，顯示台北市動物園中存在一定感染源，需要進行較廣泛的篩檢，以瞭解這些未被 PCR 檢查出來的個體或族群，是否曾感染或處於隱性感個體階段，而這可能需要搭配免疫學檢測才能達成。

之前已有兩篇國內文獻曾報導台北市動物園動物弓蟲症的感染流行病學調查，檢體收集都集中在 2000 年前後；其中一篇是以商品化的 LAT(Latex agglutination test) 套組評估橫跨 142 個物種的 1,107 個動物冷凍血清(2000 年)，其整體的弓蟲血清陽性盛行率為 38.7%，其中盛行率高於 50% 的動物有熊科(70%)、袋鼠科(63.04%)及貓科(57.69%)動物<sup>5</sup>；另一篇是以半巢式 PCR 偵測動物屍體肌肉中存在的弓蟲 B1 基因，在橫跨 89 個物種的 171 個檢體

(1999年-2001年)中有 14 檢體(8.2%)呈陽性反應，但只有 2 個陽性檢體經定序後成功取得序列，確認為弓蟲的基因<sup>8</sup>；這兩篇研究分別發表於 2009 年及 2016 年，均屬於回溯性研究，檢體的檢測結果似乎僅做流行病學研究調查之用，並未與當時動物園的現況或相關記錄作比對，對臨床的治療或園區內弓蟲的防治似乎較無助益。

本研究希望在作完檢體的檢測後，盡快就結果與獸醫師作溝通了解，搭配現有疾病診斷-分子檢測的結果，以提供獸醫師更全面的資訊，制定較完整的醫療及防治計畫，以避免動物再發生因急性感染致死的憾事。

### 三、重要工作項目

主要工作項目有收集檢體及進行血清 ELISA 檢測；

#### 1. 收集檢體

檢體來源主要分為兩大類；

- A. 排定的健康檢查動物血清：由每個開放性動物欄舍收集至少 10%-30%動物數量的檢體，以瞭解動物園普遍的血流流行病學。
- B. 懷疑或經 PCR 診斷判定感染弓蟲，甚至發病的動物血清：瞭解弓蟲曾感染、感染中或發病中個體血清中抗體力價高低的關聯。

#### 2. ELISA 檢測

本次試驗預計將採用法國 ID.VET 公司出品的商品化 ELISA 套組 ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species (ELISA test)，該套組目前已成功應用來偵測包括犬、貓、牛、馬、豬/野豬、綿羊及野生動物(鹿、鬣狗、獅及狐狸等動物)等動物血清/血漿中抗弓蟲 P30 蛋白的 IgG<sup>3,4,6,7</sup>，應該可以應用於動物園內各類動物檢測公蟲抗體之用，可以使用的檢體包括血清、血漿以及其它的組織液。

實施方法與

計畫執行期間將與動物園獸醫室與檢驗室的獸醫師保持

|            |   |
|------------|---|
| <p>步 驟</p> | <p>聯繫，以瞭解動物園中動物弓蟲症控制以及檢體採集的情形，執行過程如下；</p> <p><b>1. 收集檢體</b></p> <p>本計畫預計篩檢 300 個檢體，主要以血清或血漿為主，其它檢體如有利於疾病診斷的判讀，也可考慮納入；</p> <p>A. 於計畫執行期間排定健檢的動物中選擇約 200 個檢體，主要是瞭解目前所有園區內動物感染弓蟲的血清流行病學調查。</p> <p>B. 其餘則用於檢測懷疑或分子診斷判定已感染的動物檢體；如可以的話，這類檢體在治療後也持續追蹤一段時間，以了解感染及治療過程中血清力價的變化。</p> <p><b>2. ELISA</b></p> <p>每個檢體進行二重複，如相差過多再進行一次。操作過程如下；</p> <p>A. 取一定量套組所附之陽性抗體(P)及送檢檢體(S)加入 96 孔盤槽(槽內已敷蓋弓蟲 p30 抗原)中作用一段時間後，小心將未作用的抗體清洗掉。</p> <p>B. 加入套組所附有鍵結 HRP 的二級抗體作用一段時間後，將未作用的二級抗體洗掉。</p> <p>C. 加入呈色劑(TMB)作用一段時間後，如果存在抗弓蟲的抗體，原本藍色的溶液會轉變成黃色，在停止其繼續作用後，讀 450nm 波長的吸光值(OD)。</p> <p>D. 每個檢體的吸光值依下列公式計算出抗體的力價比值(S/P) = <math>(OD_S - OD_{NC}) / (OD_P - OD_{NC}) \times 100</math>；如果比值 <math>\leq 40\%</math>，應判定為陰性；如果比值介於 40% 至 50% 之間，屬存疑檢體；如果比值 <math>\geq 50\%</math>，則應判定為陽性。</p> <p><b>3. 與臨床資料做比對</b></p> <p>計畫執行期間，檢測結果將盡可能與動物的健康資訊做連結，尤其是陽性的檢體，將盡快告知獸醫室，也與分子診斷的結果作對比，作為獸醫師制定醫療及防治計畫</p> |
|------------|---|

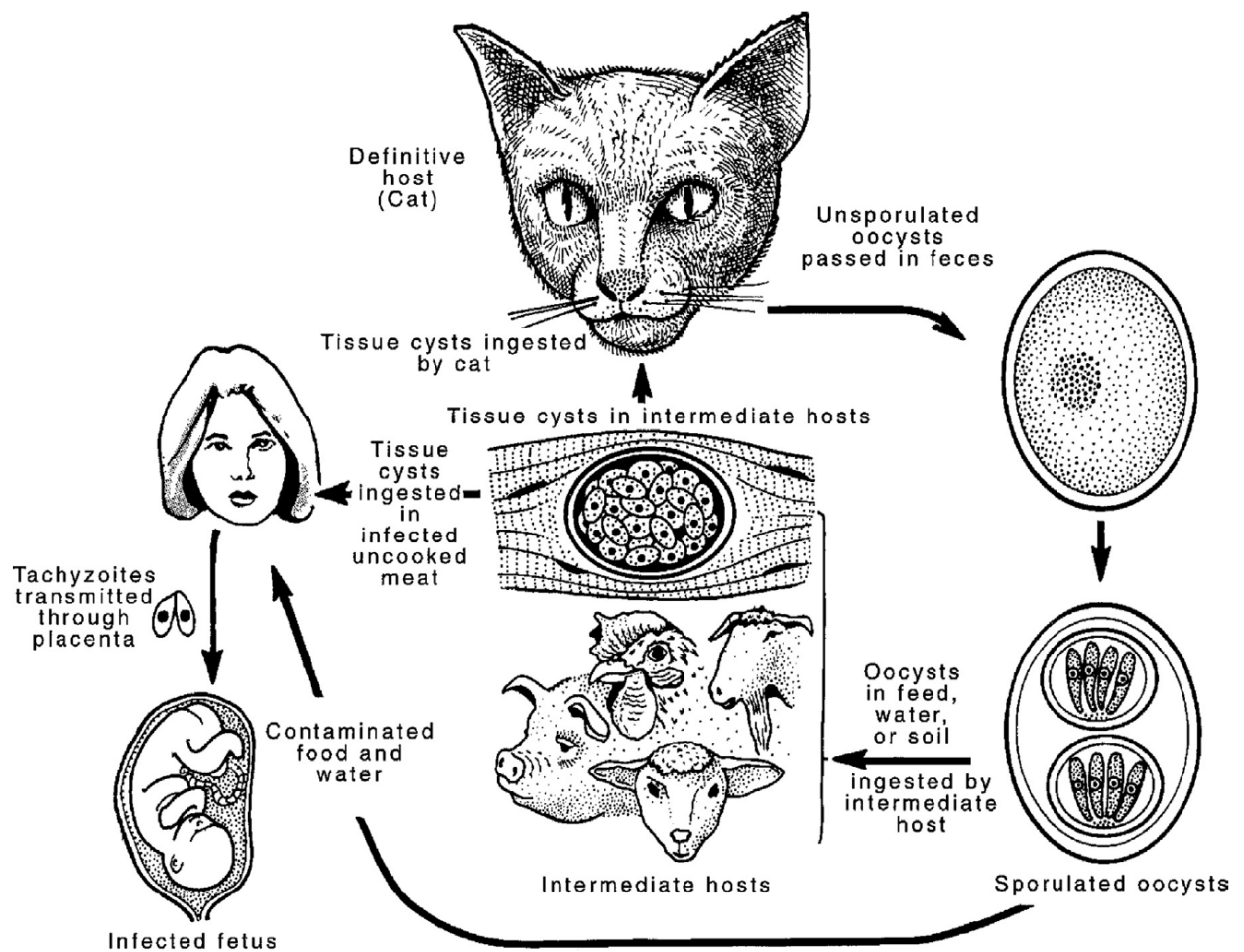
|                       |  |
|-----------------------|--|
|                       | 的參考。   |
| 預期成果                  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 瞭解動物園內動物抗弓蟲抗體陽性的血清流行病學。</li> <li>2. 瞭解動物在弓蟲不同的感染階段，其血清抗體力價的變化。</li> <li>3. 作為弓蟲感染分子診斷的對照指標。</li> <li>4. 評估可能的感染源所在。</li> </ol>   |
| 已參與計畫名稱及合作機構          | <p>相關專業團隊：<input checked="" type="checkbox"/>有 <input type="checkbox"/>無</p> <p>與宜蘭大學生物技術與動物科學系郭村勇教授研究室合作，已成功開發抗犬 YKL40 的單鏈變異區片段(scFv)抗體，並用以建立定量 ELISA，目前也正申請專利中。</p> <p>建立合作平臺可行性：<br/> <input checked="" type="checkbox"/>否<br/> <input type="checkbox"/>是，團隊_____</p> |
| 團隊成員在計畫內之角色           | <p>本研究中的 ELISA 檢測將由本研究室的碩士班及博士班研究生執行，由於他們的研究均需要應用 ELISA 檢測血清中存在抗原的量以及抗體的力價，故他們對檢體的處理與保存、ELISA 的操作與操作過程的調整以及檢測結果的判讀與分析等都已相當熟悉，再藉由與計畫主持人的討論，以及與動物園提供的相關資料做比對，相信能提供動物園適當且有用的參考資訊，以制定適當的醫療或防治計畫。</p>   |
| 投入計畫之工作時數（每週平均）或比率（%） | <p>計畫執行期間，研究生每週約投入 25-30% 時間執行本計畫，計畫主持人每週約投入 15-20% 時間參與本計畫。</p>   |
| 相關專業經驗及過去參與類似計畫之研究成果  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本研究室具備開發單株抗體及將單株抗體轉為單鏈變異區片段(single chain variable fragment)的能力。</li> <li>2. 本研究室長年以 ELISA 偵測血中的抗原量及抗體力價，也可以自行表現抗原建立定量 ELISA<sup>1</sup>。</li> </ol>  |

|        |   |
|--------|---|
|        | <p>3. 本研究室先前曾參與動物園兩棲爬蟲類病毒性疾病及食肉目絲狀蟲疾病的分子篩檢。</p>   |
| 計畫優勢   | <p> <input type="checkbox"/> 創新性：<br/> <input type="checkbox"/> 前瞻性：<br/> <input type="checkbox"/> 獨特性：<br/> <input type="checkbox"/> 國際競爭力：<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 核心保育計畫：<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 動物園精進業務：<br/> <input type="checkbox"/> 其他： </p>  |
| 預期效益   | <p>可量化效益</p> <p> <input checked="" type="checkbox"/> 增進動物福祉<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 改善圈養環境<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 提升醫療技術<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 保育教育推廣<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 提升動物園形象<br/> <input checked="" type="checkbox"/> 保育臺灣本土物種<br/> <input type="checkbox"/> 建立保育合作平臺<br/> <input type="checkbox"/> 培訓專業人才<br/> <input type="checkbox"/> 增加遊園人次<br/> <input type="checkbox"/> 其他： </p> <p>不可量化效益：</p>                   |
| 重要參考文獻 | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cheng KC, Lee JJ, Wang SL, Lin CY, Tseng CT, Lin CS and Liao AT. Elevated plasma YKL-40 level is found in the dogs with cancer and is related to poor prognosis. <i>J Vet Sci.</i> 2019; <b>20</b>(5): e53</li> <li>2. Dubey JP (2014). The History and Life Cycle of <i>Toxoplasma gondii</i>. In LM Weiss and K Kim (Eds). <i>Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods</i>, 2<sup>nd</sup> ed, (pp.1-17). San Diego,</li> </ol> |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>CA: Elsevier LTD.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Ferreira SCM, Torelli F, Klein S, Fyumagwa R, Karesh WB, Hofer H, Seeber F and East ML. Evidence of high exposure to <i>Toxoplasma gondii</i> in free-ranging and captive African carnivores. <i>Int J Parasitol Parasites Wildl.</i> 2019; <b>8</b>: 111-7.</li> <li>4. Gomez-Rios A, Ortega-Pacheco A, Gutierrez-Blanco E, Acosta-Viana KY, Guzman-Marin E, Guiris-Andrade MD, Hernandez-Cortazar IB, Lopez-Alonso R, Cruz-Aldan E and Jimenez-Coello M. <i>Toxoplasma gondii</i> in Captive Wild Felids of Mexico: Its Frequency and Capability to Eliminate Oocysts. <i>Vector Borne Zoonotic Dis.</i> 2019; <b>19</b>(8): 619-24.</li> <li>5. Lin DS, Sung NC, and Fei AC. Prevalences of antibodies to <i>Toxoplasma gondii</i> in Taipei Zoo Animals. <i>Taiwan Vet J.</i> 2009; <b>35</b>(1): 43-8.</li> <li>6. Racka K, Bartova E, Budikova M and Vodrazka P. Survey of <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies in meat juice of wild boar (<i>Sus scrofa</i>) in several districts of the Czech Republic. <i>Ann Agric Environ Med.</i> 2015; <b>22</b>(2): 231-5.</li> <li>7. Roqueplo C, Halos L, Cabre O and Davoust B. <i>Toxoplasma gondii</i> in wild and domestic animals from New Caledonia. <i>Parasite.</i> 2011; <b>18</b>(4): 345-8.</li> <li>8. Yu ZA , Liu CY, Pu CE, Chen CT, Chao CH, Yu JF, and Wang LC. Investigation of <i>Toxoplasma gondii</i> Infection in Animals in Taipei Zoo Using Semi-nest Polymerase Chain Reaction. <i>TW J Biodivers.</i> 2016; <b>18</b> (1): 19-28</li> <li>9. 劉振軒、張淑美、蔡明翰、李細祥(2009)。第八十一章 弓形蟲感染症。載於劉振軒、潘銘正、陳宜君、姜秀子、余燦華(編輯)，人畜共通傳染病臨床指引第二版(頁 343-347)。台北市。行政院衛生署疾病管制局。</li> </ol> |
|--|---|

|        |  |
|--------|--|
| 附<br>件 | <input type="checkbox"/> 無<br><input type="checkbox"/> 文件 種<br><input checked="" type="checkbox"/> 圖說 1 種<br><input type="checkbox"/> 其他 |
|--------|--|





附圖一、弓蟲的生活史

取自 Dubey. JP (2014). The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In LM Weiss and K Kim (Eds). *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*, 2<sup>nd</sup> ed, (pp.1-17). San Diego, CA: Elsevier LTD.