

病例報告：印度星龜核內球蟲感染症

涂央昌、陳怡玟、吳介豪、陳彥玟、胡書佳、莊宇菁*

農業部獸醫研究所

摘要 龜鰲目核內球蟲 (intranuclear coccidiosis of Testudines ; TINC) 為陸龜的新興傳染病，會引起嚴重全身性感染，並且能感染多種品種的陸龜。本病例報告描述國立屏東科技大學保育類野生動物收容中心收容之印度星龜 (*Geochelone elegans*) 感染龜鰲目核內球蟲的肉眼病變、組織病理學特徵及分子生物學檢測結果。走私查緝之 617 隻印度星龜在該收容中心圈養約 1 年後，開始陸續出現零星死亡，臨床上呈現眼口鼻分泌物增加、尿液滯留、虛弱、體重下降、厭食、嗜睡等症狀，發病率為 48.6% (300/617)，累積死亡率達 11.3% (70/617)。肉眼檢查可見體腔積液、肝臟呈斑駁樣、腎臟呈黃白色且觸感堅實、膀胱蓄積大量黃白色顆粒樣結晶物。組織病理學檢查，於肝臟、腎臟及胰臟均可見以單核炎症細胞浸潤為主的多發局部壞死，並且在實質細胞的核內可見各種不同生長階段的滋養體、配子體、裂殖體及裂殖子原蟲，以及在細胞質內或細胞外可見裂殖體及裂殖子原蟲。經分析這 3 隻受感染陸龜之原蟲小次單位核糖體核糖核酸基因 (18S rDNA) 部分序列，發現其與西里貝斯陸龜 (*Indotestudo forstenii*) 所測得之龜鰲目核內球蟲 (基因庫序號：AY728896) 序列最為近似。根據上述各項檢測結果，確認送檢的印度星龜病例係感染 TINC。此病例報告可供作為野生動物及特寵獸醫師的參考。

關鍵詞：核內球蟲、組織病理、分子生物學檢測、印度星龜

緒言

印度星龜 (*Geochelone elegans*) 是陸龜科象龜屬，分布在印度、巴基斯坦及斯里蘭卡的乾旱地區，非臺灣原生種，但屬珍貴稀有野生動物，印度星龜目前是全球野生動物非法貿易中被交易最多的龜類之一。

陸龜類感染龜鰲目核內球蟲 (intranuclear coccidiosis of Testudines ; TINC) 最早是於 1990 年代被發現，目前已成為各種陸龜類最重要的傳染病 [2, 9, 20]，在美國、歐洲及中國都有文獻報告 [2, 9, 13]，已知感染的種類包括輻射紋龜 (*Astrochelys radiata*)、西里貝斯陸龜 (*Indotestudo forstenii*)、

豹紋陸龜 (*Stigmochelys pardalis*)、挺胸龜 (*Chersina angulate*)、麒麟陸龜 (*Manouria impressa*)、緬甸山龜 (*Heosemys depressa*)、加拉巴哥象龜 (*Chelonoidis niger becki*)、東部箱龜 (*Terrapene carolina carolina*)、蛛網陸龜 (*Pyxis arachnoides*)、扁尾陸龜 (*Pyxis planicauda*)、緣翹陸龜 (*Testudo marginata*)、赫曼陸龜 (*Testudo hermanni*)、希臘陸龜 (*Testudo graeca*)、四爪陸龜 (*Testudo horsfieldii*)、蘇卡達象龜 (*Centrochelys sulcata*)、黃腿象龜 (*Chelonoidis denticulatus*)、紅腿象龜 (*Centrochelys sulcata*)、印度星龜等 [2, 3, 8, 10, 11, 13]。

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

TINC 為新發現之球蟲，目前尚未命名也尚未歸類到任何屬 (genus)，依據原蟲小次單位核糖體核糖核酸基因 (18S rDNA) 序列親緣分析顯示，該病原介於 Eimeriidae 和 Sarcocystidae 之間 [11]，其中又以 Eimeriidae 的基譜系系群 (basal lineages) 較被接受 [10]。

TINC 的傳播途徑雖仍不明瞭，但藉由在感染陸龜的糞便中發現有卵囊的存在以及動物實驗的驗證，推測可能是經由糞口途徑傳播 [10]。其潛伏期約 30 至 47 天，有些陸龜的潛伏期甚至可達 43 至 133 天或直至死亡，每克糞便中可能存在少於 10 個至 40,000 個卵囊 [10]。卵囊隨糞便排出後，經過 3~4 天會呈現芽孢化 (sporulation)，芽孢化的卵囊中具有 4 個孢子囊 (sporocyst)，其內各含有 2 個孢子體 (sporozoite) [10]。在哺乳動物的細胞核內，可發現不同發育階段的球蟲，包括滋養體 (trophozoite) 直徑約 2~5 μm [8, 11]；裂殖體 (meront) 直徑可達 7 μm 內含大量裂殖子 (merozoite) [8, 11]；裂殖子呈香蕉形約 4 x 1.5 μm ，具單一中心至偏中心的細胞核 [2, 8, 9, 10, 11, 20]；大配子體 (macrogamete) 及小配子體 (microgamete)，呈球形，直徑可達 6 μm [8, 11]。

TINC 的感染為全身性感染，包括消化系統、呼吸系統、心血管系統、泌尿生殖系統及皮膚系統 [2, 8, 9, 10, 11, 20]。受感染陸龜的臨床症狀，包括厭食、嗜睡、體重減輕、虛弱、呼吸困難、結膜潮紅、眼鼻分泌物增加、腹水、膀胱尿液滯留、皮膚水腫/潰瘍等 [2, 8, 9, 11, 13]。臨床症狀出現後，可能於數天內死亡 [2, 8, 9]。常見的肉眼病變，包括黏膜蒼白、口腔黏液濃稠、偽膜性腸炎、泄殖腔潮紅、鼻炎、腎臟呈灰色至紅色斑駁樣且堅硬、肝臟呈黃白色斑駁樣、膀胱擴張且蓄積尿液、全身皮下水腫等 [2, 8, 9, 10, 11, 20]。組織病理學下，主要的病變為淋巴球性漿細胞性的炎症反應及壞死，在病變區可見細胞核內球蟲，以及少許的細胞質內或細胞外的球蟲病原 [2, 8, 9, 11, 20]。細胞核內常見各種不同階段的球蟲，其中以呼吸道上皮細胞、肝細胞、膽管上皮細胞、胰腺導管和腺泡細胞、腸黏膜上皮細胞、腎小管上皮細胞及膀胱上皮細胞較常見，但也可以在甲狀腺、腎上腺、生殖腺、淋

巴器官及皮膚中發現核內球蟲 [2, 8, 9, 11, 20]。

核內球蟲病除於陸龜發現外，亦曾在鵝 [7, 18]、澳洲守宮 (*Australian geckos*) [6]、蛙 [16]及魚類 [17]被報導，此外，哺乳類的犢牛 [15]及鼯鼠 [14]也已被證實有感染病例被報導。

本病例報導印度星龜感染 TINC 的肉眼病變、組織病理學特徵及分子生物學檢測結果，相關資料可供野生動物或特寵獸醫師參考。

病史

617 隻遭海巡署查緝的印度星龜，於 112 年 9 月 24 日送交國立屏東科技大學保育類野生動物收容中心收容。該批星龜分開飼養於不同籠舍，在 113 年 11 月下旬開始陸續出現零星個體死亡，其後不同飼養區均出現較大規模的死亡且疫情有逐漸蔓延至各區之趨勢。至 114 年 3 月初，共計死亡約 70 隻，死亡率約 11.3% (70/617)，發病率約 48.6% (300/617)。發病星龜臨床上呈現眼睛及口鼻分泌物增加、尿液滯留、虛弱、體重下降、厭食、嗜睡等症狀。由本所剖檢 3 隻星龜，進行病理診斷 (編號 1、2、3)。

肉眼病變

剖檢可見體腔蓄積清澈液體 (圖 1、2)、肝臟呈瀰漫性潮黃及腫大，實質切面呈黃白色斑駁樣 (圖 4)、腎臟呈黃白色且觸感堅實、膀胱蓄積大量黃白色顆粒樣疑似尿酸鹽結晶 (圖 1~3)。

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。

肝臟：肝實質呈現多發局部壞死，壞死區除有單核炎症細胞及黑色素巨噬細胞 (melanomacrophage) 浸潤外，在吞噬細胞 (phagocyte) 與肝細胞的細胞質及細胞核內亦可見有裂殖體 (meront) 的存在，裂殖體內含無數細小呈圓形或香蕉形具單一核的裂殖子 (merozoite)。膽管上皮細胞的細胞核呈現肥大、形狀異常 (bizarre)、輪廓不規則，這些異常的細胞核內存

在 1 至數個滋養體 (trophozoite)、配子體 (gametocyte) 及裂殖體，類似的細胞核病變亦可見於肝實質的壞死區 (圖 5~10)。膽管上皮細胞可見核破裂、細胞質空泡化及均質樣等壞死病變 (圖 11、12)。

膽囊：膽囊上皮細胞的細胞核呈現增生、肥大、形狀異常、輪廓不規則等變化，亦可見核濃縮及核破裂的壞死病變，細胞核內可見滋養體、配子體及裂殖體，黏膜層有單核炎症細胞浸潤 (圖 13、14)。

腎臟：腎小管呈現多發局部凝固性纖維素性壞死，壞死區有顆粒球和淋巴球等炎症細胞浸潤，腎小管上皮細胞核呈現肥大、形狀異常，並且於細胞核內可見滋養體及配子體，此外，在細胞質及細胞核內，有無數細小呈圓形或香蕉形具單一核的裂殖子。腎臟的間質區，因有中等纖維化、纖維素性壞死及輕度水腫而呈現增厚的現象 (圖 15~18)。

胰臟：胰腺泡呈多發凝固性纖維素性壞死，腺泡細胞核肥大、形狀異常，核內可見配子體等病變，在細胞質及細胞核內亦可見裂殖子，腺泡間質有中等程度的纖維化病變 (圖 19、20)。

微生物學檢測

分子生物學檢測：利用聚合酶鏈反應 (PCR) 檢測疱疹病毒及核內球蟲之核酸。疱疹病毒的引子參考 VanDevanter 等人發表 [22]之引子，核內球蟲參考 Garner 等人 [8]及 Innis 等人 [11]發表之引子。

一、 疱疹病毒檢測結果為陰性。

二、 核內球蟲檢測：

1. 核酸萃取：以滅菌剪刀採取 200 mg 組織，置入 2 mL 均質管，加入 0.7 mL 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, PBS)，將均質管置入組織均質機中均質 4 次，每次 13 秒，將均質後小管放入離心管內，以每分鐘 2,000 轉速度離心 15 分鐘。取製備好的乳劑上清液，使用自動化核酸萃取儀及 MagPurix® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (ZINEXTS LIFE SCIENCE CORP.)，依其操作步驟進行核酸萃取。
2. 核內球蟲 PCR 及 18S rDNA 序列分析：所採

用的反應體積為 25 μ L，含有 12.5 μ L 之 master mix (Quick Taq™ HS DyeMix，TOYOBO CO., LTD. Japan)，1 μ L 之引子 (10 μ M，forward + reverse)，9.5 μ L 之分生用水，及 2 μ L 之核酸模板。參考已發表文獻 [8, 11]，需進行 3 組反應以得到 3 個片段，以組裝為 1,769 個鹼基對 (bp) 之 18S rDNA 序列。第一段 1,128 bp 及第 3 段 451 bp 之引子黏合溫度為 50°C，第 2 段 370 bp 之引子黏合溫度為 55°C。得到陽性產物後以商品化套組 (TOPO® TA Cloning®，Invitrogen) 依其使用說明進行基因選殖，選殖所得產物以商業定序確認序列 (Sanger sequencing，明欣生物科技)。所得序列切除質體序列後，以 SeqMan 軟體 (DNASTAR，version 7.1.0.) 組裝成長約 1,769 bp 之序列並採用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 確認最接近之物種。3 頭受檢個體所得之序列以 MegAlign (DNASTAR, version 7.1.0.) 軟體 ClustalW 方法進行比對，發現其序列相似度介於 99.5~99.7% 之間，可視為種內 (Intra-species) 差異，確認為同一物種。以 BLAST 搜尋比對之結果，發現最近似物種為由西里貝斯陸龜 (*I. forstenii*) 所測得之龜鱉目核內球蟲 (accession no.: AY728896, cover: 97%, identity: 99.42%)，其差異亦可視為種內差異。

3. 印度星龜核內球蟲親緣關係分析 (phylogenetic analysis)：參考 Garner 等人 [8]及 Innis 等人 [11]執行之親緣關係分析，下載基因庫 (GenBank, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中屬於肉孢子蟲科 (Sarcocystidae) 及艾美科 (Eimeriidae) 原蟲之 18S rDNA 代表序列，並以肝簇蟲科 (Hepatozoidae) 之犬肝簇蟲 (*Hepatozoon canis*, accession no.

MK091088) 為外群，共 24 條序列，進行親緣關係分析，以 MegAlign 軟體 ClustalW 方法進行 alignment 之後，取序列重疊區段以 MEGA 11 軟體 [21] 之 Maximum Likelihood 方法計算 Gamma Parameter for Site Rate 為 0.17 [12]，再以同一軟體之 Neighbor-Joining 方法 [19] 建構演化樹 (bootstrap test 1000 replicates [5])，演化距離以 Kimura 2-parameter 方法 [12] 計算。所得之演化樹及所引用序列如圖 21 所示，演化樹分群符合 Garner 等人 [8] 及 Innis 等人 [11] 所得之結果，即 TINC、肉孢子蟲科及艾美科之原蟲各自成單系群 (monophyletic group)，惟 TINC 與艾美科之原蟲較為接近。

細菌分離及鑑定

肺臟組織以血液培養基進行細菌分離，純化細菌後，以 16S rRNA 基因序列比對方式鑑定細菌。經序列分析結果顯示，編號 1 星龜細菌鑑定為 *Morganella morganii*、*Pseudomonas aeruginosa*；編號 2 為 *Aeromonas hydrophila*、*Citrobacter freundii*；編號 3 為 *Myroides odoratimimus*、*Morganella morganii*。上述細菌均非屬有意義之病原菌。

討論

送檢 3 隻印度星龜經組織病理學檢查，發現於肝臟、腎臟及胰臟皆有嚴重多發區域性壞死病變，於病灶內實質細胞，主要在細胞核內及少量在細胞質內或細胞外，發現各種不同階段的原蟲性寄生蟲，經分子生物學及序列分析，確認為 TINC 感染。

TINC 的感染為全身性感染，能引起各系統器官的病變 [2, 8, 9, 11, 20]，於本病例中，則以肝臟、腎臟及胰臟的壞死病變最為嚴重，在細胞核內、細胞質內及細胞外均發現有各種不同階段的球蟲病原，其中以細胞核內原蟲為最常見，而細胞質內及細胞外的球蟲病原則較少見 [2, 8, 9, 11, 20]。核內球蟲病原較易出現在膽管及膽囊上皮細胞、胰腺泡導管上皮細胞及腎小管上皮細胞，而肝細胞則相對較不易發現球蟲病

原。核內球蟲在 periodic acid–Schiff (PAS) 染色下，均呈陰性 [8]。在送檢的 3 隻星龜，肉眼病變除體腔積液及肝臟有顯著多發壞死斑外 [2, 8, 9, 20]，其膀胱均可見有尿液滯留且存在大量疑似尿酸鹽顆粒結晶，推測應與腎臟受損有關。陸龜常發生膀胱結石，結石組成尿酸鹽，主要與高蛋白飲食、缺水、腎臟及膀胱發炎等有關 [4]。

臺灣的 TINC 病例，最早係 2019 年發生於臺北市立動物園圈養的豹紋陸龜及紅腿象龜 [1]；其後，針對該園區內 17 種陸龜，採集口腔、鼻腔、泄殖腔拭子及組織，進行 PCR 檢測，發現其盛行率為 28% (n = 22) [1]。本次病例據屏東保育類野生動物收容中心獸醫師描述，由於該收容中心未曾發生過 TINC 病例，推測此次受感染的個體應是走私進入臺灣前就帶原。TINC 的生前檢查方法，包括鼻腔分泌物的細胞學檢驗，以及採取口腔、眼睛、鼻腔和泄殖腔黏膜的拭子進行 PCR 檢測，均能有效檢出病原 [2, 9, 11]。

截至目前，TINC 的病原尚未被確認。目前已知具親核性 (caryotropic) 的球蟲屬名包括 *Eimeria*、*Isopora* 及 *Cyclospora*，共至少有 11 種，均可在核內發現各種不同階段的寄生蟲 [8]。目前已知的核內球蟲受感染動物及其確認病原，包括鵝的 *E. stigmosa* [7] 與 *E. hermani* [18]、澳洲守宮的 *I. nucleoheteronotis* 及 *I. oedurae* [6]、蛙類的 *I. lieberkuehni* [16]、魚類的 *E. vanasi* [17]、犢牛的 *E. alabamensis* [15] 以及鼯鼠的 *C. talpae* [14]。本次案例由印度星龜所測得核內球蟲病原 18S rDNA 部分序列的分析比對，就其親緣關係初步分析顯示其分類地位介於住肉孢子蟲科與艾美科之間，此結果與 Garner 等人 [8] 及 Innis 等人 [11] 近似。依據 Innis 等人 [11] 的看法，TINC 係屬於新物種，甚至為新的屬，然而新種球蟲之正式命名須仰賴芽孢化卵囊之檢出，目前對於 TINC 之生活史並不清楚，其在動物體內的分布、卵囊排出的模式及臟器也未能完全了解，由於其卵囊非常的小 (未芽孢化卵囊僅 6–7 μm) 且對於滲透壓敏感容易破裂，故常規的浮游法可能無法檢出 [10]，或是需要多次重複檢驗且於鏡檢時須調整焦距方能檢出 [23]，這些因素都造成診斷及鑑定的困難。

目前推薦治療 TINC 的抗寄生蟲藥，包括 toltrazuril (15 mg/kg PO every 48 hours x 30~45 days) 或 ponazuril (20 mg/kg every 48 hours x 56 days) [2]，藥物給予的療程不能縮短 [2]，如將 toltrazuril 的治療期縮短至 2 週內，雖會減緩臨床症狀，但這治療方式卻會造成慢性感染，最終數月後仍會死亡 [2]。

走私或來路不明的陸龜易帶有潛在的傳染病風

險，若該動物為保育類動物則無法進行人道銷毀，僅能由保育中心收容及圈養，故在入院收容前須先篩檢疾病，如陸龜類常見的疱疹病毒、蛙病毒 (ranavirus)、黴漿菌等病原；此外，TINC 亦應進行檢測，希望藉由本病例報告能提供野生動物或特殊寵物獸醫臨床診斷之參考，並促進龜鱉類動物之保育及球蟲目寄生蟲的研究。

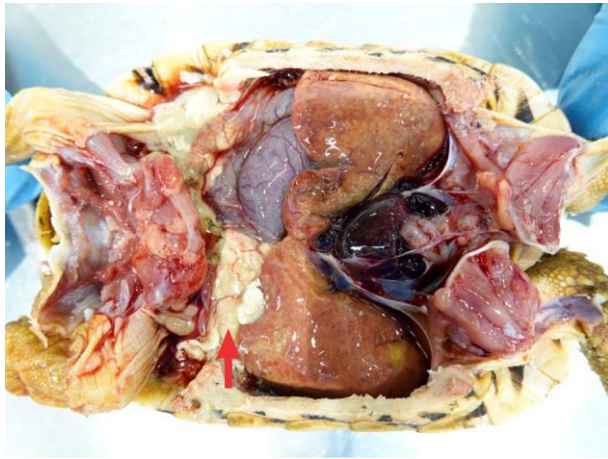


圖 1、編號 1，體腔蓄積少量清澈液體，膀胱蓄積大量黃白色顆粒樣疑似尿酸鹽結晶（紅色箭頭）。

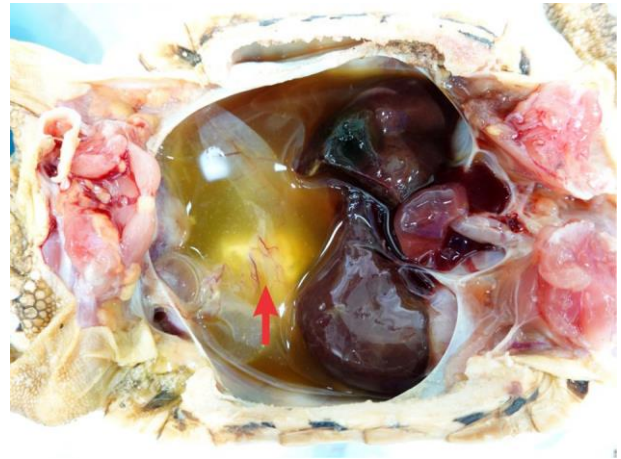


圖 2、編號 2，體腔蓄積少量清澈液體，膀胱內蓄積大量尿液，尿液中混有少量白色疑似尿酸鹽結晶（紅色箭頭）。

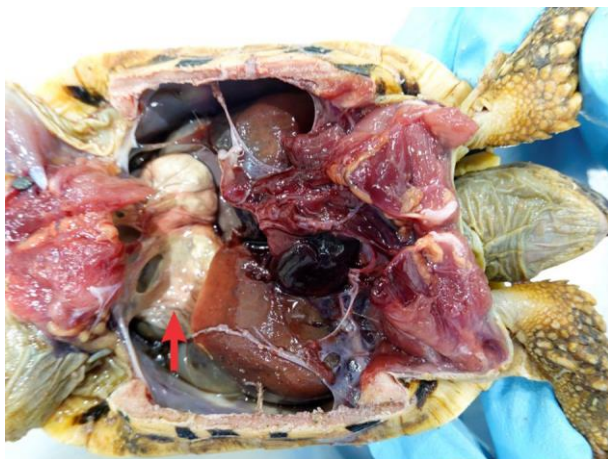


圖 3、編號 3，膀胱疑似蓄積大量黃白色顆粒樣尿酸鹽結晶（紅色箭頭）。



圖 4、編號 1，肝臟呈瀰漫性潮黃及腫大。

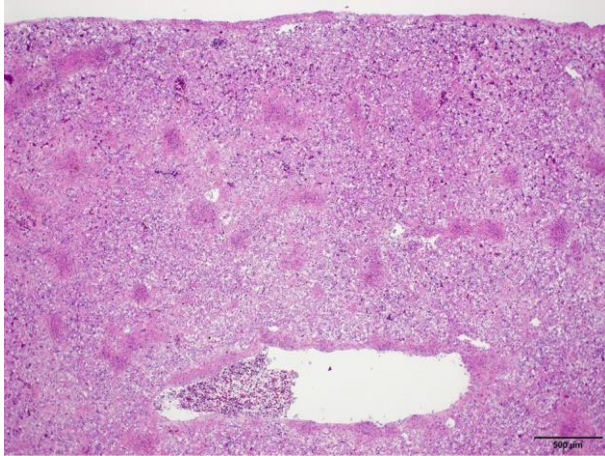


圖 5、編號 1，肝臟，呈現多發局部壞死。

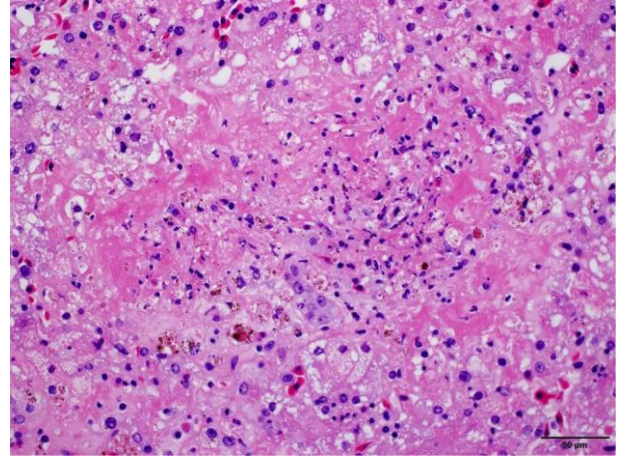


圖 6、編號 1，肝臟，纖維素性壞死及單核炎症細胞浸潤。

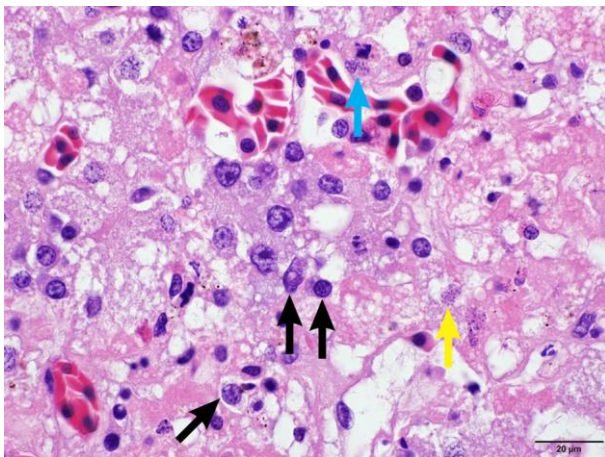


圖 7、編號 1，肝臟，細胞核可見配子體（黑色箭頭），細胞質內（青色箭頭）及細胞外（黃色箭頭）可見裂殖子。

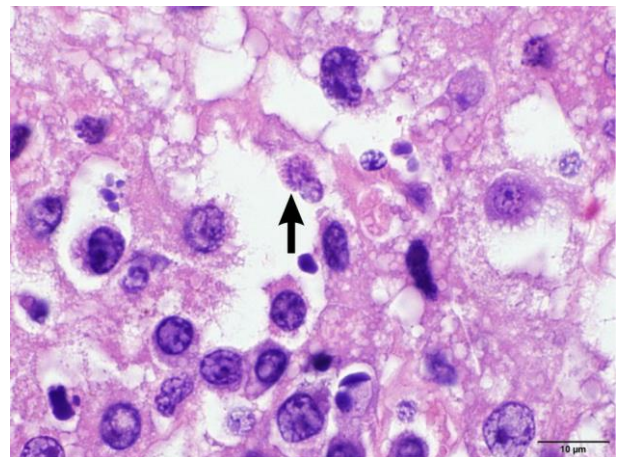


圖 8、編號 1，肝臟，裂殖子呈現香蕉形（黑色箭頭）。

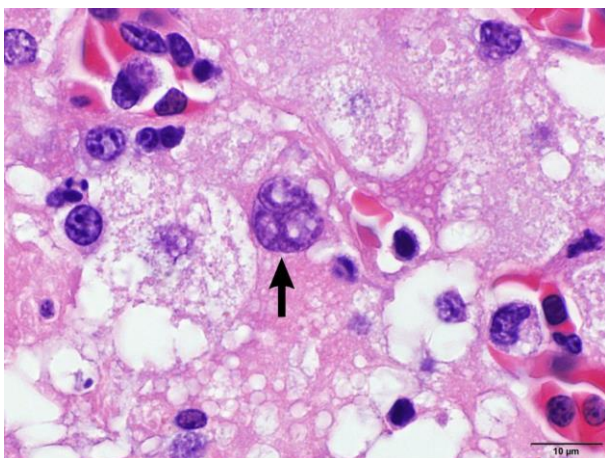


圖 9、編號 2，肝臟，肝細胞核內存在數個滋養體（黑色箭頭）。

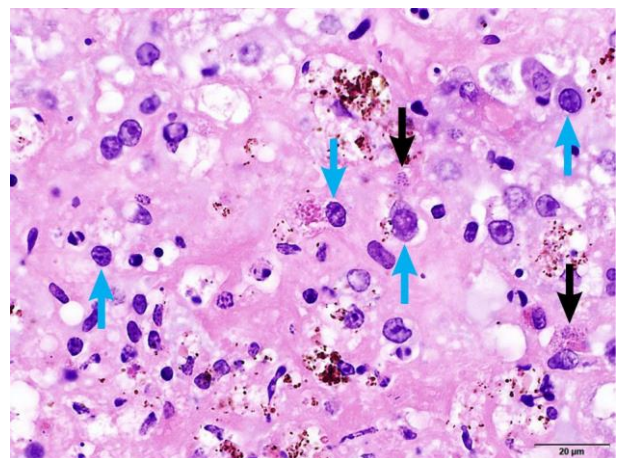


圖 10、編號 1，肝臟，肝細胞的細胞質內及細胞外可見裂殖子（黑色箭頭），細胞核內可見配子體（青色箭頭）。

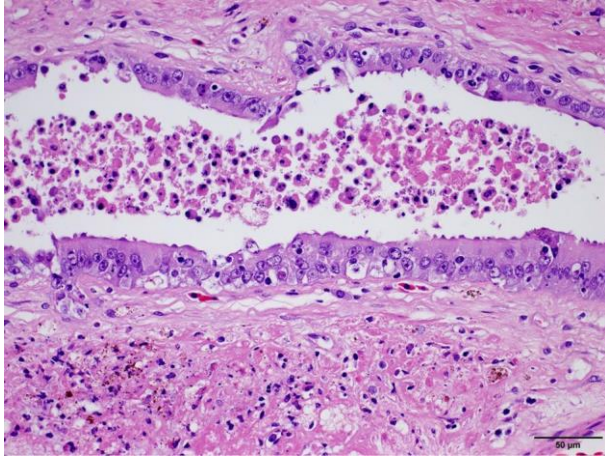


圖 11、編號 1，肝臟，膽管上皮細胞呈現增生、空泡化，且細胞核肥大、形狀不規則。膽管腔內含大量脫落、壞死的上皮細胞及單核炎症細胞。

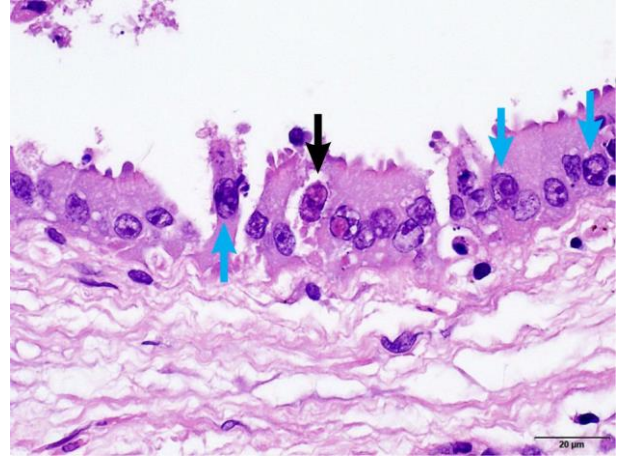


圖 12、編號 1，肝臟，膽管上細胞核呈不規則樣，其內可見營養體（黑色箭頭）、配子體（青色箭頭）。

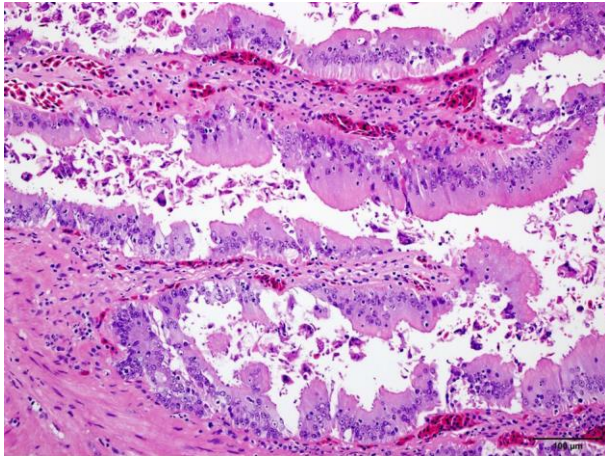


圖 13、編號 1，膽囊，上皮細胞呈增生、空泡化及壞死。

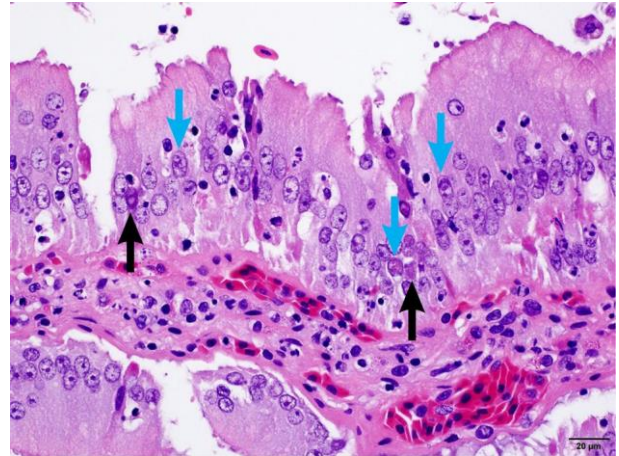


圖 14、編號 1，膽囊，細胞核內可見裂殖子（黑色箭頭）、配子體（青色箭頭）及其他不同階段之球蟲。

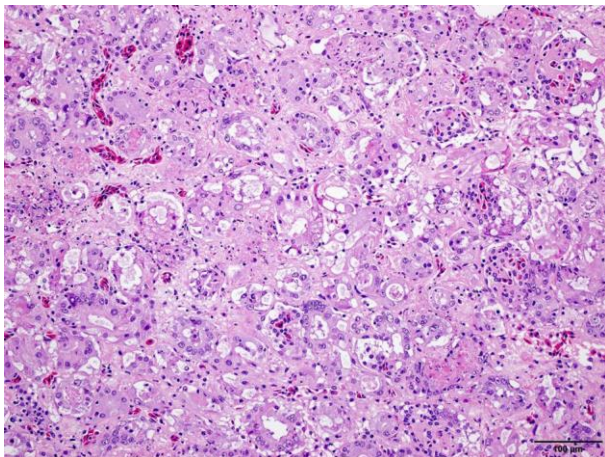


圖 15、編號 1，腎臟，腎小管呈多發壞死，間質呈輕微纖維化。

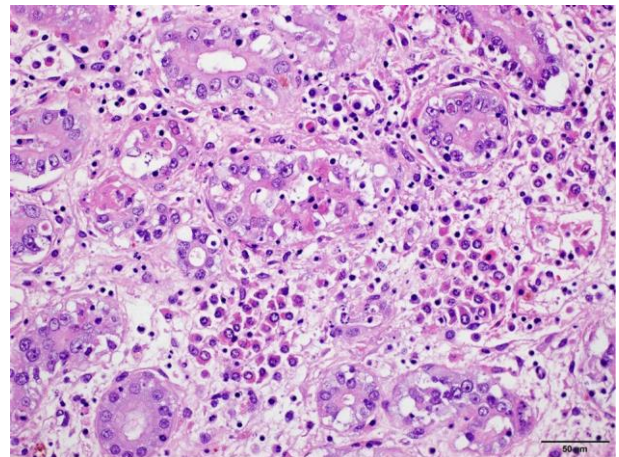


圖 16、編號 2，腎臟，腎小管上皮壞死，間質呈水腫、纖維化及中度顆粒球和淋巴球浸潤。

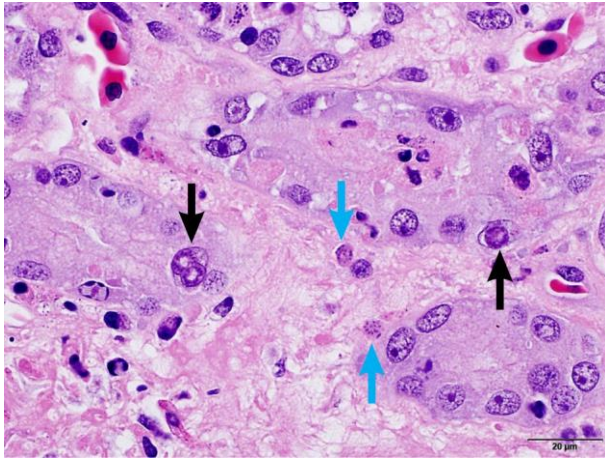


圖 17、編號 1，腎臟，細胞核內可見配子體（黑色箭頭），細胞核及質內可見裂殖子（青色箭頭）。

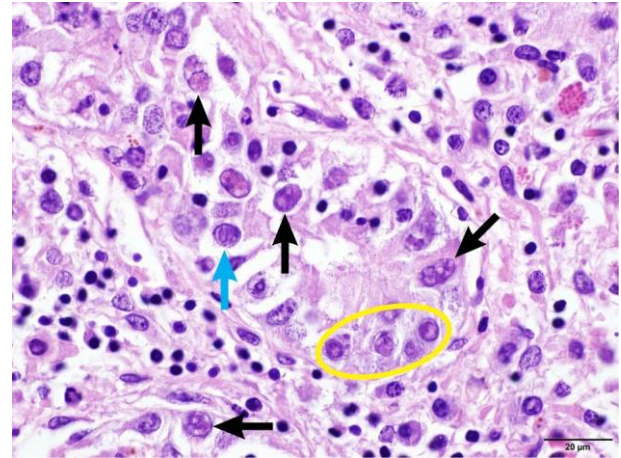


圖 18、編號 2，腎臟，細胞核內可見滋養體（黑色箭頭）、配子體（黃色圓圈），細胞核及質內可見裂殖子（青色箭頭）。

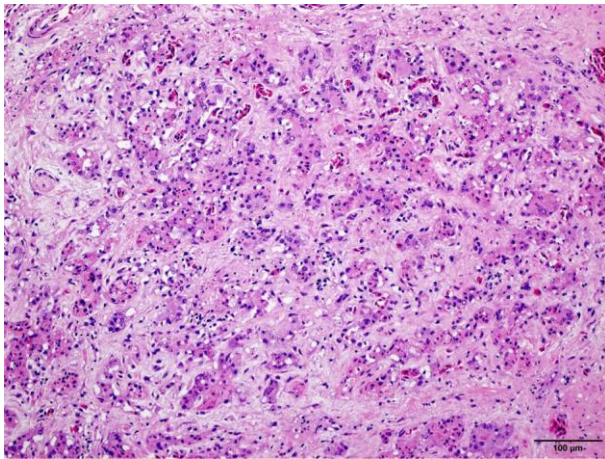


圖 19、編號 1，胰臟，腺泡細胞呈多發壞死及間質纖維化。

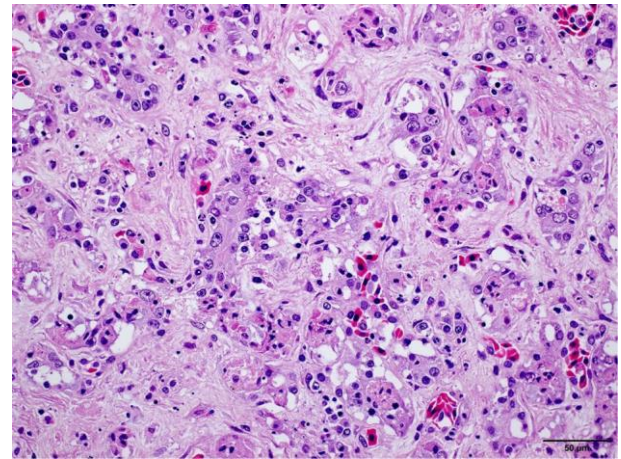


圖 20、編號 1，胰臟，腺泡呈多發壞死及間質中度纖維化。

病例報告：印度星龜核內球蟲感染症

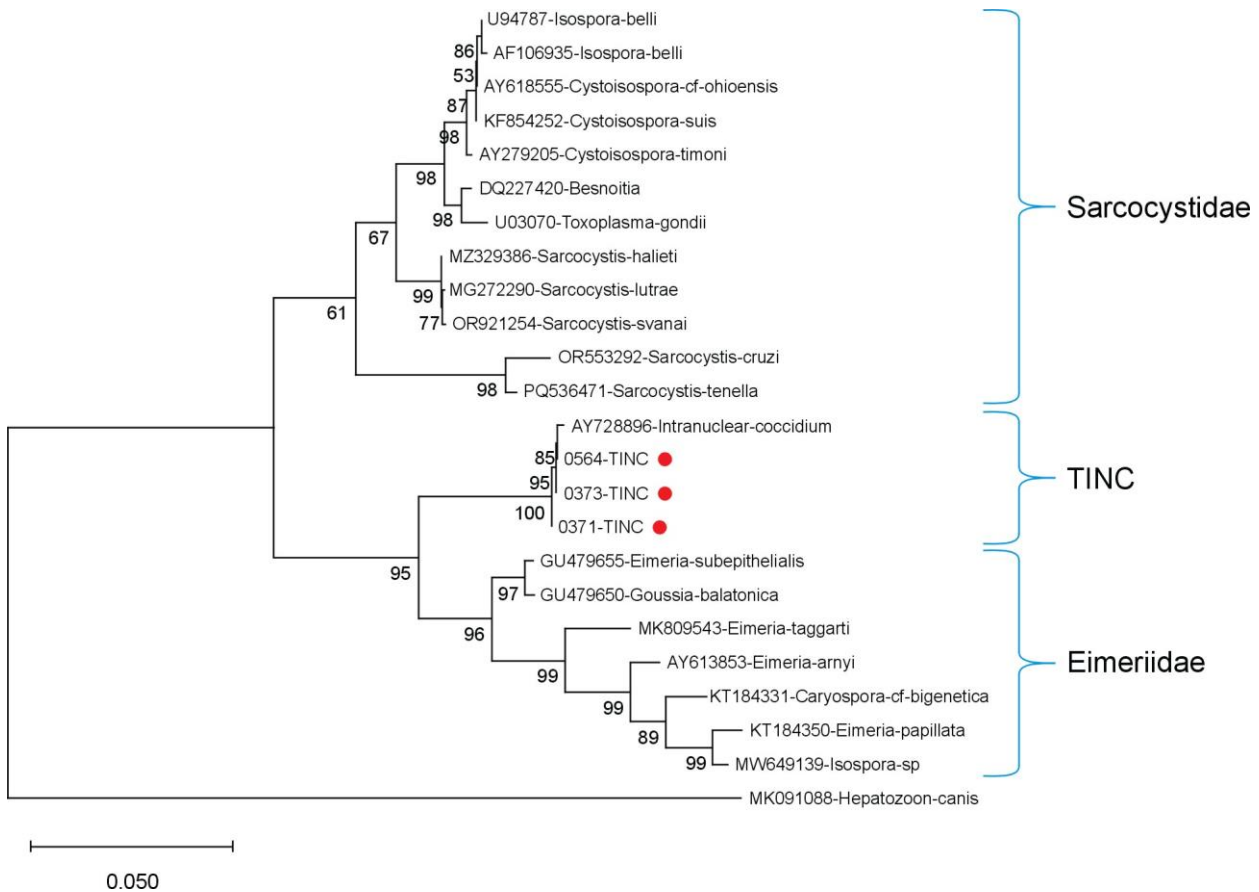


圖 21、印度星龜核內球蟲 18S rDNA 親緣關係分析，親緣關係分析結果顯示，龜鰲目核內球蟲 (TINC)、肉孢子蟲科 (Sarcocystidae)、艾美科 (Eimeriidae) 之原蟲各自成單系群 (monophyly)，惟龜鰲目核內球蟲與艾美科之原蟲較為接近。紅點代表了由本次病例中所得之 3 條印度星龜核內球蟲序列，本次分析係以 MEGA11 軟體執行 [21]，使用 Neighbor-Joining [19] 法推論親緣關係。圖中顯示了最佳的演化樹 (bootstrap test 1000 replicates)，相關分類單元聚集在一起的重複樹的百分比顯示在分支下方 [5]。演化樹為按比例繪製，分支長度的單位與用於推斷演化樹的演化距離的單位相同。演化距離使用 Kimura 2-parameter 方法 [12] 計算，單位為每個位點的鹼基替換數。位點間的變異率以 gamma distribution (參數 = 0.17) 建構 [12]。本次分析涉及 24 條核苷酸序列，包含空位和缺失資料的位置均被刪除，最終資料集中共有 1,562 個位點。

參考文獻

1. 臺北市立動物園收容野生動物之疾病監測與控管 (108 農科-10.8.1-務-e1 (1))。行政院農業委員會林務局 108 年度科技計畫研究報告。
2. Adamovicz L, Allender MC, Gibbons PM. Emerging infectious diseases of chelonians: An update. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 23:263-283, 2020. doi:10.1016/j.cvex.2020.01.014.
3. Alvarez WA, Gibbons PM, Rivera S, Archer LL, Childress AL, Wellehan JF Jr. Development of a quantitative PCR for rapid and sensitive diagnosis of an intranuclear coccidian parasite in Testudines (TINC), and detection in the critically endangered Arakan forest turtle (*Heosemys depressa*). *Vet Parasitol*, 193:66-70, 2013. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.029.
4. Amat AC, Gabriel B, Chee NW. Cystic calculi removal in African spurred tortoise (*Geochelone sulcata*) using transplastron coeliotomy. *Vet World*, 5:489-492, 2012.
5. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791, 1985.
6. Finkelman S, Paperna I. The endogenous development of four new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from Australian geckos. *Syst Parasitol*, 51:59-71, 2002. doi:10.1023/a:1012954511905.
7. Gajadhar AA, Rainnie DJ, Cawthorn RJ. Description of the goose coccidium *Eimeria stigmosa* (Klimes, 1963), with evidence of intranuclear development. *J Parasitol*, 72:588-594, 1986.
8. Garner MM, Gardiner CH, Wellehan JF, Johnson AJ, McNamara T, Linn M, Terrell SP, Childress A, Jacobson ER. Intranuclear coccidiosis in tortoises: nine cases. *Vet Pathol*, 43:311-320, 2006. doi:10.1354/vp.43-3-311.
9. Gibbons PM, Steffes ZJ. Emerging infectious diseases of chelonians. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 16:303-317, 2013. doi:10.1016/j.cvex.2013.02.004.
10. Hofmannová L, Kvičerová J, Bízková K, Modrý D. Intranuclear coccidiosis in tortoises - discovery of its causative agent and transmission. *Eur J Protistol*, 67:71-76, 2019. doi:10.1016/j.ejop.2018.11.002.
11. Innis CJ, Garner MM, Johnson AJ, Wellehan JF, Tabaka C, Marschang RE, Nordhausen RW, Jacobson ER. Antemortem diagnosis and characterization of nasal intranuclear coccidiosis in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*). *J Vet Diagn Invest*, 19:660-667, 2007. doi:10.1177/104063870701900607.
12. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16:111-120, 1980.
13. Kolesnik E, Dietz J, Heckers KO, Marschang RE. Detection of intranuclear coccidiosis in tortoises in Europe and China. *J Zoo Wildl Med*, 48:328-334, 2017. doi:10.1638/2016-0054R1.1.
14. Mohamed HA, Molyneux DH. Developmental stages of *Cyclospora talpae* in the liver and bile duct of the mole (*Talpa europaea*). *Parasitology*, 3:345-350, 1990. doi:10.1017/s0031182000060534.
15. Nishida T, Hatama S, Ishikawa Y, Kadota K. Intranuclear coccidiosis in a calf. *J Vet Med Sci*, 71:1109-1113, 2009.
16. Noller, W. Zur Kenntnis einem Nierencoccids. Der Entwicklungskreis des Coccids der Wasserfroschniere (*Isospora lieberkuhni*). *Archiv Protist*, 47:101-108, 1923.

17. Paperna I. Ultrastructural and developmental affinities of piscine coccidian. *Dis Aquat Org*, 22:67-76, 1995.
18. Pecka Z. Intranuclear development of asexual and sexual generations of *Eimeria hermani* Farr, 1953, the coccidian parasite of geese. *Zentralbl Bakteriol*, 278:570-576, 1993. doi:10.1016/s0934-8840 (11) 80829-7.
19. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425, 1987.
20. Schmidt V, Dyachenko V, Aupperle H, Pees M, Krautwald-Junghanns ME, Dauschies A. Case report of systemic coccidiosis in a radiated tortoise (*Geochelone radiata*). *Parasitol Res*, 102:431-436, 2008. doi:10.1007/s00436-007-0781-7.
21. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol*, 38:3022-3027, 2021. doi.org/10.1093/molbev/msab120.
22. VanDevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol*, 34:1666-1671, 1996. doi:10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996.
23. Wellehan JFX, Jacobson E, Stilwell J, Gibbons PM, Garner MM, Rosenoff E, Koplos P, Boyer TH. Testudine intranuclear coccidiosis (TINC). *J Herp Med Surg*, 32:144-154, 2022. doi.org/10.5818/JHMS-D-20-00024.

Case report: Intranuclear coccidiosis in Indian star tortoises (*Geochelone elegans*)

YC Tu, IW Chen, CH Wu, YW Chen, SC Hu, YC Chuang*

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract Intranuclear coccidiosis of Testudines (TINC) is a newly emerging pathogen found in tortoises. It can cause severe systematic infection and is capable to infect multiple species of tortoises. In this case report, we described gross lesions, histopathological changes, and molecular characterization of TINC infection in three Indian star tortoise (*Geochelone elegans*) sheltered in Pingtung Rescue Center. They are individuals among a total of 617 impounded illegal trade *G. elegans*. One year after residence in the rescue center, sporadic mortality started to appear. Clinical signs included increased eye, mouth, and nose discharge, urine retention, weak, weight loss, anorexia, and lethargy. The morbidity was 48.6% (300/617) and the cumulative mortality reached 11.3% (70/617). Gross changes included fluid accumulation in the body cavity, mottled liver, yellowish-white and firm kidneys, and accumulation of a large amount of yellowish-white crystalized granular material in the bladder. Histopathological examination revealed multifocal necrosis with infiltration of predominant mononuclear inflammatory cells in the liver, kidney, and pancreas; and the presence of an intralesional protozoan parasite of various stages, including trophozoites, gametocytes, schizonts, and merozoites, in the nuclei of the parenchymal cells. Schizonts and merozoites were observed within or outside the cytoplasm of the parenchymal cells. Following the analysis of the partial sequence of the small subunit ribosomal RNA gene (18S rDNA) of the protozoa found in the three infected tortoises, it appeared to be the most similar to that of TINC detected in Celebes tortoise (*Indotestudo forstenii*, GenBank accension no.: AY728896). Based on the results of various tests, the Indian star tortoises were thus confirmed to be infected by TINC. This case report can be used as a reference for wildlife and exotic pet veterinarians.

Keywords: *Intranuclear coccidiosis, Histopathology, Molecular analysis, Geochelone elegans*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture