

應用 WGS-PCR 方法輔助痢疾桿菌鑑定之探討

魏孝倫*、廖盈淑、鄧如琇、陳柏翰、邱乾順

摘要

志賀氏桿菌會引起桿菌性痢疾，目前列為我國之第二類法定傳染病，此病原近五年每年平均造成 104 例的本土個案。由於志賀氏桿菌鑑定標準方法係以傳統生化試驗配合血清學分型，但此法仍無法明確鑑定部份的志賀氏桿菌，造成臨床醫學實驗室通報的困擾。為提升志賀桿菌的鑑別度，本研究以臨床分離株測試以基因體為基礎的 PCR 分型法(WGS-PCR)，此法主要測定志賀氏桿菌基因體的各個演化枝，並搭配志賀氏菌及腸侵襲性大腸桿菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)專一性基因 *IpaH* 的測定，來鑑定出志賀氏菌的血清群。我們以 30 株痢疾桿菌確認菌株進行驗證，發現 WGS-PCR 在血清群 B、C、D 的結果與血清凝集法有 100% 的一致性，但在血清群 A 的結果與血清凝集法僅有 20% 一致。另外以 WGS-PCR 測試 29 株疑似痢疾桿菌菌株，各有 2 株菌株被鑑定為血清群 B 及 D，亦顯示 WGS-PCR 可用於鑑定血清群 B 及 D 菌株，可明確釐清疑似菌株。WGS-PCR 只需進行低成本的 PCR 檢驗，我們建議可作為血清凝集法的輔助試驗，以提升志賀氏菌的鑑別度。

關鍵字：志賀氏桿菌、WGS、PCR

前言

志賀氏桿菌(*Shigella* spp.)為桿菌性痢疾的致病原，會造成人類腹瀉、血便、粘液便、發燒、腹痛及裏急後重等症狀[1]，目前全球每年約有 1.6 億人感染且主要發生在開發中國家[2]，我國目前列為第二類法定傳染病。疾病管制署(以下簡稱疾管署)「傳染病統計資料查詢系統」[3] 顯示，我國 2015 至 2019 年本土桿菌性痢疾每年平均有 104 例個案。

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：魏孝倫*

E-mail : slwei@cdc.gov.tw

投稿日期：2020 年 09 月 16 日

接受日期：2021 年 01 月 13 日

DOI : 10.6524/EB.202301_39(2).0001

Shigella spp.已被多數人認為與大腸桿菌(*E. coli*)是同種菌[4]。傳統的 *Shigella* spp.鑑定標準方法係以生化試驗配合血清學分型綜合判定。*Shigella* spp.常以缺乏運動性及不發酵乳糖與 *E. coli* 區別，然而這些生化試驗經常無法將 *Shigella* spp.與侵襲性大腸桿菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)區分[5]。而 *Shigella* spp.依其 O 抗原分為 A、B、C、D 血清群，分別代表 *Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei* 四種菌；然而，其 O 抗原與 *E. coli* 的 O 抗原常有交叉反應[6]，這增加 *Shigella* spp.血清群判讀的困難。細菌鑑定標準方法 16S 基因定序及常用的質譜儀也無法鑑定出 *Shigella* spp.[7]。由於驗出 *Shigella* spp.必須依第二類法定傳染病於 24 小時內通報，不能明確鑑定常造成臨床醫學實驗室的困擾，而正確的 *Shigella* spp.血清型不僅可以協助第一線疫調人員初步推測可能的聚集，也有助於提升脈衝式電泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)資料庫正確性，以利後續進行流行病學監測及個案的追蹤溯源。近年來研究人員應用全基因體定序(Whole genome sequencing, WGS)技術於區分 *Shigella* spp.及 *E. coli*，發現可提高鑑別效果[8]，Sahl 等人則利用發展以 WGS 為基礎的 PCR 鑑定法(WGS-PCR)用於區分 *Shigella* spp.的四種血清群[9]，他分析 336 株 *Shigella* spp.及 *E. coli* 之全基因體資料，發現 *Shigella* spp.主要分佈在 S1、S2、S3、S4、S5 等 5 個演化枝，S1 含有 A、B、C 三種血清群，S2 含有 D 血清群，S3 含有 A、C 血清群，S4 含有 A 血清群，S5 含有 B 血清群，偵測 5 個演化枝的專一性序列進而確認出各個演化枝內的菌株。*IpaH* 則為 *Shigella* spp.及 EIEC 特有的侵襲性基因[10]。故合併以 PCR 鑑定演化枝及毒力基因於鑑定 *Shigella* spp.敏感度可達 98.6%，且可 100%排除 *E. coli* 測試株[9]。

本研究試著利用 WGS-PCR 測試 30 株 *Shigella* spp.確認菌株及 29 *Shigella* spp.疑似菌株，來評估 WGS-PCR 的鑑定效果。

材料與方法

一、菌株之收集：

- (一) 菌株：收集 *Shigella* spp.臨床分離株 54 株，來源為疾管署腹瀉及病毒實驗室及各認可實驗室依傳染病送驗規定[11]送至中區參考實驗室之確認或疑似菌株。另有 5 株購自生物資源保存及研究中心作為陽性對照之 *Shigella* spp.標準菌株，分別為 *Shigella dysenteriae* BCRC13983、*Shigella flexneria* BCRC13984、*Shigella boydii* BCRC13959、2 株 *Shigella sonnei* 分別為 BCRC10773 及 BCRC15965。此外，有 3 株購自生物資源保存及研究中心作為陰性對照之 *E. coli* 標準菌株分別為 BCRC15372、BCRC15373、BCRC15374。
- (二) *Shigella* spp.確認菌株定義：包括 5 株標準株及 25 株臨床株，經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. [12]，且以 *Shigella* spp.血清群或血清型凝集僅出現單一凝集反應。

(三) *Shigella* spp.疑似菌株定義：共有 29 株，經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. [12]，*Shigella* spp.抗血清凝集結果包含多重凝集、凝集不明確或無凝集菌株，以及血清群 A 及 B 無法鑑定至血清型別之菌株。

二、*Shigella* spp.純化及鑑定：

疑似菌株培養於Salmonella-Shigella選擇性培養基(Oxoid, Hampshire, UK)，在37°C培養18至24小時後，挑選無色菌落接種於TSA培養基(Oxoid, Hampshire, UK) (Oxoid, Hampshire, UK)，在37°C培養18至24小時，挑選單一菌落依標準操作流程進行質譜儀鑑定[12]鑑定為*E. coli* / *Shigella* spp.之後再依標準流程執行血清凝集測試[13]。

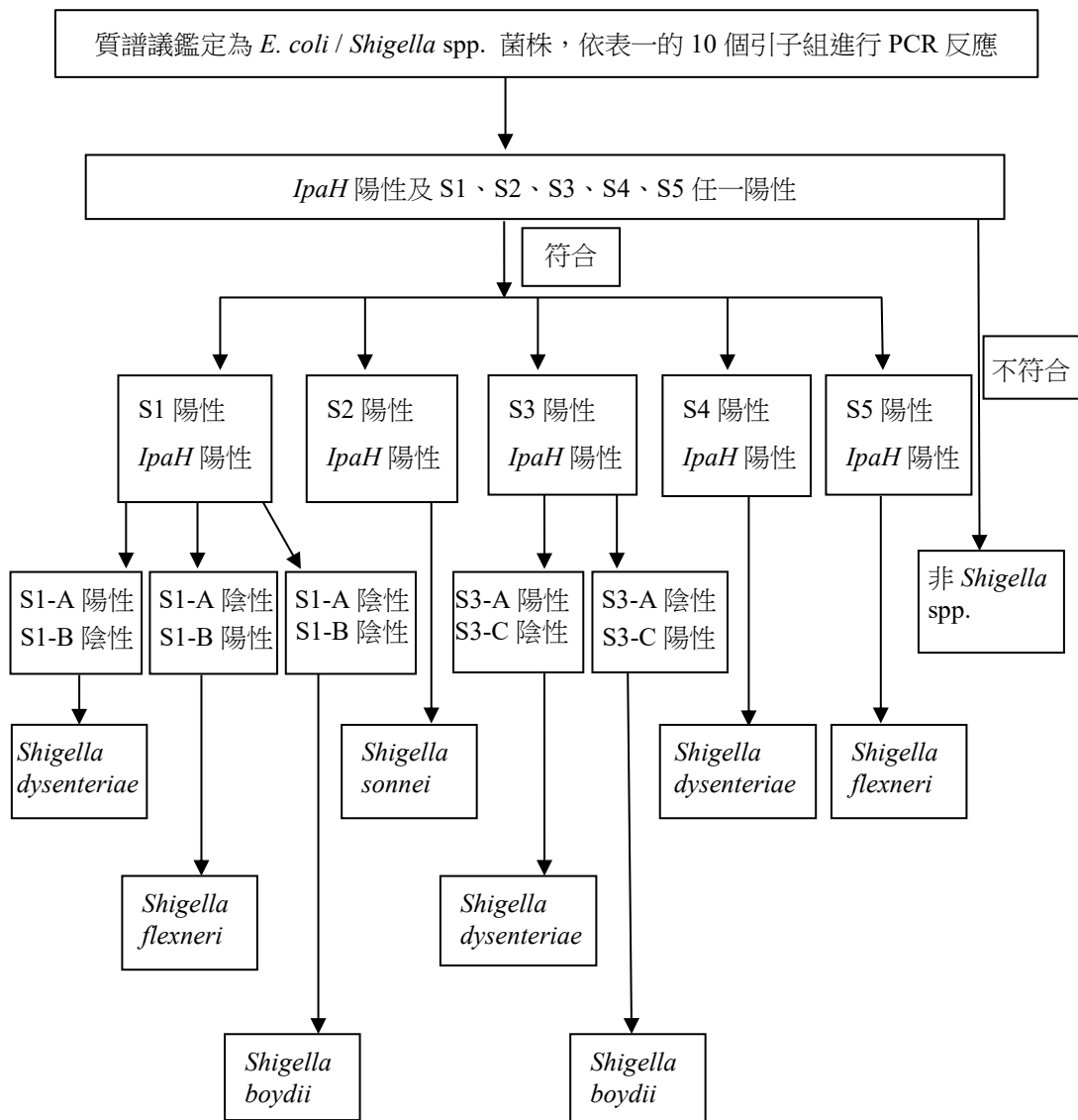
三、基因體為基礎之 PCR 分型(WGS-PCR)：

自 TSA 培養基挑取菌落置於 1 ml 無菌水中，以 100°C 加熱 15 分作為 DNA 模版。依 Sahl 的方法修改反應濃度如後述，配製 10 對引子組（表一）[9]，每個引子的操作濃度均為 10uM。每個引子組進行獨立反應，總體積均為 10 uL，內含 1uL 的 DNA 模版，5 uL 的 GoTaq® Green Master Mix(Promega, USA) 及 1 uL 的 10 uM 引子組。依表一之反應產物片段大小判讀對應的血清群，流程圖如圖一。

表一、WGS-PCR 使用之引子序列、標的基因、增幅片段、對應之演化枝及所包含之血清群。[8]

引子組	引子名稱	引子序列 5'→3'	標的基因	增幅片段大小	演化枝	演化枝包含血清群
1	S1-F	CTTCAACGCACGAATATCAAC	type 3 restriction enzyme	1008	S1	A, B, C
	S1-R	CGGAAATTGTGAATCTGGTCTT				
2	S2-F	GCCCTTTAGCGGATCGTAGT	rhs core protein	561	S2	D
	S2-R	CAGCTGCATATAACAGAGCAA				
3	S3-F	GATAATGGCGACGAAAGGAA	conserved hypothetical protein	334	S3	A, C
	S3-R	GTAGCGAACTGGTAGCGATG				
4	S4-F	CAGCGTGTGCAGGGATCAGTCG	shiga-toxin 1 subunit A	451	S4	A
	S4-R	CGGACTCTCCATCTGCCGGACAC				
5	S5-F	CAATAACGAGCTACCGATTACCTT	putative periplasmic protein	808	S5	B
	S5-R	CTTCAGCGGTGTTAAAGGTACAG				
6	<i>IpaH</i> -F	TGAGTTACCTGAATCACTGGAAG	<i>IpaH</i> invasion antigen	180	S1, S2, S3, S4, S5	A, B, C, D
	<i>IpaH</i> -R	TCGAGGATGATAGTGCAGGTC				
7	S1B-F	AGGTTCTGGTTTGGGTAATGTC	flexneria 6 O-antigen	511	S1-B*	B
	S1B-R	TCCTAIACTTTGGGCTTCTGCT				
8	S1A-F	ATATGTCGCCATTCGATTTACC	putative prophage protein	617	S1-A*	A
	S1A-R	CTCAATGTCTAAGCCAACAGGA				
9	S3C-F	CAGCAATTCGGAAAGGATTAC	adhesin	87	S3-C*	C
	S3C-R	GTTCAACCCACCAACTCTTCAC				
10	S3A-F	CATTCAGGTAGCACCATATCCA	cox	479	S3-A*	A
	S3A-R	GTTTCTCACCCGATAAACCAGA				

*「-」後字體表示該演化枝內的血清型。



圖一、WGS-PCR 鑑定分型判定流程。[8]

S1、S2、S3、S4、S5 為演化枝，S1-A、S1-B、S3-A、S3-C 表「演化枝-演化枝內的血清型」，IpaH 表 IpaH 基因。

結果

一、Shigella spp. 確認臨床株及標準株之評估

共有確認臨床株 25 株及志賀氏菌標準株 5 株用於評估（表二），B、C 及 D 血清群菌株均分別被 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella flexneri*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei*，兩項試驗 100% 一致。A 血清群有 10 株菌，僅有 1 標準株及 1 臨床株經 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella dysenteriae*，兩項試驗僅有 20% (2/10) 一致，其它 8 株均鑑定不出為 *Shigella* spp.，8 株中有 4 株為 IpaH(-)，推測可能不是 *Shigella* spp.。另外陰性對照的 *E. coli* 標準菌株與 *Shigella* spp. 血清抗體雖都有程度不一的凝集反應，但 WGS-PCR 結果均為陰性（未顯示資料）。

二、*Shigella* spp. 疑似臨床株之評估

在 29 株疑似菌株中（表三），各有 2 株以 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella flexneri* 及 *Shigella sonnei*。其它的 25 株菌，包含 A 血清群、A 血清群弱凝集、D 血清群弱凝集、多重凝集或無凝集等，其 WGS-PCR 均為陰性，而其 *IpaH* 基因有 22 株為陰性，推測這群菌不是 *Shigella* spp.。

三、血清凝集試驗在不同檢驗機構的差異

比較認可機構送驗時提供其鑑定的血清群與本實驗室確認之血清群資料，發現在 25 株 *Shigella* spp. 確認菌中有 1 株(4%)與確認結果不一致（表二）；在 29 株疑似菌株有 25 株(86.2%)與確認的結果不一致（表三），顯示多重凝集或凝集不明確菌株，在機構間的檢驗結果差異大。

表二、已知 *Shigella* spp. 菌株 WGS-PCR、*IpaH* 鑑定結果。

送驗血清群別	鑑定血清群別	數量	血清型別	WGS-PCR**	<i>IpaH</i> 陽性數
A*	A	1	type 1	<i>S. dysenteriae</i>	1
A	A	1	type 2	<i>S. dysenteriae</i>	1
A	A	4	type 3	-	3
A	A	3	type 7	-	1
A	A	1	type 8	-	0
B*	B	1	2a	<i>S. flexneri</i>	1
B	B	1	1a	<i>S. flexneri</i>	1
B	B	2	2a	<i>S. flexneri</i>	2
B	B	2	3a	<i>S. flexneri</i>	2
B	B	4	4a	<i>S. flexneri</i>	4
B	B	3	6	<i>S. flexneri</i>	3
B	B	1	yV	<i>S. flexneri</i>	1
C*	C	1	ND	<i>S. boydii</i>	1
A-、B-、C-、D-	C	1	ND	<i>S. boydii</i>	1
D*	D	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2
D	D	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2

*標準菌株。

**-,陰性非 *Shigella* spp.。

表三、疑似 *Shigella* spp. 菌株之 WGS-PCR、*IpaH* 鑑定結果。

送驗血清群別*	鑑定血清群別*	數量	血清型別*	WGS-PCR**	<i>IpaH</i> 陽性數
A-、B-、C-、D-	A+	1	-	-	0
A	A±	1	-	-	0
B	B	2	-	<i>S. flexneri</i>	2
B	B+、C+	3	-	-	0
B	A+、B+、C+	1	-	-	0
B	A+、B+、C+、D+	1	-	-	0
B	B+、D+	1	-	-	0
C	A±、B±、C±、D±	1	-	-	0
D	D±	2	NA	-	1
D	D+、A±、C±	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2
A-、B-、C-、D-	A-、B-、C-、D-	9	-	-	1
A(1)、B(1)、D(3)***	A-、B-、C-、D-	5	-	-	1

*±, 20-40 秒內出現凝集；-, 1 分鐘內未出現凝集。

** -, 陰性非 *Shigella* spp.。

*** ()內表示數量。

討論

Shigella spp. 與 *E. coli* 因基因有 80% 以上相同，已被多數微生物學家認為是同種[4]，因此在鑑定上常有混淆，但因 *Shigella* spp. 會引起嚴重疾病及低劑量即可造成感染的特性，在我國被列為法定傳染病，且因血清型別有助於初步疫情調查之判斷，我們希望找出較為明確的方法提高 *Shigella* spp. 的鑑別度，進一步增加 *Shigella* spp. 的 PFGE 資料庫的正確性。例如 2007 年臺中市某國小發生 *Shigella sonnei* 大型群聚事件，我們利用 *Shigella sonnei* 的 PFGE 資料庫比對病人及環境分離株之型別，成功協助釐清並阻斷污染源[14]。

本研究發現 WGS-PCR 與血清型鑑定在 *Shigella* spp. 確認菌株的 B、C、D 血清群有 100% 的一致性，但 A 血清群只有 20% 一致，這有兩種可能，一為 WGS-PCR 的資料庫代表性不足，未納入足夠的 A 血清群，以致引子的設計無法測出 *Shigella* spp.；另一個可能是，這些 A 群的不一致菌並非 *Shigella* spp.，只是 *E. coli* 的 O 抗原與 *Shigella* spp. 的血清會有交叉反應，因本實驗的 *Shigella* spp. 確認菌株是經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. 後，再以 *Shigella* spp. 血清鑑定為標準，並未同時測試 *E. coli* 血清抗原，因此無法排除為 *E. coli* 的可能性。與其它機構結果不一致的菌株中有 2 株 7 型及 1 株 3 型均缺少 *IpaH* 基因，推測可能不是 *Shigella* spp.，因為 *IpaH* 基因是 *Shigella* spp. 及 EIEC 均會攜帶的專一性基因[10]。綜合來說，這些 A 群的不一致菌仍需要有更充份的資料庫及證據才能確認其分類，我們建議現階段 WGS-PCR 仍主要用於 B、C、D 血清群的鑑別。

本實驗發現 WGS-PCR 可於血清凝集不明確時，輔助判定是否為 *Shigella* spp.，有 2 株 B 群未能分型菌及 2 株 D 群多重凝集菌，均被 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella* spp.，顯示 WGS-PCR 在鑑定 B 群及 D 群菌時較血清凝集法容易鑑定出 *Shigella* spp.。

各指定實驗室送驗血清群與本室確認血清群在疑似菌株中有高達 86.2% 的不一致（表三），這些不一致菌以 WGS-PCR 鑑定不出為 *Shigella* spp.。因為多數後測結果顯示為多重凝集，推估應是檢驗人員未實際測試完所有血清群而誤判，因此我們建議在執行血清凝集測試時應依標準操作程序完成所有血清群的測定，始能綜合判讀。

WGS-PCR 雖僅在 B、C、D 血清群與血清凝集鑑定一致，但具有簡單、低成本、又明確的特性，我們建議仍可作為輔助試驗。本研究使用評估的菌株有限且來源多樣性不足，因此本評估有其限制。

參考文獻

1. Lampel KA, Formal SB, Maurelli AT. A Brief History of Shigella. *EcoSal Plus* 2018; 8(1): ESP-0006–2017.
2. Williams P, Berkley JA. Dysentery (shigelosis) current WHO guidelines and the WHO essential medicine list for children. *WHO Guideline* 2016.
3. <https://nidss.cdc.gov.tw/Home/Index?op=1>
4. Devanga Ragupathi NK, Muthurandhi Sethuvel DP, Inbanathan FY, et al. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New Microbes New Infect* 2018; 21: 58–62.
5. Johnson JR. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* 2000; 49(7): 583–5.
6. Lefebvre J, Gosselin F, Ismail J, et al. Evaluation of commercial antisera for *Shigella* serogrouping. *J Clin Microbiol* 1995; 33(8): 1997–2001.
7. Khot PD and Fisher MA. Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51(11): 3711–6.
8. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52(8): 139–46.
9. Sahl JW, Morris CR, Emberger J, et al. Defining the Phylogenomics of *Shigella* Species: a Pathway to Diagnostics. *J Clin Microbiol* 2015; 53(3): 951–60.
10. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2687–91.
11. 衛生福利部疾病管制署：衛生福利部疾病管制署傳染病檢體採檢手冊。2018。取自：<https://www.cdc.gov.tw/Category/List/fl4pGet3T9fQxrpbiCzuDw>。

12. 廖盈淑：微生物鑑定質譜儀標準操作程序。第二版。2017。取自：
<https://lims.cdc.gov.tw/DocumentsManage/ElectronicPaperDocument>。
13. 衛生福利部疾病管制署：傳染病標準方法檢驗手冊：桿菌性痢疾。2020。取自：
https://www.cdc.gov.tw/Category/Page/4pQgzB07prAqzxE_zUDOGw。
14. 趙雁南、黃頌恩、邱乾順等：2007 年 11 月台中市某國小水源性桿菌性痢疾流行事件調查。疫情報導 2008；24(10)：769-79。