

計畫編號：DOH97-DC-2012； GRB編號：PG9612-0285

行政院衛生署疾病管制局九十七年度計畫

亞太區域細菌傳染病監測網組織(PulseNet Asia Pacific)合作研究計畫

自行研究成果報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

研究主持人：邱乾順

研究人員：李孟訓、童聖凱、洪崇盛

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

# 目 錄

一、摘要	4-5
二、本文	
(一)、前言	6-7
(二)、材料與方法	8
(三)、結果	9-11
(四)、討論	12-13
(五)、結論	14
(六)、結論	16
(七)、參考文獻	16-17
(八)、圖表	
<b>Table 1. The country sources of <i>Shigella sonnei</i> isolates used in this study</b>	<b>18</b>
<b>Table 2. Geographical distribution of <i>S. sonnei</i> isolates used in this study</b>	<b>19-20</b>
<b>Table 3. Allele diversity for 26 VNTR loci in various isolate sets</b>	<b>21-22</b>
<b>Table 4. MLVA20 genotypes appearing in three or more countries</b>	<b>23-25</b>
<b>Table 5. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster A</b>	<b>26-31</b>
<b>Table 6. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster G</b>	<b>32-34</b>
<b>Table 7. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster F</b>	<b>35-36</b>
<b>Table 8. Distribution of MLVA20 genotypes within clusters B, C, D, E and H</b>	<b>37</b>
<b>Figure 1. Phylogenetic tree of MLVA20 genotypes constructed using minimum spanning tree algorithm. Genotypes differing at 2 or less of the 20 VNTR loci were assigned to</b>	

be a clonal group. Countries where the genotype originated are marked with colors. The area of circle is proportional to the number of countries detected with the genotype.

**38-39**

**Figure 2. Phylogenetic tree of MLVA20 genotypes constructed using minimum spanning tree algorithm. Genotypes differing at 2 or less of the 20 VNTR loci were assigned to be a clonal group. Continents where the genotype originated are marked with colors. The area of circle is proportional to the number of countries detected with the genotype**

**40-41**

## 摘要

關鍵詞：PulseNet, Molecular subtyping, MLVA, *Shigella sonnei*

本研究收集源於6大洲51個國家1,628株*S. sonnei*菌株，以評估本實驗室所研發之MLVA之應用性，並描繪*S. sonnei*之地理區域流行面貌；菌株有1,100株源於台灣，另有528株源於其它50國家，分離時間為1943至2008年。本研究確立前8個最高變異loci，包括SS3, SS6, SS9, SS1, SS11, SS10, SS13與SS12，此8個高變異loci將建議給PulseNet International監測網組織實驗室，以取代目前使用之標準化PFGE分型法。由20個中低變異的loci建立的菌株親緣關係樹，將菌株分成3個大群組、5個小群組與12個孤立基因型；3個大群組出現在所有菌株來源的6大洲，其中群組A於1996年至2007年出現於40個國家。群組A基因型SS20.2是最主要的流行基因型，出現在5大洲(Africa, Asia, Europe, North America與South America)的24個國家。雖然某此基因型或群組在全球流行，但Argentina的菌株分型結果顯示，*S. sonnei*亦存在有地理區域的獨特基因型或群組。特定基因型或群組跨國/跨洲流行，很可能與菌系致病能力或近幾十年來頻繁的國際旅遊相關。

## **Abstract**

Keywords: PulseNet, Molecular subtyping, MLVA, *Shigella sonnei*

A total of 1,628 *S. sonnei* isolates were collected from 51 countries in 6 continents to evaluate the power of MLVA method developed in Taiwan and to delineate the geographical distribution of *Shigella sonnei* strains or clones in countries and continents. Of the isolates, 1,100 were indigenous in Taiwan and 528 were originated in other 50 countries collected from 1943-2008. The study confirmed the 8 most variable VNTR loci, SS3, SS6, SS9, SS1, SS11, SS10, SS13 and SS12, which will be recommended to the laboratories of PulseNet International as the molecular typing method to replace the current PFGE method. The phylogenetic tree constructed with the profiles of 20 low and moderate variable loci grouped the MLVA20 genotypes into 3 large clusters, 5 small clusters and 12 singletons. The genotypes within the 3 large clusters emerged in countries in the 6 continents. Genotypes within cluster A were widespread in 40 countries from 1996 to 2007. Among the genotypes in cluster A, SS20.2 was the most prevalent; it was detected in 24 countries located in five continents including Africa, Asia, Europe, North America and South America. Although some genotypes or clonal clusters were prevalent globally, the genotypes discovered in Argentina revealed that there were existing with geographical unique *S. sonnei* genotypes or clones. The global distribution of certain strains or clonal groups could be attributed to higher virulence for certain genotypes and high frequency of international travel in recent decades.

## 前言

*S. sonnei* 是旅遊腹瀉疾病之主要病原菌之一(3, 6, 14)，經由旅遊活動，病原菌可能跨國或跨地區地區流行。由疾管局之監測資料顯示，台灣大部份 *S. sonnei* 感染病例率與旅遊有關，2003 底更發生許多旅行團在印尼巴里島感染 *S. sonnei* 的事件(7)，因此世界各地區流行之菌株，會與該地區人民來往之頻率相關，推測台灣和東南亞各國之菌株，應該有相當大的親緣關係，然而過去一直沒有適當的分子指標做為研究 *S. sonnei* 親緣關係的方法。PFGE 是 PulseNet 監測網所使用的標準分型工具(12)，然而 PFG 不是探討 *S. sonnei* 親緣關係的適當工具。MLST 雖然是探討 *Neisseria meningitidis* 菌株演化關係的優良工具(10)，但 MLST 對 *Shigella* 之分型效力不高，甚至有不同血清型的菌株，屬於同一 ST type 的情形 (16)。PFGE 是 PulseNet 之標準分型工具，但 PFGE 本身仍有相當多的缺點，因此美國 CDC 積極發展其它分型技術以補 PFGE 之不足；歷經 5-6 年的研發，發現腸內科細菌普遍具有 VNTR (variable-number tandem repeat)，可供發展 MLVA (multilocus VNTR analysis)技術，MLVA 技術不但在分型效力(discriminatory power)上不輸 PFGE，且其材料不需使用活的菌株進行分析，只需要 DNA 即可，如此可解決菌株在國際間運送所產生的生物安全問題。過去，本實驗室利用國立台灣大學資訊所所研發之 VNTRDB 程式(2)，在尋找 VNTR candidates 上具有優勢，在短短兩年內即完成具有 26 個 VNTR loci 的 *S. sonnei* 之 MLVA 研發工作(8)。由於各 VNTR locus 的演化速率不同，因此可藉由不同 VNTR locus 的組合，探討 *S. sonnei* 之親緣關係。掌握此 MLVA 技術平台，可邀請各國研究者參與探討不同地理區域和國家間 *S. sonnei* 菌株之親緣關係，此一親緣關係，可用於解釋 *S. sonnei* 在各地區流行狀況與各地區人民交流/旅遊頻率，研究成果可評估 MLVA 技術在菌株親緣(演化)關係之運用價值，經由此研究資料的呈現，未來 MLVA 技術可能成為探討許多腸內科細菌或其它種類細菌之分子工具。

本研究利用台灣是 PulseNet Asia Pacific 組織成員之利，邀請 PulseNet 成員與國際學者合作，提供多樣化的 *S. sonnei* 菌株或菌株 DNA，進行 MLVA 分析，以評估各

VNTR loci 之特性，以挑選出適合 PulseNet 食因性疾病監測網常規分析之分子分型工具，並建立菌株親緣關係，以探討菌株跨國/跨洲之流行面貌。

## 材料與方法

**菌株來源：**本研究共分析1,628株*S. sonnei*菌株。菌株或DNA來自本局研檢中心中區實驗室和參與之國際學者，包括Argentina、France、Iran、Italy、Malaysia、Senegal與Vietnam (Table 1)。分離日期，主要在1996-2007，France有早期菌株，時間可追溯到1943年。菌株來源分佈6大洲(continent)、24個地理區(regions)的51個國家(Table 2)。

**MLVA分析：**所有菌株皆完成26個VNTR loci的分析，依據之前本實驗室所研發發表之方法進行PCR反應、PCR amplicons片段長度分析與決定其重覆單元數目(8)。

**資料分析：**各locus重覆單元數目，以阿拉伯數字記錄，以BioNumerics software (version 4.6; Applied Maths, Kortrijk, Belgium)之“Character Type”資料形式，輸入疾病管制局*Shigella* Fingerprint Database資料庫。應用Minimum Spanning Tree演算法(由BioNumerics軟體所提供)建構菌株之MLVA種源關係樹，各VNTR loci之對偶基因變數值，以Nei's diversity index (D)為衡量標準，其計算方程為： $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$ 。



## 結果

**VNTR allele diversity**：VNTR loci在1,628株菌株之變異度，前8名依序為SS3、SS6、SS1、SS9、SS11、SS10、SS7、SS13，allele diversity值與allele數目有正相關( $R^2=0.7826$ )，allele diversity值前6個loci有9-30個alleles (Table 3)。中低度變異的20個VNTR loci在不同國家所提供的菌株，其allele分佈(allele diversity)有明顯差異；France的菌株來源多元，其菌株在1943-2007年期間分離自41個國家，VNTR loci出現較多的allele且有較均勻的分佈，故allele diversity值相對上比在其它國家的菌株高；Iran、Senegal與Vietnam之菌株來自較短時間內，且多分離自較集中的區域，不少VNTR loci在這些國家的菌株沒有變異(Table 3)；台灣菌株有1146株，除了少數是外源性，大多是本土分離，但菌株大多分離自群突發事件(outbreaks)，故中低度變異之VNTR loci，其allele diversity不高。為了減低來自群突發事件大量菌株的影響，計算609個MLVA26基因型中各loci的allele diversity值，結果allele diversity值排序與使用所有菌株所計算出來的值排序大致相同

**MLVA基因分型**：計算26個loci的分型結果，1,628株菌株總計分成609個MLVA26基因型，除了兩株2007年分離自France與Chad的菌株具有相同MLVA26基因型外，不同國家菌株皆不具有相同之MLVA26基因型。在使用20個中低變異loci (排除6個最高變異的loci，SS3, SS6, SS1, SS9, SS11, SS10)，1,628株菌株總計分成162個MLVA20基因型，其中有13個MLVA20基因型出現在3個或以上的國家(Table 4)，其中SS20.2、SS20.20、SS20.1、SS20.19最為普遍，依次出現在24、12、11與8個國家。

**MLVA親緣關係樹**：SS1、SS3、SS6、SS9、SS10與SS11等6個loci之變異程度高，不適合用於建立菌株較長時間的演化關係，探討*S. sonnei*之跨國/跨洲流行面貌，故將6個高變異的loci排除。由20個中、低度變異的loci所建立的親緣關係樹(Figure 1)，資料係以菌株來源的51個國家為本，挑出每個國家菌株中每一個MLVA20基因型別，所建構之關係樹，圓形面積代表該基因型出現的國家數。MLVA20基因型別所建構之親緣樹，以相異2個或2個以下loci為切割值(cut off value)，如此形成3個大群組(A、F、G)、5個小群組(B、C、D、E、H)和12個單獨基因型(singleton) (Figure 1)。

群組A有55個基因型，分佈在所有6個洲別51個國家中的40個國家。群組A基因型最早出現在1973年 (Table 5)。有14個基因型有跨國流行情形，其中SS20.2、SS20.20、SS20.1、SS20.19，分別在24、12、11與8個國家中出現；SS20.20、SS20.1、SS20.19與SS20.2皆只相差一個locus (Figure 1)。SS20.2是群組A的founder，擁有最多的SLVs (single locus variants)，出現的時間長(1996-2007年)。

群組G擁有55個基因型，分佈在所有6個洲19個國家，群組基因型最早出現在1943年 (Table 6)。有9個基因型跨國流行，當中有7個基因型出現在2個國家，2個基因型(SS20.88與SS20.91)出現在3個國家；SS20.91為群組G的founder，有最多的SLVs基因型。

群組F擁有24個基因型，分佈在Africa、Asia、Europe等8個國家，在研究的菌株中，群組基因型最早出現在1943年 (Table 7)。有4個基因型跨國流行，SS20.6是群組F的founder (Figure 1)，出現在Malaysia與Vietnam。群組F基因型流行的國家以Malaysia最多，其次是Europe的France與Asia的Vietnam。Europe的8個型別中，有6個是早期的菌株(1943-1974年)。

在5個小群組中，群組B與E都屬Argentina之菌株；群組C與D皆出現於Europe，且以早期菌株為主；群組E出現在台灣，但親緣關係接近群組G (Table 8)。

12個獨立基因型(singletons)，分佈在7個國家，其中a、b、c在親緣關係上較屬於群組A，h較近群組F，i、j、k則接近群組G，另5個基因型和其它所有基因型皆有遠的距離 (Figure 1)。

**各國菌株基因型分佈：**在51個國家中，有8個國家之菌株數目(基因型別)較多，包括Argentina、France、Iran、Italy、Malaysia、Senegal、Taiwan、Vietnam。Argentina的菌株基因型相當獨特，除了有些基因型分佈在群組A外，分佈在群組G的基因型自成一個小的次群組 (Figure 2)，其它的基因型分佈在2個獨立的小群組 (clusters B & E)，相對上，France菌株之基因型相當均勻分佈在3個大的群組 (群組A、F、G)。Iran的6個基因型皆位於群組A，彼此差距一個locus，親緣關係很接近；由Senegal學者所提供1997-1998年所分離的菌株，基因型皆位於群組A，由法國學者提供之Senegal菌株，基因型相當歧異，分別位於群組A、群組F、群組G與1個獨立基因型(f)。Italy菌株位於群組A與群組G，群組A菌株主要在Sicily與Lombardy地區流行，群組G菌株是由Kosovo難民營所分離。Malaysia菌株基因型相當多

樣，主要集中在群組F與群組G；相對地，Taiwan的菌株基因型集中在群組A與群組G，Vietnam的菌株基因型則主要分佈在群組A與群組F兩大群組，同時有3個遠距單獨基因型。

## 討論

本研究有7位國際學者提供菌株與台灣收集之菌株共1,628株菌株，菌株來自6大洲51國家，菌株樣本足夠多元，可用於評估各VNTR locus之allele diversity與應用MLVA資料建立菌株親緣關係，以探討*S. sonnei*之全球流行面貌。

VNTR loci在突變速率、allele數目與各allele在族群分佈上有所差異，然而VNTR locus之突變速率不易評估；突變速率與各locus內之重覆單元數(copy number of repeat sequence unit)有關，即重覆單元數目高的菌株，其突變速度快，重覆單元數目少的菌株，其突變速度慢。在應用上，一般是考慮個別locus之alleles的族群分佈度(allele diversity)，allele diversity值高的locus，理論上有比較快的變異(突變)速率，具有較多的allele數量，能擁有高的分型效力(discriminatory power)。一般8個allele diversity高的loci，即擁有PFGE相當或更高的分型效力(8)，可用於取代PFGE，成為疾病監測與群聚感事件流病調查之工具。因此，國際食因性疾病分子分型監測組織—PulseNet International的實驗室，多年來積極發展能取代所使用的標準PFGE分型法。因為locus之allele diversity有strain或clone效應，在同一個地區或國家所分離的菌株，對某些loci可能有分佈上的偏移，例如本研究中Iran與Senegal學者所提供的當地菌株，在26個loci中就有16個沒有變異(allele diversity = 0)，因此本研究收集6大洲與多達51個國家的菌株，所得到之各locus之allele diversity具有很好的代表性，但因為Iran、Senegal與Taiwan之大部份菌株相當單元化，可能來自相同的clones，若將此三個國家的菌株不列入計算，最高變異的8個loci分別是SS3、SS6、SS1、SS9、SS11、SS10、SS13與SS12。

MLVA分型結果也可用於探討菌株之親緣關係，由於各VNTR locus之演化速率不同，不同的VNTR loci組合，可用來探討菌株或近或遠的演化時間距離的親緣關係。使用包括高變異VNTR loci之26個MLVA分型資料，可將菌株有效加以區別，在1,628株菌株中，只有2株相同MLVA26基因型的菌株出現在不同國家，顯見MLVA在細分型(fine typing)方面具有高效力。但如此高區別性之資料，雖有利於群突發事件(outbreaks)的流病調查，卻不利探討菌株跨國或跨地理區域的流行面貌；由於SS3、SS6、SS1、SS9、SS11、SS10具有高allele diversity值，將此6個loci排除，由20個中低變異度的loci所建立的菌株親緣關係，可定義某

個基因型或群組，探討這些基因型或群組在各地理區域的分佈情形。

由20個中低變異的loci所建立的菌株親緣關係樹(Figure 1與Figure 2)，顯示各基因型或群組之區域地理分佈。研究資料顯示，有些基因型或群組具有跨國/跨洲流行情形，例如群組A的基因型，出現在菌株來源的6個大洲、40個國家；當中的SS20.2基因型在24個國家出現，SS20.2其它3個SLV基因型也分別在出現在7、11、12個國家，顯示SS20.2與其SLV基因型之流行幅度相當廣。群組G與群組F也都有跨國/跨洲流行的情形，只是沒有像群組A的基因型，傳播如此廣泛。研究結果雖然顯示，*S. sonnei*流行之clonal groups不多，且有全球流行之情況，但還是存在區域或國家特有之clones (基因型)，例如Argentina之菌株，有部份屬於全球流行的clones，但也有獨特的clones包括群組B、群組E與群組G之一個次群組；另外，早期(1943年)自Sweden/Denmark等歐洲國家分離之菌株，屬獨特的基因型群組(群組C與D)，顯示利用20個中低變異度loci的分型資料，擁有足夠的區分效力；由20個loci在1,628株菌株所存在之alleles數目，理論上即擁有區分 $4.5 \times 10^{11}$ 型別的能力；26個loci則擁有 $9.5 \times 10^{18}$ 型別的能力。

## 結論

源於6大洲51國家1,628株*S. sonnei*菌株，分離時間1943-2008年，用於評估MLVA技術中各VNTR loci之變異度(allele diversity)、探討*S. sonnei*之區域流行面貌。變異度大之VNTR loci能用於細微分型，可做為監測疾病流行與群聚感染流病調查之工具；中低變異度之loci可用於探討經過較長時間演化菌株之親緣關係。本研究確立前8個高變異度loci (SS3, SS6, SS1, SS9, SS11, SS10, SS13, SS12)，將建議給PulseNet International監測網組織實驗室，進行跨實驗室之確效工作，以取代目前使用之標準化PFGE分型法。使用20個中低變異的loci建立的菌株親緣關係，指出3大群組具有跨洲流行情形，基因型SS20.2及其數個SLV基因型廣泛地在各國、各洲流行；然而Argentina的菌株顯示，除了有全球性的流行基因型外，亦有區域性獨特基因型。特定基因型或群組跨國/跨洲流行，很可能與菌系致病能力或旅遊頻繁度相關。

## 97 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：亞太區域細菌傳染病監測網組織(PulseNet Asia Pacific)合作  
研究計畫

主持人：邱乾順

計畫編號：DOH97-DC-2012

### 1. 計畫之新發現或新發明

發現 *Shigella sonnei* 有跨地理區域流行之情形。在所分析來自六大洲 51 個國家的 1628 株菌株中，有一主要的 clonal group，此一 clonal group 之 strains 在 6 大洲之 40 個國家中出現，可見 *Shigella sonnei* 跨地理區域流行的普遍性

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

*Shigella sonnei* 具高度感染性，到國外流行地區旅遊，容易被感染，帶回國內後引發國內的流行。所以，國人到國外旅遊，必需注意飲食衛生，避免遭到感染，禍延國內。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

*Shigella sonnei* 在國內的感染病例甚少，且大多是境外移入病例，加強旅遊宣導甚為重要。另外，*Shigella sonnei* 可能有某些 strains/clones 特別具有感染能力，加強國際合作進行菌株基因型的監測，偵測強病原株之流行，以適時發出警訊，進行民眾出國旅遊的宣導工作。

## 參考文獻

1. **Braden, C. R.** 2006. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* **43**:512-7.
2. **Chang, C. H., Y. C. Chang, A. Underwood, C. S. Chiou, and C. Y. Kao.** 2007. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res* **35**:D416-21.
3. **Ekdahl, K., and Y. Andersson.** 2005. The epidemiology of travel-associated shigellosis--regional risks, seasonality and serogroups. *J Infect* **51**:222-9.
4. **Espié, E., F.-X. Weill, C. Brouard, I. Capek, G. Delmas, A.-M. Forgues, F. Grimont, and H. deValk.** 2005. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype Agona infections in infants in France, linked to infant milk formula, investigations ongoing. *Euro Surveill* **10**.
5. **Kirk, M. D., C. L. Little, M. Lem, M. Fyfe, D. Genobile, A. Tan, J. Threlfall, A. Paccagnella, D. Lightfoot, H. Lyi, L. McIntyre, L. Ward, D. J. Brown, S. Surnam, and I. S. Fisher.** 2004. An outbreak due to peanuts in their shell caused by *Salmonella enterica* serotypes Stanley and Newport--sharing molecular information to solve international outbreaks. *Epidemiol Infect* **132**:571-7.
6. **Kotloff, K. L., J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, and M. M. Levine.** 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* **77**:651-66.
7. **Lee, H. C., K. L. Chen, C. L. Tsai, C. H. Chen, T. N. Yeh, C. R. Yang, Y. L. Wang, H. Y. Chiu, C. L. Lee, H. P. Su, and T. H. Lin.** 2004. Imported infection of *Shigella sonnei* molecular epidemiological investigation of cases of the Bali tours. *Epidemiology Bulletin* **20**:23-42.
8. **Liang, S. Y., H. Watanabe, J. Terajima, C. C. Li, J. C. Liao, S. K. Tung, and C. S. Chiou.** 2007. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol* **45**:3574-80. .
9. **Mahon, B. E., A. Ponka, W. N. Hall, K. Komatsu, S. E. Dietrich, A. Siitonen, G. Cage, P. S. Hayes, M. A. Lambert-Fair, N. H. Bean, P. M. Griffin, and L. Slutsker.** 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J Infect Dis* **175**:876-82.
10. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:3140-5.
11. **Sandt, C. H., D. A. Krouse, C. R. Cook, A. L. Hackman, W. A. Chmielecki, and N.**



- G. Warren.** 2006. The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multiserotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania. *J Clin Microbiol* **44**:3208-12.
12. **Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter, and R. V. Tauxe.** 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* **7**:382-9.
13. **Swaminathan, B., P. Gerner-Smidt, L. K. Ng, S. Lukinmaa, K. M. Kam, S. Rolando, E. P. Gutierrez, and N. Binsztein.** 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis* **3**:36-50.
14. **Terajima, J., N. Tosaka, K. Ueno, K. Nakashima, P. Kitsutani, M. K. Gaynor, S. Y. Park, and H. Watanabe.** 2006. *Shigella sonnei* outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. *Jpn J Infect Dis* **59**:282-3.
15. **Werber, D., J. Dreesman, F. Feil, U. van Treeck, G. Fell, S. Ethelberg, A. M. Hauri, P. Roggentin, R. Prager, I. S. Fisher, S. C. Behnke, E. Bartelt, E. Weise, A. Ellis, A. Siitonen, Y. Andersson, H. Tschape, M. H. Kramer, and A. Ammon.** 2005. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Dis* **5**:7.
16. **Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman.** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**:1136-51.

## 圖表

Table 1. The country sources of *Shigella sonnei* isolates used in this study

Country	No. of isolates	Year of isolation	Provider
Argentina	48	2001-2007	Dr. N. Binsztein
France	148	1943-2007	Dr. I. Filliol
Iran	52	2002-2003	Dr. R. Ranjbar
Italy	72	2001-2004	Dr. C. Mammina
Malaysia	64	1994-2000	Dr. K.-L. Thong
Senegal	46	1997-1998	Dr. A. Gassama Sow
Taiwan	1146	1996-2008	Taiwan CDC
Vietnam	52	2006-2007	Dr. P. D. Cam

Table 2. Geographical distribution of *S. sonnei* isolates used in this study.

Continent	Region	Source country	No. isolates
Africa	Central African	Central African Republic	1
		Chad	1
	East Africa	Kenya	2
		Tanzania	1
	Middle East	Egypt	3
	North Africa	Algeria	2
		Morocco	6
		Tunisia	1
	South Africa	Mayotte	1
	Southeast Africa	Madagascar	6
	West Africa	Burkina Faso	1
		Cameroon	2
		Ivory Coast	1
		Mali	2
		Nigeria	1
		Sao Tome and Principe	1
		Senegal	52
Asia	East Asia	China	6
		Taiwan	1100
	Middle East	Iran	52
		Israel	3
		Pakistan	1
		Turkey	1
	Middle East	Middle East	1
	South Asia	India	3
		Nepal	2
	Southeast Asia	Cambodia	8
		Indonesia	16
		Malaysia	65
		Myanmar	1
		Philippines	1
		Thailand	3
	Vietnam	62	
Europe	Central Europe	Poland	1
	North Europe	Denmark	1

		Sweden	8
	South Europe	Italy	70
	Southeast Europe	Greece	1
	Southwest Europe	Spain	1
	West Europe	France	73
North America	Caribbean	Cuba	1
		Haiti	1
	Central America	Guatemala	1
	North America	Mexico	1
		North America*	4
Pacific	South Pacific	Tahiti	1
	Southwest Pacific	New Caledonia	1
South America	South America	Argentina	48
		Brazil	1
		French Guyana	4
		Venezuela	1
Total			1628

\*Country name not available

Table 3. Allele diversity for 26 VNTR loci in various isolate sets.

Locus	Repeat unit (bp)	No. alleles	Argentina	France	Iran	Italy	Malaysia	Senegal	Taiwan	Vietnam	Total	MLVA type (n = 609)
SS3	7	30	0.76	0.94	0.86	0.80	0.93	0.84	0.86	0.91	0.90	0.94
SS6	7	30	0.88	0.93	0.81	0.87	0.85	0.87	0.81	0.86	0.88	0.94
SS1	7	17	0.80	0.79	0.77	0.77	0.47	0.74	0.59	0.82	0.76	0.86
SS9	6	17	0.80	0.88	0.85	0.68	0.88	0.75	0.59	0.79	0.72	0.85
SS11	6	9	0.50	0.76	0.58	0.39	0.74	0.23	0.60	0.50	0.70	0.77
SS10	6	10	0.73	0.73	0.63	0.26	0.75	0.00	0.56	0.47	0.68	0.72
SS13	6	6	0.66	0.66	0.14	0.44	0.42	0.00	0.28	0.58	0.40	0.58
SS7	7	3	0.49	0.50	0.50	0.22	0.50	0.00	0.41	0.00	0.48	0.49
SS24	168	4	0.41	0.54	0.00	0.28	0.43	0.00	0.22	0.44	0.31	0.46
SS5	7	3	0.38	0.50	0.00	0.26	0.40	0.19	0.25	0.41	0.32	0.45
SS12	9	6	0.38	0.54	0.00	0.26	0.72	0.00	0.21	0.41	0.29	0.44
SS22	11	4	0.38	0.51	0.00	0.30	0.43	0.00	0.21	0.44	0.29	0.43
SS15	6	4	0.38	0.54	0.00	0.26	0.42	0.00	0.21	0.41	0.29	0.43
SS20	40	2	0.38	0.49	0.07	0.26	0.40	0.00	0.21	0.41	0.29	0.42
SS19	5	4	0.41	0.48	0.00	0.26	0.44	0.00	0.21	0.41	0.28	0.41
SS17	6	3	0.38	0.47	0.00	0.26	0.44	0.04	0.21	0.41	0.28	0.40
SS16	17	3	0.38	0.43	0.00	0.26	0.48	0.00	0.25	0.11	0.27	0.40
SS23	16	7	0.38	0.42	0.00	0.03	0.62	0.04	0.23	0.38	0.26	0.37
SS2	9	3	0.38	0.42	0.00	0.26	0.47	0.23	0.18	0.00	0.22	0.33
SS4	7	3	0.41	0.39	0.00	0.26	0.45	0.00	0.18	0.00	0.21	0.32

SS21	18	4	0.39	0.42	0.00	0.26	0.47	0.00	0.16	0.00	0.21	0.31
SS18	5	5	0.38	0.31	0.04	0.05	0.47	0.00	0.17	0.00	0.19	0.28
SS25	135	3	0.30	0.37	0.00	0.26	0.44	0.00	0.12	0.00	0.17	0.27
SS14	9	4	0.39	0.32	0.00	0.00	0.32	0.00	0.17	0.00	0.18	0.26
SS26	101	5	0.00	0.27	0.00	0.03	0.43	0.29	0.07	0.41	0.12	0.24
SS8	60	4	0.00	0.41	0.00	0.24	0.34	0.00	0.03	0.00	0.09	0.21

---

Table 4. MLVA20 genotypes appearing in three or more countries.

Country	SS20.2	SS20.20	SS20.1	SS20.19	SS20.24	SS20.115	SS20.27	SS20.26	SS20.31	SS20.17	SS20.42	SS20.88	SS20.91
Algeria		1		1									
Argentina	4	9	10		2					1			
Brazil													
Burkina Faso		1											
Burma	1												
Cambodia	1						5	1					
Cameroon	1												
Central African Republic				1									
Chad			1										
China	4								1				
Cuba		1											
Denmark													
Egypt	2	1											
France	15	4	5	3		1				1	1	1	1
French Guyana	3												
Greece	1												
Guatemala													
Haiti													
India			2										
Indonesia				14									
Iran	25	2	21		2								

Israel	3										
Italy	47	8				1					
Ivory Coast	1										
Kenya											
Madagascar	1		1								
Malaysia	10		8						1		1
Mali				2							
Mayotte											1
Mexico											
Middle East	1										
Morocco	1		2								
Nepal				1		1					
New Caledonia											
Nigeria		1									
North Am.	2		1								
Pakistan											1
Philippines											
Poland			1								
Sao Tome and Principe											
Senegal	29				1	1					
Spain	1										
Sweden											
Tahiti											
Taiwan	181	2	704	1	1		21	5	3	1	



Tanzania														
Thailand	2	1												
Tunisia														
Turkey	1													
Venezuela													1	
Vietnam	28	5					6	2	1			1		
Total	365	36	756	23	6	4	32	8	5	3	3	3	3	3
No. country with the genotype	24	12	11	8	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3

Table 5. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster A.

MLVA (20)	Source country	1973	1983	1996	1997	1998	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
SS20.1	Argentina									1					
	Chad													1	
	France													1	
	India						1								
	Iran									1					
	Madagascar													1	
	Malaysia				1										
	Morocco												1		
	North Am.					1									
	Poland												1		
	Taiwan						1								
SS20.101	Morocco									1					
SS20.102	Argentina													1	
SS20.103	Argentina													1	
SS20.104	France	1													
SS20.105	New Caledonia				1										
SS20.106	Vietnam												1		
SS20.107	Vietnam													1	
SS20.108	Senegal					1									
SS20.109	Italy									1					

SS20.110	Kenya			1	
SS20.111	Argentina		1		
SS20.112	Taiwan			1	
SS20.113	Taiwan		1		
SS20.114	France	1			
SS20.115	France				1
	Italy				1
	Nepal				1
	Senegal			1	
SS20.117	Taiwan				1
SS20.118	Taiwan		1		
SS20.119	Senegal	1			
SS20.120	Taiwan			1	
SS20.121	Taiwan			1	
SS20.122	Iran		1		
SS20.123	Iran		1		
SS20.124	China				1
SS20.125	Indonesia			1	
SS20.126	Taiwan			1	
SS20.128	Senegal	1			
SS20.150	Morocco		1		
SS20.151	France				1
SS20.152	Cambodia				1
SS20.153	Taiwan				1
SS20.154	Indonesia				1

SS20.155	Sao Tome and Principe				1
SS20.156	France				1
SS20.157	Kenya				1
SS20.158	Taiwan				1
SS20.159	India				1
SS20.160	Taiwan				1
SS20.161	Taiwan				1
SS20.162	Taiwan				1
SS20.17	Argentina			1	
	France				1
	Taiwan				1
SS20.18	Taiwan	1			
SS20.19	Algeria				1
	Central African Republic				1
	France		1		
	Indonesia		1		
	Mali			1	
	Nepal				1
	Taiwan			1	
SS20.2	Argentina			1	
	Burma				1
	Cambodia		1		

	Cameroon									1
	China							1		
	Egypt									1
	France								1	
	French									
	Guyana						1			
	Greece									1
	Iran									
	Israel									
	Italy									
	Ivory Coast									
	Madagascar									
	Malaysia									
	Middle East									
	Morocco									
	North Am.									
	Senegal									
	Spain									
	Taiwan									
	Thailand									
	Turkey									
	Vietnam									
SS20.20	Algeria									
	Argentina									
	Burkina Faso									

	Cuba			1		
	Egypt	1				
	France				1	
	Iran			1		
	Italy		1			
	Nigeria					1
	Taiwan		1			
	Thailand				1	
	Vietnam					1
SS20.21	Mexico					1
	Senegal		1			
SS20.22	Italy			1		
SS20.24	Argentina				1	
	Iran				1	
	Senegal	1				
	Taiwan				1	
SS20.25	Senegal		1			
	Tunisia					1
SS20.26	Cambodia					1
	Taiwan					1
	Vietnam					1
SS20.27	Cambodia				1	
	Taiwan					1
	Vietnam					1
SS20.28	France					1

	Taiwan			1
SS20.29	Senegal	1		
	Taiwan			1
SS20.30	Taiwan		1	
SS20.31	China		1	
	Taiwan		1	
	Vietnam		1	

Table 6. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster G.

MLVA (20)	SourceCountry	1943	1944	1947	1958	1959	1973	1974	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2004	2005	2006	2007
SS20.10	Taiwan												1					
SS20.11	Argentina													1				
SS20.12	Taiwan												1					
SS20.13	Malaysia									1								
SS20.14	Haiti																	1
	Malaysia									1								
SS20.140	France																	1
	Madagascar														1			
SS20.141	France											1						
SS20.142	Madagascar											1						
SS20.143	France																	1
SS20.144	Tahiti																	1
SS20.145	Guatemala																	1
SS20.146	Senegal																1	
SS20.147	France																	1
SS20.148	France																1	
SS20.149	Brazil																	1
SS20.15	Malaysia											1						
SS20.16	Taiwan								1									
SS20.3	Taiwan													1				
	Tanzania														1			
SS20.63	Italy												1					



SS20.64	Sweden	1			
SS20.65	Italy				1
SS20.66	Sweden	1			
SS20.67	Sweden		1		
SS20.68	North Am.			1	
	Taiwan				1
SS20.69	Malaysia			1	
SS20.70	France		1		
SS20.71	Malaysia			1	
SS20.72	Malaysia		1		
SS20.73	France				1
SS20.74	Taiwan			1	
SS20.75	Cameroon		1		
SS20.76	Taiwan				1
SS20.77	Morocco				1
SS20.78	Argentina				1
SS20.79	Taiwan				1
SS20.8	France		1		
	Italy				1
SS20.80	Argentina				1
SS20.81	Malaysia		1		
SS20.82	Argentina				1
SS20.83	Taiwan				1
SS20.84	Taiwan			1	

SS20.85	France	1				
SS20.86	Italy				1	
SS20.87	France					1
	Madagascar		1			
SS20.88	France	1				
	Pakistan				1	
	Venezuela					1
SS20.89	France			1		
	Malaysia					1
SS20.9	Taiwan				1	
SS20.90	Malaysia		1			
SS20.91	France					1
	Malaysia			1		
	Mayotte					1
SS20.92	Malaysia		1			
SS20.93	Malaysia		1			
SS20.94	Malaysia		1			
SS20.95	Malaysia			1		
SS20.96	Taiwan		1			
SS20.97	Taiwan					1

Table 7. Distribution of MLVA20 genotypes within cluster F.

MLVA (20)	Source country	1943	1946	1963	1967	1974	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2004	2005	2006	2007
SS20.136	France													1			
SS20.34	Malaysia										1						
SS20.4	Taiwan							1									
SS20.41	Malaysia											1					
SS20.42	France				1												
	Malaysia									1							
	Vietnam																1
SS20.43	Malaysia												1				
SS20.44	Vietnam																1
SS20.45	Malaysia										1						
SS20.46	Vietnam																1
SS20.47	Malaysia												1				
	Taiwan								1								
SS20.48	Malaysia							1									
SS20.49	Malaysia									1							
SS20.5	Vietnam																1
SS20.50	Madagascar												1				
SS20.51	Malaysia										1						
SS20.52	Malaysia						1										
SS20.53	Philippines																1
SS20.54	France			1													

SS20.55	France	1		
SS20.56	Sweden	1		
SS20.57	Sweden		1	
SS20.58	France			1
SS20.6	Malaysia		1	
	Vietnam			1
SS20.7	France		1	
	Senegal		1	

Table 7. Distribution of MLVA20 genotypes within clusters B, C, D, E and H.

Cluster	MLVA (20)	SourceCountry	1943	2001	2002	2003
B	SS20.132	Argentina			1	
	SS20.133	Argentina			1	
	SS20.134	Argentina			1	
	SS20.135	Argentina			1	
	SS20.32	Argentina		1		
C	SS20.130	Sweden	1			
	SS20.131	Sweden	1			
	SS20.163	France				1
D	SS20.35	Denmark	1			
	SS20.36	Sweden	1			
E	SS20.33	Argentina			1	
	SS20.38	Argentina			1	
	SS20.39	Argentina			1	
	SS20.40	Argentina			1	
H	SS20.100	Taiwan		1		
	SS20.99	Taiwan		1		

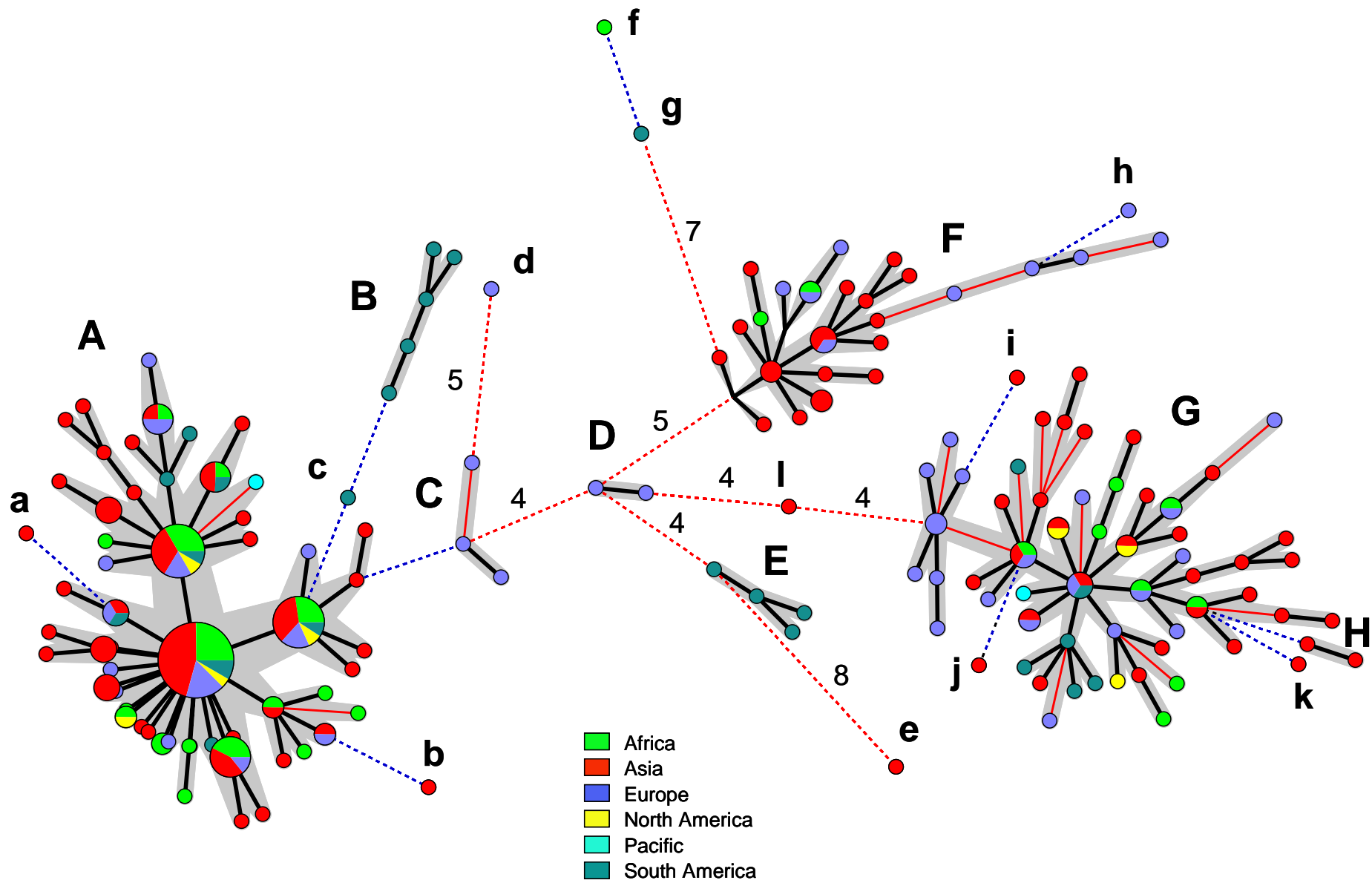


Figure 1. Phylogenetic tree of MLVA20 genotypes constructed using minimum spanning tree algorithm. Genotypes differing at 2 or less of the 20 VNTR loci were assigned to be a clonal group. Continents where the genotype originated are marked with colors. The area of circle is proportional to the number of countries detected with the genotype.

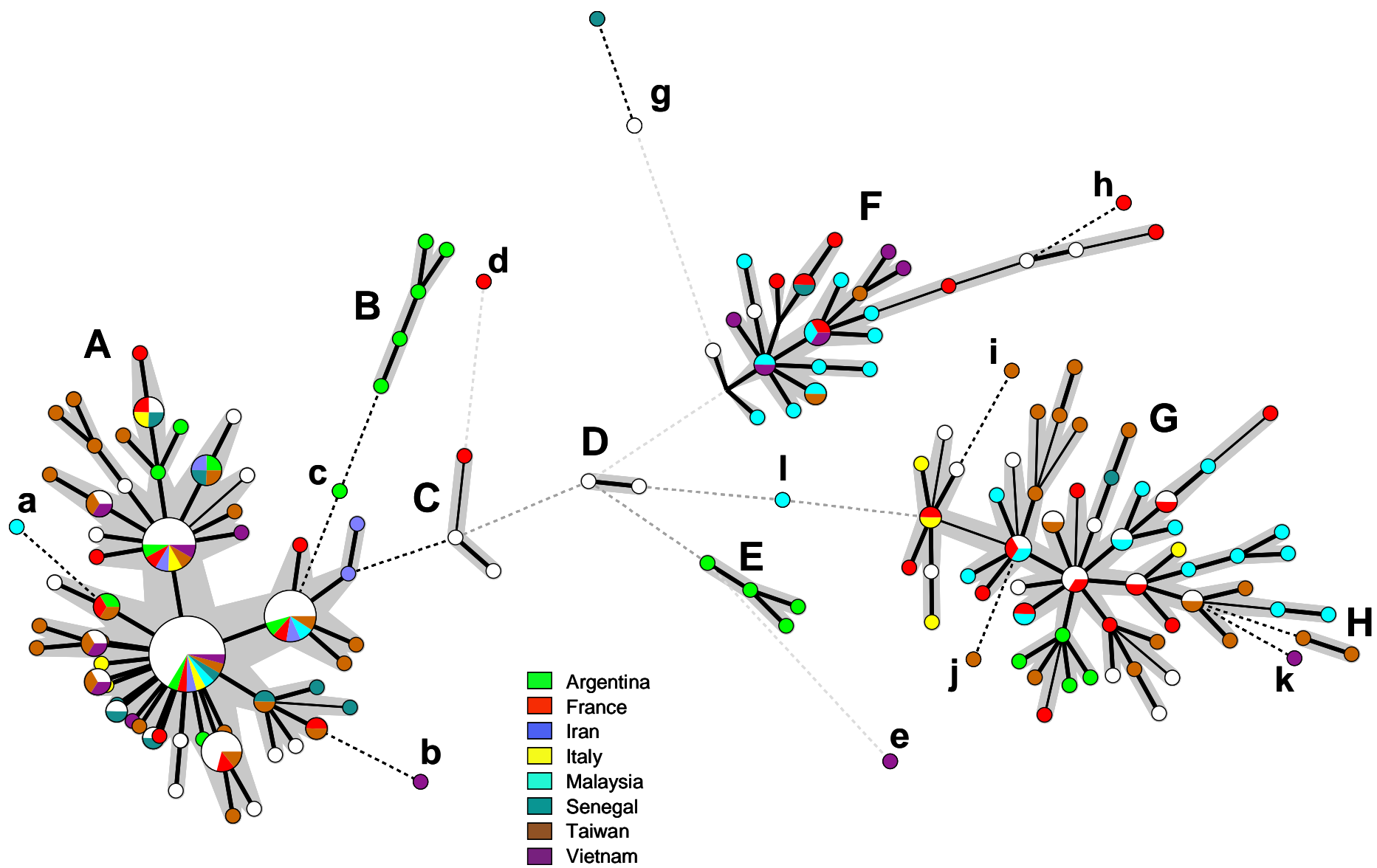




Figure 2. Phylogenetic tree of MLVA20 genotypes constructed using minimum spanning tree algorithm. Genotypes differing at 2 or less of the 20 VNTR loci were assigned to be a clonal group. Countries where the genotype originated are marked with colors. The area of circle is proportional to the number of countries detected with the genotype.