

計畫編號：DOH96-DC-2025； GRB 編號：PG9512-0048

行政院衛生署疾病管制局九十七年度計畫

發展與評估下世代之細菌分子分型技術：*Shigella flexneri*

MLVA 分子分型技術

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	5-6
二、本文	
(一)、前言	7-9
(二)、材料與方法	10-12
(三)、結果	13-16
(四)、討論	17-18
(五)、結論	19
(五)、結論	20
(六)、參考文獻	21-23
(七)、圖表	
Table 1. <i>Shigella flexneri</i> isolates used in this study	24
Table 2. Residency of <i>Shigella flexneri</i> infected persons	25
Table 3. VNTR candidates selected from the tandem repeat sequence loci explored by VNTRDB program from genomic sequences of <i>Shigella flexneri</i> serotype 2a strain 301, serotype 2a strain 2457T, serotype 5 strain 8401	26-28
Table 4. VNTR candidates selected from the tandem repeat sequence loci explored by VNTRDB program from genomic sequences of 3 <i>Shigella</i> species	29
Table 5. <i>Shigella flexneri</i> strains used to screen VNTR loci	30
Table 6. Locations, copy number, sizes of amplicons of 36 VNTRs in sequence strains, 301, 2457T and 8401	31-33
Table 7. Primers, dyes and multiplex PCR combinations	34-36
Table 8. Allele diversity of 36 VNTR loci for various serotype groups	37-38
Table 9. The discriminatory index (DI) and confidence interval	

(CI) of various typing methods for various serotype groups 39

Table 10. *Shigella flexneri* 4a isolates collected not in a psychiatric nursing center in I-Lee Township, Hualien County 40

Figure 1. Dendrogram constructed with PFGE patterns using UPGMA algorithm for the *Shigella flexneri* isolates and the associated information related to the bacterial isolates. The isolates were grouped into two major clusters, A and B. (A) the dendrogram for isolates in cluster A; (B) dendrogram for isolates in cluster A 41-42

Figure 2. Phylogenetic tree for 242 *S. flexneri* isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. Imported isolates were marked in red color and the ATCC strain (ATCC 700930) was marked in black color. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. MLVA types differing by three or less are regarded as a group and are marked in gray shadow. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The phylogenetic tree showed 5 major clusters, 4a, 6, 3a/3b, 1a/1b and 2a/2b. Each of groups 3a/3b and 2a/2b consisted of 2 subclusters 43

Figure 3. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 4a serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. Serotype for the genotype was indicated within the circle. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci,

dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolate indicated by number 5 and marked in red color was originated from Cambodia. The other 5 isolates, which were not recovered in a psychiatric hospital center in Hualien County, was numbered as those assigned for the isolates listed in Table 10 **44**

Figure 4. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 3a/3b and 1a/1b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The isolates originated from Cambodia in 3a/3b subcluster B was marked in red color. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolates recovered from outbreak A were colored in blue **45**

Figure 5. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 2a/2b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The imported isolates were colored in red and the ATCC strain was marked in black color. The other colors each indicated isolates recovered from an outbreak. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolates recovered from outbreak A were colored in blue **46**

摘要

關鍵詞： *Shigella flexneri*、分子分型、變異重覆序列分析、多位址基因序列分型、脈衝電泳、DNA 指紋圖譜資料庫、分子流行病學

本研究利用VNTRDB電腦軟體蒐尋已發表之3條*Shigella flexneri*、1條*S. dysenteriae*與2條*S. sonnei*基因體序列中，具變異的重覆序列(variable-number tandem repeat sequence, VNTR)潛力的位點(locus)，再經8株不同血清型菌株測試，確認了36個VNTR loci。總計有至少12種血清型242株菌株完成36個VNTR loci的多位址基因序列分型分析(multilocus VNTR analysis, MLVA)，這些菌株也同時完成脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)圖譜分析。MLVA之分型效力明顯高於PFGE，在90株2a菌株群組與107株4a菌株群組的比較，分析8個最多變異loci所得到的分型效力，即高於PFGE。MLVA資料所建立的親緣關係樹顯示，不同type factor antigens群組之菌株，有較遠距的親緣關係，而具同一type factor antigen但不同group factor antigens之菌株，有較親近的親緣關係，但在3a/3b群組中，有兩個具遠距關係的次群組，顯示MLVA具有區分菌株種源關係(clonal relationship)之功能；MLVA所建立的菌株親緣關係與利用PFGE圖譜所建立的關係相當一致。本研究結果指出，可挑選8個高變異的loci做為常規*S. flexneri*菌株分型工具，以供流行病學調查與疾病監測之用，而高達36個loci的MLVA資料，是探討菌株種源關係的有利工具。

Abstract

Keywords: *Shigella flexneri*, multilocus VNTR analysis (MLVA), variable-number tandem repeat (VNTR), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), DNA fingerprint database, molecular epidemiology

In this study, we explored the variable-number tandem repeat (VNTR) candidates from three released *Shigella flexneri*, one *S. dysenteriae* and two *S. sonnei* genomic sequences using the VNTRDB computer software. Thirty-six VNTR loci were confirmed by testing the candidates with 8 strains of different serotypes. A total of 242 isolates from at least 12 serotypes were characterized with the multilocus VNTR analysis (MLVA) on the 36 loci; the isolates were also genotyped with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). MLVA exhibited significantly higher level of discriminatory power than PFGE on the isolates tested. For the groups of 90 isolates of serotype 2a and 107 isolates of serotype 4a, the discriminatory power of by analyzing the 8 most variable loci was higher than PFGE. The phylogenetic relationship built with MLVA profiles revealed that strains with different type factor antigens had more distant relationship but strains with a common type factor antigen but different group factor antigens had closer relationship. There were two distinct subgroups were present in the 3a/3b group, suggesting that MLVA could be a useful tool to built the clonal relationship among *S. flexneri* strains. The phylogenetic relationship built with MLVA profiles was concordant with that built with PFGE patterns. The present study indicates that a panel of highly variable loci can be used to be routine subtyping method for outbreak investigation and disease surveillance and MLVA with as many as 36 loci can be a powerful tool for investigation of clonal relationship among *S. flexneri* strains.

前言

微生物病原分型方法(typing method)之研發，是病原微生物學者長期以來的研究焦點之一。對細菌病原菌株進行分型分析，可探討病原菌株間之親緣關聯性，因此可應用於探討菌株之演化關係與傳染病流行病學調查(6, 12)。由於分子生物學的發展，近年來所發展之各種分子分型(molecular typing)技術，在傳染病的流行事件偵測與感染來源追蹤上，已有相當成功的應用性；例如脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)，被美國疾病管制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)採用為標準的細菌分型方法，用於建立食因性疾病之實驗室分子分型即時監測網—PulseNet (23)，此監測網經過 10 年的驗證，證明成效卓著，因此 PulseNet 監測網已朝向全球化發展，建構成為全球性的食因性疾病監測網。

經由微生物學者之努力與實際的應用考驗，目前被廣泛應用之分子分型方法，主要有 multilocus sequence typing (MLST)與 PFGE，MLST 得到 DNA 序列資料，適合應用於分析菌株經由長期(數年或數十年)演化之親緣關係(1, 16)，但分析費用成本高昂，分型效力(discriminatory power)低，在傳染病爆發流行事件調查與感染來源追蹤之應用價值甚低；PFGE 則有很高的分型效力，經由技術改良，已大為降低分析成本與時間需求，經由許多實驗室的實際應用，發展在傳染病爆發流行事件調查與感染來源追蹤上，具有很高應用價值(5, 7)。然而，PFGE 仍有其侷限性，PFGE 在分析一些細菌如 *Salmonella* 某些血清型，例如 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 與 *S. Choleraesuis*，分型效果並不理想；但相對的，PFGE 在 *Shigella* 的分型上，則因 *Shigella* 的基因體變化太快，在菌株經由數個月(或經年)的流竄感染後，其 PFGE 基因型已有太多的變化，而難以勾連其種源(clonal)關聯性(26)。PFGE 另一缺點，是產生的結果為影像資料，需借助昂貴的電腦軟體進行分析，且圖譜資料容量大，不利資料的傳輸與應用，是建構全球性實驗室分子分型監測網的技術障礙。

近年來，學者研究發現細菌基因體中具有同向重覆序列(tandem repeat sequence)的存在，有些重覆序列在不同菌株中之重覆數目會有所差異，這種重覆序列變異位子

(variable number tandem repeat locus, VNTR locus)具有分型潛力，若找到多個 VNTR loci，即可顯現極高的分型效力，用於分析菌株間之親緣關係，做為傳染病監測的分型工具。在已研發成功的數個菌種中，發現這種多 VNTR 位子分析方法(multilocus VNTR analysis, MLVA)，具有和 PFGE 相當或更好的分型效力(18, 19)，且分析結果為數字資料，在資料之傳輸、比對上相對的容易，是一個非常具有潛力的分子分型方法，未來在一些菌種的分析上，可能取代 PFGE，成為 PulseNet 這類傳染病監測網的標準分型方法。但 MLVA 乃有缺點，MLVA 為菌種或血清型專一性(species- or serotype-specific)，每一種菌種或血清型，必需尋找一套獨特的 VNTR loci，例如 *S. Enteritidis* 的 VNTR loci 組合，無法應用於分析所有的 *Salmonella* 血清型，相對而言，PFGE 方法具有普遍性，使用 XbaI 為限制酶的 PFGE 方法，可分析所有 *Salmonella* 的血清型；目前，*Salmonella* 各血清型與其它食因性病原菌種如 *Shigella* spp.等之 MLVA 技術的研發工作，仍是微生物學者努力的課題。

桿菌性痢疾 (shigellosis)是由痢疾桿菌(*Shigella* spp.)所引起之急性腹瀉傳染病，為開發中國家主要的腹瀉疾病之一(11)，常見症狀有發燒、程度不等的下痢、噁心、嘔吐、痙攣以及粘液性血便等，且常出現無症狀感染者。該菌屬依其生化及抗原特性可分為四群，分別為 *S. dysenteriae* (A 群)、*S. flexneri* (B 群)、*S. boydii* (C 群)及 *S. sonnei* (D 群)。除了 D 群為單一血清型別(subserovar)外，根據傳統分類將 A、B、C 群可各細分為 15 種、13 種及 20 種血清型。在 *S. flexneri* 13 種血清型分別為 1a、1b、2a、2b、3a、3b、4a、4b、5a、5b、6、X variant 及 Y variant。但仍有一些屬無法分型者(nontypable)，然而科學的演進，有些無法分型菌株已陸續被鑑定為新的血清型別，近年來 *S. flexneri* 1c 在埃及(8)、孟加拉(24)、越南(22)等地流行，另外 *S. flexneri* 4c 亦被建議成為一新的血清型別(20)，*S. flexneri* 4c 報導曾在中國引發群聚感染(27)。

根據衛生署疾病管制局傳染病倉儲系統資料顯示，台灣於 2007 年桿菌性痢疾總確定數為 246 例，其中 45 例確認為境外移入病例，本土病例則為 201 例。分離之菌種以 *S. flexneri* 及 *S. sonnei* 為主，過去研究顯示，前者主要發現於山地鄉原住民部落間之流行感染(3)，後者則經常在平地鄉鎮地區引起群聚感染事件(15)，常見於人口密集機構如學

校、精神照護及安養中心、監獄、軍隊等；人與人之間的接觸傳染是最主要的傳播模式，經由污染的食物與飲水也常引發較大規模的流行(17)。而近年來，食品保存技術發達，國際食品貿易興盛，經由污染的食品引發的國際性桿菌性痢疾爆發流行時有所聞，例如 2007 年泰國出口的玉米筍曾造成丹麥與澳大利亞的 *S. sonnei* 感染流行事件(13)，或因飛機上提供之食物污染造成國際性痢疾群突發事件，例如 2004 年發生在日本與美國的 *S. sonnei* 群突發事件(25)。

S. sonnei 與 *S. flexneri* 是台灣桿菌性痢疾比較主要的菌種；*S. sonnei* 已有 PulseNet 的標準 PFGE 方法可供應用，但我們發現 PFGE 有時無法區別一些無流病關聯性的菌株。本實驗室去年發展了 *S. sonnei* MLVA 技術，該 MLVA 方法之分型效力高於 PFGE，能夠有效地區別那些 PFGE 無法區分的菌株，MLVA 分型結果也可有效應用於群突發事件之調查(14)。MLVA 的資料不但能夠用於流病調查與疾病的監測，亦可用於研究菌株的種源關係(clonal relationship)。由於 *S. flexneri* 也是引發台灣桿菌性痢疾的主要菌種，過去常在山地鄉引發流行，PFGE 是目前 *S. flexneri* 最有效率的分型方法，然而 PFGE 資料較不適合用於探討菌株之種源關係，因此有必要研發 *S. flexneri* 之 MLVA 方法，以取代 PFGE，同時也做為探討菌株種源關係之工具。

材料與方法

菌株來源：本研究共分析242株*S. flexneri*菌株，241株分離地點在台灣與1株美國ATCC菌株(ATCC 700930)。菌株收集時間為西元1995至2008年間，包括10個血清型(*S. flexneri*至少有13個血清型)與2株無法分型菌株(Table 1)。10個血清型當中，以4a (107株)與2a (90株)最多，菌株分離時間主要分佈在2005年與2006年。有18株菌株之感染地確定在國外，包括中國(6株)、印尼(4株)、柬埔寨(4株)、印度(3株)與埃及(1株) (Table 1)。感染個案之居住地包括台灣23個縣市中的17個縣市，當中以花蓮縣的141例最多，南投縣的24例次之(Table 2)；花蓮縣菌株以血清型4a (102例)為主，皆分離自玉里鎮的玉里榮民醫院，該院長期以來有桿菌性痢疾流行的問題，本批玉里榮民醫院4a菌株最早分離日期是2001年。

蒐尋鑑定 VNTR 位址：使用台灣大學資訊研究所高成炎教授實驗室所發展之VNTRDB 電腦程式(2)，蒐尋 *S. flexneri* serotype 2a strain 301 (GenBank accession no. AE005674)、*S. flexneri* serotype 2a strain 2457T (GenBank accession no. AE014073)、*S. flexneri* serotype 5 strain 8401 (GenBank accession no. CP000266)中重覆序列位址(tandem repeat loci)，在數量千餘個重覆序列位址中，挑出 50 具有 VNTR candidates—即重覆序列數目在 3 條基因體中有差異者(Table 3)。由於有些 VNTR loci 在 3 條基因體上可能沒有變異，為了儘可能找出最多的 *S. flexneri* VNTR loci，同時亦使用 VNTRDB 程式蒐尋 5 條不同 *Shigella* species 之基因體序列，包括 *S. flexneri* serotype 2a strain 301、*S. sonnei* strain SS046 (GenBank accession no. CP000038)、*S. sonnei* strain 53G (Wellcome Trust Sanger Institute [<http://www.sanger.ac.uk>])與 *S. dysenteriae* strain Sd197 (GenBank accession no. CP000034)，由蒐尋出之重覆序列 loci 中挑出 17 個 VNTR candidates，這些 candidates 在比對的兩條 *S. flexneri* 基因體序列中沒有變異，但在 *S. dysenteriae* 或 *S. sonnei* 之基因體序列有不同重覆序列數目(Table 4)。

Primers 之設計：VNTR candidate loci 兩側 200-bp 序列(5' & 3' flanking regions)為設計 primers 之序列標的。以免費軟體 Primer3 [<http://frodo.wi.mit.edu>] (accessed November, 1, 2009)蒐尋適當 primers。

備製細菌基因體 DNA：*S. flexneri* 菌株貯存於 -70°C 超低溫冷凍環境下。分析前，先培養於 tryptic soy agar，在 37°C 環境下培養 18 小時。第二天，取一接種環($10\ \mu\text{L}$)之菌體，於 $100\ \mu\text{L}$ TE buffer ($10\ \text{mM}$ Tris-Cl, $1\ \text{mM}$ EDTA, pH 8.0) 下製成細菌懸浮液， 100°C 加熱 10 分鐘，經由離心($3700\ \times\ g$) 10 分鐘後，將上層液移到新的 eppendorf 管備用。

VNTR locus 之篩選：利用 VNTRDB 總共挑選 67 個 VNTR candidates 進行 VNTR locus 之確認與篩選。67 個 VNTR candidate loci 使用免費軟體 Primer3 設計 primers，進行 PCR 增幅反應。PCR 操作如下：每一反應總體積 $10\ \mu\text{L}$ ，包括 UltraspecTM water ($5.5\ \mu\text{L}$)、 10% DMSO ($1\ \mu\text{L}$)、 10X buffer ($1\ \mu\text{L}$)、 $2.5\ \text{mM}$ dNTP ($0.8\ \mu\text{L}$)、 $2\ \mu\text{M}$ primers ($0.5\ \mu\text{L}$)、 $5\ \text{u}/\mu\text{L}$ Tag polymerase ($0.2\ \mu\text{L}$)、DNA extract ($1\ \mu\text{L}$)；PCR 反應乃以 95°C 加熱 5 min，再經 30 個循環反應(94°C 30s→ 54°C 45s→ 72°C 45s)，之後在 72°C 反應 10 min。PCR 產物以 eGene (現為 QIAxcel system)毛細管電泳儀(QIAGEN in Taiwan)進行 DNA 片段大小分析。每一 VNTR locus 以 8 株具遠距 PFGE 關係之不同血清型別菌株(Table 5)進行測試，各 VNTR candidate locus 若在此 8 株測試菌株中有重覆序列數目變異者，即視為 VNTR locus。確認之 VNTR locus 在下列情況下，將被排除：(1) PCR amplicons 超過 600-bp。PCR amplicons 係利用 Sequencer 決定其 DNA 片段大小來估算重覆序列重覆數目，Sequencer 精準分析之 DNA 片段大小有其侷限性；(2)VNTR locus 在基因體上有 1 個以上的 copies。

MLVA 分析：VNTR locus 篩選過程，由 67 個 VNTR candidates 中確定 36 個 VNTR loci (Table 6)，做為 MLVA 分析對象。MLVA 分析，將 36 個 VNTR loci 組合成 9 組 multiplex PCR 反應，其使用之 primer 序列、螢光種類、primer 濃度等，列於 Table 7。螢光 primers，由台灣之美商應用生命股份有限公司合成與 ABI 系統相容之螢光染料(6-FAM, NED, VIC 或 PET) (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)。每一 multiplex PCR 增幅反應中，每一反應物含有 $10\ \mu\text{L}$ PCR 混合液，混合液含有 $1\ \times$ PCR buffer， $3\ \mu\text{M}$ MgCl_2 ， 0.1 至 $0.2\ \mu\text{M}$ primers, $200\ \mu\text{M}$ each deoxyribonucleotide, 1.0 unit 的 recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan) 與 $1\ \mu\text{L}$ 的 DNA template。PCR 反應液置於溫度循環器 GeneAmp PCR System 9600 (Applied BioSystems)，以 $94\ ^{\circ}\text{C}$ 處理 5 min 後，再進行 30 次循環反應($94\ ^{\circ}\text{C}$

30s→54 °C 45s→72 °C 45s) ，再經72 °C反應5 min。

DNA 片段長度分析：具螢光之 PCR 反應溶液，先取 2μL PCR product + 98μL Ultraspec™ water 稀釋，取 1μL 已稀釋之 PCR product 置於 96 well reaction plate 與 Hi-Di 及 Liz 500 standards 混合(每個 well 內含 10μL Hi-Di™ Formamide + 0.1μL Liz 500 standards)，已稀釋(dilute)之 PCR product 再以 PCR thermocycler 於 95°C 加熱 5 min，之後放置在冰盒 5 min 冷卻，再以 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析其片段大小(以 GeneScan 500 LIZ Size Standard [cat # 4322682; Applied BioSystems]為參考標誌)。各樣本資料與 amplicons 長度資料，以 GeneScan Data Analysis Software ver 3.7 (Applied BioSystems)貯存分析，所有不同長度之 amplicons，皆經定序程序決定其重覆單元數目，DNA 定序以 ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit 反應，使用 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析。重覆單元數目以 Table 6 所列之 *S. flexneri* 2a str. 301 之 PCR amplicon 長度與 VNTR locus 重覆單元數為參照標準。

PFGE分析：所有菌株皆以標準化之PFGE方法(21)進行DNA指紋圖譜分析，唯本研究 *S. flexneri*之PFGE分析使用NotI取代XbaI。

資料分析：經由 amplicons 長度推估之重覆單元數目，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： $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$ 。MLVA 和 PFGE 之分型效力指數(discriminatory index)之歧異度指數(Simpson's index)的多樣性指標(diversity, D)和 95% 的信賴區間(confidence interval, CI)，以 Hunter 等人之公式計算(9, 10)。

結果

VNTR loci：總計有36個VNTR loci被確定，另有一個locus位於invasive plasmid，具有高度變異度，但因為invasive plasmid穩定度低，菌株經由繼代培養過程中，invasive plasmid經常消失，降低該locus之分型應用價值，故未將此locus列入MLVA分型方法中。36個VNTR loci中，有32個由3條*S. flexneri*基因體序列找出的VNTR candidates中經測試而確定，另外4個VNTR loci，在3條*S. flexneri*基因體序列中並無變異，是由5條3個*Shigella species*的基因體序列找出的VNTR candidates中經測試而確定(Table 6)。

36個VNTR loci中，其重覆單元長度介於3到178 bp之間(Table 6)，當中有10個loci之單元長度為6 bp最多；長度為3-bp的倍數者，總計有22個loci。14個loci在3條*S. flexneri*基因體序列中存在只有1個重覆單元(Table 6)。

在242株完成36個loci分析的菌株中，各locus之allele數目介於2-18個之間(Table 8)，有些alleles因為insertion或deletion，重覆單元數非整數，這些alleles以amplicons的長度表示，其數字皆大於100 (Table 8)。各locus在總數242株菌株之allele diversity介於0.02-0.77之間；然而各locus之變異性大小有血清型的差異，在90株2a血清型菌株群組中，有15個loci沒有變異；在107株4a菌株群組中則有23個loci沒有變異；只有8個loci在兩組2a與4a血清型群組菌株中皆有具有變異。2a血清型群組菌株之來源較多元(heterogeneous)，較能代表VNTR loci在2a血清型族群之變異度；在2a群組菌株中前8個變異度最大的VNTR loci，分別為SF6 (allele diversity為0.86)、SF3 (0.73)、SF4 (0.70)、SF7 (0.69)、SF9 (0.59)、SF27 (0.49)、SF8 (0.47)與SF11 (0.43) (Table 8)；變異最大的8個loci中，有6個(SF6、SF4、SF7、SF27、SF8與SF11)在4a血清型菌株中，沒有變異。4a群組菌株只有13個loci有變異，107株4a菌株中有102株有共同來源，這13個loci應該是4a血清型族群具高突變率的loci。在10 serotypes (共45株菌株)群組，大部份loci皆有高的allele diversity值，此45株菌株之來源相當多元化。

MLVA與PFGE分型效力：MLVA對總體242株菌株(Total群組)之分型效力，明顯比PFGE高，具有統計上的差異(95%信賴區間CI值無重疊) (Table 9)；對不同血清型族群而言，MLVA對2a群組與4a群組菌株，其分型效力亦明顯高於PFGE；對其它10個血清型的45株菌

株(10 serotypes)，其分型效力亦高於PFGE，但未有統計上明顯之差異。對2a群組，若只計算最高變異之8個loci (SF3, SF4, SF6, SF7, SF8, SF9, SF11, SF27)，MLVA之分型效力亦高於PFGE，但未有統計上之明顯差異。對4a群組，若只計算最高變異之8個loci (SF2, SF3, SF5, SF9, SF17, SF22, SF23, SF25)，MLVA之分型效力在統計明顯高於PFGE。

PFGE親緣關係分析：利用PFGE-NotI圖譜，以UPGMA演算法建構親緣關係樹。親緣關係樹顯現兩大群組，群組A包括血清型4a (107株)、3a (8株)、3b (4株)與Y (2株) (Figure 1A)；4a與1株Y血清型菌株有較近的親緣關係，3a與3b有近的親緣關係。107株4a菌株中，有102株分離自花蓮縣玉里鎮榮民醫院，該院精神療養院區長時期有1a和4a菌株的感染流行(12)。來自玉里鎮榮民醫院4a菌株分離時間為2001-2007年，其中2001年有1株、2005年13株、2006年84株與2007年4株。其它5株4a菌株，分離自4個縣市(Table 10)，其中1株源於東埔寨(菌株編號04-901-762456)與1999年在台中縣清水鎮分離之菌株(菌株編號：sh18247)與玉里榮民醫院流行菌株有較遠距親緣關係(Figure 1A)，另外3株分離自南投縣仁愛鄉(1997年與1999年)和台東縣延平鄉(2001年)之菌株，則位於玉里榮民醫院流行菌株群組中。Figure 1A顯示有2株3a與4株3b血清型菌株，有較近的親緣關係；然而另有6株3a菌株，與這6株3a/3b菌株有很相當遠的親緣關係(Figure 1B)。

Figure 1B顯示1a/1b菌株間和2a/2b菌株間有較近親緣關係。有些菌株分離自10個群突發事件(outbreaks)；分離自同一個群突發事件之菌株，有較近的親緣關係。群組2b/X的12株菌株中，只有1株2b菌株非分離自同一群突發事件；該事件於2008年3月發生在苗栗縣某精神專科醫院，菌株於3月26日到4月4日期間分離，同一群突發事件中，分離時間相差不到10天，菌株竟有如此大的基因圖譜變異，且出現不同血清型菌株，是相當奇特。

MLVA親緣關係分析：242株不同血清型菌株之36個VNTR loci資料，以MST演算法，建立其親緣關係樹 (Figure 2)，所建立之菌株親緣關係，與利用PFGE圖譜所建立之關係相當一致 (Figure 1)。依菌株分享之VNTR loci數目多寡、血清型別與流病關係，可將菌株可區分成4a、6、3a/3b、1a/1b與2a/2b等5個主要群組(Figure 2)；3a/3b可再區分成2個次群組(A與B)，兩次群組間相差15個loci；2a/2b群組亦可分成兩個次群組(C與D)，次群組C包含14株境外移入菌株，次群組D之所有菌株則皆屬本土菌株。

4a群組計有109株菌株，包括107株4a與2株Y血清型菌株。109株菌株中，有6株包括5株4a (Table 10)與1株Y血清型菌株，非分離自花蓮縣玉里鎮榮民醫院。分離自花蓮玉里榮民醫院之102株4a與1株Y血清型菌株，有相當緊密之親緣關係(Figure 3)，群組中之基因型間大多有1個locus的距離，有些有2個loci的距離；編號1(分離時間地點為1997年在南投縣仁愛鄉)、3 (1999年南投縣仁愛鄉)與4 (2001年台東縣延平鄉)之4a菌株基因型，與玉里榮民醫院分離之菌株有相當緊密之親緣關係，這些菌株也高度的PFGE圖譜相似度(Figure 1)；另外兩株4a菌株，1株(編號2)於1999年分離自台中縣清水鎮，另1株(編號5)是一位高雄縣鳳山市市民2008年在柬埔寨遭到感染入境；編號7之Y血清型菌株，與玉里榮民醫院群組菌株有較低PFGE圖譜相似度。玉里榮民醫院之4a與Y血清型菌株有很高的遺傳關聯性，推測Y血清型菌株可能由4a菌株所突變而來；Chen等人(4)曾進行*S. flexneri*血清轉換的分子機制研究，發現由同一病人分離之2a與Y血清型菌株，其差異只在glucosyltransferase gtrII 基因上的單一胺基酸的突變所導致。玉里榮民醫院分離之Y血清型亦可能由4a轉換血清型而來。

3a/3b群組具有兩個明顯的次群組(A與B)，這兩個次群組之PFGE圖譜亦有相當明顯的差異(Figure 1)。次群組B由3a與3b血清型菌株所組成，有1株3a與1株3b菌株有很高的PFGE圖譜與MLVA圖譜相同度，分享相同PFGE圖譜或只有1個VNTR locus的差距(Figure 1A & Figure 4)；次群組B的6株菌株皆為3a血清型，其中1株來自柬埔寨，雖然其PFGE圖譜和其它2株菌株有高相似度(Figure 1 B)，但和其它同次群組菌株之MLVA圖譜有高達8個VNTR loci以上的差異。

1a/1b群組中有6株1b菌株分離自同一突群發事件(outbreak A)，6菌株有5種MLVA型別，無明顯的主要MLVA型別，各型別間差異多為1個locus (Figure 4)。有1株1a與1株1b菌株只有1個locus的差異；和3a/3b一樣，1a/1b血清型可能很容易發生轉換。

2a/2b群組亦可分成2個次群組，次群組C包含2a、2b與X血清型菌株(Figure 5)，當中有14株菌菌株為境外移入，其中有6株來自中國、4株來自印尼、2株來自印度，其餘2株分別來自埃及與柬埔寨；次群組C亦包括3個群突發事件(outbreaks B, C 與 J)，群突發事件B與C皆有各自的共同MLVA型別，而群突發事件J之菌株包括2b與X血清基菌株，且有5種MLVA型別，有些菌株間最小差異高達4個VNTR loci。該事件於2008年3月發生在苗栗縣某

精神專科醫院，菌株於3月26日到4月4日期間分離，為何同一群突發事件中，分離時間相差不到10天，菌株竟有如此大的MLVA與PFGE基因圖譜變異，是難理解釋的；很有可能該菌株已在此醫院循環感染多時。

次群組D之菌株只有2a血清型，皆為本土菌株，菌株有的來自6個群突發事件(outbreaks D, E, F, G, H與I)，個別群突發事件菌株間，有相同MLVA型別，或只有1個locus的差異。

4a同源菌株之VNTR loci變異：由親緣關係樹分析，推論105株4a與1株Y菌株應屬同源，只有兩株4a菌株可排除同源。此106株菌株可用於評估36個loci中，那些可能具有高變異性。在36個loci中，有10個loci在106株菌株中有變異，分別是SF2 (變異指數0.27)、SF3 (0.58)、SF5 (0.11)、SF9 (0.06)、SF17 (0.47)、SF20 (0.02) SF22 (0.07)、SF23 (0.5)、SF26 (0.04) 與SF37 (0.06)，故SF2、SF3、SF17與SF23，應屬於4a血清型的高變異loci。

討論

本研究使用已被序列發表之3條*S. flexneri*與3條其它*Shigella* species基因體DNA序列，應用台大資訊所發展的電腦軟體VNTRDB，儘可能找出*S. flexneri*之VNTR candidates，再使用12種(包括nontypable) *S. flexneri*不同血清型的菌株進行測試，共確認了多達36個*S. flexneri*的VNTR loci。因為VNTR locus的分型層次是species-或serovar-specific，即有的locus只對某一species是為有變異的VNTR，對同一菌屬其它species則未必具有變異；有的locus只對某一serovars是VNTR，但對同一species其它serovars則沒有變異，不是VNTR。*S. flexneri*具有至少13個serovars，在研發階段，應儘可能找出可能的VNTR loci，再進一步利用大量不同血清型的菌株進行測試，以決定各種*S. flexneri*血清型中，那些loci是VNTR，與各VNTR在特定的血清型之變異度。

本研究分析了12種血清型共242株菌株，其中以90株2a血清型與107株4a血清型菌株最多，其它10種血清型共45株。107株4a菌株中，有102株是分離自發生院內流行的同一個醫院，其它5株菌株中的3株菌株之PFGE與MLVA基因圖譜分析，亦指出和該醫院之菌株是同源，因此只有2株菌株有較遠親緣關係，這些菌株只能測試具有較高突變速率的loci，無法測試整個4a族群中的VNTR loci與各allele的分佈和變異度。90株2a菌株，具有較多元來源(heterogeneous)，所決定之VNTR loci較能代表該2a族群；其它10種血清型，只有45株菌株，菌株量太少，不能真正確定有多少個loci是各別血清型的VNTR。

MLVA的分型效力明顯高於PFGE，若能使用少數VNTR loci即能擁有比PFGE一樣或更高的分型效力，就能取代PFGE應用在防疫監測上。MLVA的分析，搭配目前使用的ABI sequencer可偵測5個目標(5種螢光)，故每次可偵測4個樣本目標(保留一個螢光做為standard sizing markers用)；因此，實際應用上，8個loci可設計在2個multiplex PCR反應，2個runs的sequencer分析，可比PFGE更快速、經濟，可在短時間內分析大量菌株。本研究初步確定，2a與4a的8個高變異VNTR loci，其分型效力皆高於PFGE。由於不同血清型之高變異loci不同，對其它*S. flexneri*血清型的高變異loci，有待其它實驗室進行測試加以決定。台灣是桿菌性痢疾低度流行的國家，主要流行的*Shigella* 菌株是*S. sonnei*與*S. flexneri*，*S. flexneri*則以

2a血清型為主。因為缺乏足夠的*S. flexneri*其它血清型菌株，後續的測試工作，有待和東南亞各國、非洲等桿菌性痢疾高度流行的國家合作。

PFGE與MLVA的分析結果顯示，4a、1a/1b、2a/2b/X、3a/3b與6血清型菌株間有明顯遺傳上的距離，即具有不同type factor antigens的菌株，有較遠距的親緣關係，但有相同type factor antigen不同group factor antigens的菌株，則有較近的親緣關係。group factor antigens之轉換，可能相當容易，本研究顯示，有1株1a和1株1b菌株和1株3a與1株3b的菌株，彼此間只差一個VNTR locus (Figure 4)，另外亦可見2a和2b菌株，只差了4個loci，因此group factor antigens之轉換可能相當頻繁。另外，4a群組亦包括1株Y血清型菌株，2a/2b群組中X血清型引發的群突發事件(outbreak J)，亦由病人分離到1株2b血清型菌株，此菌株和另1株X血清型菌株有相同的MLVA圖譜，這種由4a轉變為Y或由2b轉變為X的變異，則是導因於type factor antigens的突變。過去Chen等人(4)曾報導1個2a轉變為Y的血清型轉換案例，在一起*S. flexneri* 2a引發的桿菌性痢疾群突發事件的追蹤案例中，1位病人在2個月期間持續排菌，最後血清型由2a轉變為Y (28)，分子生物學的研究証實，該血清型轉變是導因於glucosyltransferase gtrII基因的突變。我們的PFGE與MLVA的親緣關係分析結果亦指出，具相同type factor antigen但不同group factor antigens的*S. flexneri*，有較緊密的親緣關係，應有共同的VNTR loci，故可共同使用同一套VNTR loci；雖然*S. flexneri*至少有13種血清型，新的血清型或無法分型之血清型也被陸續報告出來，這些新型血清型菌株也造成程度不一的區域流行(8, 20, 22, 27)，但因為type factor antigens的種類只有6種，眾多的血清型皆屬此6種，推測只需要6套VNTR loci組合，即可應用於所有*S. flexneri*血清型的分析。

3a/3b群組菌株，可分成2個次群組，次群組間相差15個loci，差異相當明顯(Figure 2)；PFGE圖譜所建立的親緣關係樹亦顯示，此2個次群組有明顯的距離(Figure 1)，PFGE和MLVA所建立的親緣關係具有相當的一致性，而擁有36個VNTR loci的MLVA方法，具有分析clonal group的高應用性。

結論

本研究鑑定36個*S. flexneri*之VNTR loci，可用於尋找各血清型之不同變異程度的VNTR loci。MLVA分析結果，可用於建立菌株之親緣關係，亦可用於區別菌株進行流行病學調查與研究之用，其分型效力高於PFGE，在2a與4a群組菌株的測試中，8個高變異loci的結果，即可高於PFGE的分型效力，因此MLVA可取代PFGE，做為防疫上監測*S. flexneri*之用。雖然不同血清型之VNTR loci有差異，*S. flexneri*之亦至少擁有13種血清型，但具相同type factor antigen但不同group factor antigens的菌株，應可適用同一套VNTR loci；因此，在實際的應用上，6套VNTR loci的組合，應可滿足所有*S. flexneri*血清型的分型需求。

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：發展與評估下世代之細菌分子分型技術：*Shigella flexneri*

MLVA 分子分型技術

主持人：邱乾順

計畫編號：DOH96-DC-2025

1. 計畫之新發現或新發明

研發出 *S. flexneri* 之 MLVA 分型技術，可用於取代 PFGE 做為國際 PulseNet 監測網之分型工具，且其 MLVA 資料，可用於分析菌株之親緣關係，可應用於追蹤菌株之演化來源，做為流行病學研究的分子工具。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

國際 PulseNet 是美國疾病管制中心所建立之食因性疾病分子分型監測網，過去一切技術平台皆由美國疾病管制中心所建立。本研究之成果，將可進一步發展，以取代目前被使用之 PFGE 標準分型技術，在國際社會，有所貢獻。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

台灣 *S. flexneri* 主要流行於山地鄉的原住民部落，特別是南投縣之仁愛鄉與花蓮縣之秀林鄉。若利用本研究所發展的 MLVA 技術，可了解這些流行在不同山地鄉的菌株間之親緣關係，釐清 *S. flexneri* 在山地鄉之間的流行面貌。在台灣發生之本土 *S. flexneri* 菌株感染將愈來愈少，近年來發生之菌株大多是境外移入，本計畫所發展出來的 MLVA 技術，可做為國際共同監測 *S. flexneri* 的技術平台，推展國際合作。

參考文獻

1. *Neisseria* MLST Home Page [<http://pubmlst.org/neisseria>] (accessed January 4, 2007).
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. **Chen JH, C. C., Chen PC.** 2003. Molecular epidemiology of *Shigella* in a Taiwan township during 1996 to 2000. *J Clin Microbiol* **41**:3078-3088.
4. **Chen, J. H., W. B. Hsu, C. S. Chiou, and C. M. Chen.** 2003. Conversion of *Shigella flexneri* serotype 2a to serotype Y in a shigellosis patient due to a single amino acid substitution in the protein product of the bacterial glucosyltransferase *gtrII* gene. *FEMS Microbiol Lett* **224**:277-83.
5. **Chiou, C. S., W. B. Hsu, H. L. Wei, and J. H. Chen.** 2001. Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. *J Clin Microbiol* **39**:1048-56.
6. **Chiou, C. S., J. C. Liao, T. L. Liao, C. C. Li, C. Y. Chou, H. L. Chang, S. M. Yao, and Y. S. Lee.** 2006. Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infect Dis* **6**:25.
7. **Chiou, C. S., T. L. Liao, T. H. Wang, H. L. Chang, J. C. Liao, and C. C. Li.** 2004. Epidemiology and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol* **42**:3998-4006.
8. **El-Gendy, A., N. El-Ghorab, E. M. Lane, R. A. Elyazeed, N. I. Carlin, M. M. Mitry, B. A. Kay, S. J. Savarino, and L. F. Peruski, Jr.** 1999. Identification of *Shigella flexneri* subserotype 1c in rural Egypt. *J Clin Microbiol* **37**:873-4.
9. **Grundmann, H., S. Hori, and G. Tanner.** 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol* **39**:4190-2.
10. **Hunter, P. R.** 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* **28**:1903-5.
11. **Kotloff KL, W. J., Ivanoff B.** 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* **77**:651-666.
12. **Lee, Y. S., M. C. Liu, C. F. Ko, C. H. Lu, and Y. H. Tseng.** 2005. Molecular epidemiology of *Shigella flexneri* in a long-stay psychiatric nursing center during 2001 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**:1353-60.
13. **Lewis, H. C., M. Kirk, S. Ethelberg, R. Stafford, K. Olsen, E. M. Nielsen, M. Lisby, S. B. Madsen, and K. Molbak.** 2007. Outbreaks of shigellosis in Denmark and

- Australia associated with imported baby corn, August 2007--final summary. *Euro Surveill* **12**:E071004 2.
14. **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. .
 15. **Lin, C. S., T. K. Wang, C. L. Tsai, S. Y. Ho, C. L. Lee, H. Y. Chen, and T. M. Pan.** 2001. Analysis of relationships between several *Shigella sonnei* outbreaks in the Taoyuan area of Taiwan. *Epidemiology Bulletin* **17**:83-97.
 16. **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.
 17. **Mohle-Boetani JC, S. M., Finger R.** 1995. Communitywide shigellosis: control of an outbreak and risk factors in child day-care centers. *Am J Public Health* **85**:812-816.
 18. **Noller, A. C., M. C. McEllistrem, A. G. Pacheco, D. J. Boxrud, and L. H. Harrison.** 2003. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol* **41**:5389-97.
 19. **Pourcel, C., F. Andre-Mazeaud, H. Neubauer, F. Ramiise, and G. Vergnaud.** 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **4**:22.
 20. **Pryamukhina, N. S., and N. A. Khomenko.** 1988. Suggestion to supplement *Shigella flexneri* classification scheme with the subserovar *Shigella flexneri* 4c: phenotypic characteristics of strains. *J Clin Microbiol* **26**:1147-9.
 21. **Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett.** 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* **3**:59-67.
 22. **Stagg, R. M., P. D. Cam, and N. K. Verma.** 2007. Identification of newly recognized serotype 1c as the most prevalent *Shigella flexneri* serotype in northern rural Vietnam. *Epidemiol Infect*:1-7.
 23. **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.
 24. **Talukder, K. A., Z. Islam, M. A. Islam, D. K. Dutta, A. Safa, M. Ansaruzzaman, A. S. Faruque, S. N. Shahed, G. B. Nair, and D. A. Sack.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of provisional serotype *Shigella flexneri* 1c and clonal relationships with 1a and 1b strains isolated in Bangladesh. *J Clin Microbiol* **41**:110-7.
 25. **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.
26. **Wei, H. L., Y. W. Wang, C. C. Li, S. K. Tung, and C. S. Chiou.** 2007. Epidemiology and evolution of genotype and antimicrobial resistance of an imported *Shigella sonnei* clone circulating in central Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**:469-75.
27. **Zhang, W., J. C. Pan, D. M. Meng, R. Ye, and H. Q. Wang.** 2007. PFGE of *Shigella flexneri* 4c isolates from food-poisoning outbreaks and sporadic diarrhea patients. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **41**:50-3.
28. **邱乾順, and 李翠鳳.** 1997. 某少年觀護所桿菌性痢疾流行調查. *疫情報導* **第 13 卷**:371-385.

圖表

Table 1. *Shigella flexneri* isolates used in this study.

Serotype	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2003	2004	2005	2006	2007	2008	NA ^j	Total
1a			1				1				1				3
1b						2				6					8
2a	1	4	1	1	1 (1) ^a	2			1	48 (2) ^c	8	16 (7) ^d	6 (2) ^f	1	90 (12)
2b						1		1 (1) ^b					3 (2) ^g		5 (3)
3a							1			3		2 (1) ^e	2		8 (1)
3b			1								2	1			4
4a			1		2		2			13	84	4	1 (1) ^h		107 (1)
4b													1 (1) ⁱ		1 (1)
Non-typable										2					2
X													10		10
Y							1				1				2
6										1		1			2
Total	1	4	4	1	3 (1)	5	5	1 (1)	1	73 (2)	96	24 (2)	23 (2)	1	242 (18)

^a China; ^b China; ^c Cambodia (1), Indonesia (1); ^d China (3), India (2), Indonesia (2); ^e Cambodia (1); ^f China (1), Cambodia (1); ^g Egypt (1),

Indonesian (1); ^h Cambodia; ⁱ India; ^j ATCC 700930

Table 2. Residency of *Shigella flexneri* infected persons.

Serotype	高雄市	高雄縣	臺南市	臺南縣	彰化縣	臺中市	臺中縣	南投縣	苗栗縣	新竹市	新竹縣	桃園縣	臺北市	臺北縣	基隆市	花蓮縣	臺東縣	NA	Total
1a																2	1		3
1b		1		5				2											8
2a	1	6			1	2	2	26	1		1	2	2	4		34	3	5	90
2b	1			1			2		1										5
3a						1		2	1	1		1			1		1		8
3b							1	1								2			4
4a		1					1	2								102	1		107
4b			1																1
Nontypable					1		1												2
X									10										10
Y								1								1			2
6							1		1										2
Total	2	8	1	6	2	3	8	34	14	1	1	3	2	4	1	141	6	5	242

Table 3. VNTR candidates selected from the tandem repeat sequence loci explored by VNTRDB program from genomic sequences of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 301, serotype 2a strain 2457T, serotype 5 strain 8401.

Indices (Start–End)			Copy number				Pattern	Matches /
301	2457T	8401	301	2457T	8401	dif	Size	Indels %
3106840–3106949	3095532–3095587	3092653–3092699	12.22	6.22	5.22	7.00	9	100 / 0
909098–909109	903875–903892	767291–767308	2.00	3.00	3.00	1.00	6	100 / 0
1282413–1282611	1282112–1282488	1297107–1297305	1.11	2.11	1.11	1.00	178	100 / 0
2832848–2833037	2827433–2827716	1742507–1743379	2.02	3.02	1.02	2.00	94	98 / 0
1105540–1105570	4270986–4271043	1110707–1110737	1.14	2.14	1.14	0.99	27	100 / 0
1048053–1048061	1052269–1052277	1056631–1056645	1.50	1.50	2.50	1.00	6	100 / 0
1121816–1121823	1124692–1124699	1139885–1139896	2.00	2.00	3.00	1.00	4	100 / 0
1307681–1307716	1307531–1307566	1321598–1321645	6.00	6.00	8.00	2.00	6 or 12	76 / 0
1404218–1404230	742939–742947	1422903–1422915	3.25	2.25	3.25	1.00	4	100 / 0
1411792–1411894	2700263–2700315	0–0	2.05	1.05	0.00	1.00	50	98 / 0
1503201–1503221	1541550–1541570	1505628–1505666	2.33	2.33	4.33	2.00	9	100 / 0
1627362–1627390	1666964–1666992	2979232–2979248	2.41	2.41	1.41	1.00	12	100 / 0
1643653–1643676	1683257–1683289	1642761–1642784	2.66	3.66	2.66	1.00	9	100 / 0
1726368–1726412	1723829–1723858	2739085–2739114	3.00	2.00	2.00	1.00	15	93 / 0
1783984–1783999	1821682–1821697	1783292–1783323	1.62	1.62	4.00	2.37	8	100 / 0
1815154–1815655	1812670–1813171	2878648–2879008	3.56	3.56	2.56	1.00	141	100 / 0
1980470–1980480	1957099–1957109	1989147–1989152	2.20	2.20	1.60	0.60	5	100 / 0
2013474–2013482	1990100–1990108	2022145–2022159	1.50	1.50	2.50	1.00	6	100 / 0
2014554–2014577	1991180–1991203	2023231–2023247	3.42	3.42	2.42	1.00	7	90 / 0
2021836–2021866	1998462–1998520	2030506–2030536	1.10	2.10	1.10	1.00	28	100 / 0

2191828-2191884	2173326-2173382	2194110-2194184	3.16	3.16	4.16	0.99	18	80 / 0
2249755-2249767	2229151-2229163	2243405-2243423	2.16	2.16	3.16	1.00	6	100 / 0
2415189-2415202	2394619-2394632	2407742-2407760	2.79	2.79	3.79	1.00	5	100 / 0
244319-244334	247649-247664	249165-249174	2.66	2.66	1.66	1.00	6	100 / 0
2596144-2596163	2574251-2574270	2591958-2591983	3.33	3.33	4.33	1.00	6	100 / 0
2602152-2602207	2580259-2580314	2597972-2598003	2.33	2.33	1.33	0.99	24	100 / 0
2657390-2657419	2650951-2650980	2653067-2653106	6.00	6.00	8.00	2.00	5	100 / 0
2924609-2924635	2919274-2919290	2971584-2971600	2.70	1.70	1.70	1.00	10	100 / 0
3116928-3116942	3105564-3105578	3102685-3102706	2.14	2.14	3.14	1.00	7	100 / 0
3996256-3996306	822318-822350	787659-787709	8.50	5.50	8.50	3.00	6	100 / 0
4408247-4408258	4400417-4400425	4376829-4376840	4.00	3.00	4.00	1.00	3	100 / 0
4503901-4503946	4496033-4496078	4471718-4471799	1.27	1.27	2.27	0.99	36	100 / 0
4552030-4552041	4544156-4544167	4519106-4519113	3.00	3.00	2.00	1.00	4	100 / 0
4578870-4578879	4570993-4571002	4545941-4545960	1.00	1.00	2.00	1.00	10	100 / 0
498342-498358	498129-498145	542957-543009	1.88	1.88	5.88	4.00	9	100 / 0
630853-630864	626956-626967	675228-675239	4.00	4.00	4.33	0.33	3	100 / 0
632053-632075	628156-628178	676428-676442	2.87	2.87	1.87	1.00	8	100 / 0
7105-7118	7105-7118	7105-7184	2.33	2.33	13.33	11.00	6	100 / 0
746797-746805	742939-742947	2802448-2802460	2.25	2.25	3.25	1.00	4	100 / 0
817159-817166	813301-813308	853148-853161	1.33	1.33	2.33	0.99	6	100 / 0
882393-882408	4050380-4050395	4067314-4067323	2.66	2.66	1.66	1.00	6	100 / 0
885802-885877	880599-880674	919895-920048	1.94	1.94	3.94	1.99	39	86 / 5
935839-937694	4103658-4104547	3619938-3621310	3.83	1.83	2.83	2.00	482	96 / 0
2602886-2603004	2580993-2581111	2598682-2598744	2.12	2.12	1.12	1.00	56	100 / 0
373303-373313	3538293-3538303	368202-368208	2.75	2.75	1.75	1.00	4	100 / 0

660913-660926	3826976-3826989	3836633-3836642	3.50	3.50	2.50	1.00	4	100 / 0
705741-705749	701957-701965	750244-750259	1.28	1.28	2.28	1.00	7	100 / 0
2816643-2816696	2811252-2811281	1727226-1727249	8.83	4.83	3.83	5.00	6	97 / 2
3883519-3883557	708281-708319	3917644-3917664	6.50	6.50	3.50	3.00	6	100 / 0
2923013-2923060	2917678-2917725	2970015-2970035	5.33	5.33	2.33	3.00	9	97 / 0

Table 4. VNTR candidates selected from the tandem repeat sequence loci explored by VNTRDB program from genomic sequences of 3 *Shigella* species.

Locus	Copy number					Difference	Pattern size	Matches /Indels %
	<i>S. dysenteriae</i> str. Sd197	<i>S. flexneri</i> 2a str. 301	<i>S. flexneri</i> 2a str. 2457T	<i>S. sonnei</i> str. 53G	<i>S. sonnei</i> str. Ss046			
SSTR-C1	17.22	1.22	1.22	1.22	1.22	15.99	9	98 / 0
SSTR-C2	1.71	2.00	2.00	13.00	14.00	12.28	7	100 / 0
SSTR-C5	1.50	6.50	6.50	2.50	2.50	5.00	6	93 / 0
SSTR-C6	6.80	3.79	3.79	2.79	2.79	4.00	5	96 / 0
SSTR-C7	2.33	6.22	6.22	3.22	3.22	3.88	9	93 / 4
SF-11a	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	2.00	17	100 / 0
SSTR-C9	3.85	1.85	1.85	1.85	1.85	2.00	7	100 / 0
SSTR-C11	2.23	1.23	1.23	3.23	2.23	2.00	17	97 / 0
SF16a	3.75	1.75	1.75	2.25	2.25	2.00	8	95 / 0
SSTR-C13	2.55	4.22	4.22	3.22	3.22	1.66	9	86 / 10
SF14a	1.58	2.58	2.58	1.50	1.50	1.08	12	100 / 0
SSTR-C18	1.05	1.05	1.05	2.05	2.05	1.00	19	100 / 0
SSTR-C19	1.45	2.45	2.45	1.45	1.45	0.99	24	97 / 2
SFSTR-C2	0.00	7.59	7.59	3.59	3.59	4.00	5	91 / 8
SFSTR-C4	0.00	1.11	1.11	2.11	2.11	1.00	35	97 / 2
SF12a	9.02	7.02	7.02	7.02	7.02	2.00	39	88 / 2

Table 5. *Shigella flexneri* strains used to screen VNTR loci.

Strain code	Serotype	Yr. isolation	Source County	Source City
86e47955	1a	1997	臺東縣	關山鎮
sh19453	1b	2000	南投縣	埔里鎮
89e0199	2a	2000	花蓮縣	秀林鄉
sh19240	2b	2000	臺中縣	清水鎮
C05.0969	3a	2005	臺中市	北屯區
sh20907	3b	2000	南投縣	仁愛鄉
E05.0785	4a	2005	花蓮縣	玉里鎮
C05.1375	6	2005	臺中縣	潭子鄉

Table 6. Locations, copy number, sizes of amplicons of 36 VNTRs in sequence strains, 301, 2457T and 8401.

VNTR locus	Length of repeat unit (bp)	Strain 301			Strain 2457T			Strain 8401		
		Location	Number of repeat unit	Length of amplicon	Location	Number of repeat unit	Length of amplicon	Location	Number of repeat unit	Length of amplicon
SF1	6	909098-909109	2	242	903891-903908	3	248	767291-767308	3	248
SF2	178	1282397-1282574	1	294	1282112-1282467	2	472	1297091-1297268	1	294
SF3	6	3996256-3996303	8	179	3776951-3776980	5	161	3786522-3786569	8	179
SF4	6	2816650-2816691	7	204	2811285-2811302	3	180	2847109-2847120	2	174
SF5	94	2832848-2833035	2	286	2827459-2827740	3	380	2830844-2830937	1	192
SF6	9	3106840-3106947	12	250	3095559-3095612	6	196	3092653-3092697	5	187
SF7	5	2657390-2657419	6	208	2650977-2651006	6	208	2653067-2653106	8	218
SF8	9	2923013-2923057	5	211	2917704-2917748	5	211	2970015-2970032	2	184
SF9	9	1643653-1643670	2	228	1683282-1683308	3	237	1642761-1642778	2	228
SF10	6	3883519-3883554	6	150	3891055-3891090	6	150	3917644-3917661	3	132

SF11	17	3416399-3416449	3	227	3406574-3406624	3	227	3378282-3378332	3	227
SF12	39	886809-887080	7	384	881622-881893	7	384	920980-921251	7	384
SF13	24	2602152-2602199	2	198	2580285-2580332	2	198	2597972-2597995	1	174
SF14	12	517804-517827	2	199	513696-513719	2	199	561120-561144	2	199
SF15	27	3501665-3501691	1	156	4270991-4271044	2	183	3463579-3463605	1	156
SF16	8	354277-354284	1	166	353412-353419	1	166	388376-388383	1	166
SF17	28	2021810-2021837	1	173	1998462-1998517	2	201	2030479-2030507	1	173
SF19	6	1048053-1048058	1	217	1052285-1052290	1	217	1056631-1056642	2	223
SF20	4	1121816-1121823	2	246	1124708-1124715	2	246	1139885-1139896	3	250
SF21	12	1627362-1627385	2	179	1666989-1667012	2	179	1595095-1595106	1	167
SF22	141	2791628-2792050	3	647	2786262-2786684	3	647	2878756-2879037	2	506
SF23	7	2014554-2014574	3	206	1991206-1991226	3	206	2023231-2023244	2	199
SF24	18	2191828-2191881	3	246	2173352-2173405	3	246	2194110-2194181	4	264
SF25	5	2415189-2415198	3	244	2394645-2394654	3	244	2407742-2407756	4	249
SF26	6	244319-244330	2	201	247649-247660	2	201	249165-249170	1	195
SF27	6	2596144-2596161	3	242	2574277-2574294	3	242	2591958-2591981	4	248

SF28	10	4578870-4578879	1	174	4571020-4571029	1	174	4545941-4545960	2	184
SF29	3	630330-630338	3	234	626449-626457	3	234	674702-674713	4	237
SF30	8	632053-632068	3	222	628172-628187	3	222	676428-676435	2	214
SF31	6	7105-7116	2	173	7105-7116	2	173	7105-7182	13	239
SF32	6	817159-817164	1	174	813317-813322	1	174	853148-853159	2	180
SF33	39	885802-885879	2	203	880615-880692	2	203	919895-920050	4	281
SF34	56	2602886-2602997	2	244	2581019-2581130	2	244	2598683-2598737	1	188
SF35	4	3946251-3946262	3	181	3826976-3826987	3	181	3836606-3836613	2	177
SF36	7	705741-705747	1	235	701973-701979	1	235	750244-750257	2	242
SF37	6	2013477-2013482	1	235	1990129-1990134	1	235	2022148-2022159	2	241

Table 7. Primers, dyes and multiplex PCR combinations.

Multiplex PCR sets	Locus	Primer sequence (5' to 3') ^a	Working conc. (μM)	T _m (°C)
1	SF35	GGGTGAAGGTGCCAAAGTTA 6-FAM-ATGAGCGGTCAACAGGTTCT	0.1	54
	SF26	GAAGAAGTGGAAAGGCGTTG NED-AATCACCTTCGTTGTCAGG	0.1	54
	SF7	PET-CCGGA ACTATTGGTCTGGAA ATCGACCACATGTTCAATGG	0.1	54
	SF29	VIC-GTTATGCGCCGTTATCACC GTTAACATCACCGCGAAGGT	0.1	54
2	SF1	6-FAM-GGGATTTAGGGGGAGATCAG CTGGTTTTGCTGATGCGTTA	0.1	54
	SF32	NED-CCGCAGCAAGGGACTATTT GCGTTCCGATAACCAGTTGAT	0.1	54
	SF10	PET-CKGGAACCGTTTTGTATCAG AAGGACGCACGTCAAATACC	0.1	54
	SF22	VIC-CTGATGGCGAAGGAGAAGAA AAGGGAGTATGCGGTCAAAA	0.2	54
3	SF19	6-FAM-CGTGGATGATTGTGGTTCTG AGGATCGCATCGATAAAAACG	0.1	54
	SF27	NED-CTGCTGCACACCTTAAACCA AGGTGATTACGTGCCAGTCC	0.1	54
	SF31	PET-CCCGCCAGTAATATCAGCAT CAGCGCAGTATGTTTTCCAA	0.1	54
	SF12	VIC-GAATTTTCGCCAATGAAAGC GTCGCCATTACGCATCAAC	0.1	54
4	SF4	6-FAM-CCGAGGAACAGTACGCTTTT CCTGCTGGCTTACCACACC	0.1	54
	SF15	NED-CCCACCTTTTGATTCTGGATAA GCCATAAACAATCCA ACTGTGA	0.1	54
	SF25	GAGCAGGGATCCGTCATTTA PET-CGTGATGATTTCCGAGGTGT	0.2	54
	SF3	VIC-TTTTAGCATGGTTATTCTCCTTG GCGATGCTGGAAAACTGAT	0.1	54
5	SF36	6-FAM-AAGCAACGGACAACGAGAAT GGAAGAGCGAGAACGCATAC	0.1	54

	SF8	NED-GCCAGAGCTGTTGGTACTGG CGATTTTTGTCCGCTGAAAG	0.1	54
	SF16	PET-GTACGCGGAAATCCTGAAGA GTGATCCCACATGACATCCA	0.1	54
	SF13	VIC-AAATTGCCCGCAGYAAAGTG AAACCGCCAGCAAATAAAG	0.1	54
6	SF9	6-FAM-CAAATGGTAACGTCGCATCA ATGGGATTGCTGCGTAACAC	0.1	54
	SF17	NED-GAGATCCTGATGCGTCGTTT GGAATRAACGTCAACGAGGT	0.1	54
	SF2	PET-GGGCAA AATTAGCTCGGAGT GCCAAAGGGAGCAGACTGTA	0.1	54
	SF33	VIC-GGTTACCCACAGCAGTCACA TGTGGAGCAA AAGTGGATTG	0.1	54
7	SF28	6-FAM-TTCTCAGGCACAAAGTGACC CGCTTGATATGAGCGTGAAA	0.1	54
	SF14	NED-GCCGCCGGATTTATCTTTAT CAATTTGTTTCGGCATCGTAA	0.1	54
	SF34	PET-AATATTATCGGCGGTGCAGT CGTATTCTTCGCCATTCCAT	0.1	54
	SF30	VIC-AGCGAAGAGAGCGACAAGAT TGAGATGCACCTCTTCCTCA	0.1	54
8	SF24	6-FAM-CTGGATGTTCTGGCGTACCT CCACCGGTTAAGCCAAATAA	0.1	54
	SF23	NED-TGTTGT TAACTCGCCGTTCA CTGTTGCTGCACAGTCTTCA	0.1	54
	SF21	PET-TCTCCTGACCTTGGGTATCG AGACCGAAGCGTAAGACCAA	0.1	54
	SF11	VIC-AAGCAAGCCTTAGCAATCTTTG TCTGCATTCACTTCTTCTACCG	0.1	54
9	SF37	6-FAM-TTCAGCAATCTTTCCGATCA CCCGCTGATAATTCACCTGT	0.1	54
	SF5	NED-GTCACTCTCGTCTGGGGAAT GCGGGAACGGACTGT TAAAT	0.1	54
	SF6	PET-GAAATACTCAGGTGTCAACATTCG GCTTTGGAGAGTATTATTGCCTGT	0.1	54
	SF20	VIC-AATCTGGCCAATGCCTCTAC CAACCTGAATGCTGCCATTA	0.1	54

^a 6-FAM, NED, PET and VIC are ABI patented fluorescent dye

Table 8. Allele diversity of 36 VNTR loci for various serotype groups.

VNTR locus	No. alleles	Range of copy number ^a	2a (n=90)	4a (n=107)	10 serotypes (n=45)	Total (n=242)
SF1	5	0-4	0.04	0.00	0.72	0.56
SF2	4	1-3, 283	0.02	0.29	0.20	0.51
SF3	12	2-18	0.73	0.60	0.79	0.77
SF4	12	1-12	0.70	0.00	0.83	0.70
SF5	6	0-3, 155, 161	0.16	0.11	0.68	0.64
SF6	18	0-19	0.86	0.00	0.84	0.76
SF7	9	2-12	0.69	0.00	0.50	0.62
SF8	7	2-8	0.47	0.00	0.71	0.65
SF9	8	1-9	0.59	0.07	0.74	0.61
SF10	5	1-6	0.16	0.00	0.71	0.61
SF11	3	1-3	0.43	0.00	0.65	0.62
SF12	5	2-8, 389	0.00	0.02	0.41	0.54
SF13	3	1-3	0.28	0.00	0.12	0.44
SF14	4	0-3	0.02	0.00	0.68	0.56
SF15	2	1-2	0.02	0.00	0.44	0.49
SF16	2	1-2	0.00	0.00	0.37	0.50
SF17	2	1-2	0.31	0.47	0.08	0.49
SF19	2	1-2	0.02	0.02	0.35	0.50
SF20	3	0-3	0.00	0.02	0.08	0.02
SF21	3	0-2	0.06	0.00	0.62	0.22
SF22	5	0-4	0.21	0.07	0.60	0.57
SF23	5	0-9	0.00	0.50	0.51	0.64
SF24	4	3-4, 241, 258	0.00	0.00	0.65	0.53
SF25	10	0-11	0.14	0.19	0.45	0.23
SF26	4	0-3	0.00	0.04	0.70	0.57
SF27	4	2-4, 241	0.49	0.00	0.62	0.62
SF28	2	1-2	0.00	0.00	0.47	0.50
SF29	2	3-4	0.00	0.00	0.43	0.50
SF30	2	2-3	0.00	0.00	0.44	0.49
SF31	4	2-11	0.00	0.00	0.24	0.05
SF32	2	1-2	0.00	0.00	0.44	0.49
SF33	3	2-4	0.00	0.00	0.58	0.15
SF34	3	1-3	0.34	0.00	0.13	0.49
SF35	2	2-3	0.00	0.00	0.47	0.50

SF36	3	0-2	0.00	0.00	0.54	0.53
SF37	3	0-2	0.00	0.04	0.47	0.50

^a Some alleles have no perfect copy number and are indicated by the amplicon lengths of the alleles assigned by the numbers larger than 100.

Table 9. The discriminatory index (DI) and confidence interval (CI) of various typing methods for various serotype groups

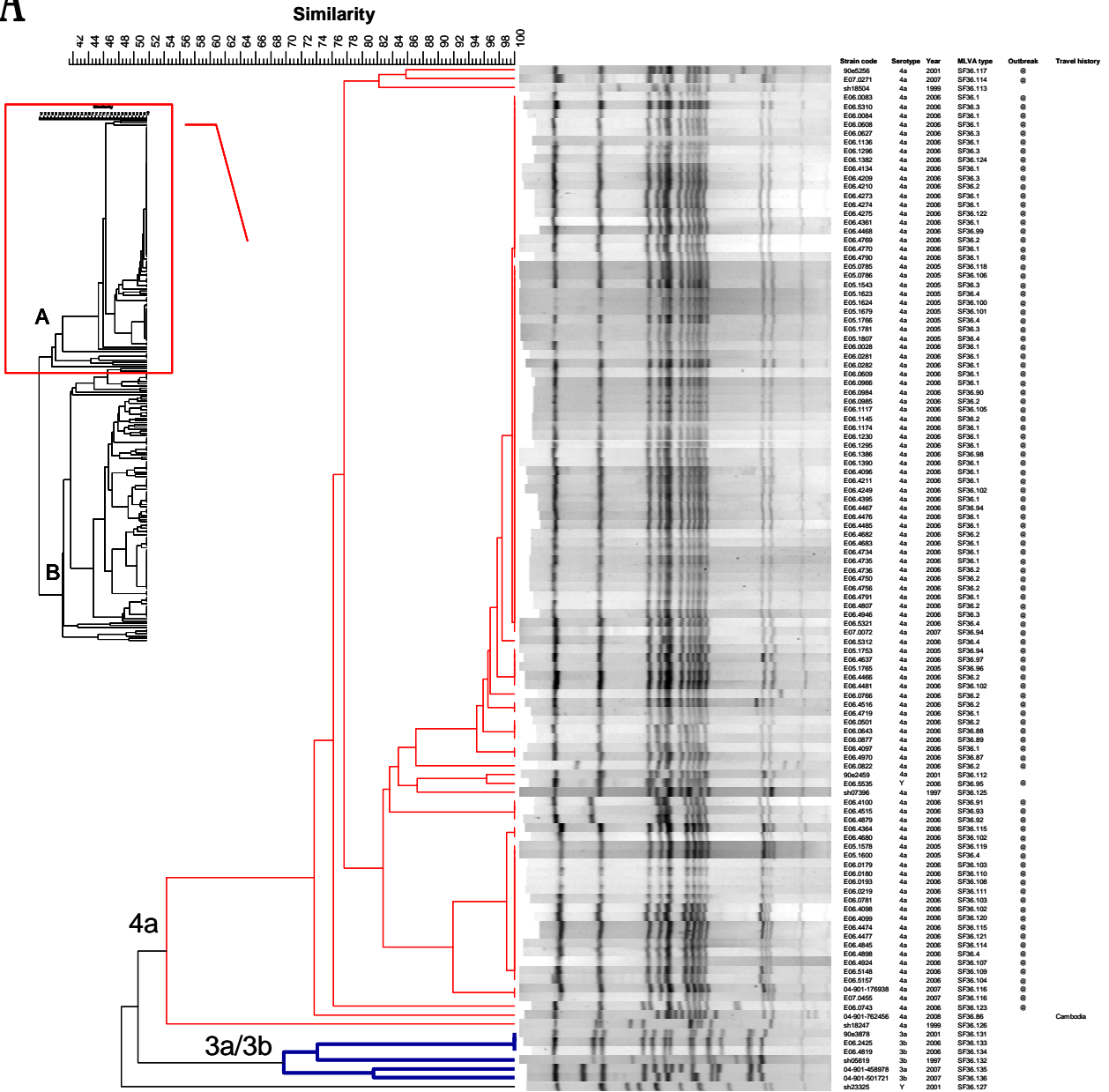
Typing method	2a (n=90)			4a (n=107)			10 serotypes (n =45)			Total (n=242)		
	No. types	DI	CI	No. types	DI	CI	No. types	DI	CI	No. types	DI	CI
PFGE	43	0.9416	0.9096-0.9735	17	0.7367	0.6768-0.7967	35	0.9798	0.9578-1.0018	95	0.9401	0.9221-0.9580
MLVA (36) ^a	59	0.984	0.9754-0.9927	44	0.8975	0.8540-0.9411	40	0.9919	0.9803-1.0035	143	0.9776	0.9676-0.9877
MLVA (8)	51	0.9778	0.9682-0.9874	40	0.8965	0.8533-0.9397	NA	NA	NA	NA	NA	NA

^a The number in parenthesis indicates the number loci included in the MLVA typing panel. The 8 loci in MLVA (8) are SF3, SF4, SF6, SF7, SF8, SF9, SF11, SF27 for the 2a group; SF2, SF3, SF5, SF9, SF17, SF22, SF23, SF25 for the 4a group.

Table 10. *Shigella flexneri* 4a isolates collected not in a psychiatric nursing center in I-Lee Township, Hwalien County.

No.	Strain code	Year	PFGE-NotI-pattern	SF_MLVA type	Source county	Source city
1	sh07396	1997	JZXN09.0095	SF36.125	南投縣	仁愛鄉
2	sh18247	1999	JZXN09.0097	SF36.126	臺中縣	清水鎮
3	sh18504	1999	JZXN09.0096	SF36.113	南投縣	仁愛鄉
4	90e2459	2001	JZXN09.0055	SF36.112	臺東縣	延平鄉
5	04-901-762456	2008	JZXN09.0289	SF36.86	高雄縣	鳳山市

A



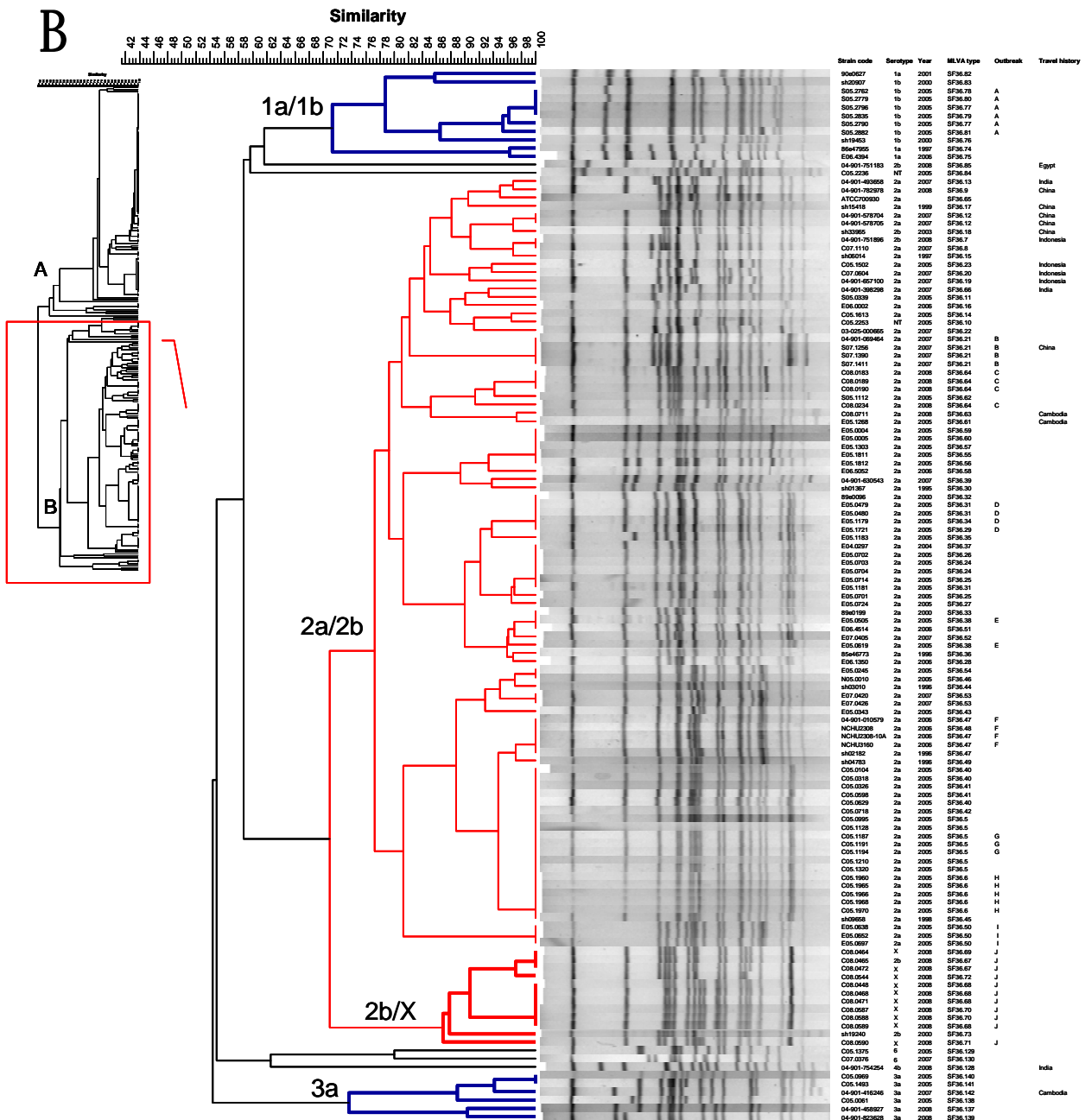


Figure. 1. Dendrogram constructed with PFGE patterns using UPGMA algorithm for the *Shigella flexneri* isolates and the associated information related to the bacterial isolates. The isolates were grouped into two major clusters, A and B. (A) the dendrogram for isolates in cluster A; (B) dendrogram for isolates in cluster B.

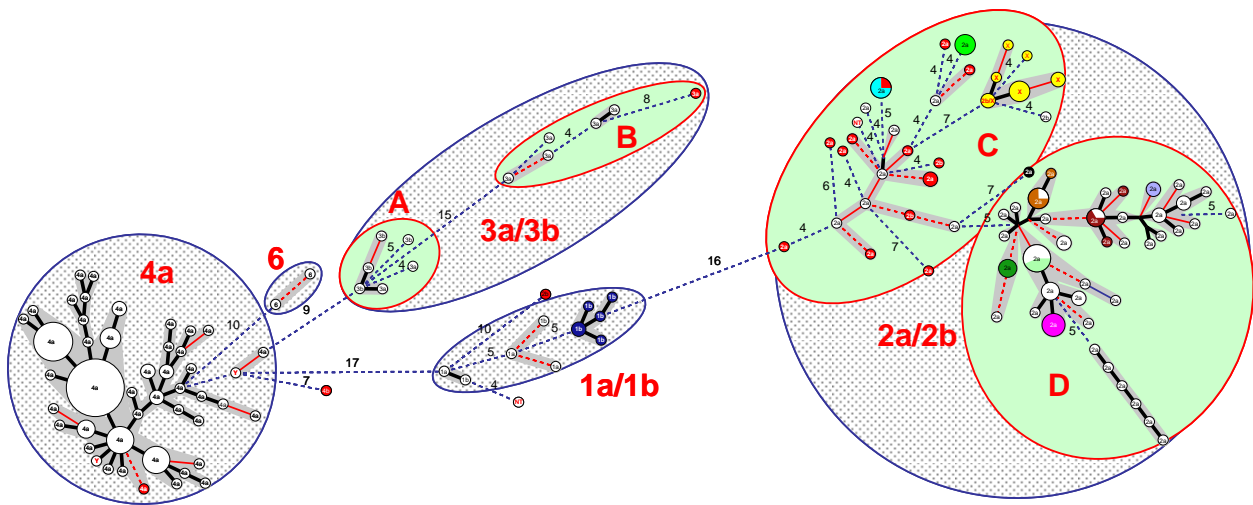


Figure 2. Phylogenetic tree for 242 *S. flexneri* isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. Imported isolates were marked in red color and the ATCC strain (ATCC 700930) was marked in black color. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. MLVA types differing by three or less are regarded as a group and are marked in gray shadow. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The phylogenetic tree showed 5 major clusters, 4a, 6, 3a/3b, 1a/1b and 2a/2b. Each of groups 3a/3b and 2a/2b consisted of 2 subclusters.

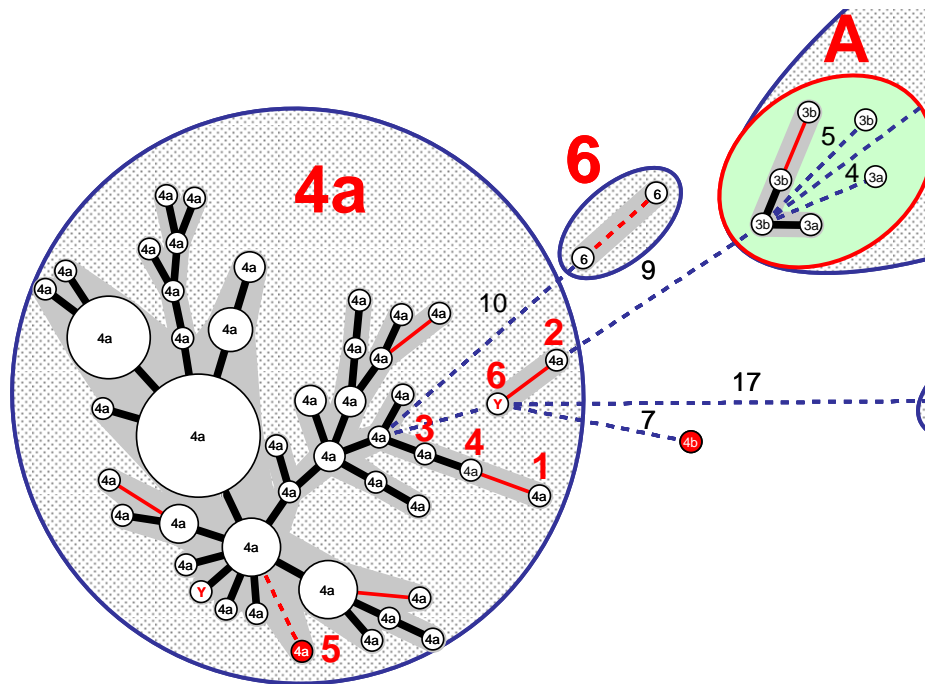


Figure 3. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 4a serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. Serotype for the genotype was indicated within the circle. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolate indicated by number 5 and marked in red color was originated from Cambodia. The other 5 isolates, which were not recovered in a psychiatric hospital center in Hualien County, was numbered as those assigned for the isolates listed in Table 10.

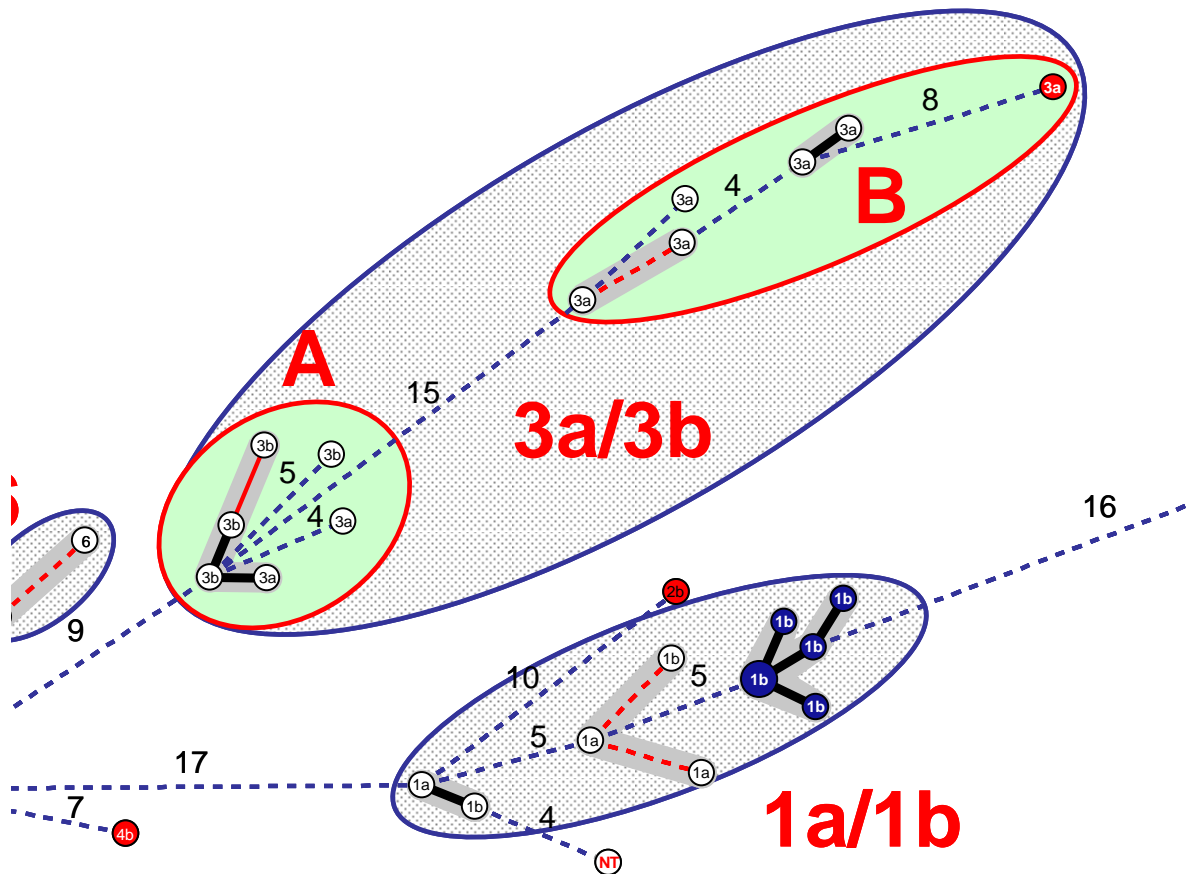


Figure 4. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 3a/3b and 1a/1b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The isolates originated from Cambodia in 3a/3b subcluster B was marked in red color. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolates recovered from outbreak A were colored in blue.

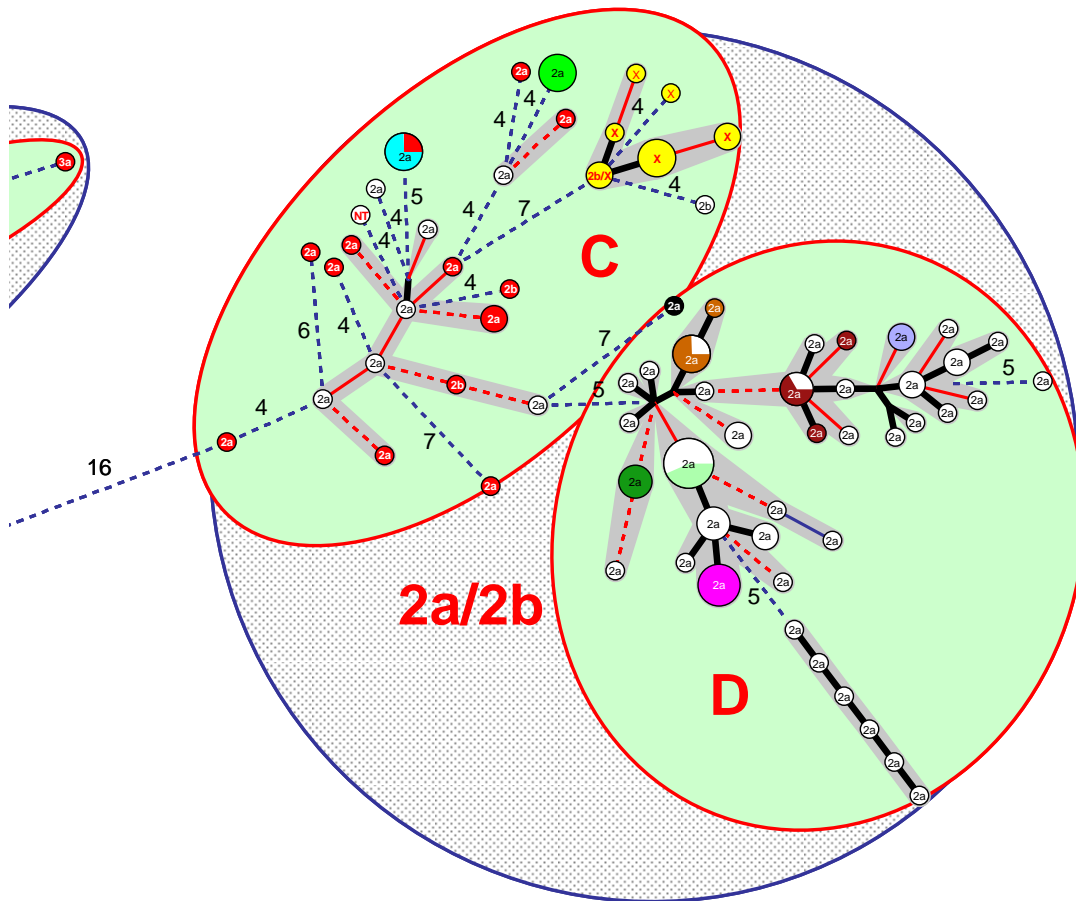


Figure 5. Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 2a/2b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The imported isolates were colored in red and the ATCC strain was marked in black color. The other colors each indicated isolates recovered from an outbreak. Differences of loci between two MLVA types are indicated by bold black line for 1 locus, red line for 2 loci, dash red line for 3 loci and blue line for 4 or more loci and the differences are numbered. The isolates recovered from outbreak A were colored in blue.