

計畫編號：DOH93-DC-2042

行政院衛生署疾病管制局九十三年度自行研究計畫

Shigella sonnei 同源分離株基因體之分子演化研究

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：魏孝倫、王佑文、廖璿程、李俊青、蔡麗淑

執行期間：93年1月1日至93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、中英文摘要	2-3
二、本文	
(一)、前言	4-6
(二)、材料與方法	7-9
(三)、結果	10-18
(四)、討論	19-22
(五)、參考文獻	23-25
(六)、圖表	
圖一、IS-PCR 反應產物在 2.0% agarose 膠片.....	26
圖二、IS 圖譜、圖譜親緣關係樹狀圖、IS 基因.....	27
圖三、IS1 族群之 PFGE 圖譜、圖譜之親緣關係.....	28-29
圖四、IS3 族群之 PFGE 圖譜、圖譜之親緣關係.....	30
圖五、IS6 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係.....	31
圖六、IS7 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係.....	31
圖七、IS11 族群之 PFGE 圖譜、圖譜親緣關係.....	32
圖八、IS23 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係.....	32
圖九、IS25 族群之 PFGE 圖譜、圖譜親緣關係.....	33
表一、1996-2004 年間各 IS 型別數量分佈.....	34
表二、相同 PFGE 圖譜不同 IS 型別之族群.....	35
表三、J16N09.0015 族群.....	35
表四、J16N09.0018 族群.....	36

摘要

關鍵詞：*Shigella sonnei*、分子分型、IS-PCR 分型法、脈衝電泳分型法、台

灣實驗室分子分型監測網

在本研究，我們發展一個以 PCR 為基礎，稱為 IS-PCR 的新分型技術，可快速進行 *Shigella sonnei* 的基因分型。應用 IS-PCR 與 PFGE 分型法，分析 920 株收集於 1996-2004 年之 *S. sonnei* 分離株，以研究這些經歷多年流行之菌株的族群演化。IS-PCR 分型法自 920 株分離株中鑑定出 30 種 IS 型別，大部份的 IS 型別只短暫地存在，有 5 個 IS 型別的菌株存在 2 年或以上的時間，另有 4 個型別間歇性地出現。最盛行的 IS 基因型是源於印度的 IS1，該族群佔了所有測試菌株的 78%，自 2000 年開始，總數 713 株的 IS1 分離株中已存在 90 多個 PFGE 圖譜，這些 PFGE 基因型具高度歧異度，圖譜間之最小相似度甚至低至 55%，雖然 IS1 族群發展出許多 PFGE 基因型，但只有少數基因型能存在 2-3 年時間。演化現象也在一些具相同 PFGE 圖譜的分離株中被觀察到，例如 J16N09.0015 族群即存在 IS1、IS11、IS17、IS18 和 IS23 基因型，這些具不同 IS 型別的分離株，彼此無時間和地點的流病關聯性。本研究結果呈現，搭配分型效力較低的 IS-PCR 和分型效力高的 PFGE 方法分析 *S. sonnei* 分離株，可有效地從已歷經流行多年的菌株中鑑定出各個同源群組，在結合流行病學資料之下，更可具體描述疾病的傳播型式。

ABSTRACT

Keywords: *Shigella sonnei*, molecular subtyping, IS-PCR, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), PulseNet Taiwan

In this study, we developed a new PCR-based subtyping technique, called IS-PCR, for rapid genotyping of *Shigella sonnei* isolates. A total of 920 *S. sonnei* isolates collected from 1996 to 2004 were subtyped using both IS-PCR and PFGE to investigate clonal evolution among strains circulating for years. IS-PCR identified 30 IS types from the 920 isolates. Most of IS types circulated in a short time, five appeared in 2 or more year period, and four appeared intermittently. IS1, originated from India, was the most prevalent type, representing for 78% of the tested isolates. Since 2000, more than 90 PFGE patterns had developed among 713 IS1 isolates. These PFGE genotypes were highly divergent, the least similarity among the PFGE patterns was only 55%. Although numerous PFGE genotypes emerged, only few genotypes could exist for 2-3 years. Evolution was also observed among groups of isolates with identical PFGE patterns. For example, the J16N09.0015 family contained isolates of IS1, IS11, IS17, IS18 and IS23 genotypes. Isolates of these IS genotypes were collected from various geographic area in various time. This study demonstrates that subtyping of *S. sonnei* isolates by both less discriminatory IS-PCR and high discriminatory PFGE methods can be effective to identify clonal groups among isolates through circulation for years and, accompanying with epidemiologic data, can clearly delineate transmission patterns of the disease.

前言

Shigella spp.是桿菌性痢疾(shigellosis)之病原，具有高度傳染性，只要10~100個病原體即可能造成感染(5)，引發嘔吐、發燒、下痢或伴隨血便等腸道症狀，在衛生條件落後的地區特別容易引發流行，台灣桿菌性痢疾病例不多，每年約在200-600例之間，但偶有大型爆發流行事件，導致病例數大量增加，例如2001年病例數即超過1,300例。*Shigella* spp.有*S. dysenteriae* (group A)、*S. flexneri* (group B)、*S. boydii* (group C)與*S. sonnei* (group D)等四菌種(1)，在台灣以*S. flexneri*與*S. sonnei*為主要流行菌種，*S. dysenteriae*與*S. boydii*甚為罕見，偶見於境外感染案例，其中*S. flexneri*流行區域以山地鄉為主，*S. sonnei*不常出現，但偶在西部城鎮地方校園引發大型爆發流行事件(9,10)。傳染病的防治重點在追查感染源和疾病傳播途徑，故*S. flexneri*與*S. sonnei*在流行面貌上的差異，很值得探究；過去曾對台灣中部與東部地區 shigellae 菌株進行系統性的 PFGE 分型研究(15)，2004年又執行「台灣實驗室分子分型監測網計畫」，曾對全國 shigellae 菌株進行即時 PFGE 分析(14)，這些研究結果指出，台灣*S. flexneri*主要在南投縣仁愛鄉、花蓮縣秀林鄉與卓溪鄉、宜蘭縣大同鄉與南澳鄉等山地鄉某原住民族居住之部落流行，菌株有共同演化來源，而*S. sonnei*主要為境外移入來源，例如2001年導致桿菌性痢疾大流行之菌株，即為來自印度的*S. sonnei*菌株(15)。

脈衝電泳分型法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)是目前細菌分子分型法中最具有分型效力(discriminatory power)的方法，是傳染病流行事件調查分析菌株間關聯性的最有利工具，更被美國疾病管制中心採用，做為「實驗室分子分型即時監測網—PulseNet」計畫之標準分型方法(12)，在食因性疾病特別是 *Escherichia coli* O157 的監測上，成果卓著。PFGE 高分型效力的優點，反而不適觀察菌株的長期演化；PFGE 技術是分析細菌基因體結構變化的方法，由於有些細菌例如 shigellae 之基因體變化相當快速，經常分離自同一爆發流行事件(outbreak)的菌株，圖譜即有差異(差異 1-3 條 DNA 片段之圖譜)出現，故 PFGE 很不適於研究菌株在流行多年後的基因體變化結果，無法對傳染病的流行進行長期的觀察，做出正確的解釋(interpretation)，故有必要尋找其它的方法，以補 PFGE 之不足。

本研究發展一套基於 insertion sequence 1 (IS1)序列的分型方法，即利用 *S. sonnei* 基因體含有數十套 IS1 的特性(2)，在 IS1 序列兩端設計 primers，利用 PCR 增幅兩 IS1 間之 DNA 片段(inter-IS1 DNA fragment)，此亦為 DNA 增幅多形性(amplified length fragment polymorphism)技術之一種；因 primers 的序列和 IS1 序列是 100%相同，故應能比其它 DNA 增幅多形性方法，具有更高的專一性與再現性。本研究發展出來新的 IS-PCR 分型方法，同時應用 IS-PCR 分型法並搭配 PFGE 分型法，分析 920 株 1996-2004 年間分離自

全國(以中部和東部地區最多)之 *S. sonnei* 菌株，探討菌株之族群演化情形，並應用流行病學資料，探究 *S. sonnei* 痢疾傳播之形式。

台灣地理上有海洋的天然屏障優勢，病原不易入侵而顯見單純，加上防疫追蹤體系健全，可掌握完整之菌株和流病資料，這些條件非常有利於本研研的執行。

材料與方法

菌株來源：菌株由醫療院所檢驗室分離後，依照傳染病防治法規定，送至衛生署疾病管制局(疾管局)北、中、南、東區實驗室鑑定，或各縣市衛生局採集疑似病例檢體，送至疾管局各區實驗室培養分離。1996-2004 年東部地區大部份菌株皆送至本實驗室，2004 年包括北部與南部菌株也集中送至本實驗室。菌株以 15% glycerol 保存於-75°C 超低溫冷凍櫃，並將菌株之流病資料以電腦建檔。流病基本資料來自通報醫療院所填寫之「傳染病個案(含疑似病例)報告單」，與當地衛生所人員填寫之「防疫檢驗檢體送驗單」。資料包括病人之姓名、性別、出生年月日、居住地、發病日期、採檢日期、臨床症狀、投藥情形、與旅遊記錄。

PFGE 操作：使用美國疾病管制中心 PulseNet 的標準方法(6)，進行 shigellae 菌株之包埋、菌體分解、膠體清洗工作和進行 PFGE 電泳分析，以 *Salmonella Braendrup* H9812/XbaI 之基因體 DNA 片段當做分子參考標誌，*S. Braendrup* H9812 由美國疾病管制中心 PulseNet 計畫負責人 Dr. Bala Swaminathan 所贈。唯本研究使用 NotI 取代美國疾病管制中心標準操作程序所使用的 XbaI，由於 XbaI 切割 *Shigella* 基因體成為較小較多的片段，電泳不易清楚分離，且圖譜不易分析，多年的研究經驗易指出 NotI 產生之圖譜，已足以敏感地區別 shigellae 菌株。PFGE 圖譜以數位相機(1792 x 1200

pixels)拍照，貯存為 TIFF 影像檔。

IS-PCR 操作：將菌培養於 Blood Agar，37°C 培養 16 小時後，取一顆菌落製成 1 ml 懸浮液(濃度為 $2-5 \times 10^8$ 菌體/ml)，每一 PCR 反應，加入 1 ul 懸浮液($2-5 \times 10^5$ 菌體)，做為 template。根據 IS1 的序列(11)，由兩端向外設計 primers，為 IS1a：5'CTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAG3' 與 IS1b：5'CGGTGGAGCTGCATGACAAAGTCATCGGGC3'。使用 Takara Shuzo Co.的 ExTaq™ long-PCR 的套組進行反應，反應條件為 94°C，5 分鐘處理後，再進行 25 個循環的 94°C 30 秒 → 68°C 8 分鐘。PCR 反應產物以 2 % agarose 膠片(15 cm x 20 cm，20 膠孔)分離，每隔 5 個膠孔(樣本)放置 1 分子參考標誌(100 bp DNA Ladder, Gene Teks, Taipei, Taiwan)，在 0.5% TBE buffer、200 volts 下，電泳 70 min。電泳完成後，以 ethidium bromide (1 mg/l) 染色後，在 UV 燈座上呈色，以數位像機(1792 x 1200 pixels)拍照，貯存為 TIFF 影像檔。

DNA 圖譜分析：PFGE 圖譜和 IS 圖譜以 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)分析軟體將圖譜常態化、建檔，並與菌株之流病資料連結，做成可應用 BioNumerics 比對型式之圖譜資料與資料庫。IS 圖譜解之讀，因傳統電泳方法不足以清楚解析大於 3 kb 之 DNA 片段，另 IS-PCR 增幅大於 3 kb DNA 片段之效率不穩定，且使用之分子參考標誌之大小範圍為

0.1–3 kb，故只有在此範圍之 DNA 片段才選定為有效之 DNA 片段，供比對分析。

結果

IS-PCR 分析：本研究使用的 PCR 反應條件，能有效地增幅出清楚的多形性 DNA 片段圖譜(圖一)。所測試的 920 株 *S. sonnei* 菌株，IS-PCR 的可分型率(typability)達 100%，且再現性(reproducibility)高，雖然仍會出現一些較模糊的 DNA 條帶，但條帶有明顯濃度差異，並不太影響判斷；因為使用 long-PCR 的條件增幅 DNA 片段，故 DNA 片段可達 3 kb 以上，只是 3 kb 以上之 DNA 片段不易在 2% agarose 膠中，應用傳統的電泳方法加以分離，且使用之分子參考標誌(molecular size markers)範圍為 0.1-3 kb，所以只有在此範圍內之 DNA 條帶才被選取做為比較標的。

IS 型別之親緣關係：由測試的 920 株菌株，鑑定出 30 個 IS 型別，以 UPGMA 演算法和 Dice similarity 係數建構圖譜之親緣關係，可得到三個明顯的群組—即群組 A、B 與 C(圖二)，群組內 IS 型別間之親緣關係，由文章後面之資料證明 IS3、IS4、IS14、IS25 和 IS26 具演化關聯，故群組 A 屬於 IS3 族群；IS1、IS2、IS11、IS17、IS18、IS23 和 IS30 具演化關聯，故群組 B 屬於 IS1 族群。

1996-2004 年期間 IS 型別之分佈：IS 型別之時間分佈列於表一。各 IS 型別中，以 IS1 的 713 株最多，佔所有分離株之 78%，其次為 IS3 有 62 株。各 IS 型別出現時間可分成三類組：1)出現時間短暫(少於 1 年)，有 21 種 IS

型別屬這一類，2)流行 2 年或更長時間，例如 IS3、IS25、IS27 和 IS30，3) 間歇性出現，例如 IS6、IS7、IS11 和 IS23；IS11 菌株流行 4 年後消失了 3 年，於 2003-4 年再度出現。

IS1 族群：具 IS1 圖譜之分離株有 713 株，菌株首次出現於 2000 年 3 月，由一名荷蘭籍人士在印度遭受感染，入境台灣後發病，在台中縣某醫院被分離。IS1 菌株在 2000 年 10 月底引發花蓮縣四維高中桿菌性痢疾爆發流行事件，全年有 67 株分離株屬 IS1 族群，隨後 2001-2002 年，IS1 菌株在台灣北、中、東部各地引發流行，分別有 451 株和 180 株分離株，至 2003 年流行消退，該年只有 13 株 IS1 分離株，其中有 3 株來自中國與印尼；2004 年只有 2 株 IS1 分離株，來自印尼和越南，故自 2004 年開始，沒有本土的 IS1 菌株流行。

IS1 菌株在四年間(2000-2003 年)演化出許多 PFGE 基因型，包括 2004 年境外移入之菌株，總計 713 株分離株擁有 95 種 PFGE 圖譜(圖三)。以最先的印度來源分離株為指標菌株，指標菌株之 PFGE 圖譜為 J16N09.0019，共有 227 株分離株擁有 J16N09.0019 圖譜，佔所有 IS1 族群之 32%。除了指標基因型外，尚有一些 PFGE 基因型存在較多分離株且橫跨流行 3 年，包括 J16N09.0022、J16N09.0023、J16N09.0026、J16N09.0028 與 J16N09.0039；大多數 PFGE 基因型只存於少數菌株，這些基因型在很短時間內即消失。

PFGE 圖譜之變化，是以指標菌株之圖譜為中心，由 PFGE 圖譜所建構的親緣關係樹狀圖顯示，和指標 PFGE 圖譜有 80%以上相似度之 32 個 PFGE 基因型(群組 B)，即包含了 73%的分離株。另外和指標 PFGE 圖譜親緣關係較遠的 3 個群組(A、C、D)，其 15 個 PFGE 基因型也存在於 19%的分離株中(圖三)。

由 IS1 眾多的 PFGE 基因型與流行狀況推測，大多數新的基因型菌株適應力不足，很快即被淘汰，只有少數能生存，繼續引發感染，而指標菌株的基因型仍是最能生存者，共存在 4 年，在 2000-2004 年間皆是年度最盛行的基因型。或可歸因於防治措施的介入，2004 年已無本土來源的 IS1 分離株出現。

IS3 族群：2001 年 8 月 1 日桃芝颱風過境重創南投縣信義鄉，數日後在信義鄉潭南村出現桿菌性痢疾爆發流行，分離株和嘉義縣阿里山鄉 4-5 月發生的痢疾流行事件之分離株，有相同的 PFGE 圖譜，由於信義鄉和阿里山鄉接壤，兩山地鄉間有公路相通，且潭南村出現病例之前，7 月 2 日在離阿里山鄉較近的望美村已出現 2 名 IS3 的病例，故推測引發潭南村爆發流行事件之 IS3 菌株來自阿里山鄉。IS3 菌株之後傳到南投縣仁愛鄉和埔里鎮，2002 年也出現在台中縣新社鄉和豐原市，11-12 月間在台中縣太平市引發一個家庭成員的聚集感染事件。62 株 IS3 分離株中，有 11 個 PFGE 基因

型，PFGE 圖譜間之相似性高，J16N09.0018 與 J16N09.0036 是兩個主要的型別(圖四)，兩圖譜間只差一條 invasive plasmid 的 DNA 條帶，該 plasmid 會在菌株繼代培養過程中自然消失。和 IS1 族群相比，IS3 族群流行期間較短，分離菌株少，基因型別也較單純。

IS6 族群：1998 年首度出現在台中縣龍井鄉，同年在豐原市造成群聚感染，在 2000 年再次出現於台東縣關山鎮，2002 年 10-11 月間在台東縣台東市再次出現，3 例病例中有 2 例為同一家庭之群聚感染。因菌株相隔長時間間歇出現且地點相距遙遠，菌株間之流病關聯性很值得探討。PFGE 分析結果顯示，不同時間不同地點分離之菌株有相同 PFGE 圖譜(J16N09.0011)，但在台東市同一家庭分離之 2 菌株有不同但高相似度之 PFGE 圖譜(圖五)。這些菌株應具高度親緣關聯，推測是同源菌株；IS6 菌株可能在別地流行(例如北部地區，因為資料庫只擁有少數北部地區菌株資料)，或是菌株潛伏在長期帶原者身上，才會消失一段長時間之後又出現。

IS7 族群：2000 年在台東縣台東市有 1 株 IS7 分離株，2001 年在南投縣仁愛鄉有 2 株分離株，2003 年在台東縣延平鄉紅葉村有 3 株分離株，2004 年又在紅葉村有 4 株分離株。紅葉村之分離株有相同 PFGE 圖譜，與台東市和仁愛鄉分離株之 PFGE 圖譜雖然有 70% 以上相似度，但呈現相當的歧異度(圖六)，推測紅葉村 2003 與 2004 年之分離株應屬同源，但紅葉村分離

株與台東市和仁愛鄉之菌株，則只能依據共同 IS7 基因型，確立其同源關係。

IS11 族群：1996-2004 年間共有 35 株 IS11 分離株，分離株擁有 11 種 PFGE 圖譜，圖譜間呈現相當大之歧異性(圖七)。具圖譜高相似度之群組 A 分離株，特別是 J16N09.0009 基因型菌株，1996-1997 年間出現在廣大地區，包括台北縣、南投縣、花蓮縣、台東縣、高雄縣、屏東縣等地。1996 年花蓮縣卓溪鄉卓清村的群聚感染，分離株有兩種高相似度之圖譜(J16N09.0002 和 J16N09.0005)；2004 年台中縣烏日鄉分離株和 1999 年新社鄉分離株有相同 PFGE 圖譜；2004 年宜蘭縣南澳鄉分離株和其它分離株 PFGE 圖譜有比較大的歧異性。2003 年來自中國的分離株也屬 IS11 族群，但 IS11 族群菌株應該早已在台灣流行，由中國來源菌株和本土菌株具高相似度的圖譜推測，IS11 菌株也可能源於境外。

IS23 族群：9 株 IS23 分離株中，7 株是 2003 年印尼峇里島旅遊團感染之分離株，1 株分離自峇里島病例之國內接觸者，1 株是 2000 年四維高中痢疾爆發流行事件之分離株；四維高中痢疾流行事件之分離株，以 IS1 型別為主，IS23 應為 IS1 菌株之變異種；IS1 和 IS23 圖譜有高度親緣關係(圖二)。印尼來源菌株和四維高中 IS23 菌株之 PFGE 圖譜有 70%之相似度(圖八)；由於引發四維高中痢疾流行事件之菌株源於印度，印度和印尼峇里島之菌株或有同源關係。

IS25 族群:17 株 IS25 分離株擁有 6 種 PFGE 圖譜,以 J16N09.0018 (10 株)與 J16N09.0036 (3 株)佔多數(圖九),該兩種 PFGE 圖譜也出現在 IS3 族群之分離株中(表二),IS3 和 IS25 圖譜相似度高,位於同一 IS 親緣群組(群組 A)(圖二),然而 IS25 族群在流行病學上,已和 IS3 族群有所區隔;IS25 族群主要在信義鄉潭南村之外的地區流行,桃芝颱風過境後引發潭南村的痢疾爆發流行事件的菌株,是 IS3 基因型;表四之 J16N09.0018 族群顯示,IS25 菌株最早出現的記錄在南投縣埔里鎮,之後在信義鄉羅娜村流行,而 IS3 菌株則在信義鄉潭南村和仁愛鄉精英村流行。基於擁有共同 PFGE 基因型,顯然 IS25 和 IS3 具有同源性,但兩基因型族群擁有適應能力,各自流行。

相同 PFGE 圖譜但不同 IS 型別之族群:IS-PCR 分型法雖然分型效力不如 PFGE,但也出現有些相同 PFGE 圖譜之分離株,卻擁有不同 IS 型別(表二),表示 IS 型別也在進行演化。這些擁有相同 PFGE 圖譜但不同 IS 型別之族群,有的源於同一爆發流行事件,有的則無時間與地點上之流病關聯。

J16N09.0009 族群:擁有 J16N09.0009 圖譜之分離株有 18 株,17 株為 IS11 型別,1 株為 IS30;IS11 和 IS30 之圖譜有高相似度(圖二)。18 株 J16N09.0009 分離株中,17 株出現在 1997 年,1 株出現於 1998 年,病例居住在台北縣、南投縣、花蓮縣、台東縣、高雄縣與屏東縣。病例間是否具

流病關聯已不可考，推測當時台灣曾發生 J16N09.0009 族群(或 IS11 族群)之流行，流行之區域廣且期間長，單單藉由時間與地點聚集之傳統流行病學監測方法，很難偵測到這些看似”散發”性的痢疾流行事件；若此類流行事件發生在 2004 年，即本局之「實驗室分子分型監測網」已建置完成之時，即可經由即時比對菌株之 PFGE 圖譜，偵測到此一流行事件，更可進一步追查病例間之流病關係，找出傳染之途徑，進行有效的防治。

J16N09.0015 族群：具有 J16N09.0015 圖譜之 20 株分離株，來源有 1998 年桃園縣武漢國小痢疾爆發流行事件、2003 年印尼峇里島旅遊團感染痢疾事件、2004 年柬埔寨旅遊感染痢疾事件、2004 年越南旅遊感染痢疾事件，另有 2004 年印尼峇里島旅遊感染個案、1999 年台中縣新社鄉和 2004 年台中縣烏日鄉感染個案，台中縣兩名個案未曾出國(表三)。各感染事件，在時間和地點上並無直接的流病關聯性，菌株卻有相同 PFGE 基因型別。IS-PCR 分析結果可區別不同事件來源之分離株，即桃園縣武漢國小來源菌株為 IS18 型別、2003 年印尼峇里島來源菌株為 IS23 型別、2004 年柬埔寨和越南來源菌株為 IS17 型別(表三)，2004 年印尼峇里島來源菌株為 IS1 型別，台中縣兩例未曾出國之個案，其菌株為 IS11 型別。2004 年台中縣烏日鄉之個案，疫調了解其確實未曾出國，但分離菌株卻和 2003 年峇里島旅遊感染事件之分離株有相同 PFGE 圖譜，當時推測可能是有人在峇里島被感

染後回國，由於防疫出現漏洞，造成社區感染；但 IS-PCR 分析結果指出，該菌株和 1999 年台中縣新社鄉之菌株屬相同 IS 型別，該個案亦未曾出國。IS 圖譜親緣關係樹狀圖顯示，IS1、IS11、IS17、IS18 和 IS23 皆屬於群組 B (圖二)，具高度親緣關係。2004 年柬埔寨和越南分離株擁有相同的 PFGE 和 IS 型別(J16N09.0015:IS17)，推測該基因型菌株是東南亞地區跨國流行的主要菌株，未來此基因型菌株將可能再度由到該地區旅遊回國之旅客攜帶入境。

J16N09.0018 族群：J16N09.0018 基因型菌株有 IS3、IS4、IS15、IS25 與 IS26 型別(表四)；J16N09.0018 菌株最早記錄是 1999 年 2 月，由台中市之病例分離，為 IS4 型別；2001 年 7 月 9 日 J16N09.0018 菌株再次出現在南投縣埔里鎮，為 IS25 型別，該基因型(J16N09.0018:IS25)菌株於 7 月 14 日出現於信義鄉羅娜村；8、10 和 11 月羅娜村與望美村之分離株皆屬 IS25 基因型(表四)。J16N09.0018:IS3 基因型菌株於 2001 年 8 月 4 日引發信義鄉潭南村之痢疾爆發流行事件，該事件分離株中同時有 IS26 型別菌株；J16N09.0018:IS3 菌株在同年 8 月 30 日出現於仁愛鄉，隨後在精英村造成流行；在精英村中興巷的聚集感染個案分離株中，存在 IS14 型別菌株。J16N09.0018 族群屬於 IS3 族群的 11 個 PFGE 圖譜型別之一，阿里山鄉之 IS3 菌株，被認為是信義鄉潭南村痢疾流行事件的菌株來源，而阿里山鄉菌

株來源則有待追查；1999年2月自台中市病例分離之 J16N09.0018:IS4 菌株，可能是阿里山菌株的源頭。

J16N09.0023 族群：66 株 J16N09.0023 菌株中，有 65 株屬 IS1 基因型，1 株為 IS2 基因型(表二)；J16N09.0023:IS1 菌株出現在花蓮縣四維高中痢疾爆發流行事件之分離株中，J16N09.0023:IS2 菌株分離自四維高中流行期間之花蓮縣吉安鄉，兩基因型菌株具高度親緣關係。

J16N09.0036 族群：28 株 J16N09.0036 菌株中，有 26 株是 IS3，2 株為 IS25；J16N09.0036 和 J16N09.0018 圖譜差異只在 invasive plasmid 之有無(圖四)，擁有 invasive plasmid 之 J16N09.0036 菌株為 phase I，具感染致病能力，失去 invasive plasmid 之 J16N09.0018 菌株為 phase II，不具感染致病能力，invasive plasmid 容易在培養繼代過程中失去；不考慮 invasive plasmid 時，J16N09.0036 族群即為 J16N09.0018 族群。

討論

本研究發展新的 IS-PCR 分型法，配合 PFGE 分型法分析收集於 1996-2004 年期間之 920 株 *S. sonnei* 分離株，探討 *S. sonnei* 之演化問題。PFGE 本質是細菌整個基因體之 restriction fragment length polymorphism 的分析法，由於細菌可能獲取外源 plasmid，加上 DNA 基因體上擁有許多長長短短的重覆序列，基因體之 DNA 序列排列結構很容易經由 homologous recombination 的交換重組而改變(4)，因此 PFGE 圖譜經常出現變異，因此 PFGE 方法能擁有高分型效力；對照上，IS-PCR 分型法是當初基於 *S. sonnei* 擁有數十套 insertion sequence IS1 而設計的快速 PCR 分型方法(2)；shigellae 擁有眾多套數的 IS1 序列，已解序完成的 2 條 *S. flexneri* 基因體 DNA 序列上，更擁有百套以上之 IS1 序列(8,13)，但因 PCR 增幅的效力與受限於傳統 agarose 膠片電泳法之分離效果，IS-PCR 方法只能偵測小於 3 kb 之 inter-IS1 DNA 片段；雖然 IS1 在 shigellae 中具活性(7)，隨時會改變插入的位置與套數，但 IS-PCR 方法很難敏感地偵測到這些變異；本研究結果顯示，菌株之 PFGE 圖譜的變異，比 IS 圖譜的變異快很多。

PFGE 方法能敏感地偵測到菌株的變異，是調查細菌性傳染病病例間關聯性，最具效力的分型方法；PFGE 更被應用於傳染病的監測網系統，美國疾病管制中心(Centers for Disease Control and Prevention)所建立的「實驗

室分子分型即時監測網—PulseNet」，即應用標準化的 PFGE 為統一的分型工具(12)；PulseNet 在監測食因性細菌傳染病，特別是 *E. coli* O157 的流行，有非常大的成效。PFGE 是偵測細菌性傳染病行流的利器，但因細菌 PFGE 圖譜的變化快速；但 PFGE 的高分型效力，反而不利於探討較長期間菌株的演化和追蹤分離株之族群關聯(clonal relationship)；IS-PCR 之分型效力較低，反而有利於研究流行數年期間之菌株間的演化狀況，和追蹤菌株之族群來源。

擁有 713 株分離株的 IS1 族群，共有 95 個 PFGE 圖譜，圖譜間已有很大歧異度，甚至有些圖譜間只分享 55% 的相似度(圖三)，若只進行 PFGE 分析，勢必無法釐清大部分菌株間的族群關係，但這些菌株則有共同的 IS 型別。IS-PCR 分型法所鑑定出的 IS 型別，其時間上的分佈相當具有流病學的解釋效力，例如 IS1 族群在 2000 年才進入台灣，2001-2002 年期間造成大流行，2003 年逐漸消失，2004 年只有境外移入的 IS1 菌株(表一)；IS1 族群的興衰消長，是個典型例子，1996-2004 年間之大部份 IS 族群，只能短暫存在或持續存在 1-2 年(表一)，只有少數 IS 族群能在消失後再度出現。

雖然 IS1 族群演化出眾多 PFGE 基因型，但大多數基因型無法生存下來，只有少數能成為主要的流行型別，此種現象也見於 IS3 等其它族群；雖然基因體大結構的改變可能不利於生存，但在小的範圍內的改變仍持續地

進行, IS1 序列會複製插入新的基因體位置(7), 此改變範圍小, 不易被 PFGE 分型法偵測到, 但可能被 IS-PCR 偵測到, 即菌株經長時間的獨立演化後, 雖然基因體結構(PFGE 圖譜)無大的變化, 但在小範圍內, IS1 序列位置和套數已發生變化; J16N09.0015 族群即提供很好的例子, 來自不同年度不同國度擁有相同 PFGE 圖譜之菌株, 卻擁有不同的 IS 型別, 此例子說明本研究發展之 IS-PCR 方法, 在探討 *S. sonnei* 演化問題上, 具有良好之實用性。

發展分子分型技術之目的, 是為了監測傳染病的流行, 每一種分型方法皆有其優缺點, 因此分型結果的解釋(interpretation)能力, 是應用分子分型技術之關鍵, 必需視問題的本身, 選擇合適的分子分型方法。本研究証實分型效力較低的 IS-PCR 方法, 反而比 PFGE 更有利於解釋 *S. sonnei* 菌株經歷數年期間之後的演化問題, 有利追蹤菌株之族群關係(clonal relationship); 過去研究流行性腦脊髓膜炎的病原菌 *Neisseria meningitidis* 的族群關係, 即利用 MLST (multilocus sequence typing)的方法, 此方法比對 7 個 house-keeping genes 的 DNA 序列, 決定菌株之族群關聯性, 由於 DNA 序列之變異速度比基因體結構的變異慢, 且 DNA 序列比 PFGE 圖譜能提供更多資料, 做為分子演化的計算之用, 故能更準確釐清菌株經長時間演化後之族群關係, 有利追蹤 *N. meningitidis* 菌株在國際間之流傳過程(3)。雖然 IS-PCR 搭配 PFGE, 在探討 *S. sonnei* 族群演化的問題上, 有另人滿意的結

果，但 IS-PCR 分析的結果和 PFGE 一樣是圖譜形式的資料，需要嚴謹的標準化操作步驟；IS-PCR 使用傳統的 agarose gel 電泳方法分離 DNA 片段，操作過程變數不易控制，因此操作步驟的標準化比 PFGE 更加困難。未來應參照 MLST 方法，發展一套 sequence-based 的分型方法，以取代 IS-PCR 之缺點。

IS-PCR 分析結果顯示，大部份的 *S. sonnei* (IS) 族群，只流行 1-2 年即消失(表一)，但仍有少數 IS 族群(例如 IS6、IS7 和 IS11)消失 1 年或數年後又再度出現，此現象可能是此菌株在台灣其它區域流行而延續下來，因為在 2004 年以前，本實驗室建立之「*Shigella* DNA 指紋圖譜資料庫」所收集之菌株，大多數是台灣中部與東部之分離株；或是由國外侵入，例如 1996-1999 年期間 IS11 族群在全國各區(主要是花蓮縣和南投縣)流行，2000-2002 年未發現 IS11 菌株，2003 年再度出現的菌株是源於中國，此中國菌株和 1999 年和 2004 年台中縣之本土菌株(病例未曾出國)，PFGE 圖譜間只差一條 DNA 條帶(圖七)，菌株具高度親緣關係；鑑於過去引發 2000-2002 年台灣桿菌性痢疾大流行之 *S. sonnei* 菌株，是源於印度，2003 年有印尼峇里島旅遊團 *S. sonnei* 群聚感染事件，2004 年至少有 55% (11/20) 分離株源於中國和東南亞國家(14)；境外 *S. sonnei* 病原的入侵台灣，可能是台灣屢屢發生 *S. sonnei* 痢疾流行的原因。

參考文獻

1. **Benenson, A. S.** 1995. Control of Communicable Diseases Manual, 14th ed. p. 421-425. American Public Health Association, Washington, D. C.
2. **Bustos-Martinez, J. A. and M. C. Gomez-Eichelmann.** 1987. Frequency of IS1-mediated molecular events in different members of the family Enterobacteriaceae. *J.Bacteriol.* **169**:4946-4949.
3. **Chiou, C. S., Chou, C. Y., Liao, T. L., Chang, H. L., Yao, S. M., Li, C. C., and Lee, Y. S.** 2005. Molecular Epidemiology and the Clonal Groups of *Neisseria meningitidis* in Taiwan, 1996-2002. *J.Clin.Microbiol.* (Submitted).
4. **Drummel-Smith, J., P. A. Amor, and C. Whitfield.** 1997. Polymorphism, duplication, and IS1-mediated rearrangement in the chromosomal his-rfb-gnd region of *Escherichia coli* strains with group IA and capsular K antigens. *J.Bacteriol.* **179**:3232-3238.
5. **DuPont, H. L., M. M. Levine, R. B. Hornick, and S. B. Formal.** 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J.Infect.Dis.* **159**:1126-1128.
6. **Gautom, R. K.** 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J.Clin.Microbiol.* **35**:2977-2980.
7. **Hsu, W. B. and J. H. Chen.** 2003. The IS1 elements in *Shigella boydii*: horizontal transfer, vertical inactivation and target duplication. *FEMS*

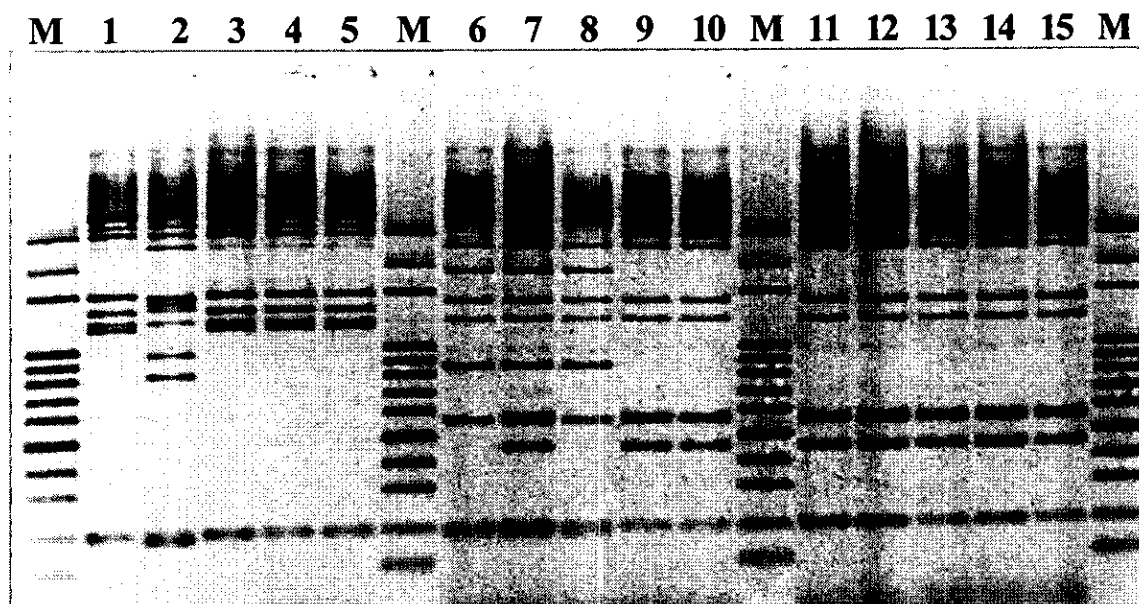
Microbiol.Lett. 222:289-295.

8. **Jin, Q., Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, and J. Yu.** 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res.* 30:4432-4441.
9. **Lai, S. W., H. C. Lin, C. C. Lin, C. S. Liu, Y. T. Shih, C. T. Peng, C. H. Tsai, F. J. Tsai, and K. C. Ng.** 2000. Clinical analysis of a dysentery outbreak in Taichung. *Acta Paediatr.Taiwan.* 41:18-21.
10. **Lee, T. M., C. Y. Chang, L. L. Chang, W. M. Chen, T. K. Wang, and S. F. Chang.** 2003. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 45:173-181.
11. **Ohtsubo, H. and E. Ohtsubo.** 1978. Nucleotide sequence of an insertion element, IS1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75:615-619.
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.* 7:382-389.
13. **Wei, J., M. B. Goldberg, V. Burland, M. M. Venkatesan, W. Deng, G. Fournier, G. F. Mayhew, G. Plunkett, III, D. J. Rose, A. Darling, B.**

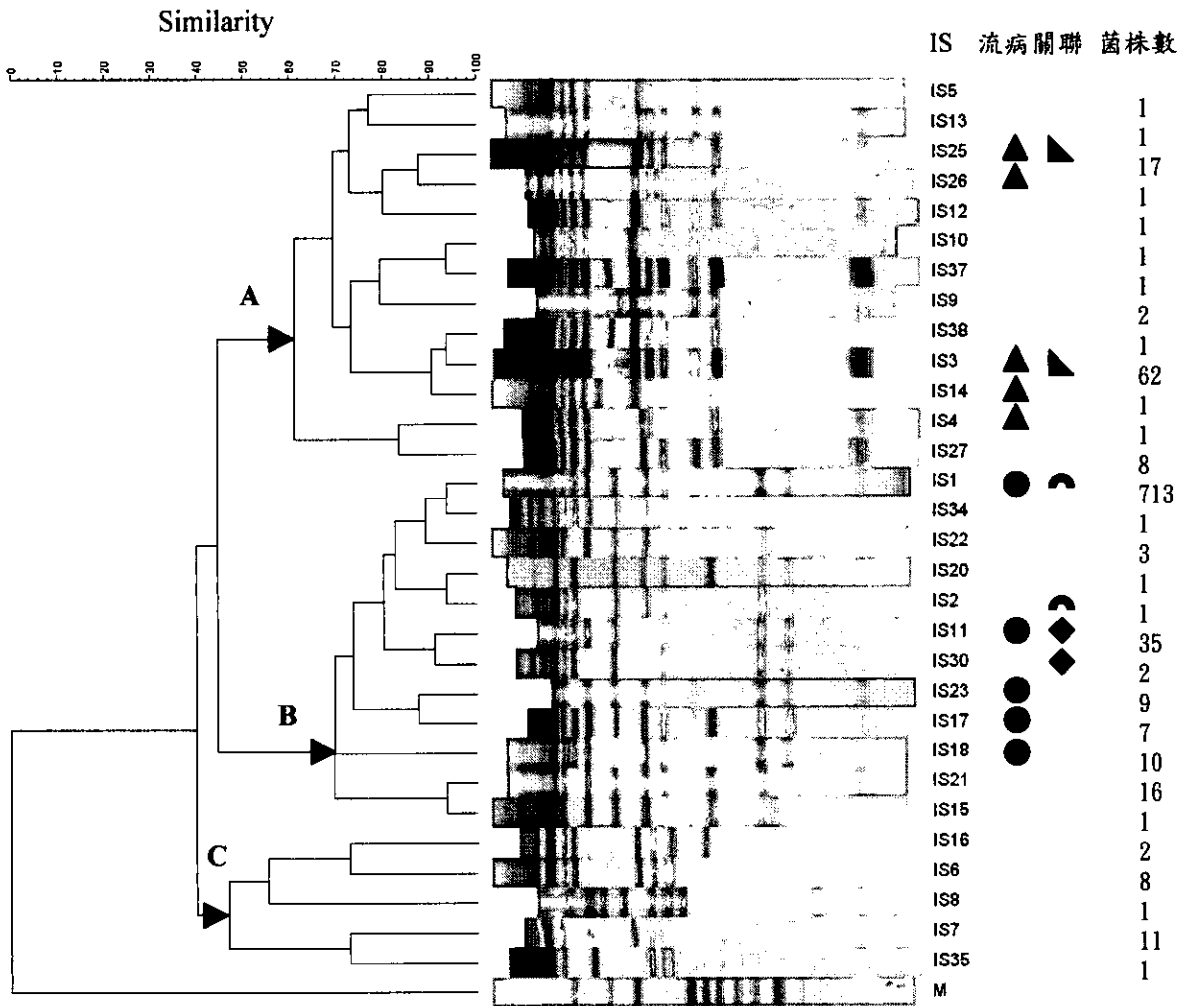
Mau, N. T. Perna, S. M. Payne, L. J. Runyen-Janecky, S. Zhou, D. C. Schwartz, and F. R. Blattner. 2003. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect.Immun.* 71:2775-2786.

14. 邱乾順、林鼎翔、周振英、魏孝倫、李翠鳳、李永盛、楊世仰、廖璿程、李俊青、王佑文、林怡璇、姚淑滿、柯靜芬、劉顏、郭莉莉。2005。建構台灣細菌病原實驗室分子分型即時監測網(第一年)研究報告(DOH93-DC-2005)。
15. 邱乾順、楊榮泉、趙長勝、劉顏。2002。台灣東部與中部地區 *Shigella sonnei* 所引發之桿菌性痢疾分子流行病學研究報告(DOH90-DC-2018)。

圖表



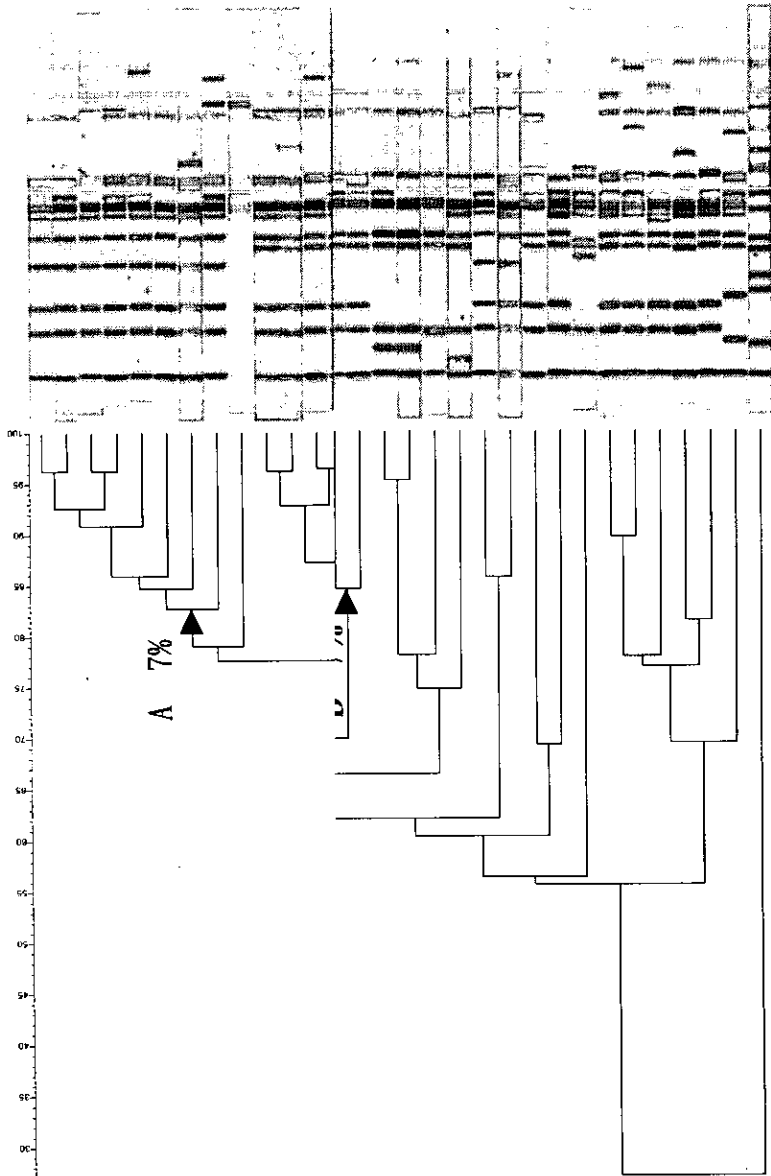
圖一、IS-PCR 反應產物在 2.0% agarose 膠片上之 DNA 圖譜。M 為 100 bp DNA Ladder Markers。



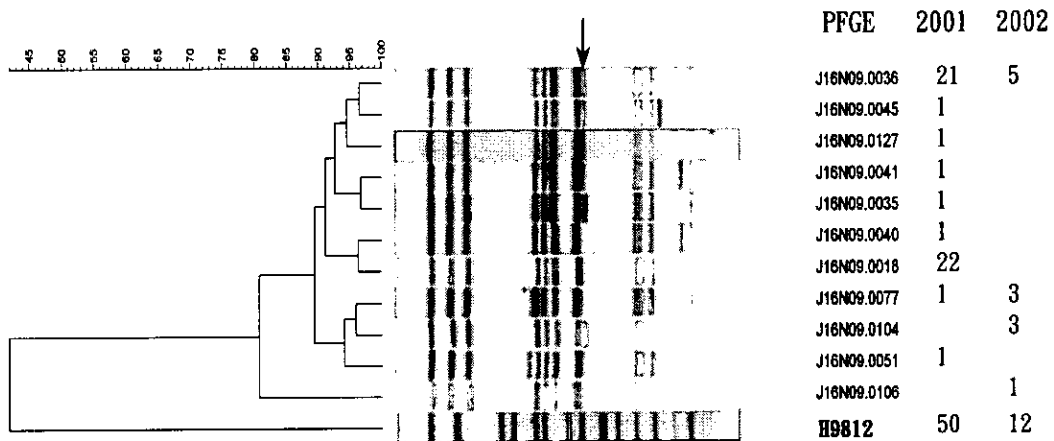
圖二、IS 圖譜、圖譜親緣關係樹狀圖、IS 基因型別間之流病關聯和分離株數量。親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間 Dice similarity coefficient 所建構而成；BioNumerics 之設定為 3% Optimization 和 0.3% Position Tolerance。IS 群組 A 與群組 B 內以幾何圖案標示者，為具演化關聯性之 IS 型別。

PFGE 2000 2001 2002 2003 2004

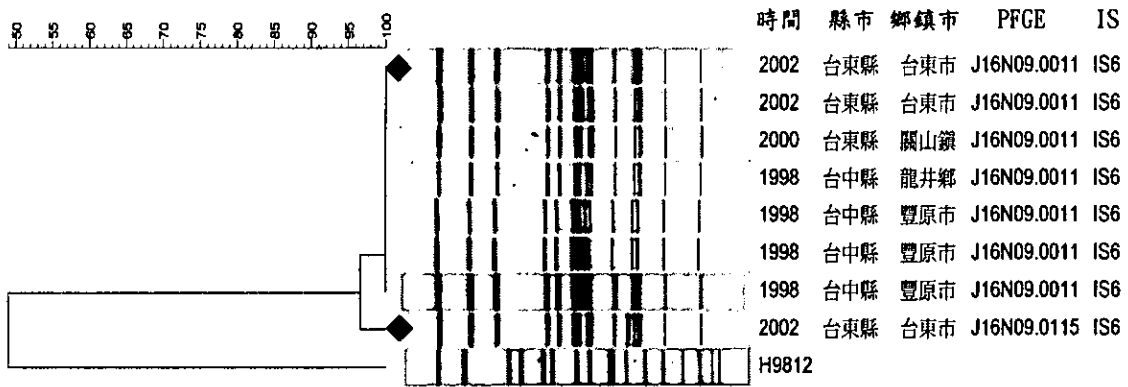
Strain ID	2000	2001	2002	2003	2004
J16N09.0067		28			
J16N09.0134		1			
J16N09.0064		1			
J16N09.0065		3			
J16N09.0068		1			
J16N09.0022	1	12	1		
J16N09.0069		2			
J16N09.0070		1			
J16N09.0066		2			
J16N09.0050		12	2		
J16N09.0143		1			
J16N09.0056		3			
J16N09.0072		2,4			
J16N09.0091			2,3		
J16N09.0089			1		
J16N09.0100			1		
J16N09.0101			1		
J16N09.0145		1			
J16N09.0111			1		
J16N09.0135		1			
J16N09.0082			1		
J16N09.0088			1		
J16N09.0117				2	
J16N09.0081		1			
J16N09.0081		1			
J16N09.0083		1			
J16N09.0084		1			
J16N09.0095			1		
J16N09.0082		1			
H9812	67	451	180	13	2



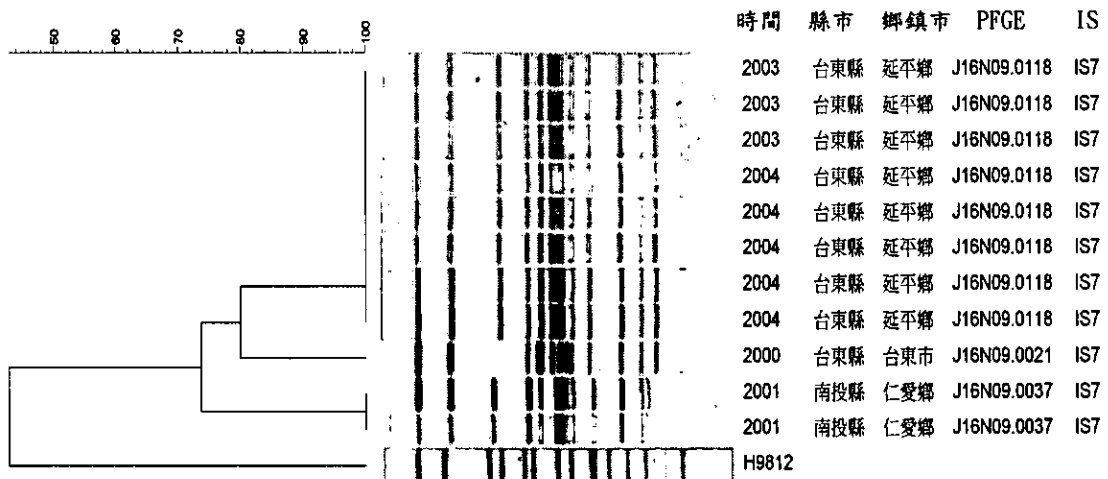
圖三、IS1 族群之 PFGE 圖譜、圖譜之親緣關係樹狀圖、與各 PFGE 基因型在 2000-2004 年之分離株數。親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成；BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.3%。黑色劍頭標示 A、B、C 與 D 群組位置，群組間之圖譜相似度超過 80%，且所佔之分離株數佔總數 5%以上。●，標示指標菌株之 PFGE 圖譜(J16N09.0019)。□，圈示其它分別來自中國、印尼和越南之分離株。



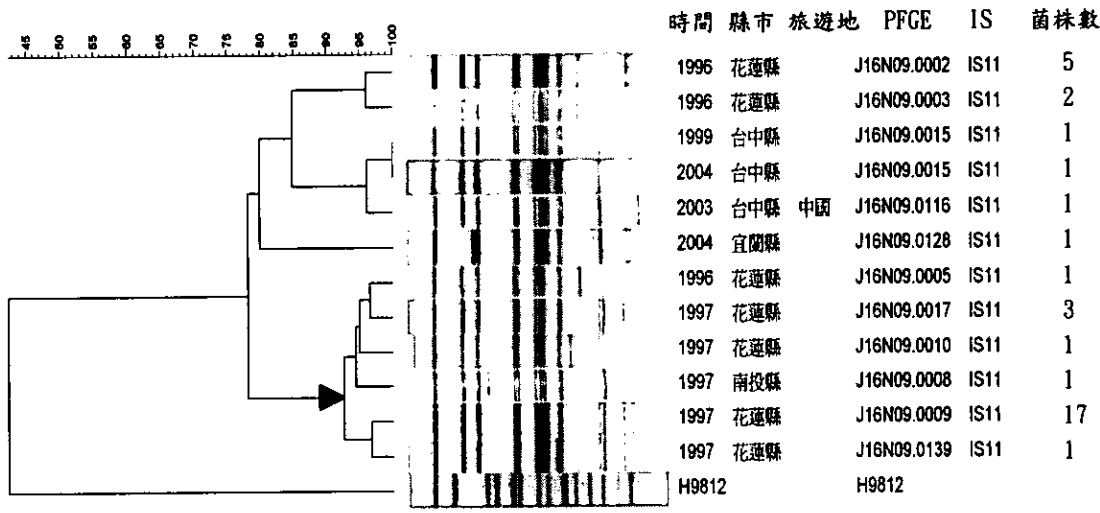
圖四、IS3 族群之 PFGE 圖譜、圖譜之親緣關係樹狀圖、與各 PFGE 基因型在 2001-2002 年之分離株數。親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成；BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.3%。H9812 為分子參考標誌。劍頭所指之條帶為 invasive plasmid，繼代過程可能消失，使 *S. sonnei* 菌株由 phase I 變為 phase II，J16N09.0036 為 J16N09.0018 菌株之 phase I 時期之圖譜。



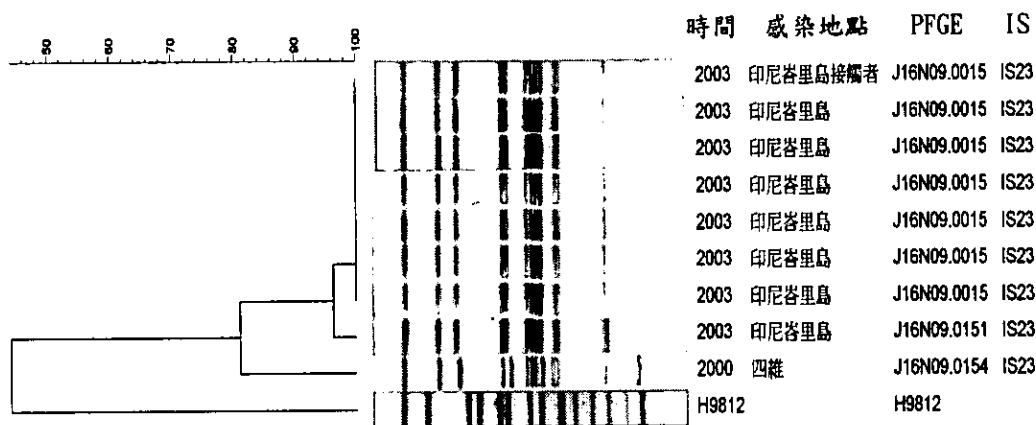
圖五、IS6 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係樹狀圖，親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成，BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.8%。
◆，標示同一家庭感染病例所分離 2 菌株之圖譜。



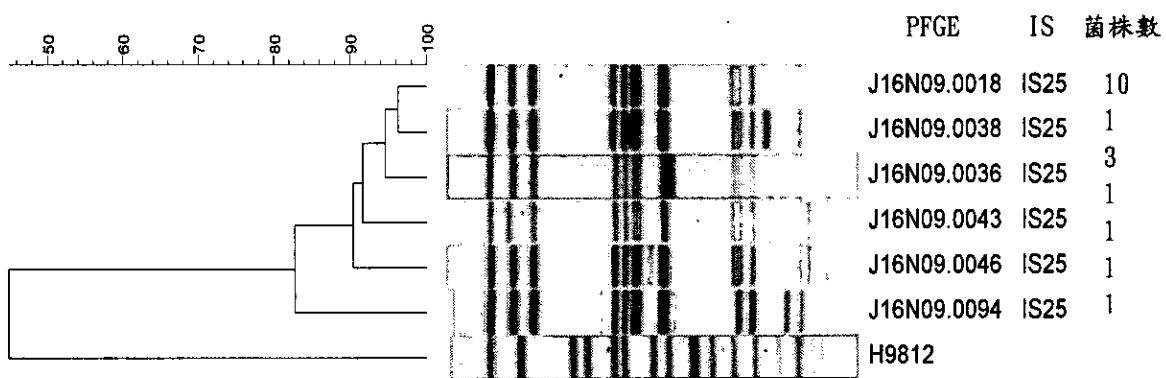
圖六、IS7 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係樹狀圖，親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成，BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.7%。



圖七、IS11 族群之 PFGE 圖譜、圖譜親緣關係樹狀圖、和擁有該 PFGE 圖譜之菌株數量。親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成，BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.7%。



圖八、IS23 族群之 PFGE 圖譜與圖譜親緣關係樹狀圖，親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成，BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.7%。



圖九、IS25 族群之 PFGE 圖譜、圖譜親緣關係樹狀圖、與擁有該基因型之分離株數量；親緣樹狀圖以 UPGMA 演算法，圖譜間之 Dice similarity coefficient 建構而成，BioNumerics 之設定為 Optimization: 3%和 Position Tolerance: 0.7%。

表一、1996-2004 年間各 IS 型別數量分佈。

IS type	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Total
Cluster B (IS1 family)										
IS1					67	451	180	13	2	713
IS2					1					1
IS11	8	21	2	1				1	2	35
IS15						1				1
IS17									7	7
IS18			10							10
IS20						1				1
IS21			16							16
IS22									3	3
IS23					1			8		9
IS30		1	1							2
IS34									1	1
Cluster A (IS3 family)										
IS3						50	12			62
IS4				1						1
IS5						1				1
IS9		2								2
IS10		1								1
IS12							1			1
IS13			1							1
IS14						1				1
IS25						15	1	1		17
IS26						1				1
IS27							7	1		8
IS37						1				1
IS38							1			1
Cluster C										
IS6			4		1		3			8
IS7					1	2		3	5	11
IS8	1									1
IS16	2									2
IS35						1				1
Total	11	25	34	2	71	525	205	27	20	920

表二、相同 PFGE 圖譜不同 IS 型別之族群

PFGE	IS1	IS2	IS3	IS4	IS11	IS14	IS17	IS18	IS23	IS25	IS26	IS30	Total
J16N09.0009					17							1	18
J16N09.0015	1				2		6	4	7				20
J16N09.0018			22	1		1				10	1		35
J16N09.0023	65	1											66
J16N09.0036			26							2			28

表三、J16N09.0015 族群

菌株編號	PFGE	IS	時間	縣市	鄉鎮市	流病描述
SH12435	J16N09.0015	IS18	1998	桃園縣		武漢國小爆發流行事件
SH12324	J16N09.0015	IS18	1998	桃園縣		武漢國小爆發流行事件
SH12569	J16N09.0015	IS18	1998	桃園縣		武漢國小爆發流行事件
SH12342	J16N09.0015	IS18	1998	桃園縣		武漢國小爆發流行事件
SH33592	J16N09.0015	IS23	2003	台北縣	永和市	印尼峇里島病例接觸者
SH33597	J16N09.0015	IS23	2003	台中市	西區	印尼峇里島旅遊感染
SH33680	J16N09.0015	IS23	2003	彰化縣	彰化市	印尼峇里島旅遊感染
SH33651	J16N09.0015	IS23	2003	彰化縣	芳苑鄉	印尼峇里島旅遊感染
SH33683	J16N09.0015	IS23	2003	彰化縣	竹塘鄉	印尼峇里島旅遊感染
SH33741	J16N09.0015	IS23	2003	台中市		印尼峇里島旅遊感染
SH33766	J16N09.0015	IS23	2003	台中市		印尼峇里島旅遊感染
N04.1870	J16N09.0015	IS17	2004	高雄市	鼓山區	柬埔寨旅遊感染
N04.1872	J16N09.0015	IS17	2004	台北市	中山區	柬埔寨旅遊感染
N04.1873	J16N09.0015	IS17	2004	桃園縣	龍潭鄉	柬埔寨旅遊感染
N04.1876	J16N09.0015	IS17	2004	台北市	信義區	柬埔寨旅遊感染
N04.0450	J16N09.0015	IS17	2004	桃園縣	龍潭鄉	越南旅遊感染
N04.0453	J16N09.0015	IS17	2004	台北縣	鶯歌鎮	越南旅遊感染
S04.1133	J16N09.0015	IS1	2004	雲林縣	四湖鄉	印尼峇里島旅遊感染
SH15299	J16N09.0015	IS11	1999	台中縣	新社鄉	未出國
C04.2952	J16N09.0015	IS11	2004	台中縣	烏日鄉	未出國

表四、J16N09.0018 族群

菌株 編號	IS	分離日期		縣市	鄉鎮區	村里	備註
		年	月 日				
SH15371	IS4	1999	2 28	台中市	中區		
SH22782	IS25	2001	7 9	南投縣	埔里鎮	大城里	
SH22815	IS25	2001	7 14	南投縣	信義鄉	羅娜村	
SH22979	IS25	2001	8 5	南投縣	信義鄉	羅娜村	信筆巷
SH23398	IS25	2001	8 10	南投縣	信義鄉	羅娜村	
SH24459	IS25	2001	10 3	南投縣	信義鄉	羅娜村	羅娜國小
SH24457	IS25	2001	10 3	南投縣	信義鄉	羅娜村	羅娜國小
SH24465	IS25	2001	10 10	南投縣	信義鄉	望美村	
SH24733	IS25	2001	11 4	南投縣	信義鄉	羅娜村	信筆巷
SH24911	IS25	2001	11 6	南投縣	信義鄉	羅娜村	信筆巷
SH24912	IS25	2001	11 6	南投縣	信義鄉	羅娜村	信筆巷
SH23323	IS3	2001	8 4	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23322	IS3	2001	8 4	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23330	IS26	2001	8 8	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23331	IS3	2001	8 8	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23332	IS3	2001	8 8	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23333	IS3	2001	8 8	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23334	IS3	2001	8 8	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23341	IS3	2001	8 9	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23342	IS3	2001	8 9	南投縣	信義鄉	潭南村	潭南村爆發流行事件
SH23784	IS3	2001	9 6	南投縣	信義鄉	東埔村	
SH23991	IS3	2001	9 13	南投縣	埔里鎮	北梅里	
SH23680	IS3	2001	8 30	南投縣	仁愛鄉		
SH24129	IS3	2001	9 30	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24460	IS3	2001	10 3	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24471	IS3	2001	10 5	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24463	IS3	2001	10 9	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24648	IS3	2001	10 18	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24649	IS3	2001	10 18	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24650	IS3	2001	10 18	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH25048	IS3	2001	11 26	南投縣	仁愛鄉	精英村	富貴路
SH24914	IS3	2001	11 17	南投縣	仁愛鄉	精英村	中興巷
SH24918	IS3	2001	11 21	南投縣	仁愛鄉	精英村	中興巷
SH24915	IS14	2001	11 22	南投縣	仁愛鄉	精英村	中華巷
SH24919	IS3	2001	11 24	南投縣	仁愛鄉	精英村	中興巷