

計畫編號：DOH96-DC-2025 (96-97); DOH98-DC-2022 (98)

行政院衛生署疾病管制局 96-98 年度科技研究發展計畫

發展與評估下世代之細菌分子分型技術

第一年 *Shigella sonnei* MLVA 分子分型技術

第二年 *Shigella flexneri* MLVA 分子分型技術

第三年 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar

*Typhimurium* MLVA 分子分型技術

## 研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：邱乾順

研究人員：洪崇盛、童聖凱

執行期間：2007 年 1 月 1 日至 2009 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目 錄

一、摘要	3-5
二、本文	
(一)、前言	6-7
(二)、材料與方法	8-18
(三)、結果	19-30
(四)、討論	31-40
(五)、結論與建議	41-42
(六)、參考文獻	43-45
(七)、圖表	
<b>Figure 1.</b> Minimum spanning tree of the MLVA genotypes for the <i>S. sonnei</i> strains collected from 10 shigellosis outbreaks	46
<b>Figure 2.</b> Minimum spanning tree of the MLVA genotypes for 22 <i>S. sonnei</i> isolates with indistinguishable PFGE patterns	47
<b>Figure 3.</b> Dendrogram constructed with PFGE patterns using UPGMA algorithm for the <i>Shigella flexneri</i> isolates and the associated information related to the bacterial isolates	48
<b>Figure 4.</b> Phylogenetic tree for 242 <i>S. flexneri</i> isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm	49
<b>Figure 5.</b> Phylogenetic tree for <i>Shigella flexneri</i> 4a serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm	50

<b>Figure 6.</b> Phylogenetic tree for <i>Shigella flexneri</i> 3a/3b and 1a/1b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm	<b>51</b>
<b>Figure 7.</b> Phylogenetic tree for <i>Shigella flexneri</i> 2a/2b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm	<b>52</b>
<b>Figure 8.</b> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖一	<b>53</b>
<b>Figure 9.</b> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖二	<b>54</b>
<b>Figure 10.</b> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖三	<b>55</b>
<b>Table 1.</b> Characteristics of 10 shigellosis outbreaks and genotypes of 151 <i>S. sonnei</i> isolates from the outbreaks	<b>56-57</b>
<b>Table 2.</b> Characteristics of the 26 VNTR loci and the primers for MLVA analysis.	<b>58-62</b>
<b>Table 3.</b> MLVA profiles for 536 <i>S. sonnei</i> isolates characterized in this study	<b>63-84</b>
<b>Table 4.</b> <i>Shigella flexneri</i> isolates used in this study	<b>85</b>
<b>Table 5.</b> Residency of <i>Shigella flexneri</i> infected persons	<b>86</b>
<b>Table 6.</b> 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	<b>87-89</b>
<b>Table 7.</b> VNTR candidates selected from the tandem repeat sequence loci explored by VNTRDB program from genomic sequences of 3 <i>Shigella</i> species	<b>90</b>

<b>Table 8.</b> <i>Shigella flexneri</i> strains used to screen VNTR loci	<b>91</b>
<b>Table 9.</b> Locations, copy number, sizes of amplicons of 36 VNTRs in sequence strains, 301, 2457T and 8401	<b>92-94</b>
<b>Table 10.</b> Primers, dyes and multiplex PCR combinations	<b>95-97</b>
<b>Table 11.</b> Allele diversity of 36 VNTR loci for various serotype groups	<b>98-99</b>
<b>Table 12.</b> The discriminatory index (DI) and confidence interval (CI) of various typing methods for various serotype groups	<b>100</b>
<b>Table 13.</b> <i>Shigella flexneri</i> 4a isolates collected not in a psychiatric nursing center in I-Lee Township, Hualien County	<b>101</b>
<b>Table 14.</b> Primers, dyes and multiplex PCR combinations	<b>102</b>
<b>Table 15.</b> Thirty-nine VNTR loci in silico explored from five <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium genomes	<b>103-104</b>
<b>Table 16.</b> Allelic diversity of 16 VNTR loci in a panel of 176 diverse isolates (P176) and a panel of 210 closely related isolates (P210)	<b>105</b>
<b>Table 17.</b> Discriminatory power of PFGE and MLVA based on various combined VNTRs in a panel of 176 diverse isolates and a panel of 210 closely related isolates	<b>106</b>
<b>Table 18.</b> Genotypes for <i>S.</i> Typhimurium isolates from seven foodborne disease outbreaks	<b>107</b>

## 摘要

本計畫分三年共完成 *Shigella sonnei*、*Shigella flexneri* 與 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 之多位址重覆序列分析(multilocus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)分子分型技術之研發。在 *S. sonnei* 的 MLVA 研發上，共鑑定 26 個 VNTR (variable-number tandem repeat) 位址，此一 MLVA 分型法具有高於脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)之分型效力，且能有效區分許多 PFGE 無法分型但無流病關聯性的菌株。在 *S. flexneri* 之 MLVA 研發上，共鑑定出 36 個 VNTRs，這些 VNTRs 在不同的血清型群(serotype groups)具有不同的變異程度，此一 MLVA 方法亦具有高於 PFGE 的分型效力，具能用於建立 *S. flexneri* 菌株之親緣關係。在 *S. Typhimurium* 的 MLVA 技術研發，利用電腦軟體鑑定了 39 個 VNTRs，其中 16 個 VNTRs 被選為常規分析菌株之用；基於 4 個高變異 VNTRs 的 (MLVA4)分析方法，擁有高於 PFGE 的分析效力，對具高度親緣關係的菌株分型效力更加明顯，且利用 16 個 VNTRs 進行的親緣關係分析，所建立的 4 個群組各具有獨特之噬菌體型(phage type)。此三年研發成果指出，MLVA 擁有比 PFGE 高的分型效力，特別是對 PFGE 無法分型但無流病關聯性的高親緣性菌株，有很好的分型效果；MLVA 也可用於建立菌株之親緣關係。由於分析 4-8 個 VNTRs 的 MLVA 方法，即具有比 PFGE 高的分型效力，可於 1-2 個 multiplex PCR 進行反應，因此 MLVA 是一個具大量分析能力與高成本效益之分子分型法，可用於替補 PFGE，用於分析菌株，以進行群突發事件調查與疾病監測和建立菌株親緣關係的分型工具。

關鍵字：*Shigella sonnei*、*Shigella flexneri*、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium、分子分型、脈衝電泳、多位址重覆序列分析

## Abstract

This three-year run project successfully developed multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) methods for *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In the development of MLVA for *S. sonnei*, a total of 26 variable-number tandem repeat (VNTR) loci were identified. This MLVA method possessed a higher discriminatory power than pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for isolates, in particular for the PFGE-indistinguishable but epidemiologically unrelated isolates. In the development of MLVA for *S. flexneri*, a total of 36 VNTRs were identified. These loci displayed various degrees of variation on different serotype groups. MLVA for *S. flexneri* possessed a better discriminatory power than PFGE for isolates; MLVA data were also useful in establishing phylogenetic relationships among isolates. In the development of MLVA for *S. Typhimurium*, a total of 39 VNTRs were in silico explored. Sixteen of these loci were selected to serve as molecular markers for routine analysis of isolates. MLVA4, an assay based on 4 highly variable loci, possessed a higher resolving power over PFGE in discriminating isolates, in particular the closely related isolates. MLVA16 profiles were also useful in establishing clonal relationships among isolates. A clustering analysis of 203 isolates presented 4 distinct clusters; isolates for each of the clusters fell into a common phage type. The results on development of MLVA indicate that MLVA possesses better discriminatory power than PFGE for isolates, in particular for PFGE-indistinguishable but epidemiologically unrelated isolates. MLVA is also a useful tool in establishing phylogenetic structures among isolates. Since MLVA based on 4 to 8 VNTRs, which can be performed in 1 to 2 multiplex PCR reactions, possesses high resolving power. Therefore, MLVA is cost-effective and high-throughput subtyping tool for outbreak investigation and disease surveillance and the data are useful in investigating phylogenetic structures among isolates.

Keywords: *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, molecular typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus variable-tandem repeat analysis (MLVA)

## 前言

微生物病原分型方法(typing method)之研發，是病原微生物學者研究焦點之一。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<sup>1,2</sup>。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<sup>3</sup>，此監測經過 14 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—PulseNet International，在亞洲成立了 PulseNet Asia Pacific 之區域性組織，並每年定期集會，討論跨國合作方案與技術研發。

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<sup>4,5</sup>，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<sup>6,7</sup>。然而，PFGE 仍有其限制，本實驗室與國外其它實驗室發現，PFGE 在分析一些 *Salmonella*，例如 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* 上，分型效果不理想[unpublished data]；但相反的，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，而難以描繪其種源 (clonal) 關聯性<sup>8,9</sup>。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之一。

近年來，研究學者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) 具有分型效力，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<sup>10,11</sup>，且分析結果為數字資料，在資料之傳輸、比對上相當容易，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，無法應用於分析其它 *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，各種菌種與 *Salmonella* 各血清型 MLVA 技術的研發工作，仍是微生物學者努力的課題。

由於 *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* 與 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) 是重要的腹瀉病原，本研究將分三年時間，發展此三種病原菌之 MLVA 新型分子分型技術。

## 材料與方法

### 第一年 發展 *Shigella sonnei* 之 MLVA 分子分型技術

**菌株來源：**於本研究中，收集自西元1996至2005年間台灣中部與東部的 *S. sonnei* 菌株536株。其中151株為來自於10個不相關的群聚感染事件的菌株(由疾病管制局所保存)，用來評估MLVA的分型效力(Table 1)，每一個群聚感染事件持續的時間為數週或數月，這些菌株之前已完成PFGE與IST的基因型別分析<sup>12</sup>。其中第5、7、8和9的4次群聚感染事件，菌株具相同IST (IST1) 型別。22株具相同PFGE基因型別(J16N09.0015)，但分別分離自9個1998-2005年期間的感染事件，感染地點發生在台灣、中國、越南、柬埔寨與印尼；其中的20菌株之前曾經利用IST加以分型<sup>8</sup>。

**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<sup>13</sup>，蒐尋 *S. sonnei* 菌株 Ss046 (GenBank accession no. CP000038)與 53G (由 Wellcome Trust Sanger Institute [<http://www.sanger.ac.uk>]<sup>14</sup>取得的序列)具有 VNTR 潛力之重覆序列位址(tandem repeat loci)，共取得 34 個 VNTR loci，利用 10 株菌株篩選去除無差異的 loci，共得到 26 個 loci (Table 2)，之後的 *S. sonnei* MLVA 分析即分析此 26 個 loci。

**備製細菌基因體 DNA：***S. sonnei* 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 µl)之菌體，於 100 µl TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 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 x g) 10 分鐘後，將上層液移到新的 eppendorf 管備用。

**PCR增幅與DNA片段分析：**用於增幅26個VNTR loci之引子，列於Table 2，引子是使用位於Primer3 website(<http://frodo.wi.mit.edu> [accessed 1 September 2007])免費軟體所設計。每對引子之一，由台灣之美商應用生命股份有限公司合成與ABI系統相容之染料(6-FAM, NED, VIC 或 PET) (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)。PCR增幅反應中，每一反應物含有10 µl PCR混合液，混合液含有1 x PCR buffer，3 µM MgCl<sub>2</sub>，0.05至0.4 µM primers, 200 µM each deoxyribonucleotide, 1.0 unit 的 recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)與1 µl 的 DNA template。26組的VNTR loci可分成七組的multiplex PCR(M1至M7)來分析。各組反應引子及濃度如下：M1 [SS12 (0.4 µM), SS14 (0.1 µM), SS16 (0.1 µM), and SS21 (0.1 µM)]、M2 [SS1 (0.05 µM), SS10 (0.1 µM), SS11 (0.1 µM), and SS22 (0.1 µM)]、M3 [SS3 (0.1 µM), SS6 (0.2 µM), SS9 (0.05 µM), and SS23 (0.1 µM)]、M4[SS5 (0.1 µM), SS7 (0.05 µM), SS8 (0.05 µM), and SS20 (0.1 µM)]、M5[SS4 (0.1 µM), SS13 (0.05 µM), SS18 (0.1 µM), and SS25 (0.1 µM)]、M6[SS2 (0.1 µM), SS15 (0.1 µM), SS17 (0.1 µM), and SS19 (0.2 µM)]和M7[SS24 (0.1 µM) and SS26 (0.1 µM)]。PCR反應液置於溫度循環器 GeneAmp PCR System 9600 (Applied BioSystems)，以94 °C處理5分鐘後，

M1至M6再進行30次循環反應(94 °C 30秒、54 °C 45秒與72 °C 45秒) ，而M7再進行30次循環反應(94 °C 30秒、62 °C 45秒與72 °C 45秒) ，再經72 °C 反應5分鐘。

具螢光之 PCR amplicons，用水稀釋 10 倍 (M7)或 100 倍(M1 至 M6)，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。*S. sonnei* 之菌株 Ss046 和 53G 之 VNTR loci 與基因體序列推估之 amplicons 長度為依據列於 Table 2。

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(5,7)。

## 第二年 發展 *Shigella flexneri* 之 MLVA 分子分型技術

**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 4)。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 4)。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 5)；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<sup>13</sup>，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 6)。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 7)。

**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 µl)之菌體，於 100 µl TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 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 x 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 $\mu$ L，包括 Ultraspec<sup>TM</sup> water (5.5  $\mu$ L)、10% DMSO (1  $\mu$ L)、10X buffer (1  $\mu$ L)、2.5mM dNTP (0.8  $\mu$ L)、2 $\mu$ M primers (0.5  $\mu$ L)、5u/ $\mu$ L Tag polymerase (0.2  $\mu$ L)、DNA extract (1  $\mu$ L)；PCR 反應乃以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 min，再經 30 個循環反應(94 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 54 $^{\circ}$ C 45s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 45s)，之後在 72 $^{\circ}$ 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 8)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 9)，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 10。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  $\mu$ l PCR混合液，混合液含有1 x PCR buffer，3  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>，0.1至0.2  $\mu$ M primers, 200  $\mu$ M each deoxyribonucleotide, 1.0 unit的recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)與1  $\mu$ l的DNA template。PCR反應液置於溫度循環器GeneAmp PCR System 9600 (Applied BioSystems)，以94 °C處理5 min後，再進行30次循環反應(94 °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 2 $\mu$ L PCR product + 98 $\mu$ L Ultraspec<sup>TM</sup> water 稀釋，取 1 $\mu$ L 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 10 $\mu$ L Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide + 0.1 $\mu$ L 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 9 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<sup>15</sup>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<sup>12, 16</sup>。

第三年 發展 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 之 MLVA 分子分型技術

**菌株：**本研究總計分析 440 株 *S. Typhimurium* 菌株，這些菌株中，有 386 株挑選自擁有 2,840 株 *S. Typhimurium* 菌株之菌株庫，菌株庫菌株來自 2004-2008 年間合作之 44 家合作醫院，進行 PFGE 圖譜分析，圖譜存在台灣疾病管制局之 *Salmonella* DNA Fingerprint Database 資料庫中；另 54 株菌株，來自 7 個發生於 1998-2003 年期間的食品中毒案件。在這些菌株中，挑出 40 株 PFGE 圖譜差異較大的菌株，以測試利 VNTRDB 軟體找出的 VNTRs 之變異性。另一組 176 株遺傳關係較遠的菌株，用於評估 VNTRs 的 allelic diversity，一組 210 株來自 9 個主要流行 PFGE 基因型的菌株，用於評估 VNTRs 的變異度(variability)。

**PFGE 分析：**所有菌株皆使用標準化的 PulseNet PFGE protocol 進行 PFGE 圖譜分析<sup>15</sup>，但每一分析使用之 *Xba*I 酵素量只用 5 單位(5 U)而非標準 protocol 所使用之 40 U。PFGE 圖譜以 Kodak EDAS290 System (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA)拍照貯存為 Tiff 格式之數位資料，供後續 BioNumerics 軟體進行分析。

**尋找VNTR位址：**使用 VNTRDB<sup>13</sup> 電腦軟體蒐尋 5 條已完成基因體定序的 *S. Typhimurium* 基因序列，包括菌株 LT2 (accession no. NC\_003197), DT104, DT2, SL1344, 與 D23580 (obtained from <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Salmonella/>)，以找出在該 5 株菌株中，具有重覆序列差異的 TR (Tandem repeat) 位址(即 VNTRs)。這些利用電腦找出的 VNTRs，以 40 株遺傳變異度大的菌株進行測測，有變異之 VNTRs 將用於後續之分析大量之菌株。測試 VNTR 之 PCR 反應，使用之 primers 係利用免費的 Primer3 軟體 <http://frodo.wi.mit.edu/> 進行設計，PCR 反應皆使用 GeneAmp PCR

System 9600 (Applied BioSystems)溫度循環控制儀。PCR反應，使用煮沸法抽取DNA<sup>17</sup>。每一體積為 10- $\mu$ l的PCR反應混合物內，包含 1x PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M of each primer, 200  $\mu$ M of each deoxyribonucleotide, 1.0 unit of the recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan)，與 1  $\mu$ l of DNA template。PCR反應先以 94°C 加熱 5 min，再進行 30 個循環反應，反應循環溫度為 94°C, 30 s→55°C, 45 s → 72°C, 45 s；最後步驟再於 72°C反應 5 min。

**MLVA 分析：**MLVA 所使用之 primers, dyes 與 multiplex PCR 組合皆列於 Table 14。所有 forward primers 皆在 5' 端結合 ABI-compatible dyes, 6-FAM, NED, VIC 或 PET，dye-labeled primers 皆委由 Applied BioSystems (Foster City, CA, USA)公司合成。16 個 VNTRs，分配在 4 個 multiplex PCR 組合，PCR 反應與上面所述相同，除了 primers 為 dye-labeled primers。有時某些菌株有些 loci 在 multiplex PCR 反應中未被增幅出產物，這些 loci 使用單一的 PCR 反應，再次分析，若仍然沒有增幅產物，PCR 反應所用之 DNA template，需使用市售的 DNA 萃取純化套組(Geneaid, Taipei County, Taiwan)萃取。PCR 增幅產物以 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer with GeneScan 500 LIZ Size Standard (cat # 4322682; Applied BioSystems)進行片段大小分析，分析條件參照之前之研究論文<sup>17</sup>。

**資料處理：**PFGE 圖譜影像以 BioNumerics version 4.5 (Applied Maths; Kortrijk, Belgium)進行處理，每一菌株之 PFGE 圖譜與資料庫之菌株之來源資料連結貯存於利用 BioNumerics 管理的疾病管制局 *Salmonella* DNA Fingerprint Database 資料庫中。MLVA 資料，係將各 VNTR loci 之 DNA 長度轉換成重覆單元數，以 BioNumerics 之“Character Type”型態貯存。菌株遺傳關聯度分析，PFGE 圖譜係以 UPGMA 演算法分析，MLVA 資料，係以 Minimum Spanning Tree 演算法進行分析。PFGE 與 MLVA 之分型效力

(discriminatory power)係以 Simpson's index of diversity (*DI*)與 95% confidence intervals (CI)<sup>12, 16</sup>表示。各 VNTR locus 之 allelic diversity 係以 Nei's diversity index，計算之公式為  $1 - \sum (\text{allelic frequency})^2$ 。

## 結果

### 第一年 發展 *Shigella sonnei* 之 MLVA 分子分型技術

**鑑定具潛力之VNTR loci：**全部26個具有潛力之VNTR loci，大多數的loci的重覆單元介於5到9 bp之間(Table 2.)。有八個loci，在菌株Ss046或53G只有一個重覆。其中以SS1較特別，於菌株53G雖然只有一個重覆，但是在菌株Ss046則有10個。

在測試10株遺傳差異大的*S. sonnei*菌株後，將放大出來的片斷定序，將其片斷大小、重覆次數和序列呈現於Table 3。測試完536個菌株後，每個loci有2到20個不等的重覆，其中6個VNTR loci (SS1、SS3、SS6、SS9、SS10和SS11)有6種或是更多的型別的重覆序列，其Nei's diversity index (DI)為0.57至0.83不等。

**基因型別分型(Genotyping)：**536菌株的分析結果如Table 3。利用MLVA分型方法將536株菌株分成126種基因型別，其D值為0.9524，信賴區間介於0.9431至0.9616之間。使用PFGE方法來分型，可分為98種基因型別，D值為0.8882，信賴區間介於0.8667至0.9097之間。結果顯示MLVA的分型方法的優於PFGE。如果只用MLVA中變異度最高的4個loci (SS3、SS6、SS9和SS10)，可分成106種型別，D值為0.9468，信賴區間介於0.9373至0.9564之間。如果選擇8個變異度最高的loci (SS1、SS3、SS6、SS9、SS10、SS11、SS13和SS23)，可分成114種型別，D值為0.9481，信賴區間介於0.9387至

0.9576之間。若選擇在22株PFGE-indistinguishable菌株中有變異的8個loci (SS1、SS3、SS6、SS9、SS11、SS13、SS16和SS23)，D值為0.9481，信賴區間介於0.9387至0.9576之間。PFGE分型法則將536株菌株分成109種型別，D值為0.9473，信賴區間介於0.9377至0.9569之間。比較8個loci的MLVA分型方法和PFGE分型方法的結果，其中22個無法利用PFGE區別的菌株，可以利用MLVA分型方法加以區分。

**利用MLVA基因分型分析群聚感染：**分析151株的10個不同群聚感染事件的*S. sonnei*菌株，這些菌株在之前之研究中，已完成PFGE和IST分析<sup>9</sup>。其中的6個群聚感染事件(群聚3、4、5、6、7和9)可利用MLVA方法分成2或更多種的基因型別(Table 1)。除了群聚9外，每個群聚感染事件有一個主要MLVA型別。於群聚感染9中，有2個MLVA型別，而PFGE分型中只發現一個基因型別。對151株分離自10個群聚感染事件的菌株而言，MLVA分型法所得到之基因型別比PFGE少，即MLVA:PFGE為 15:29。

應用minimal spanning tree演算法，建構151株菌株(10個不同群聚事件)之MLVA種源關係樹(Figure 1)。如圖所示，不同的IST基因型之菌株，皆位於不同MLVA分群中。有6個群聚感染事件，菌株有兩個或更多的MLVA相似形別(與主要型別只差一個loci)。群聚2和4具有一種共同MLVA型別，這兩次群聚感染具有流行別學的相關性，這兩次群聚感染雖然在於不同的地區發生(中心以及北台灣)，但是則發生在時間很接近的時期。

根據IST分型方法分析，群聚感染事件中有4次(群聚5, 7, 8和9)是由IST1型別菌株引發；IST1菌株在2000年於台灣第一次出現。之後2000到2003年間，在東台灣及中台灣引發多次群聚感染事件(24)。4個群聚感染事件可利用MLVA分成2到4種型別(Figure 1)。SS26.1是4個群聚感染事件中最常見的MLVA型別，也是群聚感染事件7, 8, 和9的主要型別。群聚感染5為第一個由IST1引起的群聚感染事件。SS26.66是群聚感染5的主要型別，可以和群聚感染7, 8, 和9加以區分。

**利用 MLVA 分析無法用 PFGE 區別的菌株：**在本次實驗中，有 22 株菌株取自於 9 個無流病相關的感染事件，感染發生於 5 個不同的國家，且利用兩個酵素(NotI 和 XbaI)的 PFGE 分析，仍無法將其區別。在之前的一項研究裡<sup>9</sup>，群聚感染 E1-E8 中的 20 個菌株可利用 IST 分型方法分成 5 種 IST 基因型別，但是在台灣的群聚感染 E2 和 E3，越南和高棉的群聚感染 E6、E7 和 E8 則無法被 IST 區分。相較於 PFGE 分型方法，MLVA 分型法擁有較好的區分能力。如 Figure 2 所示，E1-E9 不同感染事件的菌株可以利用 MLVA 分型來釐清其相關性。以 minimal spanning tree 演算法分析後，可以看出相近地理位置的分離菌株有較近的遺傳關聯性。例如越南和高棉所分離到的菌株遺傳關聯性高於來自其他國家的菌株。群聚事件的 E1 和 E8 分別由兩種 MLVA 基因型(相差一個 loci)的菌株所引起。

## 第二年 發展 *Shigella flexneri* 之 MLVA 分子分型技術

**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 9)。

36個VNTR loci中，其重覆單元長度介於3到178 bp之間(Table 9)，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 9)。

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 11)，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 11)。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 11)；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 12)；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 3A)；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<sup>2</sup>。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 13)，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 3A)，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 3A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 3B)。

Figure 3B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 4)，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 3)。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 4)；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 13)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 5)，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 3)；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年在東埔寨遭到感染入境；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<sup>18</sup>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 3)。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 3A & Figure 6)；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 3 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 6)。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 7)，當中有14株菌為境外移入，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。

第三年 發展 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 之 MLVA 分子分型技術

**VNTR loci：**總計有39 TR loci在5條已完成定序的*S. Typhimurium*基因體中具有變異(Table 15)。這些loci的重覆(repeat)單元長度範圍為3 bp到200 bp，locus之重覆單元間，有87% 到100%的序列相同度。39個loci中，STTR10係存在invasive plasmid中(在菌株LT2中該plasmid為pSLT)，有六個loci (STTR3, STTR5, STTR6, STTR7, STTR9, and STTR10)先前以被找到<sup>19, 20</sup>，其中5個loci具有高數目的重覆單元(Table 15)。ST01 (STTR7)有插入與刪除(indels)序列，具不完整重覆單元，因此以PCR增幅之片段長度表示不同之

alleles；STTR3由具27-bp 與33-bp重覆單元組合而成的composite VNTR locus，兩種重覆單元間相隔一6-bp的spacer，此一locus亦以PCR增幅之片段長度表示不同之alleles。39個loci當中，有16個在測試的40株菌株中有變異，因此挑選該16個VNTRs進行後續評估，以決定其allelic diversity、分型效力(discriminatory power)與變異度(variability)。

**評估 16 個 VNTRs 特性：**16 個 VNTRs 之 allelic diversity、分型效力(discriminatory power)與變異度(variability)以386株菌株加以評估，該16個VNTRs在386株中存在2到22 alleles (Table 16)。有六個VNTRs (STTR3, STTR5, STTR6, STTR7, STTR9與 STTR10)存在5個或以上的alleles，這些VNTRs也具有高重覆單元數目。386 株菌株分成兩組P176與P210，P176包括176株遺傳關係較多樣化之菌株，P210包括210株遺傳關係較單純化之菌株，這些菌株係隨機方式自9個最盛行的PFGE型菌株中挑選出來。16個VNTRs之allelic diversity範圍由0.011到 0.920 (Table 16)。STTR5, STTR6, STTR10與STTR3為前四個最多樣化的VNTRs，ST20, ST12, ST17與ST28排名第5到第8，STTR9則排名第9位。在P210中，16個VNTRs中有12個具有變異性，其allelic diversity值範圍為0.000 to 0.706。STTR6, STTR10, STTR5與ST20為變異度前四名，ST23, STTR9, ST17與STT3排在第5到第8名。

**分型方法之分型效力比較：**PFGE與各種不同VNTRs組合的MLVA之分型效力，以兩組不同遺傳關聯之菌株(P176與P210)加以評估。PFGE對P176

菌株具有高分型效力(DI, 0.9971), P176被分成147基因型(Table 17), 然而基於STTR3, STTR5, STTR6與 STTR10四個loci的MLVA分析(MLVA4), 表現出比PFGE更高的分型效力, 共得到156個基因型。而基於目前歐洲許多實驗室使用的5個VNTRs (STTR3, STTR5, STTR6, STTR9與STTR10)的MLVA5分析, 將P176株分成158型, MLVA8與MLVA16分別得到160與161型別。

MLVA對高遺傳關聯的菌株, 表現超高的分型效力。對自9個PFGE型別挑出的P210菌株, MLVA4分析得到110個型別(Table 17), 而MLVA5得到113個型別, MLVA8得到比MLVA4多12個型別, 但MLVA4, MLVA5, MLVA8與 MLVA16之分型效力則無統計上明顯的差異。

**MLVA在爆發流行事件菌株之結果:** 54株分離自7個食品中毒案件分離之*S. Typhimurium*菌株, 用於評估16個VNTRs之應用性, 食品中毒發生時間為1998-2003年。案件1與2之菌株, 具有兩個PFGE型別, 其它5個案件之菌株, 各擁有1個PFGE型別(Table 18)。各案件之菌株則只擁有同一種MLVA型別, 案件1到4之菌株, 分享相同PFGE (TW.0001)與MLVA (SM16.130)型別, 這4個案件發生分布在2年半期間內。案件5、6與7菌株, 各具有單獨的PFGE與MLVA型別。

**親緣關係樹分析:** 利用MLVA之16個VNTRs資料, 進行P210菌株之親緣關係分析(phylogenetic analysis), 所建立之親緣關係樹(Figure 8), 顯示9個PFGE型別菌株當中, 有6個PFGE型別菌株混雜在一起, 3個PFGE型別 (TW.0559, TW.0214, TW.0049)菌株各自形成一個獨立群組。有同一PFGE型別之菌株, 已演化成為相當複雜之MLVA型別, 當中有6個PFGE型別相互混雜, 其中以TW.0001與TW.0084型菌株演化程度最高(Figure 8)。親緣關係近

之菌株，之間的差異大位源於高變異之VNTRs<sup>21</sup>，將4個高變異VNTRs排除，以12個VNTRs資料建構之親緣關係樹，顯示P210菌株皆有很近親緣關係 (Figure 9)，該分析方法應用於包括P176菌株時，其親關係圖亦指出386株菌株，都有很近的親緣關係(Figure 10)，據此推測2004-2008年在台灣流行之*S. Typhimurium*菌株，有很接近的共同祖先。



## 討論

### 第一年 發展 *Shigella sonnei* 之 MLVA 分子分型技術

本研究結果顯示，MLVA分子分型是相當有用的分析工具，可以用於流行病學調查與探討菌株間之親源關係。MLVA比PFGE有更好的分型效力，其分型結果更符合流行病學觀察的數據。在PulseNet的實驗室中，PFGE是*S. sonnei*的標準分型方法(18)。本研究分析的536菌株結果顯示，MLVA比PFGE有更好的分型效力(D值為0.9524 vs. 0.8882)。因此，可以利用MLVA分型方法來取代PFGE作為PulseNet疾病監視網*S. sonnei*的標準分型方法。

雖然有26個VNTR loci被發展出來，但是它不需要同時使用所有的VNTR loci才能進行疾病監視和群聚事件的調查，那些或多少VNTR loci即可做為疾病監視和群聚事件的調查之用，需要測試更多由不同地區取得之不同群聚事件分離菌株來決定。但本研究結果顯示，選擇其中最具變異性的VNTR loci中的4個(SS3, SS6, SS9和SS10)、8個(SS1, SS3, SS6, SS9, SS10, SS11, SS13和SS23)，所得到之分型效力與同時使用26個的分型能力(D值為0.9468、0.9481和0.9524)，無統計上明顯的差異。根據此結果，*S. sonnei*的疾病監視和群聚感染的調查只需要分析4至8個VNTR loci便已足夠。因此，只需要1至兩個multiplex PCRs(複合式連鎖聚合酶反應)就足以分析*S. sonnei*菌株探討流病的相關性。

另外也可由PFGE-indistinguishable的22株菌株之分型結果，作為選擇

VNTR loci的依據。在22株PFGE-indistinguishable菌株中，有8個VNTR loci (SS1, SS3, SS6, SS9, SS11, SS13, SS16和SS23)具有變異，計算此8個VNTR loci可以將536個分離株分成109個基因型別，D值為0.9473，結果與分析26 VNTR loci的結果相近。

研究顯示，MLVA比IST分型方法更適合用在調查*S. sonnei*的群聚感染事件。利用MLVA分析群聚事件5、7、8和9，可以提供有用的訊息。這4次的群聚感染事件一共持續了3年，IST分型分析顯示這些菌株具有共同的IST1基因型。MLVA分型的結果顯示，群聚感染事件5和事件7、8、9的主要感染型別不同。而且在群聚感染的分析中，MLVA相較於PFGE會得到較少的基因型別，但PFGE只能將群聚感染事件8與事件5、7、9的主要感染菌株加以區分，不過明顯地，MLVA或PFGE分型法皆無法完全區別由同一種IST基因型別(IST1)的所引起的4個群聚感染事件。以前研究顯示，IST分型方法對於PFGE-indistinguishable菌株有較佳的區別能力，但是仍然不能夠區分所有的群聚事件<sup>9</sup>，然而利用MLVA分型法，能清楚區別所有不同感染事件(Figure 2)，這些感染事件出現在7年(1998—2005)期間，發生在5個國家，包括高棉，中國，印尼，台灣和越南。雖然同一種PFGE型別的菌株持續循環於亞洲長達數年之久，但是基因體結構仍會隨著時間而變異，這些的變化雖然不能利用PFGE偵測到，但MLVA分型法能靈敏地加以區分。

PFGE對於*S. sonnei*菌株雖然是相當好的分型方法，但是卻無法分析部份

流行病學不相關的菌株，例如本研究中所提到無法利用PFGE加以區分的22株菌株，此現象具有矛盾性。我們在觀察多起持續性的感染流行事件，發現菌株雖隨著時間的推演而演化出許多不同PFGE基因型，但其中會有一個主要的基因型隱定地存在。在之前的研究中，以PFGE分析291株IST1的*S. sonnei*菌株，結果顯示有37種的PFGE基因型別，其中有51% ( 148 )為同一PFGE基因型別(J16N09.0019)(24)。此結果也指出，當有一個穩定的PFGE基因型別的菌株造成的廣泛的流行感染時，PFGE 將無法成為一個調查群聚感染事件有效的工具。

10件群聚感染事件中，有6件之分離株現存在1種或數種MLVA基因型別，所有次型別與主要型別相差1個loci (Figure 1)。對同一次群聚感染事件，菌株中有一個loci的變異應該是很常見的，在*S. sonnei*的MLVA分析中，如果菌株間相差1個loci，也可能是源於共同來源，此一現象，也在其它研究中發現，例如*Escherichia coli* (O157:H7)也觀察到相同的情形[17]。此研究中，曾在群聚感染事件9中同一病人身上發現兩種只差1個loci的MLVA型別菌株，兩株菌株分離時間只差了6天。雖然同一群聚感染或同一個病例中可能分離到不同MLVA型別的菌株，但菌株之變異不快，變異株出現的比例一般不高，每一個群聚感染仍會有主要的MLVA型別，在群聚事件之判斷與流病研判上，不致於有太大的影響。

## 第二年 發展 *Shigella flexneri* 之 MLVA 分子分型技術

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 6)，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<sup>18</sup>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<sup>22</sup>，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<sup>23-26</sup>，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 4)；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 3)，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。

### 第三年 發展 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 之 MLVA 分子分型技術

前人研究指出，VNTRs 具有不同突變或變異速度<sup>27-29</sup>，而不同變異速度的 VNTRs，可用來評估不同演化距離的菌株之親緣關係<sup>21,27</sup>。結合多個 VNTRs 的 MLVA 分型技術，在細菌傳染病的流行病學應用上，可用於探討病原菌較長時期的全球或跨地理區域的傳播，也因為 MLVA 具有很高的分型效力，普遍被應用在細菌性傳染病流行病學，用於調查群突發事件 (outbreaks)，追蹤感染來源(trace back)與疾病監測(disease surveillance)。理論上，VNTRs 數目愈多，MLVA 的分型效力會愈高，但也同時增加操作成本。過去的研究指出，親緣關係近的菌株間的變異，主要出現在少數的幾個高變異 VNTRs，因此應用少數幾個高變異的 VNTRs，應可展示足夠的分型效力，足以做為群突發事件調查與疾病監測的工具。因此在研發 MLVA 技術的階段，應盡可能找出最多的 VNTRs，再評估其突變或變異速度、穩定度(stability)、與在族群中之 allelic diversity (由 allele 數目與 allele 在族群分佈兩因子所決)，再評估各種 VNTRs 組合之 MLVA 方法之分型效力，與做為親緣關係分析之應用性。

在研發 MLVA 階段，應盡可能找出可能的 VNTRs，再以大量的菌株進行評估。本研究利用電腦軟體 VNTRDB<sup>13</sup>，蒐尋 5 條 *S. Typhimurium* 菌株基因體序列，找出 39 個 VNTRs。過去尋找鑑定 VNTRs，需使用 Tandem repeat Finder<sup>30</sup> 蒐尋目標菌之基因體序列之 TRs，通常這個程序可找出數百個至上千個 TRs，再從這些 TRs 中找出 VNTRs，這個過程需耗費很多人力、時間與經費成本，測試很多數量的 TRs。高變異的 VNTRs 很容易被找到，但低

變異的菌株，只存在遺傳關係很遠的菌株中，不易被找到。因為 *S. Typhimurium* 目前已有 5 株菌株基因體已被完成定序，且序列資料可取得，因為 VNTRDB 可自每一條基因體中找出 TRs，再定位這些 TRs 在其它基因體中是否存在，其重覆單元數目，故可直接利用電腦找出並確定在這些基因體存有重覆單元差異的 TRs。電腦耗費約 7 天的時間，即可確定這些 VNTRs，傳統上需耗費至少一年以上之大量人力與龐大經費，也幾乎無法找到如此多的 VNTRs。

VNTRDB 找出的 39 個 VNTRs，有 16 個在測試的 40 株菌株中有重覆單元數目的差異，此 16 個 VNTRs 被選定，分析大量的菌株，做進一步的評估。本研究使用 176 株(P176)在 2,840 株 *S. Typhimurium* 菌株庫中屬於稀有 PFGE 型別的菌株(這些菌株有較高的遺傳差異性)，評估 16 個 VNTRs 之 allelic diversity，VNTR 之 allelic diversity 值代表該 locus 之 allele 數目與在族群之分佈。評估結果顯示 STTR3、STTR5、STTR6 與 STTR10 有最高的 allelic diversity 值(Table 16)，這 4 個 VNTRs 也同時具有較多的 allele 數目。210 株(P210)的 *S. Typhimurium* 菌株，隨機挑選自 9 個最盛行的 PFGE 型別，相同 PFGE 的菌株，應有較親近的親緣關係，P210 菌株可用於評估 VNTRs 之變異度。評估資料顯示，在 P176 菌株中具有高 allelic diversity 值的 VNTRs，大致上也有較高的變異度，唯在前四名排序上，有 STTR3 與 ST20 的差異(Table 16)。兩組菌株之評估結果，可做為不同應用目的選擇 VNTRs 組合之基礎。

一個理想可應用於群突發事件調查與疾病監測的分子分型工具，應該具有高分型效力(high discriminatory power)、低成本(low cost)、資料易於解讀(ease to interpret)、資料容易攜帶交換(high portability)與能快速大量分析樣本(high throughput)之特定。MLVA 具有極高的分型效力，資料容易解讀，容易跨實驗室進行交換比對。理論上，分析愈多 VNTRs 的 MLVA 會具有愈



高的分型效力，但也同時要付出愈多的分析成本。在群突發事件調查與疾病監測應用上，4 個 VNTRs 安排在 1 個 multiplex PCR 反應加以分析，分析 8 個 VNTRs 只需 2 個 multiplex PCR 反應，如此的 MLVA 技術，將具有比 PFGE 低成本，且可快速分析大量菌株之能力，適合做為疾病監測的例行性分析工具，且可做為群突發事件時快速分析菌株，提供基因分型資料供流病調查之用。本研究指出，應用 4 個最高變異 VNTRs 的 MLVA4，即擁有高於 PFGE 的分型效力(Table 17)，在 P210 菌株的評估中，MLVA8 可比 MLVA4 多得到 12 個基因型(Table 17)。此結果指出，平時使用 1 個 multiplex PCR 反應分析 4 個 VNTRs，即可做為群突發事件調查與疾病監測之例行性分析工具，若為了避免高變異 VNTRs 產生的同源演化(homoplasy)問題，在具相同 MLVA4 基因型時，而有流病資料不符合時，可加做另外 4 個 VNTRs。

VNTRs 具有高變異度，其穩定度在發展 MLVA 技術時，也是一個重要的評估要項。本研究分析 54 株分離自 7 個食品中毒案件之菌株，結果顯示 MLVA 之 VNTRs 應具有相當高的穩定度，因為同一案件之菌株，皆有同一種 MLVA 型別，而 7 個案件之前 4 個案件，其菌株有同一 MLVA 型別(也具有共同的 PFGE 型別) (Table 17)，此 4 個案件，發生在 2.5 年期間之內，案件之嫌疑食品皆為牛肉，4 個案件之牛肉或可能來自相同的污染來源，因發生時間相差 2.5 年，牛肉是同一批號之可能性不大，可能為不同批次的污染。據此資料推測之高變異 VNTRs，應該也有相當高程度的穩定度。

2004-2008 年分離之 2,840 株菌株，雖然有 469 個 PFGE 型別，但前 10 個 PFGE 型別即佔 59%，前 2 個 PFGE 型佔 40%。這些主要的 PFGE 型別出現在 2004-2008 期間。依據加拿大的經驗，有 2 株 *S. Typhimurium* 菌株具有相同的 PFGE 圖譜，追查的結果大多來自同一個群聚(cluster)，若依此經驗，依照 PFGE 分型結果，台灣每天都有 *S. Typhimurium* 的群聚感染，但同一污染源，又如何造成數年的持續感染？MLVA 分析結果顯示，相同 PFGE

圖譜菌株，可再被分成數目龐大的 MLVA 基因型，因此這些相同 PFGE 圖譜菌株應有許多不同來源。PFGE 分析結果，顯示台灣有 *S. Typhimurium* 之地方性流行問題(endemic problem)，大量不同來源之菌株具有相同 PFGE 圖譜。PFGE 在加拿大或許是 *S. Typhimurium* 有用的疾病監測分子分型工具，但在台灣則缺乏可接受的分型效力，MLVA 則可補 PFGE 的不足，對台灣的 *S. Typhimurium* 的監測，有很大價值。

## 結論與建議

1. 分析*S. sonnei*遺傳關聯性的MLVA分型法(含有26個VNTRs)，此方法比PFGE有更高的分型效力，並且能提供流行病學調查有用的訊息和分辨難以利用PFGE區分的菌株。本研究的評估指出，MLVA有潛力取代PFGE成為*S. sonnei*的標準分型法。不過，MLVA分子分型方法還需要測試更多不同地區的流行菌株來決定應該選擇那些VNTRs來作為*S. sonnei*的疾病監視和群聚感染事件調查的分型工具。
2. 36個*S. flexneri*之VNTRs，可用於尋找各血清型之不同變異程度的VNTRs。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VNTRs；因此，在實際的應用上，6套VNTRs的組合，應可滿足所有*S. flexneri*血清型的分型需求。
3. 16個*S. Typhimurium*之VNTRs，利用4個高變異VNTRs (MLVA4)的分型方法，即擁有比PFGE高的分型效力。*S. Typhimurium*的MLVA技術，可做為群突發事件流病調查與疾病監測的例行性分子分型工具，用於台灣嚴重

4. 依據2004-2008年結合44家全國各地醫院所做的*Salmonella*監測，顯示在台灣*S. Typhimurium*感染相當嚴重，屬於地方性流行。在疾病監測上，在加拿大相當有效的PFGE技術，在台灣之分型效力不足，MLVA能大大提升分型效力，是進行*S. Typhimurium*感染監測與流病調查的利器。未來，食品安全將是全國人民關注之重點，MLVA技術將是食因性疾病監測有力的工具。在明年度台灣FDA掛牌開始運作後，疾管局應積極執行PulseNet Taiwan的食因性疾病監測網工作，確保人民食的安全。

## 參考文獻

1. Chiou CS, Liao JC, Liao TL, et al. Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infect Dis*. Feb 15 2006;6(1):25.
2. Lee YS, Liu MC, Ko CF, Lu CH, Tseng YH. Molecular epidemiology of *Shigella flexneri* in a long-stay psychiatric nursing center during 2001 to 2003. *J Clin Microbiol*. Mar 2005;43(3):1353-1360.
3. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. May-Jun 2001;7(3):382-389.
4. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(6):3140-3145.
5. *Neisseria* MLST Home Page [<http://pubmlst.org/neisseria>] (accessed January 4, 2007).
6. Chiou CS, Liao TL, Wang TH, Chang HL, Liao JC, Li CC. Epidemiology and molecular characterization of *Streptococcus pyogenes* recovered from scarlet fever patients in central Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol*. Sep 2004;42(9):3998-4006.
7. Chiou CS, Hsu WB, Wei HL, Chen JH. Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. *J Clin Microbiol*. Mar 2001;39(3):1048-1056.
8. Chiou CS, Wei HL, Wang YW, Liao JC, Li CC. Usefulness of Inter-IS1 Spacer Polymorphisms for Subtyping of *Shigella sonnei* Isolates. *J Clin Microbiol*. Nov 2006;44(11):3928-3933.
9. Wei HL, Wang YW, Li CC, Tung SK, Chiou CS. Epidemiology and evolution of genotype and antimicrobial resistance of an imported *Shigella sonnei* clone circulating in central Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Aug 2007; 58(4):469-475.
10. Pourcel C, Andre-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*. Jun 8 2004;4:22.
11. Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, Boxrud DJ, Harrison LH. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol*. Dec 2003;41(12):5389-5397.
12. Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol*. Nov 2001;39(11):4190-4192.
13. Chang CH, Chang YC, Underwood A, Chiou CS, Kao CY. VNTRDB: a bacterial

- variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res.* Jan 2007;35(Database issue):D416-421.
14. The Wellcome Trust Sanger Institute.
  15. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* Spring 2006;3(1):59-67.
  16. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* Sep 1990;28(9):1903-1905.
  17. Liang SY, Watanabe H, Terajima J, et al. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* Nov 2007;45(11):3574-3580. .
  18. Chen JH, Hsu WB, Chiou CS, Chen CM. 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.* Jul 29 2003;224(2):277-283.
  19. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J Clin Microbiol.* Apr 2003;41(4):1469-1479.
  20. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods.* Nov 2004;59(2):163-172.
  21. Chiou CS, Watanabe H, Wang YW, et al. Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* Apr 2009;47(4):1149-1154.
  22. 邱乾順, 李翠鳳. 某少年觀護所桿菌性痢疾流行調查. *疫情報導.* Dec 25 1997;第13 卷(第 12 期):371-385.
  23. Zhang W, Pan JC, Meng DM, Ye R, Wang HQ. PFGE of *Shigella flexneri* 4c isolates from food-poisoning outbreaks and sporadic diarrhea patients. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* Jan 2007;41(1):50-53.
  24. Stagg RM, Cam PD, Verma NK. Identification of newly recognized serotype 1c as the most prevalent *Shigella flexneri* serotype in northern rural Vietnam. *Epidemiol Infect.* Oct 9 2007:1-7.
  25. Pryamukhina NS, Khomenko NA. Suggestion to supplement *Shigella flexneri* classification scheme with the subserovar *Shigella flexneri* 4c: phenotypic characteristics of strains. *J Clin Microbiol.* Jun 1988;26(6):1147-1149.
  26. El-Gendy A, El-Ghorab N, Lane EM, et al. Identification of *Shigella flexneri*

- subserotype 1c in rural Egypt. *J Clin Microbiol.* Mar 1999;37(3):873-874.
27. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol.* Sep 2004;4(3):205-213.
28. Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* Jun 2006;188(12):4253-4263.
29. Vogler AJ, Keys CE, Allender C, et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat Res.* Mar 1 2007;616(1-2):145-158.
30. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* Jan 15 1999;27(2):573-580.

圖表

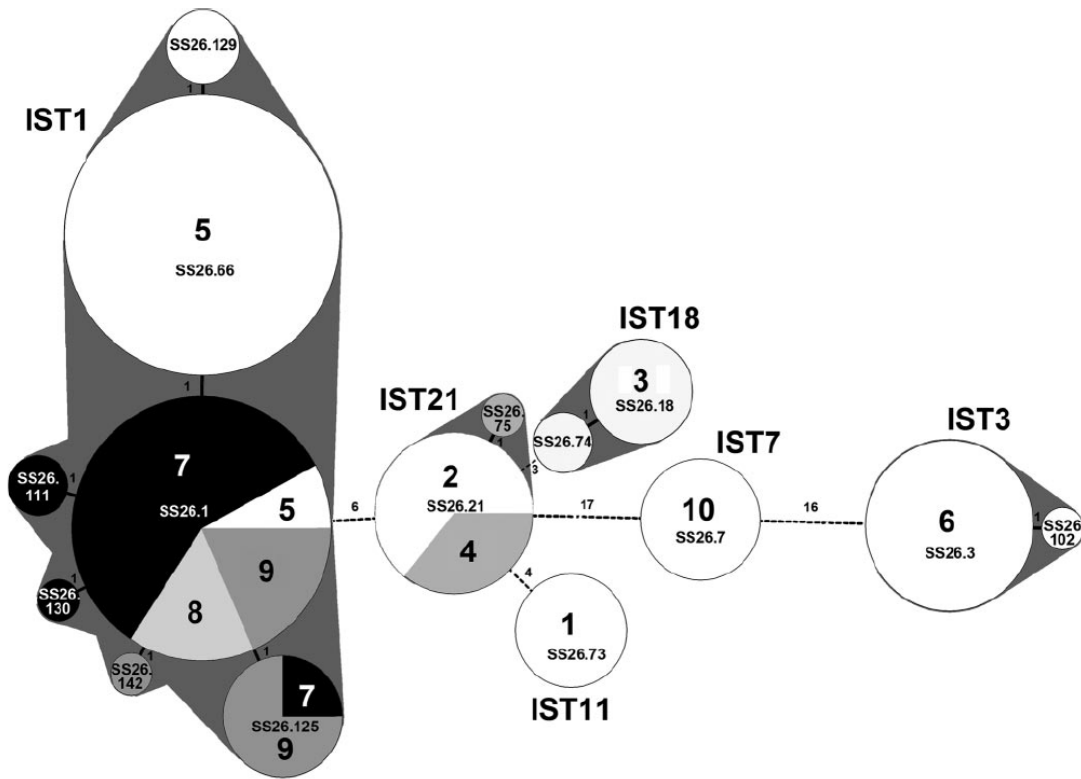
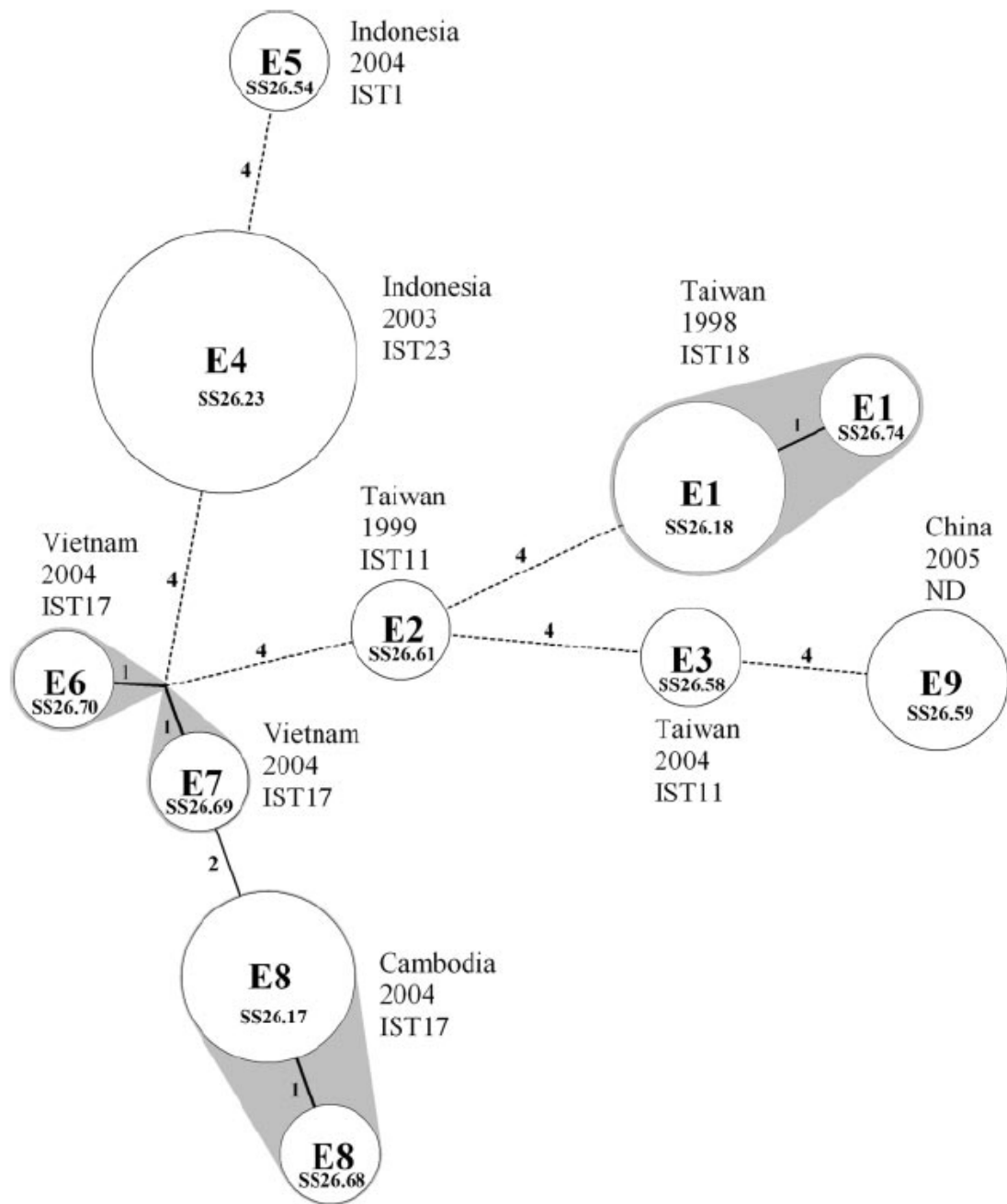


Figure. 1. Minimum spanning tree of the MLVA genotypes for the *S. sonnei* strains collected from 10 shigellosis outbreaks. The clustering was constructed by a minimum spanning tree algorithm. Arabic numerals (1 to 10) and indicate the outbreaks from which the MLVA strains were collected. The circle size is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. MLVA types differing by zero or one VNTR locus are regarded as a group and are marked with gray. Differences in loci between the two MLVA types are numbered. The IST genotypes for the outbreak strains are indicated. MLVA codes are marked in the circles.





**Figure. 2.** Minimum spanning tree of the MLVA genotypes for 22 *S. sonnei* isolates with indistinguishable PFGE patterns (J16N09.0015) collected from nine epidemiologically unrelated events (E1 to E9) in five different countries. Each event is noted with the country of infection, the year of occurrence, and the IST genotype. The circle size is proportional to the number of isolates belonging to the MLVA genotype. MLVA types differing by zero or one VNTR locus are regarded as a group and are colored gray. The differences in loci between two MLVA types are numbered. The MLVA codes are indicated in the circles.

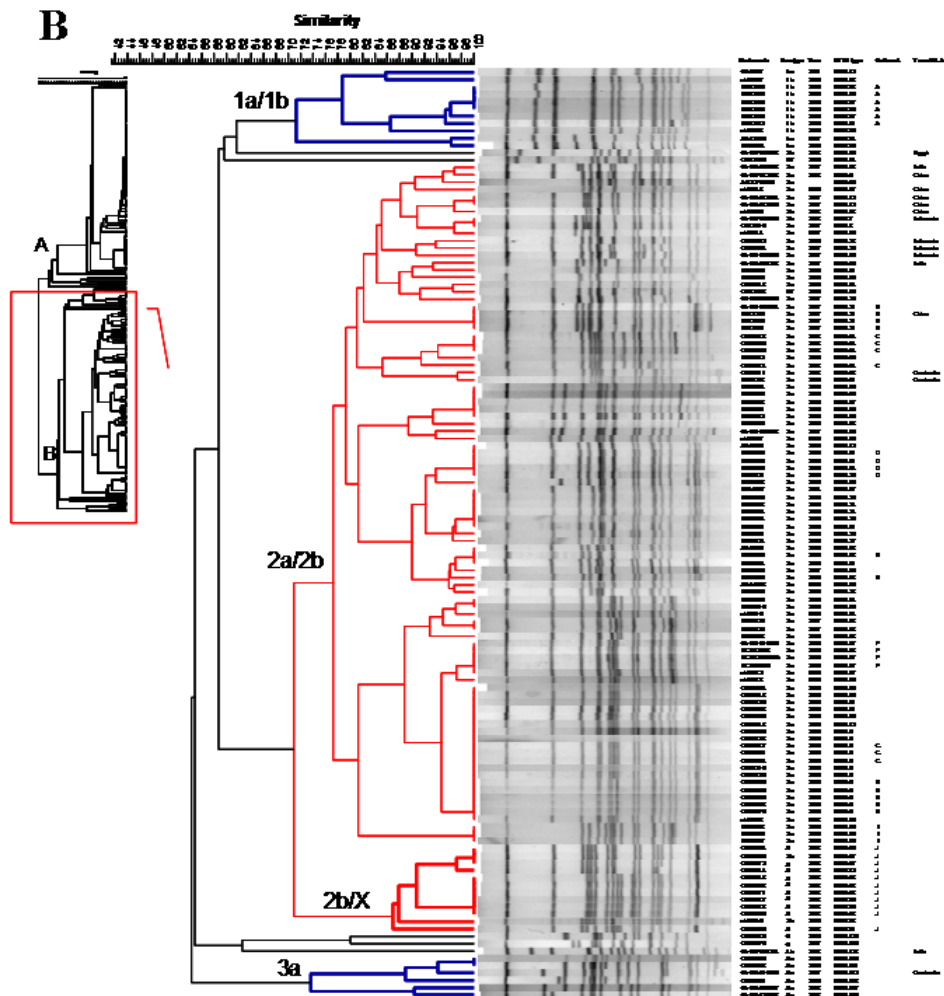


Figure 3. Dendrogram constructed with PFGE patterns using UPGMA algorithm for the *Shigella flexneri* isolates and the associated information related to the bacterial isolates. The isolates were grouped into two major clusters, A and B. (A) the dendrogram for isolates in cluster A; (B) dendrogram for isolates in cluster A.

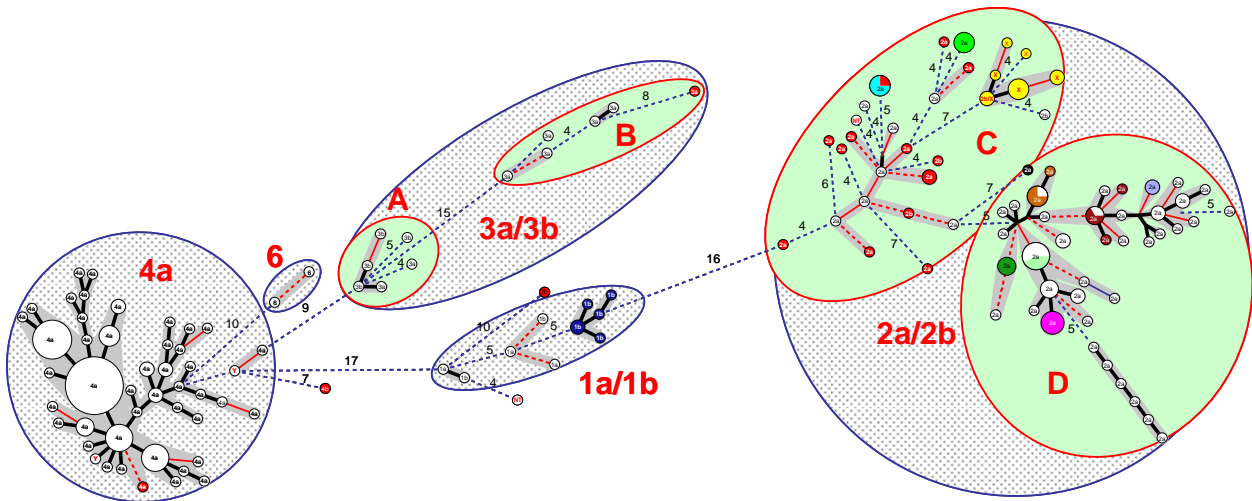
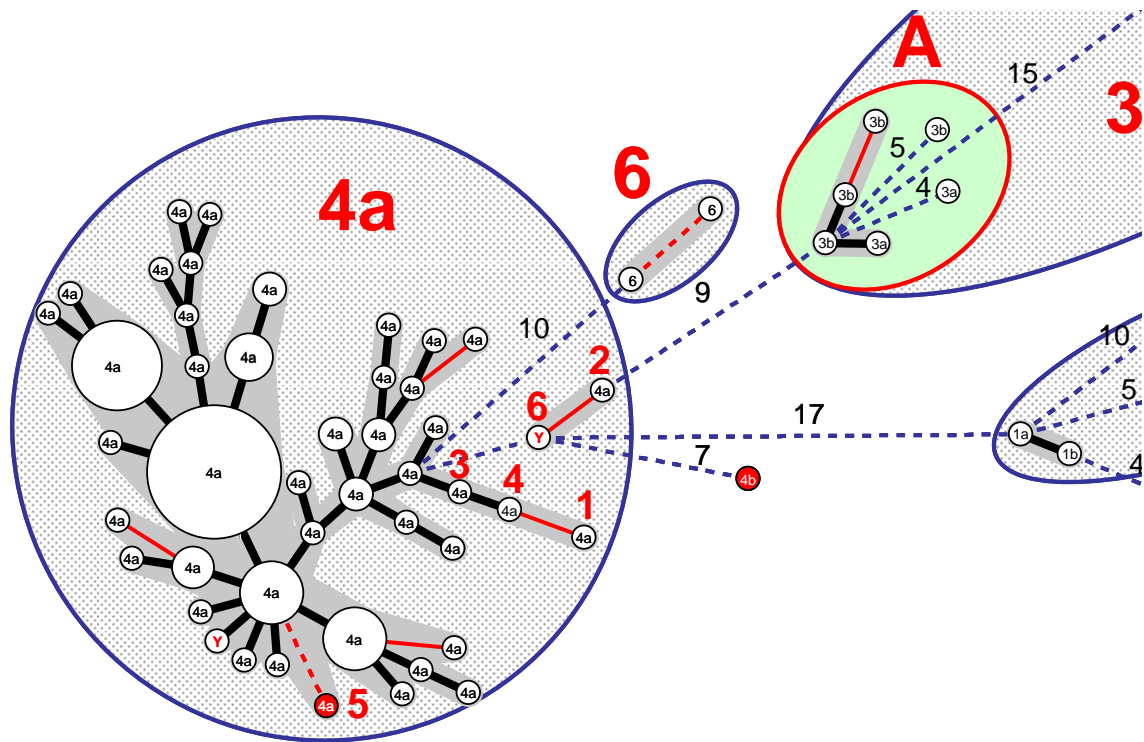
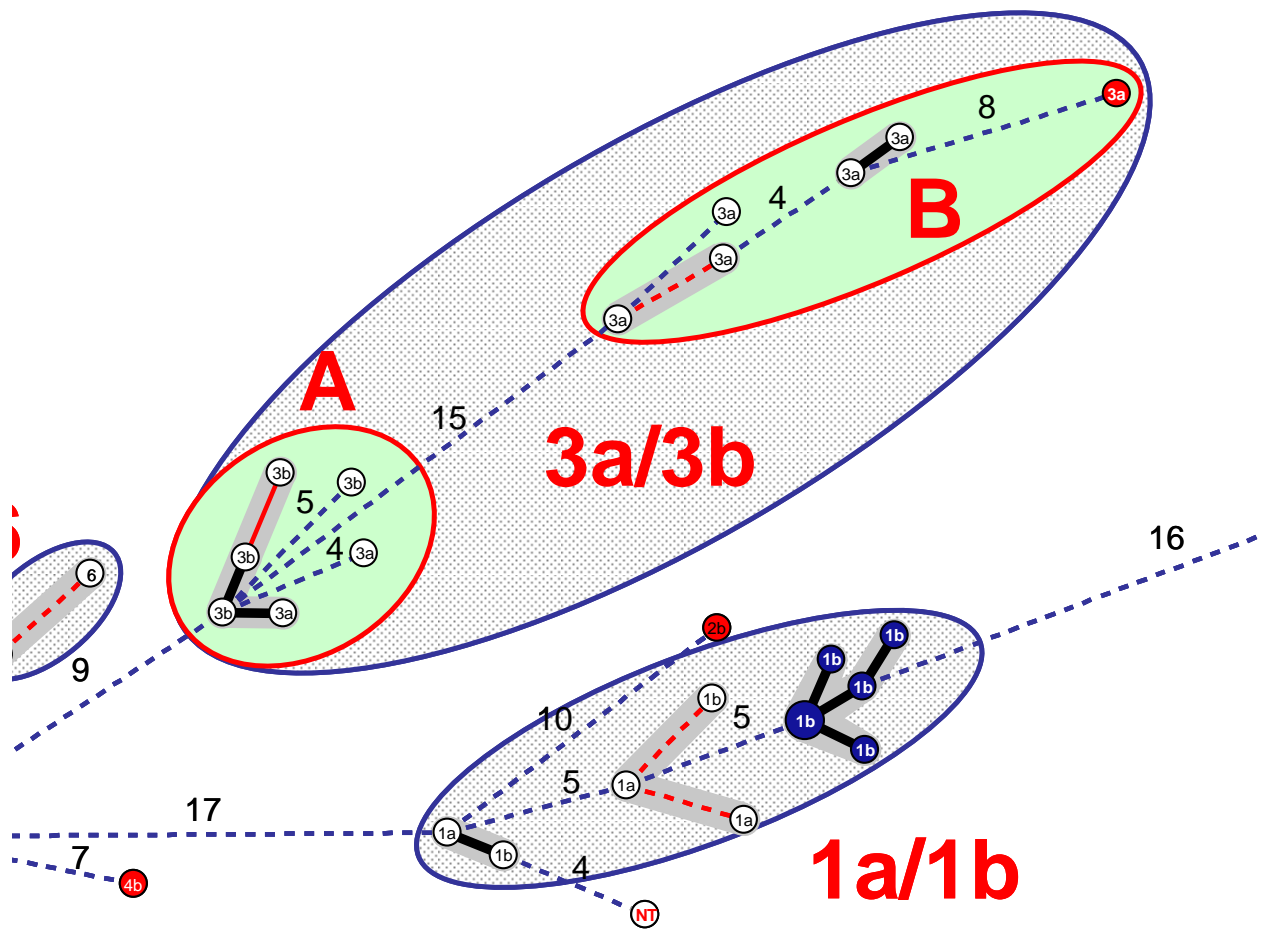


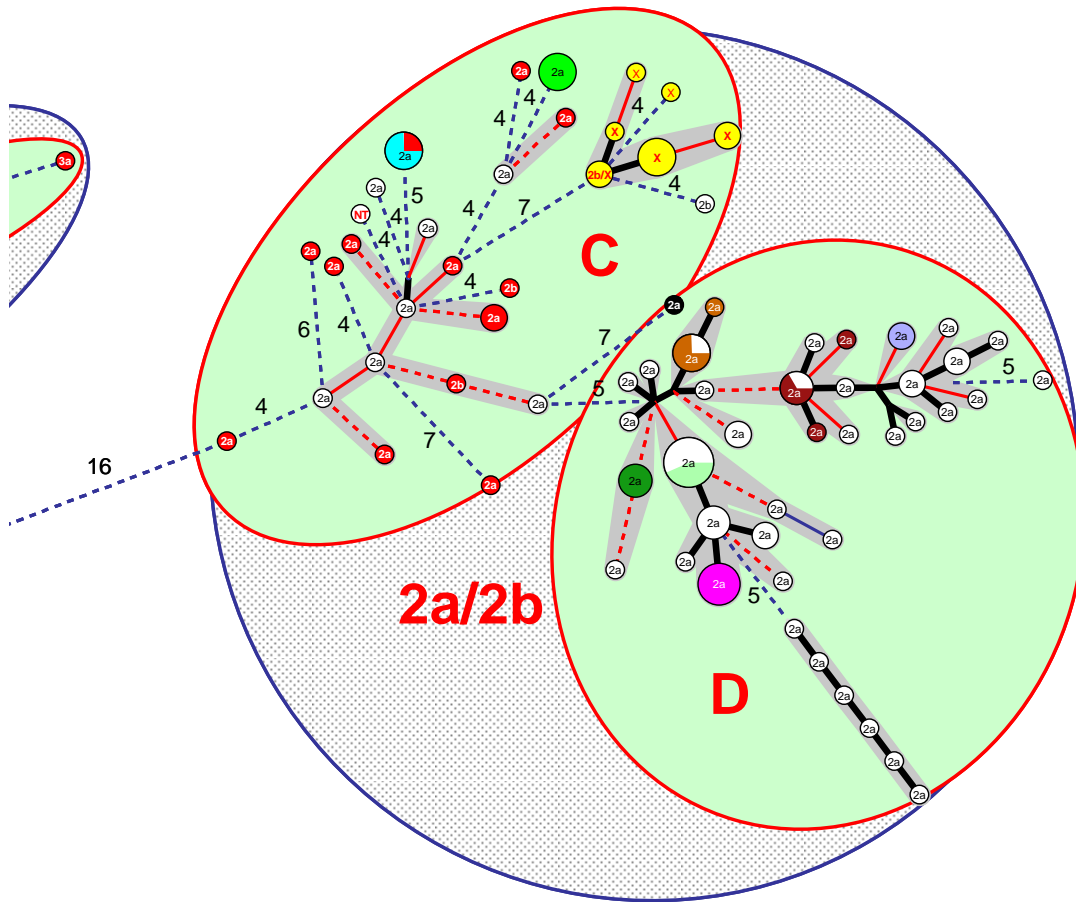
Figure 4. Phylogenetic tree for 242 *S. flexneri* isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. Imported isolates were marked in red color and the ATCC strain (ATCC 700930) was marked in black color. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging 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.



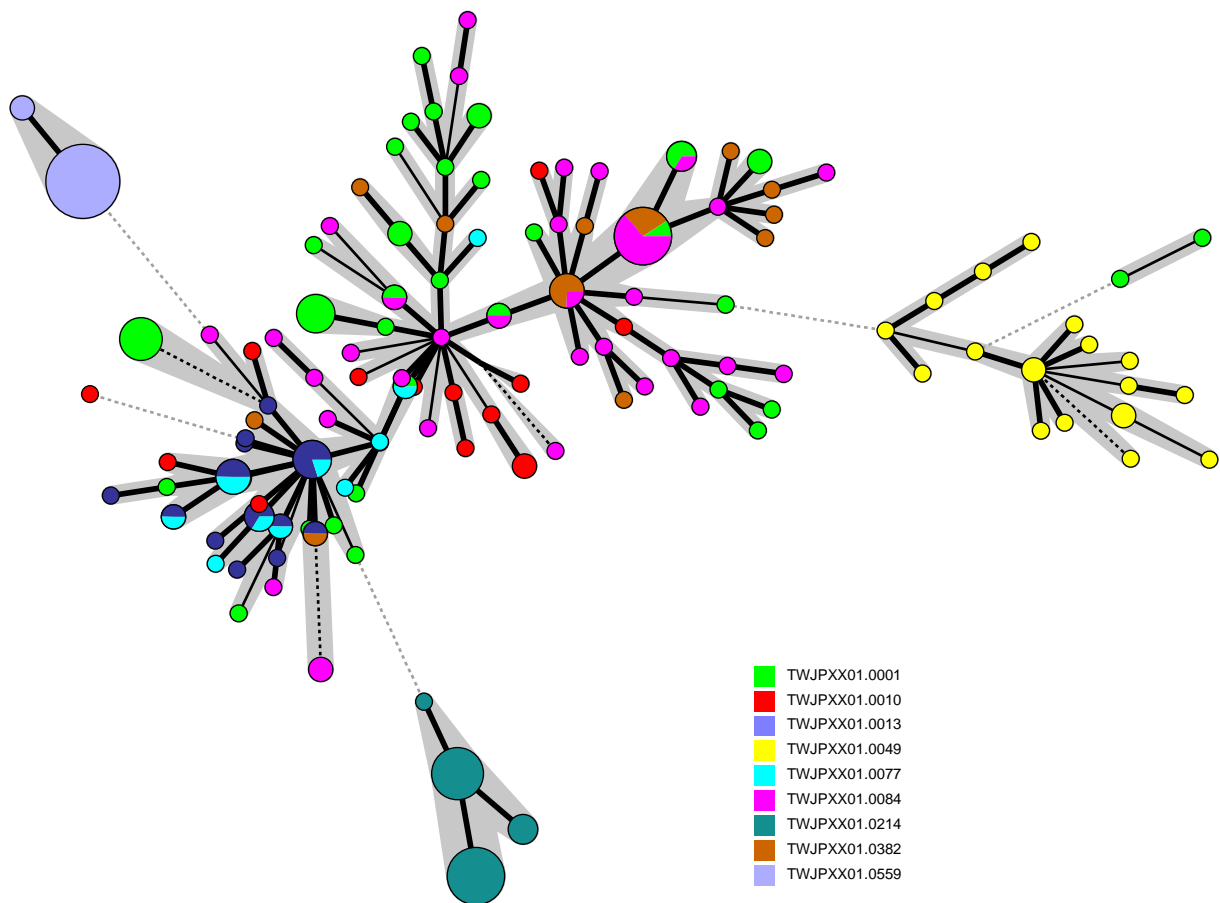
**Figure 5.** Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 4a serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The area of circle is proportional to the number of isolates belonging to the indicated MLVA genotype. Serotype for the genotype was indicated within the 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 13.



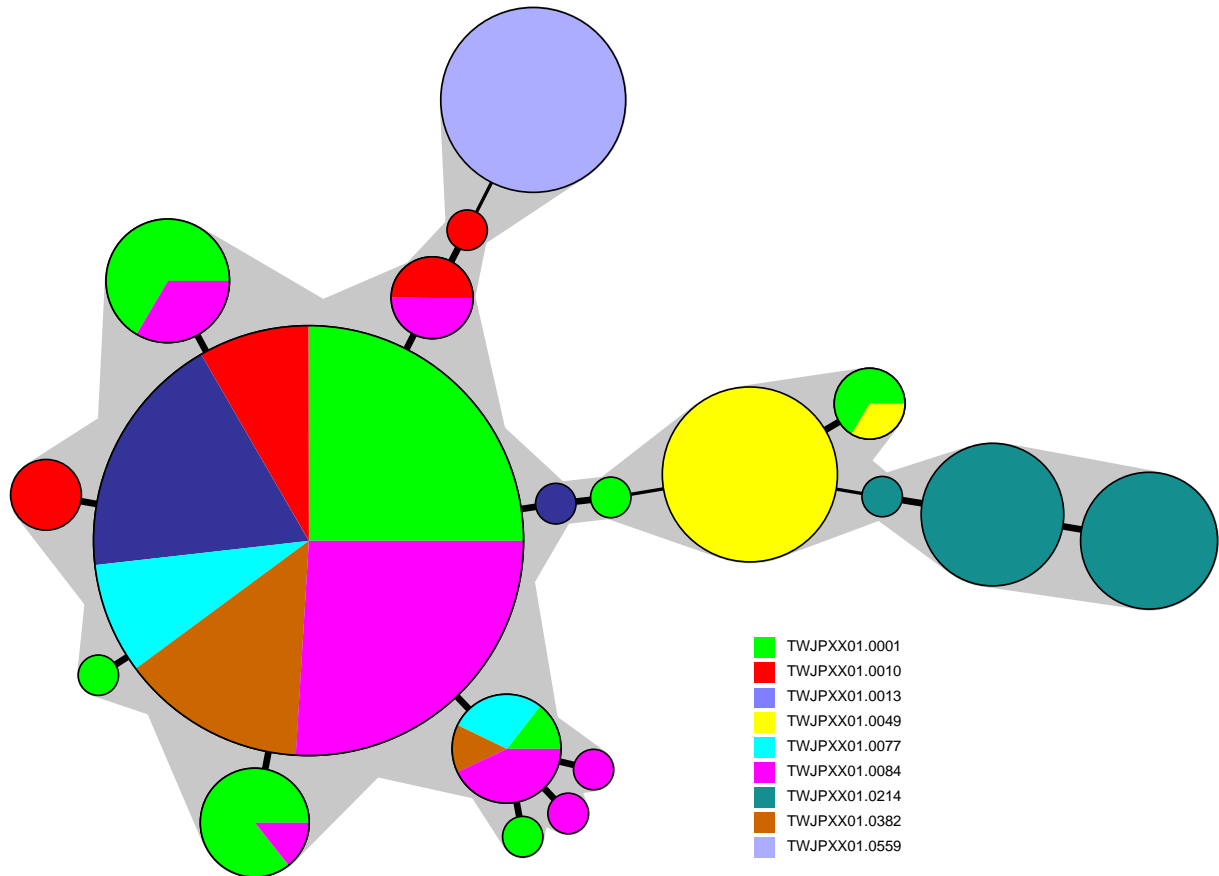
**Figure 6.** Phylogenetic tree for *Shigella flexneri* 3a/3b and 1a/1b serotype isolates constructed with MLVA profiles using minimum spanning tree algorithm. The isolates originated from Cambodia in 3a/3b subcluster B was marked in red color. Differences of loci between two MLVA types are indicated 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 7.** 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.

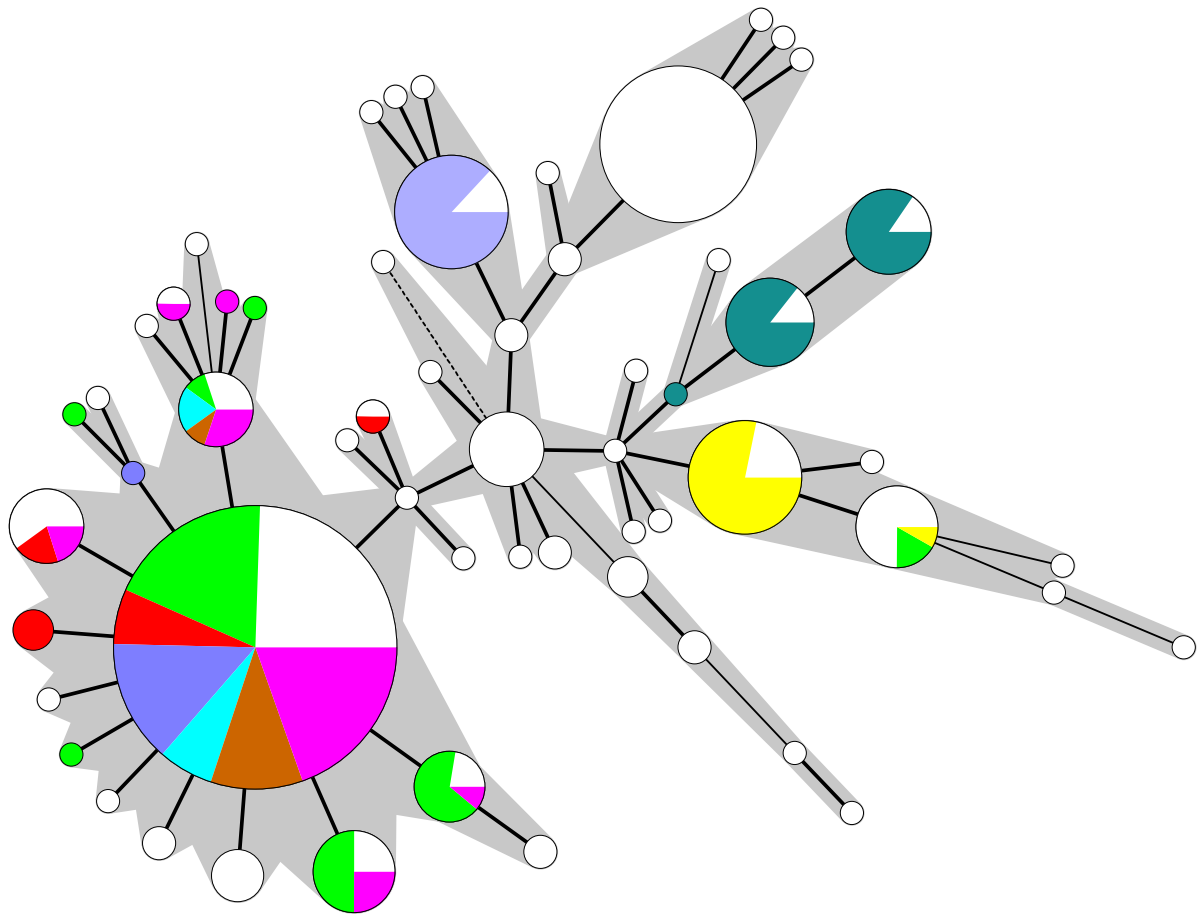


**Figure 8.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖一。關係圖以 Minimum Spanning Tree 演算法，以 P210 菌株 16 個 VNTRs 資料所建構。P210 有 210 株隨機挑選來自 9 個高盛行率的 PFGE 型別的菌株，同一 PFGE 型別菌株，以相同顏色標示。



**Figure 9.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖二。關係圖以 Minimum Spanning Tree 演算法，以 P210 菌株 12 個 VNTRs 資料所建構，即將 4 個高變異 VNTRs (STTR3, STTR5, STTR6, STTR10) 之資料排除。P210 有 210 株隨機挑選來自 9 個高盛行率的 PFGE 型別的菌株，同一 PFGE 型別菌株，以相同顏色標示。





**Figure 10.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 菌株親緣關係圖三。關係圖以 Minimum Spanning Tree 演算法，以 386 菌株 12 個 VNTRs 資料所建構，即將 4 個高變異 VNTRs (STTR3, STTR5, STTR6, STTR10) 之資料排除。386 株菌株包括 P210 的 210 株與 P176 的 176 株菌株。P210 組菌株使用不同顏色標示 9 個 PFGE 型別的菌株，P176 菌株以白色標示。

Table 1. Characteristics of 10 shigellosis outbreaks and genotypes of 151 *S. sonnei* isolates from the outbreaks

Outbreak	Date of isolation (yr/mo/day)	Location (county)	No. isolates	PFGE type <sup>a</sup> (no. isolates)	IST <sup>a</sup> (no. isolates)	MLVA type (no. isolates)
1	1996/2/5–1996/3/10	Hwalien	7	J16N09.0002 (5) J16N09.0003 (2)	IST11 (7)	SS26.73 (7)
2	1998/10/19–1998/11/12	Nantou	9	J16N09.0014 (9)	IST21 (9)	SS26.21 (9)
3	1998/10/31	Taoyuan	8	J16N09.0015 (4) J16N09.0016 (1) J16N09.0129 (1) J16N09.0140 (1) J16N09.0141 (1)	IST18 (8)	SS26.18 (6) SS26.74 (2)
4	1998/11/6	Taoyuan	6	J16N09.0014 (5) J16N09.0096 (1)	IST21 (6)	SS26.21 (5) SS26.75 (1)
5	2000/10/20–1998/11/4	Hwalien	49	J16N09.0019 (17) J16N09.0020 (1) J16N09.0023 (9) J16N09.0024 (1) J16N09.0025 (10) J16N09.0026 (6) J16N09.0027 (1) J16N09.0028 (1) J16N09.0029 (1) J16N09.0131 (1) J16N09.0127 (1)	IST1 (48) IST23 (1)	SS26.1 (3) SS26.66 (43) SS26.129 (3)
6	2001/8/2–2001/8/11	Nantou	17	J16N09.0018 (9) J16N09.0036 (8)	IST3 (16) IST26 (1)	SS26.3 (16) SS26.102 (1)
7	2001/8/9–2001/8/24	Nantou	27	J16N09.0019 (18) J16N09.0023 (3) J16N09.0050 (1) J16N09.0125 (1) J16N09.0147 (4)	IST1 (27)	SS26.1 (22) SS26.111 (2) SS26.125 (2) SS26.130 (1)
8	2001/10/4–2001/10/5	Taoyuan	6	J16N09.0072 (4) J16N09.0086 (1) J16N09.0126 (1)	IST1 (6)	SS26.1 (6)

							SS26.1 (7)
9	2002/4/21–2002/6/5	Nantou	14	J16N09.0019 (14)	IST1 (14)	SS26.125 (6)	SS26.142 (1)
-----							
10	2003/12/18–2004/1/9	Taitung	8	J16N09.0118 (8)	IST7 (8)	SS26.7 (8)	

---

<sup>a</sup>Data from a previous study <sup>9</sup>.

Table 2. Characteristics of the 26 VNTR loci and the primers for MLVA analysis.

VNTR locus	Consensus sequence(s) of repeat unit	Length of repeat unit (bp)	Strain Ss046			Strain 53G			No. allele <sup>a</sup>	Allele diversity <sup>b</sup> (126 strains)	Primers
			Location	Number of repeat unit	Length of amplicon	Location	Number of repeat unit	Length of amplicon			
SS1	ATGCGCC	7	1616607- 1616676	10	195	1685624- 1685630	1	132	11	0.57 (0.72)	VIC-TTGCCAGTACACCTCACTCG GCGTCGGCGTTAATATACT
SS2	CGTTCCCAG	9	3720971- 3720988	2	181	3854019- 3854027	1	172	2	0.29 (0.39)	6-FAM-AACCGGAGTGCAGCATAATC TTTAACGTCGATGCGAAATG
SS3	CATTCAA	7	3462989- 3463086	14	212	3595484- 3595595	16	226	20	0.83 (0.91)	6-FAM-CTGGGAGATGAACAGGAGGA ATGCCAGCGACAAGTTTCTT
SS4	ATGCTGA	7	3592746- 3592759	2	238	3726183- 3726203	3	245	2	0.29 (0.39)	6-FAM-ACCCAGCTGAATGGATTGTC AGCTTCAGATCCTTGCCGTA
SS5	CGTCTTC	7	3589488- 3589515	4	245	3722688- 3722708	3	238	2	0.34 (0.44)	6-FAM-CTCTGCTGAGCATCACGAAA AGCGGGTAACTGAATCATGG
SS6	AGAAAGC	7	4203622- 4203719	3	250	4323815- 4323905	13	243	20	0.83 (0.92)	NED-GAGTCGCTAAACGCTTGCTT GGGAAATAGAGCGGACCTTT
SS7	ACACCAT	7	1363761- 1363774	2	177	1346602- 1346622	3	184	2	0.33 (0.44)	NED-CACGGCTGAAATCAACATGA CACGTGCTCGCTCTTTAGAA
SS8	GGTAATGACT CCAACTTATT GATAGTGTTT	60	3975503- 3975562	1	196	4112363- 4112482	2	256	2	0.04 (0.12)	VIC-CGGATGATTGCCGAGATATT CGATATACGCAGCGAATTGA

TATGTTCA  
GATAATGCCC  
GATGACTTTG  
TC

SS9	TGCAGG	6	4197029- 4197076	8	209	4317216- 4317269	9	215	9	0.61 (0.76)	VIC-CGCAATCAGCAAAACAAAGA GCGATGCTGGAAAACTGAT
SS10	AGAGGA	6	765727-7 65710	3	198	777669-7 77710	7	223	6	0.58 (0.74)	6-FAM-ACGGTGGGCTTTCTCTACCT GCGAGGGGGAGATCAGTATT
SS11	CTGACT	6	266254-2 66277	4	199	261172-2 61207	6	211	6	0.57 (0.73)	NED-CTGGTCCGGGAGATTATCG CTGTTTCAGCGGTCTCTTCC
SS12	AACCCGGTG	9	281168-2 81185	2	188	278744-2 78770	3	197	4	0.36 (0.48)	NED-GCTGTAGGCACGAAAAGAA TGGATATTGTGCAGGGTTCA
SS13	GCTGGT	6	2893867- 2893884	3	236	3026278- 3026289	2	230	4	0.38 (0.5)	VIC-AGACGCTGGCTTATGACGAT GCCACTGTCTGAATGGTCT
SS14	TGCCAGATC	9	815674-8 15691	2	165	830701-8 30727	3	174	2	0.29 (0.39)	PET-TTCAAAAGTCTGCCCGTTGT GTGGATTTTGCGGAACAGAT
SS15	GCCATT	6	1733392- 1733403	2	246	1814911- 1814928	3	252	2	0.34 (0.44)	NED-ACCCGCTCTCTTCGCTTAAT TTGGCTCATCAAGCACAATC
SS16	AAAGTGCTAT GCAGTAA	17	4666803- 4666836	2	134	4822898- 4822948	3	151	3	0.31 (0.45)	6-FAM-GTCAGGTTATGCGTCTGCAA AAGAAGAAAGCGTCGCGTAA
SS17	CCGATG	6	1418565- 1418576	2	244	1403533- 1403550	3	250	2	0.34 (0.44)	VIC-GTTACCTGTATGCCGCGATT AGCGTCAGTACGCCGTTAAT
SS18	CCTAT	5	4755082- 4755091	2	213	4919271- 4919285	3	218	3	0.28 (0.37)	PET-TGGTTATGATGTCACTGGCAAT CCATTTTTCCACCGTAATGGTTT

SS19	TGTTA	5	2478072- 2478081	2	243	2569486- 2569500	3	248	2	0.34 (0.44)	PET-CGAGCATTTTACCCCAAAAA TTTCCGCATTACGGAGAGTT
SS20	CGTTACTCCC CGGTTCCCGC ATCAGAATTA CGTGGTAGTA	40	4650394- 4650473	2	243	4806529- 4806568	1	203	2	0.34 (0.44)	PET-TGGCAATGTTTCGTTGGTTA GTGCAAAGCTTAGGCGTGAT
SS21	ATAAGAAAAA TCTTTAGC	18	4493355- 4493372	1	204	4648827- 4648862	2	222	2	0.27 (0.37)	VIC-TCGATAAATGCGTGAAAAACTT TGTGAATAGCAACAAAACGACA
SS22	AAACAGAAC TC	11	4545382- 4545403	2	237	4702309- 4702319	1	226	2	0.34 (0.44)	PET-GTTTTAAACGCATCAGAAGACG ACTGTTGGCGAGAAAGCTGTA
SS23	GTTAACGCTT ACCTCC	16	3777764- 3777717	3	180	4038374- 4038453	5	212	5	0.38 (0.48)	PET-CTGGCTTAATGGCTACATAC CGCATGAGCGTGTGTAATG
SS24	AATCCTCTAT CACCGACCA AATTCGAAAA GCCTGCTCA ACGAGCAGG CTTTTTTGCA TTTGTAGCTC ATGAGGATG AGAACCTCCG GGGCAGGG AGGTTCGACT CGAGCGAAG CGAGAGAAC	168	4038618- 4038953	2	485	4175556- 4175723	1	317	2	0.34 (0.44)	NED-ACGAAGGGGTCGGAGGTT GCGCGTCTTATCAGGCCTAC

	GTTGCGCCAG											
	CAACGGCCC											
	GCAGGGCGA											
	G											
	CCACGAAGT											
	GGCGAGT											
SS25	ACTAGACTGG	135	3466987-	1	243	3599989-	2	378	2	0.19 (0.27)	NED-TAGCGGTGCGACAAATTACA	
	CCCCCTGAAT		3467121			3600258					TGCTGAACAATTGCGATCTT	
	CTCCAGACAA											
	CCAGTATC											
	ACTTAAATAA											
	GTGATAGTCT											
	TAATACTAGT											
	TTTTAGAC											
	TAGTCATTGG											
	AGTACAGATG											
	ATTGATGTCTT											
	AGGGCCG											
	GAGAAACGC											
	AGACGGCGTA											
	CC											
SS26	GCATCCGGCA	101	4798869-	4	555	4962108-	4	555	4	0.09 (0.15)	PET-CGTATGCGTTGTTTAGCGTTAG	
	GTTGGCGCAC		4799272			4962511					TCTATTTGTGACATGCCGATA	
	AATGCCTGAT											
	GCGACGCT											

TGACGCGTCT  
TATCATGCCT  
ACAAGTCTGT  
GCCGAACC  
GTAGGCCGGA  
TAAGGCGTTC  
ACGCC

<sup>a</sup>Number of alleles detected in 536 *S. sonnei* isolates.

<sup>b</sup>Allele diversity calculated from 536 isolates (from 126 MLVA strains)



Table 3. MLVA profiles for 536 *S. sonnei* isolates characterized in this study.

Strain code	Year of isolation	MLVA type	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SS8	SS9	SS10	SS11	SS12	SS13	SS14	SS15	SS16	SS17	SS18	SS19	SS20	SS21	SS22	SS23	SS24	SS25	SS26	Note
85e47127	1996	SS26.16	1	2	14	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
85e47128	1996	SS26.16	1	2	14	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
85e47209	1996	SS26.60	7	2	18	2	4	16	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
85e46821	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46841	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46842	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46839	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46840	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46858	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
85e46873	1996	SS26.73	5	2	15	2	4	9	2	1	10	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O1
sh04185	1996	SS26.8	1	2	11	2	3	2	2	1	11	5	3	4	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	5	
sh08289	1997	SS26.10	1	1	13	3	3	19	3	1	11	5	7	4	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	3	2	1	4	
sh08542	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47517	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47518	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47499	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47498	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47453	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47439	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47406	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47620	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

86e48405	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47356	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47381	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47382	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47397	1997	SS26.11	7	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh09397	1997	SS26.51	7	2	23	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh08069	1997	SS26.51	7	2	23	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e48248	1997	SS26.51	7	2	23	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e48397	1997	SS26.51	7	2	23	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47360	1997	SS26.51	7	2	23	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e47383	1997	SS26.55	8	2	22	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh08255	1997	SS26.56	7	2	24	2	4	17	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
86e48259	1997	SS26.57	7	2	22	2	4	16	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh07150	1997	SS26.9	1	1	13	3	3	18	3	1	11	5	7	4	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	3	2	2	4	
sh07156	1997	SS26.91	1	1	13	3	3	17	3	1	11	5	7	4	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	3	2	2	4	
sh09727	1998	SS26.13	1	1	10	3	3	9	3	1	12	5	6	3	2	2	3	3	3	3	3	1	2	1	3	1	1	4	
sh12435	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3/E1
sh12324	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3/E1
sh12571	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3
sh12342	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3/E1
sh12448	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3
sh12566	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3
sh14338	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	
sh14713	1998	SS26.18	8	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	
sh10657	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh12163	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13039	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh12941	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh12999	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh12619	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh12657	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13679	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13685	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13810	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13798	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13797	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh13132	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh13394	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh13796	1998	SS26.21	6	2	21	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O2
sh10491	1998	SS26.30	7	2	22	2	4	10	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh14974	1998	SS26.52	7	2	23	2	4	18	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh11620	1998	SS26.53	7	2	23	2	4	15	2	1	9	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh10289	1998	SS26.6	1	2	11	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh10290	1998	SS26.6	1	2	11	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh10288	1998	SS26.6	1	2	11	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh12446	1998	SS26.74	6	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3
sh12569	1998	SS26.74	6	2	19	2	4	6	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	4	O3/E1
sh12971	1998	SS26.75	6	2	26	2	4	12	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O4
sh09650	1998	SS26.94	1	2	11	2	3	2	2	1	10	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh15371	1999	SS26.4	1	1	16	3	3	6	3	2	9	5	8	3	2	3	3	3	3	2	3	1	2	1	5	1	1	4	

sh15299	1999	SS26.61	9	2	18	2	4	20	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E2
89e1237	2000	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1761	2000	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2112	2000	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2653	2000	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
89e1223	2000	SS26.129	2	2	20	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1924	2000	SS26.129	2	2	20	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2075	2000	SS26.129	2	2	20	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
sh18933	2000	SS26.65	10	2	24	2	4	13	3	1	12	7	5	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
89e1097	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1102	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1231	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1370	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1731	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1107	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1115	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1135	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1181	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1410	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1448	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1496	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1501	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1529	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1844	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1845	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5

89e1867	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1868	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1869	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1872	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1883	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2045	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2074	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2097	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2243	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2284	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2285	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2335	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2342	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2353	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2360	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1331	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2060	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2034	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2197	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1253	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1312	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1418	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1852	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1930	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e1958	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5

89e1965	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e2009	2000	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O5
89e0849	2000	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
89e0131	2000	SS26.93	1	2	12	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh24655	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23554	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh22064	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23344	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
shSWD	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
shWKM	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
sh25185	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
90e2237	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23320	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh24652	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23398	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23400	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23401	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23405	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
shWYC	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
shWSR	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
shLHF	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
shCMK	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O8
sh24468	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23404	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23407	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7

sh24073	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23339	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24920	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24653	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24656	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24657	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24467	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24651	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24167	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23870	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23559	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23560	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23561	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23563	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23564	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23566	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23632	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23633	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23394	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23395	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23397	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23437	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23553	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23555	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23525	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh23551	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23345	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23346	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23347	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23348	2001	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23634	2001	SS26.101	1	1	15	3	3	22	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23202	2001	SS26.102	1	1	14	3	3	24	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh22572	2001	SS26.106	2	2	23	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25176	2001	SS26.106	2	2	23	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25180	2001	SS26.106	2	2	23	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24658	2001	SS26.107	2	2	22	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24466	2001	SS26.108	2	2	21	2	4	18	3	1	7	7	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24126	2001	SS26.109	2	2	20	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23990	2001	SS26.109	2	2	20	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23866	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24470	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24469	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24461	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24462	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24125	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23863	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23867	2001	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25178	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23319	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23558	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	



sh23392	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23431	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23393	2001	SS26.111	2	2	21	2	4	17	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh24181	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23868	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24826	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23752	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24094	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24095	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24177	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24749	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24806	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24236	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24306	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24103	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24127	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23794	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23905	2001	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23865	2001	SS26.113	2	2	24	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25177	2001	SS26.118	2	2	21	2	4	18	3	1	7	9	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23746	2001	SS26.119	2	2	24	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24128	2001	SS26.120	2	2	25	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25184	2001	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh23552	2001	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh24654	2001	SS26.128	2	2	21	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh23556	2001	SS26.130	2	2	21	2	4	20	3	1	6	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O7
sh24860	2001	SS26.138	2	2	23	2	4	19	3	1	10	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24868	2001	SS26.138	2	2	23	2	4	19	3	1	10	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24927	2001	SS26.138	2	2	23	2	4	19	3	1	10	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25015	2001	SS26.138	2	2	23	2	4	19	3	1	10	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24915	2001	SS26.14	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24072	2001	SS26.14	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh25291	2001	SS26.140	2	2	16	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24182	2001	SS26.147	2	2	23	2	4	16	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24305	2001	SS26.147	2	2	23	2	4	16	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
shCCN	2001	SS26.15	9	2	18	2	4	10	2	1	7	3	4	2	4	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24294	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh25181	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh25182	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh25183	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24914	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24916	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24917	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24918	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24919	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24471	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24647	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24648	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24649	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24650	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	

sh24460	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24463	2001	SS26.153	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh25048	2001	SS26.154	1	1	14	3	3	24	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24129	2001	SS26.156	1	1	14	3	3	23	3	1	10	6	5	2	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh23991	2001	SS26.157	1	1	14	3	3	23	3	1	7	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24464	2001	SS26.20	9	2	15	2	4	17	2	1	7	3	5	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh22815	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22782	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22704	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22703	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24458	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23869	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23406	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23309	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24913	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24733	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24911	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24912	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24465	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24459	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh24051	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23784	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23680	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23362	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23371	2001	SS26.25	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	

sh23323	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23322	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23194	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23216	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23241	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23258	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23263	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23288	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23329	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23330	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23331	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23332	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23333	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23334	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh24357	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh24362	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh23341	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
sh23342	2001	SS26.3	1	1	14	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	O6
90e5973	2001	SS26.37	1	1	13	3	3	24	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	2	3	1	2	1	6	1	2	4	
shWYC	2001	SS26.5	1	1	16	3	3	10	3	2	8	6	6	3	2	3	3	3	3	2	3	1	1	1	0	1	2	4	
sh22576	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh22090	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh22091	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh22377	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh22392	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		

sh22199	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh22363	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh22201	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25179	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25047	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23864	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23989	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23679	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh23557	2001	SS26.67	2	2	23	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh24457	2001	SS26.78	1	1	14	3	3	24	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22979	2001	SS26.79	1	1	14	3	3	22	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22970	2001	SS26.79	1	1	14	3	3	22	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh23310	2001	SS26.79	1	1	14	3	3	22	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh22705	2001	SS26.95	1	2	16	2	3	2	2	1	18	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh22738	2001	SS26.95	1	2	16	2	3	2	2	1	18	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	
sh23565	2001	SS26.99	1	1	15	3	3	23	3	1	9	6	5	2	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh25769	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25951	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26111	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30185	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25620	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25440	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26019	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25953	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25885	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh25780	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25727	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25435	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26142	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27269	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27272	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27765	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27774	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27775	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27776	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27999	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh30253	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30172	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30171	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30186	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29288	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28842	2002	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28247	2002	SS26.100	1	1	15	3	3	23	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh30316	2002	SS26.105	1	1	15	3	3	13	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh30282	2002	SS26.105	1	1	15	3	3	13	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh30709	2002	SS26.105	1	1	15	3	3	13	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh30592	2002	SS26.105	1	1	15	3	3	13	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh30318	2002	SS26.105	1	1	15	3	3	13	3	1	9	7	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh27367	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28590	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh29393	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27794	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27558	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28111	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28023	2002	SS26.110	2	2	21	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28415	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28715	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28705	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28727	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28754	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28788	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28816	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28818	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28934	2002	SS26.112	2	2	23	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25579	2002	SS26.114	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25698	2002	SS26.114	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25609	2002	SS26.114	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28170	2002	SS26.114	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27168	2002	SS26.115	2	2	22	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27192	2002	SS26.115	2	2	22	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27560	2002	SS26.115	2	2	22	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27795	2002	SS26.115	2	2	22	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27366	2002	SS26.115	2	2	22	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30188	2002	SS26.116	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	1	1	4	
sh25718	2002	SS26.117	2	2	22	2	4	18	3	1	7	8	7	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh28841	2002	SS26.119	2	2	24	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29749	2002	SS26.12	1	1	14	3	3	22	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh26248	2002	SS26.121	2	2	25	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26274	2002	SS26.121	2	2	25	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26249	2002	SS26.121	2	2	25	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26379	2002	SS26.121	2	2	25	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26841	2002	SS26.121	2	2	25	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26840	2002	SS26.122	2	2	26	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29350	2002	SS26.122	2	2	26	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29368	2002	SS26.122	2	2	26	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29507	2002	SS26.122	2	2	26	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26364	2002	SS26.123	2	2	26	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29864	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27212	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26747	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27076	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27592	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27866	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27882	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27559	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27695	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27710	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27531	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27533	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29511	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	



sh29513	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29515	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29289	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28843	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28949	2002	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26418	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26442	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26487	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26512	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26601	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26621	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26746	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26675	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26981	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27026	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh26620	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26325	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26854	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26889	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26838	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26677	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27005	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26977	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26976	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26890	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh27270	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27271	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27998	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28001	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28000	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27273	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh27777	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9
sh28020	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28019	2002	SS26.125	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29510	2002	SS26.126	2	2	20	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29479	2002	SS26.126	2	2	20	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30183	2002	SS26.127	2	2	21	2	4	20	3	1	7	9	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29477	2002	SS26.128	2	2	21	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29478	2002	SS26.128	2	2	21	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29516	2002	SS26.128	2	2	21	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29744	2002	SS26.129	2	2	20	2	4	21	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh25405	2002	SS26.131	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	7	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26669	2002	SS26.132	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	7	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26674	2002	SS26.133	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	1	1	4	
sh30184	2002	SS26.134	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	1	1	4	
sh29863	2002	SS26.135	2	2	20	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29811	2002	SS26.135	2	2	20	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29512	2002	SS26.135	2	2	20	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27169	2002	SS26.136	2	2	21	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27176	2002	SS26.136	2	2	21	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh27623	2002	SS26.136	2	2	21	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh26673	2002	SS26.137	2	2	21	2	4	19	3	1	7	8	6	2	4	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30187	2002	SS26.139	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	1		
sh25304	2002	SS26.140	2	2	16	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh25434	2002	SS26.140	2	2	16	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh25308	2002	SS26.140	2	2	16	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh25303	2002	SS26.141	2	2	16	2	4	18	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh26488	2002	SS26.142	2	2	21	2	4	23	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	O9	
sh30250	2002	SS26.143	2	2	21	2	4	23	3	1	7	9	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30434	2002	SS26.145	2	2	25	2	4	17	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30712	2002	SS26.148	2	2	25	2	4	15	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30725	2002	SS26.148	2	2	25	2	4	15	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30342	2002	SS26.149	2	2	25	2	4	16	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30344	2002	SS26.149	2	2	25	2	4	16	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh30581	2002	SS26.149	2	2	25	2	4	16	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh25550	2002	SS26.150	2	2	25	2	4	13	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
sh28002	2002	SS26.152	1	1	13	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh28188	2002	SS26.152	1	1	13	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh29287	2002	SS26.155	1	1	14	3	3	22	3	1	10	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh28171	2002	SS26.158	1	1	13	3	3	23	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	0	
91e1650	2002	SS26.16	1	2	14	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5		
91e1761	2002	SS26.16	1	2	14	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5		
91e1770	2002	SS26.16	1	2	14	2	3	2	2	1	11	5	4	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5		
sh30284	2002	SS26.27	1	1	21	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	
sh30719	2002	SS26.27	1	1	21	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	

sh30285	2002	SS26.27	1	1	21	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	
sh30288	2002	SS26.27	1	1	21	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	
91e1570	2002	SS26.38	1	1	15	3	3	20	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	2	3	1	2	1	5	1	2	4	
sh29290	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh27094	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29746	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29759	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29748	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29529	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29528	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29745	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh29747	2002	SS26.66	2	2	20	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh26619	2002	SS26.81	1	1	14	3	3	25	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	1	4	
sh30290	2002	SS26.85	1	1	22	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	
sh30333	2002	SS26.86	1	1	20	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	1	4	
sh30334	2002	SS26.87	1	1	22	3	3	17	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	2	4	
sh25433	2002	SS26.92	2	2	24	2	4	13	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh28125	2002	SS26.97	6	2	14	2	4	22	2	1	8	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30825	2003	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30829	2003	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh31112	2003	SS26.1	2	2	21	2	4	20	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30805	2003	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30830	2003	SS26.124	2	2	20	2	4	19	3	1	7	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30842	2003	SS26.144	2	2	27	2	4	18	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh30745	2003	SS26.146	2	2	25	2	4	18	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	

sh30841	2003	SS26.151	2	2	25	2	4	19	3	1	8	8	6	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	1	
sh33592	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33597	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33680	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33651	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33683	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33741	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33766	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E4
sh33781	2003	SS26.23	4	2	11	2	4	19	2	1	8	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
92e1608	2003	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
92e1569	2003	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
92e1750	2003	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
sh33358	2003	SS26.76	8	2	14	2	4	15	2	1	8	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh31919	2003	SS26.83	1	1	14	3	3	26	3	1	9	6	5	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	1	6	1	2	4	
sh31299	2003	SS26.88	1	1	21	3	3	16	3	2	9	6	7	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	5	1	2	4	
sh32941	2003	SS26.96	6	2	16	2	4	20	2	1	9	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh33596	2003	SS26.98	8	2	14	2	4	18	2	1	8	3	3	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
sh33594	2003	SS26.98	8	2	14	2	4	18	2	1	8	3	3	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
N04.1872	2004	SS26.17	5	2	14	2	4	14	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E8
N04.1873	2004	SS26.17	5	2	14	2	4	14	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E8
N04.1876	2004	SS26.17	5	2	14	2	4	14	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E8
C04.1114	2004	SS26.22	12	2	29	2	4	17	2	1	7	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
C04.1126	2004	SS26.22	12	2	29	2	4	17	2	1	7	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
C04.1194	2004	SS26.34	7	2	16	2	4	14	2	1	9	3	4	2	4	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
S04.1133	2004	SS26.54	10	2	7	2	4	16	2	1	7	3	4	2	5	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E5

C04.2952	2004	SS26.58	11	2	16	2	4	24	2	1	6	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E3	
C04.1101	2004	SS26.63	12	2	29	2	4	17	2	1	7	3	4	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
N04.1870	2004	SS26.68	5	2	15	2	4	14	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E8	
N04.0453	2004	SS26.69	5	2	13	2	4	16	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E7	
E04.0029	2004	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
E04.0031	2004	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
E04.0045	2004	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
E04.0070	2004	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
E04.0075	2004	SS26.7	1	2	11	2	3	2	2	1	13	5	3	5	2	2	3	2	3	2	3	1	1	1	0	1	1	5	O10
N04.0450	2004	SS26.70	4	2	13	2	4	13	2	1	8	3	4	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E6
N04.1097	2004	SS26.71	4	2	13	2	4	16	2	1	8	3	5	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	
N04.0442	2004	SS26.72	11	2	15	2	4	14	2	1	7	3	4	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4		
S05.2389	2005	SS26.104	1	1	17	3	3	4	3	2	10	5	8	4	2	3	3	3	3	4	3	1	1	1	3	1	2	4	
N05.0007	2005	SS26.59	8	2	12	2	4	21	2	1	6	3	5	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E9	
N05.0008	2005	SS26.59	8	2	12	2	4	21	2	1	6	3	5	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	1	4	E9	

Table 4. *Shigella flexneri* isolates used in this study.

Serotype	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2003	2004	2005	2006	2007	2008	NA <sup>j</sup>	Total
1a			1				1				1				3
1b						2				6					8
2a	1	4	1	1	1 (1) <sup>a</sup>	2			1	48 (2) <sup>c</sup>	8	16 (7) <sup>d</sup>	6 (2) <sup>f</sup>	1	90 (12)
2b						1		1 (1) <sup>b</sup>					3 (2) <sup>g</sup>		5 (3)
3a							1			3		2 (1) <sup>e</sup>	2		8 (1)
3b			1								2	1			4
4a			1		2		2			13	84	4	1 (1) <sup>h</sup>		107 (1)
4b													1 (1) <sup>i</sup>		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)

<sup>a</sup> China; <sup>b</sup> China; <sup>c</sup> Cambodia (1), Indonesia (1); <sup>d</sup> China (3), India (2), Indonesia (2); <sup>e</sup> Cambodia (1); <sup>f</sup> China (1), Cambodia (1); <sup>g</sup> Egypt (1), Indonesia (1); <sup>h</sup> Cambodia; <sup>i</sup> India; <sup>j</sup> ATCC 700930

Table 5. 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 6. 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 7. 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			
SSSTR-C1	17.22	1.22	1.22	1.22	1.22	15.99	9	98 / 0
SSSTR-C2	1.71	2.00	2.00	13.00	14.00	12.28	7	100 / 0
SSSTR-C5	1.50	6.50	6.50	2.50	2.50	5.00	6	93 / 0
SSSTR-C6	6.80	3.79	3.79	2.79	2.79	4.00	5	96 / 0
SSSTR-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
SSSTR-C9	3.85	1.85	1.85	1.85	1.85	2.00	7	100 / 0
SSSTR-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
SSSTR-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
SSSTR-C18	1.05	1.05	1.05	2.05	2.05	1.00	19	100 / 0
SSSTR-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 8. *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 9. 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 10. Primers, dyes and multiplex PCR combinations.

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

6	SF8	NED-GCCAGAGCTGTTGGTACTGG CGATTTTTGTCCGCTGAAAG	0.1	54
	SF16	PET-GTACGCGGAAATCCTGAAGA GTGATCCCACATGACATCCA	0.1	54
	SF13	VIC-AAATTGCCCGCAGYAAAGTG AAACCGCCAGCAAATAAAG	0.1	54
	SF9	6-FAM-CAAATGGTAACGTCGCATCA ATGGGATTGCTGCGTAACAC	0.1	54
	SF17	NED-GAGATCCTGATGCGTCGTTT GGAATRAACGTCAACGAGGT	0.1	54
	SF2	PET-GGGCAAATTAGCTCGGAGT GCCAAAGGGAGCAGACTGTA	0.1	54
	SF33	VIC-GGTTACCCACAGCAGTCACA TGTGGAGCAAAGTGGATTG	0.1	54
	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 TGAGATGCACCTCTTCTCA	0.1	54
	8	SF24	6-FAM-CTGGATGTTCTGGCGTACCT CCACCGGTTAAGCCAAATAA	0.1
SF23		NED-TGTTGTAACTCGCCGTTCA 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 GCGGGAACGGACTGTAAAT	0.1	54
	SF6	PET-GAAATACTCAGGTGTCAACATTCG GCTTTGGAGAGTATTATTGCCTGT	0.1	54
	SF20	VIC-AATCTGGCCAATGCCTCTAC CAACCTGAATGCTGCCATTA	0.1	54

<sup>a</sup> 6-FAM, NED, PET and VIC are ABI patented fluorescent dye

Table 11. Allele diversity of 36 VNTR loci for various serotype groups.

VNTR locus	No. alleles	Range of copy number <sup>a</sup>	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

---

<sup>a</sup> 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 12. 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) <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> 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 13. *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

Table 14. Primers, dyes and multiplex PCR combinations.

Multiplex PCR set	Locus (alias)	Primer sequence (5' to 3')	Working conc. ( $\mu$ M)	T <sub>m</sub> ( $^{\circ}$ C)	Dye labeled
1	ST16	TGCCACACAAGACGAAATTA	0.15	F : 58	PET
		TCTATGCAAACCAGCAATGA		R : 59	
	ST17	CGAAGCACTTAGCAAGAACG	0.1	F : 59	VIC
		GAGTCCAACAGGAAACCGTAA		R : 59	
ST35	GGATGCGCTGTTAGAACGTC	0.15	F : 61	NED	
	CCACGGTGTAACCCGTTAG		R : 60		
ST36	CTCCCCCTTTTTCAGGGTAT	0.4	F : 59	FAM	
	GCCATGCAGTCCGCTATTAT		R : 60		
2	ST01 (STTR7)	CCGAGTCAACGCCTGTTTCAG	0.1	F : 61	NED
		ACGCTGTAATGGACGGCTGTC		R : 61	
	ST22	GGTCATTGAGGACGTGTGAT	0.1	F : 59	VIC
		GACGGGAATACCCTGGAATA		R : 59	
ST28	GCGGCAGTTGATTTATGACT	0.1	F : 58	FAM	
	CTTCAAGGCAAAAAGAGGTG		R : 58		
ST30	CATCGGGAAAGATGTAATCC	0.2	F : 58	PET	
	ATGCTGGATCGAACTGAAAA		R : 59		
3	ST25 (STTR5)	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT	0.2	F : 66	VIC
		GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT		R : 61	
	ST26 (STTR9)	AGAGGCGCTGCGATTGACGATA	0.1	F : 65	NED
		CATTTTCCAACAGCGGCAGTTTTC		R : 65	
	ST38	CCGCACACTAAGGAGAGACT	0.1	F : 58	FAM
TGGCTAACATCCTGAAGCTC		R : 59			
ST40 (STTR10)	CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG	0.2	F : 69	PET	
		GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC		R : 70	
4	ST06 (STTR3)	CCCCCTAAGCCCGATAATGG	0.4	F : 64	FAM
		TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA		R : 66	
	ST19 (STTR6)	TCGGGCATGCGTTGAAA	0.1	F : 64	NED
		CTGGTGGGGAGAATGACTGG		R : 63	
	ST20	GCGGGAGGATCTTTTATGG	0.1	F : 60	VIC
ACGAAGCGCCCTGATAAGTA		R : 60			
ST23	GCGGTACTGACGTCAAGTCTAA	0.2	F : 60	PET	
	CATAGGGCGCATACGTGATA		R : 60		



Table 15. Thirty-nine VNTR loci in silico explored from five *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genomes

Locus (alias) <sup>a</sup>	Repeat unit (bp)	Location in LT2	Number of repeats in strain:					Match/Indels %
			LT2	DT104	SL1344	DT2	D23580	
ST01 (STTR7)*	39	1039570–1039883	413 (8+6)	413 (8+6)	443 (9-3)	443 (9-3)	443 (9-3)	95 / 0
ST02	7	1068740–1068755	2	2	2	1	2	100 / 0
ST03	15	1129917–1129946	2	1	1	1	1	100 / 0
ST04	184	1224141–1224760	3	2	2	2	2	98 / 0
ST05	6	1227883–1227894	2	2	2	2	4	100 / 0
ST06 (STTR3)*	33	1227533–1227864	490 (3/10+ 6)	517 (4/10+ 6)	523 (3/11+ 6)	523 (3/11+ 6)	457 (3/9+ 6)	93 / 0
ST08	8	1427644–1427660	2	2	2	1	2	100 / 0
ST09	93	1531617–1532114	5	4	5	5	5	92 / 0
ST10	3	1599216–1599231	5	5	5	4	3	100 / 0
ST11	61	1762210–1762299	1	2	2	1	0	100 / 0
ST12	174	1852925–1853649	4	3	4	4	4	95 / 0
ST13	9	1958279–1958306	3	3	3	4	0	100 / 0
ST14	12	2053194–2053227	3	3	3	3	2	100 / 0
ST15	9	2078424–2078447	2	2	2	2	3	93 / 0
ST16	9	2332010–2332035	2	2	2	2	3	100 / 0
ST17*	7	2332558–2332573	2	1	2	1	2	100 / 0
ST18	9	0–0	0	1	2	1	1	100 / 0
ST19 (STTR6)*	6	2730867–2730948	13	17	8	6	9	100 / 0
ST20*	6	2750702–2750722	2	3	2	2	2	100 / 0
ST21	4	282139–282154	4	3	3	3	3	100 / 0
ST22*	12	2804204–2804239	3	3	3	3	2	100 / 0
ST23*	8	29673–29690	1	3	2	2	2	100 / 0
ST24	15	3058600–3058630	2	2	1	2	2	87 / 0
ST25 (STTR5)*	6	3184543–3184622	13	13	8	17	7	100 / 0

ST26 (STTR9)*	9	3246675–3246714	4	3	2	2	2	100 / 0
ST27	3	3314480–3314494	5	5	5	4	5	100 / 0
ST28*	15	3381836–3381850	1	2	1	1	1	100 / 0
ST29	27	3629474–3629562	3	4	3	3	3	98 / 0
ST30*	200	3682911–3683315	2	1	1	1	1	100 / 0
ST31	3	36988–36999	4	4	3	4	4	100 / 0
ST32	3	3762698–3762709	4	5	5	5	5	100 / 0
ST33	6	3965616–3965629	2	2	3	2	2	100 / 0
ST34	10	40921–40940	2	2	2	2	1	100 / 0
ST35*	12	4210906–4210930	2	2	2	2	1	96 / 0
ST36*	4	758696–758708	3	3	2	3	3	100 / 0
ST37	155	819457–820015	3	2	2	2	2	96 / 0
ST38*	12	83274–83301	2	2	2	2	1	100 / 0
ST39	6	891800–891814	2	2	3	2	2	100 / 0
ST40 (STTR10)*	6	53711–53771	10	24	7	ND	9	100 / 0

Table 16. Allelic diversity of 16 VNTR loci in a panel of 176 diverse isolates (P176) and a panel of 210 closely related isolates (P210)

Locus (alias)	Repeat unit (bp)	No. alleles in P176	Allelic diversity in P176	Allelic diversity in P210
ST01 (STTR7)	39	7	0.299	0.027
ST06 (STTR3)	33	9	0.695	0.045
ST16	9	3	0.447	0.000
ST17	7	3	0.482	0.084
ST19 (STTR6)	6	18	0.906	0.706
ST20	6	3	0.506	0.133
ST22	12	2	0.146	0.009
ST23	8	4	0.489	0.113
ST25 (STTR5)	6	20	0.920	0.454
ST26 (STTR9)	9	5	0.371	0.095
ST28	15	2	0.474	0.036
ST30	200	2	0.087	0.000
ST35	12	2	0.011	0.000
ST36	4	2	0.034	0.000
ST38	12	2	0.066	0.009
ST40 (STTR10)	6	21	0.904	0.570

Table 17. Discriminatory power of PFGE and MLVA based on various combined VNTRs in a panel of 176 diverse isolates and a panel of 210 closely related isolates.

Method	Diverse isolates (P176)			Closely related isolates (P210)		
	No. genotypes	ID	CI	No. genotypes	ID	CI
PFGE	147	0.9971	0.9953-0.9989	9	0.8698	0.8541-0.8855
MLVA4 <sup>a</sup>	156	0.9984	0.9973-0.9995	110	0.9808	0.9735-0.9880
MLVA8 <sup>b</sup>	160	0.9988	0.9980-0.9997	122	0.9823	0.9756-0.9896
MLVA16	161	0.9989	0.9981-0.9997	124	0.9831	0.9761-0.9900

<sup>a</sup>STTR3, STTR5, STTR6, and STTR10 for P176; STTR3, STTR5, STTR6, and ST20 for P210

<sup>b</sup>STTR3, STTR5, STTR6, STTR9, STTR10, ST17, ST20, and ST23 for P176 and P210

Table 18. Genotypes for *S. Typhimurium* isolates from seven foodborne disease outbreaks

Outbreak	Date occurrence	No. isolates	PFGE type (No. isolates)	MLVA type
1	1998/10/2	10	TW.0001 (9) TW.0005 (1)	SM16.130
2	1999/12/27	12	TW.0001 (10) TW.0004 (2)	SM16.130
3	2000/1/7	5	TW.0001 (5)	SM16.130
4	2001/4/4	13	TW.0001 (13)	SM16.130
5	2001/12/4	7	TW.0013 (7)	SM16.284
6	2002/1/11	3	TW.0071 (3)	SM16.285
7	2003/7/7	4	TW.0070 (4)	SM16.283