

表1 腸炎ビブリオの性状

T S I 寒天				L I M 培地			発育		V P	オキシダーゼ
斜面	高層	硫化水素	ガス	リジン	インドール	運動性	O %	8 %		
赤	黄	—	—	+	+	+	—	+	—	+

資料2

腸炎ビブリオ検査方法・定性法

検査材料 25g

アルカリペプトン水(APW) 225mlを加え、
ストマッキング処理

アルカリペプトン水の
食塩濃度は2%(1%も可)

35±1°C 16~18時間 培養

上層の1~2白金耳をTCBS寒天培地または酵素基質培地に塗抹し、
35±1°C 16~18時間培養

腸炎ビブリオと推定される集落の同定

資料 3

B. 腸炎ビブリオ試験法・定量法(作業部会案:ステージ2)

1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8, NaCl 1 %も可) (APW) 225mlを入れ、ストマッキング処理し、検体の 10 倍希釈液を作成し試料とする。次に検体の 10 倍希釈液 1ml を APW 9ml の入った試験管に入れ、検体の 100 倍希釈液を作成する。

検体の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管にそれぞれ 1ml ずつ接種し、また、検体の 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管に 0.1ml ずつ接種する。

35±1°C、16~18 時間培養後、各試験管の上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、35±1°C、16~18 時間培養する。培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定し、各段階に希釈した試験管の陽性本数を最確数表にあてはめて、1gあたりの最確数を求める。

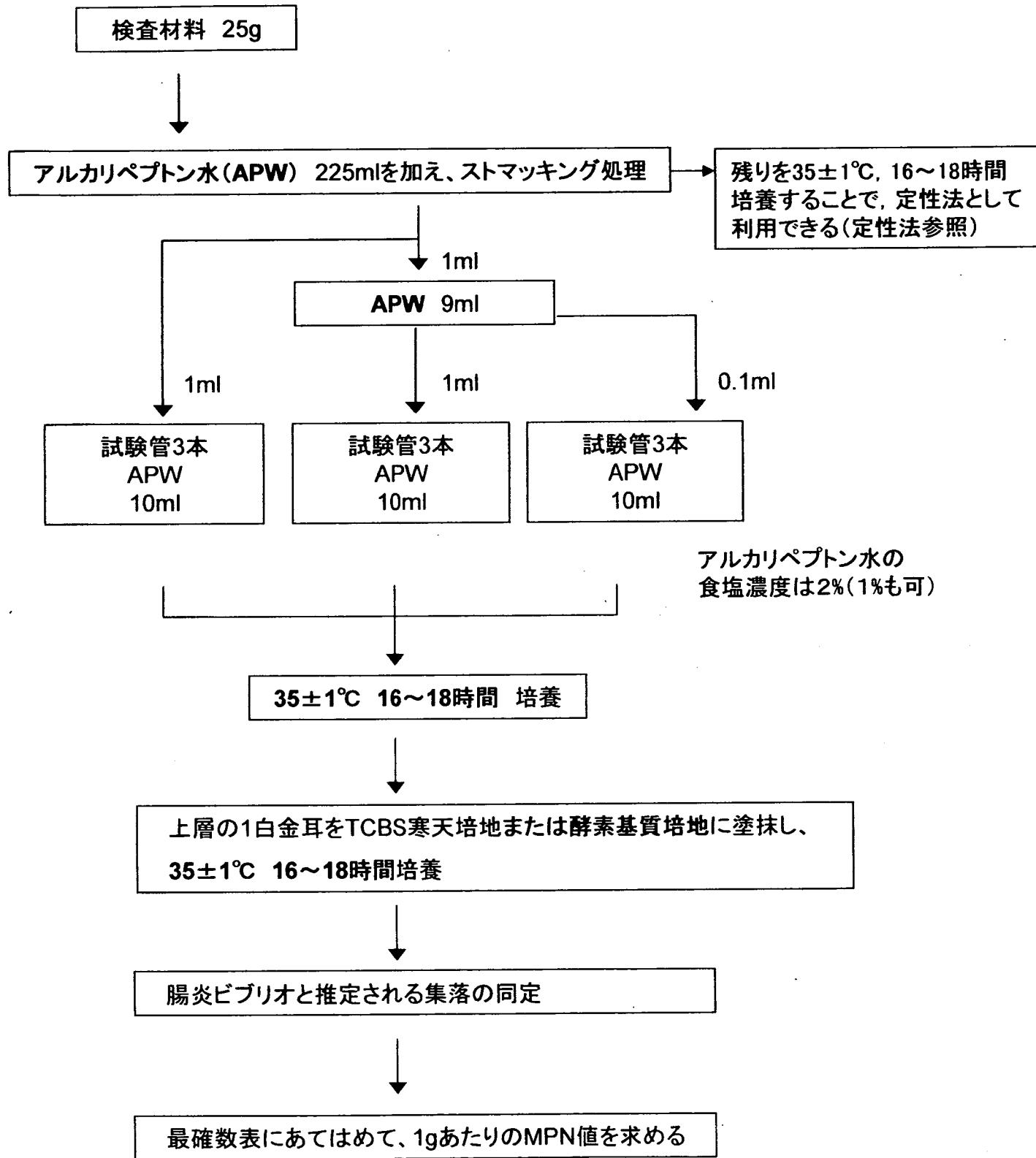
25g に APW 225ml を加えた 10 倍乳剤液は、そのまま培養して定性法として利用できる。

2. 同定

定性法に準ずる。

資料 4

腸炎ビブリオ検査方法・定量法



H19 厚労科研費腸炎ビブリオ報告書

腸炎ビブリオ 表 1-9 の別冊

製本版報告書の中に腸炎ビブリオの表2－9の挿入をおとしてしました。お詫びいたしますとともに、この別刷りを添付いたします。なお、表1については製本版に含まれていますが、再度この別刷りにも掲載いたしました。ご参照下さい。

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部

宮原美知子

表1 確認培地の食塩濃度の検討

施設	供試 菌株数	食塩濃度1%		食塩濃度2%		食塩濃度*による 判定結果の差異
		発育	判定	発育	判定	
A	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
B	100	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
C	80	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
D	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
E	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し

供試確認培地:TSI寒天、LIM培地、VP半流動寒天培地

* 1% および 2%

表2 プライマー *toxRn*, LDHの特異性の比較:A施設

菌種	供試 菌株数	陽性数	
		<i>toxRn</i>	LDH
<i>V. parahaemolyticus</i>			
Type Strain	1	1	1
食品	12	12	12
環境	35	35	35
ヒト	57	57	57
小計	105	105	105
<i>V. cholerae</i> non-O1	4	0	0
<i>V. mimicus</i> (Type Strain)	1	0	0
<i>V. fluvialis</i> (Type Strain)	1	0	0
<i>V. vulnificus</i>	4	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	4	0	0
小計	14	0	0

結果

1. *toxRn* PCR と LDH PCR の結果は一致した。
2. *toxRn* PCR では腸炎ビブリオ以外の供試株でも陽性バンドと一致する位置に薄いバンドがみられたが、反応系でのプライマー濃度が高すぎたことに起因するものと考えられた。
3. LDH PCR では腸炎ビブリオ以外の株で判定を妨害するエキストラバンドはみられなかった。

表3 プライマー *toxRn*, *toxR*, LDH の特異性の比較:B施設

菌種	供試 菌株数	陽性数		
		<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>	LDH
<i>V. parahaemolyticus</i>	189	188	188	188
<i>V. cholerae</i> O1	3	0	0	0
<i>V. cholerae</i> O139	1	0	0	0
NAG	7	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	6	0	0	0
<i>V. fluvialis</i>	6	0	0	0
<i>V. vulnificus</i>	25	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	105	4	4	0

結果

1. いずれのプライマーでも腸炎ビブリオは陽性となった。
2. *V. alginolyticus* 105株のうち4株が *toxRn*, *toxR* 共に陽性となった。

表4 プライマー *toxRn*, *toxR* の特異性の比較(腸炎ビブリオ): C施設

血清型	TDH 產生性	供試菌株:由来				陽性数	
		食品	環境	ヒト	計	<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>
O1:K1	-			1	1*	1	1
O1:K25	+			3	3	3	3
O2:K3	+			6	6	6	6
O2:K28	-		1		1	1	1
O3:K6	+	3	6	49	58	58	58
O3:K6	-	5	1		6	6	6
O3:K7	+			1	1	1	1
O3:K29	+			1	1	1	1
O3:K37	+			2	2	2	2
O3:K58	+			1	1	1	1
O4:K4	+			1	1	1	1
O4:K8	+			4	4	4	4
O4:K9	+	1		1	2	2	2
O4:K11	+			1	1	1	1
O4:K68	+			4	4	4	4
O5:K68	+			2	2	2	2
O8:K20	-		1		1	1	1
UT	-	3	2		5	5	5
合 計		12	11	77	100	100	100

* ATCC 17802 (TRH產生株)

結果

- 供試した腸炎ビブリオ100株は、いずれのプライマーでも特異的な増幅バンドの形成がみられた。

表5 プライマー $toxRn$, $toxR$ の特異性の比較(腸炎ビブリオ以外): C施設

菌種	由来	供試 菌株数	陽性数	
			$toxRn$	$toxR$
<i>V. cholerae</i> O1(エルトール)	ヒト	9	0	0
<i>V. cholerae</i> non-O1	ヒト	3	0	0
<i>V. mimicus</i>	環境	3	0	0
<i>V. vulnificus</i>	環境	34 *	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	食品	5	0	0
合計		54	0	0

* O1群:6株, O3群:3株, O4群:8株, O5群:4株,
O6群:7株, O7群:1株, 不明:5株

結果

- 供試したその他のビブリオ属菌種54株は、いずれのプライマーでも增幅バンドの形成がなかった。

表6 プライマー $toxRn$, $toxR$ の特異性の比較:D施設

菌種	供試 菌株数	陽性数	
		$toxRn$	$toxR$
<i>V. parahaemolyticus</i>			
食品	8	8	8
環境	115	114	113
ヒト	21	21	21
小計	144	143	142
<i>V. alginolyticus</i>	1	0	0
<i>V. aestuarianus</i>	1	0	0
<i>V. campbellii</i>	2	0	0
<i>V. harveyi</i>	15	0	0
<i>V. natriegenes</i>	1	0	0
<i>V. nigripulchritudo</i>	1	0	0
<i>V. olivaceus</i>	1	0	0
<i>V. penaeicida</i>	3	0	0
<i>V. pomeroyi</i>	1	0	0
<i>V. ponticus</i>	1	0	0
<i>V. rotiferianus</i>	9	0	0
<i>V. splendidus</i>	1	0	0
<i>V. vulnificus</i>	24	0	0
<i>Vibrio</i> sp.	34	4	4
ND (性状は明らかに <i>V. parahaemolyticus</i> でない)	10	0	0
bacterium	9	1	1
<i>Photococcus caeruleum</i>	4	0	0
<i>Photococcus leiognathi</i>	1	0	0
<i>Shewanella algae</i>	4	0	0
<i>Shewanella loihica</i>	1	0	0
小計	124	5	5

結果

1. *V. parahaemolyticus*については、 $toxRn$ PCR と LDH PCR の結果は一致した。
2. *V. parahaemolyticus*以外の一部の菌が、いずれのプライマーでも陽性となった。

表7 プライマー *toxRn*, LDH の特異性の比較:E施設

菌 種	由 来	供試 菌株数	陽性数	
			<i>toxRn</i>	LDH
<i>V. paraheamolyticus</i>	食品	16	16	16
	環境	48	48	48
	ヒト	19	19	19
小 計		83	83	83
<i>V. cholerae</i> non O1	食品	5	0	0
	環境	24	0	0
<i>V. fluvialis</i> / <i>V.furnissii</i>	食品	5	0	0
	環境	19	0	0
<i>V. vulnificus</i>	食品	7	0	0
	環境	17	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	食品	14	0	3
	環境	13	0	0
<i>Aeromonas</i>	食品	1	0	0
	環境	2	0	0
その他の		環境	21	0
小 計		128	0	3

結果

1. *V. paraheamolyticus*については、*toxRn* PCR と LDH PCRの結果は一致した。
2. *V. alginolyticus*に LDH PCRで陽性バンドと一致する位置にバンドがみられた株が3株あった。

以上のことから、*ToxRn* PCR の方が特異性が高いと思われる。

表8 プライマー*toxRn* の特異性(まとめ)

	供試菌株数	性数 (%)
腸炎ビブリオ	621	619 (99.7)
その他ビブリオ属菌	473	9 (1.9)

表9 プライマー *toxRn*, *toxR*, LDH の感度比較

プライマー	菌 数 (cfu/ml)				
	8.2×10^6	8.2×10^5	8.2×10^4	8.2×10^3	8.2×10^2
<i>toxRn</i>	2/2 *	2/2	2/2	1/2	0/2
<i>toxR</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LDH	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

* 陽性数／供試数

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」

平成 19 年度 分担研究報告書

「食品を対象とした腸炎ビブリオ検査方法に関する研究」

分担研究者 荒川 英二 国立感染症研究所

協力研究者・主任研究者

宮原 美知子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 現行の食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法は生鮮魚介類を中心で検討しているにもかかわらず結果の確定まで 3-4 日の日数を要している。食品成分規格の検査であるが、結果確定したときにはすでにその食品は消費されていることが想定されることから、この検査結果判定にかかる日数の短縮化が望まれている。そこで、最初の APW (アルカリペプトン水) での増菌後の PCR 判定を取り入れる方向で判定までの時間短縮化を検討した。今まで腸炎ビブリオの検出に使われているプライマーは特異性に多少の難点があることから、腸炎ビブリオだけを検出するプライマーを設定し、検討を行った。特異性については、同じ研究班でビブリオの多株に対してこのプライマーを使っての検討が行われている。ここでは、接種実験に用いた結果を中心に報告する。同じ培養法で最後まで挙動が一致し、また海産物に腸炎ビブリオと一緒に汚染が多いと考えられるアルギノリティカスを腸炎ビブリオを菌数比で 4-400 倍量接種しても食品接種実験において少數菌の腸炎ビブリオが PCR で検出可能であることが分かった。また、食品検体を APW で 10 倍希釈培養を行った場合には、規制値の MPN 100 > /g 菌量接種した検体は約 4 時間の培養で PCR により検出できることがわかった。

A. 研究目的

現行の食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法は生鮮魚介類を中心に検討しているにもかかわらず結果の確定まで3-4日の日数を要している。食品成分規格の検査であるが、結果確定したときにはすでにその食品は消費されていることが想定されることから、この検査結果判定にかかる日数の短縮化が望まれている。この短縮化を目的にPCR判定の検討を行った。

B. 研究方法

1. 配列解析によるプライマーの設定

遺伝子解析を行い、*toxR*遺伝子の塩基配列解析を行って、腸炎ビブリオ特異的な部分を検索し、腸炎ビブリオ特異的な検出用プライマーを設定した。

2. 腸炎ビブリオとアルギノリティカスの混合接種による検出実験

腸炎ビブリオのMPN法での定量実験を元に接種実験を行った。スルメイカを食品検体とした。25gを1試料として、すべての試料にアルギノリティカス 3.6×10^4 個接種した。1群は2試料として検討を行った。また、腸炎ビブリオを0, 90, 900, 9,000個接種して、APWを培養液として、MPN法での培養を行い、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 22±2時間培養した。PCRによる腸炎ビブリオ判定のために1mlAPW培養液(主に100倍希釈分)を採取し、遠心後に滅菌蒸留水で100μlを加え、ボルテックス攪拌後、96°C, 5min 加熱を行い、13,000 rpmで遠心し、上清をDNA溶液として、冷蔵保存とともに、PCRでのサンプル溶液とした。APW培養液はクロモアガービブリオに塗抹を行って、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 22±2時間培養後に腸炎ビブリオを検出した。

3. 培養時間の検討

イカを食品検体とした。1,040, 104, 10.4,

1.04個/g腸炎ビブリオ接種2試料、4群と非接種試料1試料によって $35 \pm 1^\circ\text{C}$ での培養を行った。静置培養2時間後から、3-7時間後まで、PCRのDNA溶液を採取し、腸炎ビブリオのPCR判定を行った。

C. 結果

1. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*と*Vibrio cholerae*の*toxR*遺伝子塩基配列解析により、シーケンス名: Vp-toxRnf配列

5'-GCTTTCTTCAGACTCAAGCTCAA-3'

シーケンス名: Vp-toxRnr

配列: 5'-CGCAAATCGGTAGTAATAGTGC-3'をプライマーとして設定した。その解析に関しては資料1にデータを示した。また、PCRサイクルについては、ホットスタートでの94°C, 30s, 63°C, 30s, 72°C, 30sのサイクルを30回行い、72°Cで7分間にPCR終了し、4°Cにて保存とした。PCR增幅産物は230bpである。

2. 塗抹培養の結果とPCRでの検出結果

は100%一致していた。非接種群は陰性の結果であった。

3. 1,040個/g腸炎ビブリオ接種の試料は3時間培養後から、104個/g腸炎ビブリオ接種試料では、4時間後から、10.4個接種では、5時間後、1.04個接種では6時間後には培養液から腸炎ビブリオをPCRで検出できた。また、24時間培養後に塗抹を行った結果は24時間後に分離寒天培地上で腸炎ビブリオのコロニーを検出することができた。

D. 考察

新しく設定したプライマーはアルギノリティカスの過大数接種によっても妨害を受けずに少數の腸炎ビブリオのPCRの結果を出すことが確認された。この結果はもちろん培養と塗抹に

よっても一致した結果が得られた。腸炎ビブリオの検査法は培養法ももちろんアルギノリティカスの妨害を受けないことが確認された。

腸炎ビブリオの MPN 法を使った判定は通常のやり方では、3・4 日かかることから、この培養のやり方と同じ結果の推定に役立つ培養による PCR 判定が検査日数の短縮化に役立てると考えられる。今回検討した培養のやり方によつても、4 時間で検出されるものは腸炎ビブリオが 100 個/g を超えることが想定されることから、ここで陰性であったものは、成分規格を超えないことが判定される。

今回は 1 種類の食品と 1 株の腸炎ビブリオを使っての検討であったが、さらに多くの検討を重ねることによって確かめられれば、実際の検査に応用し、4 時間培養して PCR で腸炎ビブリオが検出されなければ、腸炎ビブリオ規格を通過と見なすような運用法も考えれば、検査の効率化につながる。

E. 結論

新しく設定されたプライマーを使っての PCR による腸炎ビブリオ検出は実際に特異性が高く検出効率がよいことが分かった。

また、培養法を応用して、PCR を使っての腸炎ビブリオ定量の推定も可能ではないかと提案したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、荒川英二：食品からの腸炎ビブリオ迅速検出法の検討
防菌防黴誌、投稿中(2008)

2. 学会発表

宮原美知子、荒川英二：腸炎ビブリオの食品からの迅速検出法の検討。

第 41 回腸炎ビブリオシンポジウム、2007 年 11 月

Michiko Miyahara, Makoto Miyahara, Eiji Arakawa : Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR in food and effect of electron-beam irradiation on the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Vibrio 2007, 2007 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

資料 1

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]

VptoxRS.nuc	1	-----AAAATTTAATTATCCTACCCCCCT	24
VatoxRS.nuc	1	-----AAATTTAATTATCCTACCCGCT	24
VctoxRS.nuc	1	ACTCATAAAAACACTGTTTTGATCGAGATTGGATTATTCTAAGTCTGCATTTCATCA *...*.*...*....*	60
VptoxRS.nuc	24	AAAAGCATCTAAAAGCTCGCGTATCCTCATGCCAACGTAATTGTGATATAATCA	84
VatoxRS.nuc	24	AAAAGCATCTAAATGCTGCGCACCTCAACGCCCGTAATTGTGACATATAATCA	84
VctoxRS.nuc	60	AAGAAGATAAAAAACAGTAAAGCTGAGTGTGGGACAGGGAGATACTGGGACATTAG *...*...*...*....*	120
VptoxRS.nuc	84	CCATAATTACAACATCATCCATCTAAGAAGAACTAAATGACTAACATCGGCCAACAAATT	144
VatoxRS.nuc	84	CCATAATTACAACATCATCCATCTAAGAAGAACTAAATGACTAACATTGGGCCAACAAATT	144
VctoxRS.nuc	120	ATGTTCGGATTAGGACACAACCTCAAAAGAGATATCGATGAGTCATATTGGACTAAATTC *...*...*...*....*	180
VptoxRS.nuc	144	CTACTTGCTCAAAGGTTACCTTGATCCAATAGTAATTGCTCGCTGACCAACAAAGC	204
VatoxRS.nuc	144	CTACTTGCTCAAAGGTTCACCTTGATCCAATAGTAATTGCTCGCTGACCAACAAAC	204
VctoxRS.nuc	180	ATTCTTGCTGAAAATTACCTTGATCCCCTAACGAACTACTGTGATTGACAAAGAAGAT *...*...*...*....*	240
VptoxRS.nuc	204	GGCAACGAAGTTGTACGATTAGGAAGCAACGAAAGCCGTATACTCCGTGATGTTGGCGGAG	264
VatoxRS.nuc	204	GGCAACGAAGTTGTACGATTAGGAAGCAACGAAAGCCGTATACTCTGTGATGTTGGCGAGAG	264
VctoxRS.nuc	240	AGTGAAGAGATCATTGATTAGGAGCAACGAAAGCCGAATTCTTGGCTGCTGGCCAA *...*...*...*....*	300
VptoxRS.nuc	264	AGACCAAACGAAGTTAACCGTAACGAGCTTCACGAGTTGTTGGCGTGAGCAAGGT	324
VatoxRS.nuc	264	AGACCAAACGAAGTTAACCGTAACGAGCTTCACGAGTTGTTGGCGTGAGCAAGGT	324
VctoxRS.nuc	300	CGTCACAAACGAGGTGATTCTCGCAATGATTGATGACTTTGTTGGCGAGAGCAAGGT *...*...*...*....*	360
VptoxRS.nuc	324	TTTGAGGTGGATGACTCAAGCCTGACTCAAGCGATTCTACTCTGCGTAAGATGTTGAAG	384
VatoxRS.nuc	324	TTTGAGGTGGATGACTCAAGCCTGACTCAAGCGATTCTACTCTGCGTAAGATGTTGAAG	384
VctoxRS.nuc	360	TTTGAAGTCGATGATTCCAGCTAACCCAGCTTACGTTACCAAGGCTTCGACTCTGCGCAAATGCTCAA *...*...*...*....*	420
VptoxRS.nuc	384	GATTCAACCAAATCTCCAGAGTTGTTAACCGTTCCAAACGAGGCTATCAACTCATT	444
VatoxRS.nuc	384	GATTCAACCAAATCTCCAGAGTTGTTAACCGTTACCTAAACGTTGCTACCAACTCATT	444
VctoxRS.nuc	420	GATTGACACAAAGTCCCCAACATACGTCACAAACGGTTCCGAAACGGGTTACCAATTGATC *...*...*...*....*	480
VptoxRS.nuc	444	TGTTACTGTTGAACGCCCTAACGCCGCTTCTTCAGACTCAAGCTCAATTGAAAGTTGAAGAG →	504
VatoxRS.nuc	444	TGTTCACTGGAAACGCTGAGCCATTTCCTACTGACTCTAACACTGACGTTGAAGAAACC	504
VctoxRS.nuc	480	GCCCGAGTGGAAACGGTTGAAGAAGAGATGGCTCGCAGGAAACGAGCTGCTCATGACATC *...*...*...*....*	540
VptoxRS.nuc	504	CCAGCTTCTGATAACAATGACGCCCTGCTTAATGAGGTAGAAAACAATGTTAGAGCCGCT	564
VatoxRS.nuc	504	GCTCTGAAACAAGAACGCCAGCAGTGGAGTTAGAAGCGAGCGATAACACCACCAACAGAG	564
VctoxRS.nuc	540	TCTCAGGCCAGAACATGTCATGAAATACGCAAGACTCAAGCAGTGTGCTTCATCAGCCACT *...*...*...*....*	600
VptoxRS.nuc	564	TTAGCGACGACTTCTGACGCAATCGTTGAACCGAGAAGCGCCAGTAGTACCTGAAAAAGCA ←	624
VatoxRS.nuc	564	ATAGTGACCGATACTACTGCTGATCTTGAGCCTCAAGTAGACGCCACTAAACCTCAGCCG	624
VctoxRS.nuc	600	GTAGTGAACACACCGCAGCCAGCAATGTTGTGACGAATAATCGGCTCCAAACTTGGGG *...*...*....*	660
VptoxRS.nuc	624	CCTGTGGCTTCTGCTGTAATCCTGGATTCCACCGCTTATTATTTATTTGGCACTATTA	684
VatoxRS.nuc	624	AAGCCAGCATCTAACACGATTAACGGCTACCGCCGCTGATTATCTTTCTGCTGCTG	684
VctoxRS.nuc	660	AATCGACTGCTTATTCTGATAGCGGCTTACCTCCCGTCAGTATTACTGCTCAACTAAC *...*...*....*	720
VptoxRS.nuc	684	CTACCGATTGCGTACTGCTGTTACAAACCCAGCGGAATCTCAGTCCGTCAGATTGGT	744

VtoxRS.nuc	684	CTTCCTGTTGCGTATTGTTATTCACGAACCTCGCGGAATCCAAATTCCGTAGATTGGT	744
VtoxRS.nuc	720	CCGACCAAACCAGCTTAAACCCCTAACCGGTTGCGTAGCCGTCATAATGCCG	780
	**....**
VtoxRS.nuc	744	GAGTATCAGAACGTAACCAAGTGATGACACCTGTAATCACCCGAAATCAACAACGGTTG	804
VtoxRS.nuc	744	GAGTATCAAAGTGACCGGTGATGACACCTGTAATCACCCCTAAATCAACAACGGTTG	804
VtoxRS.nuc	780	AAT-----AACACCTGATCTTCAAAACTGGCTA	810
	**
VtoxRS.nuc	804	CCTTCATTGAGCAGTCATTGAAACGCTACGTTAACGACCATGCAGAAAGACTCGTTACCA	864
VtoxRS.nuc	804	CCTTCATTGAGCAGTCATTGAGCCTACGTTGAAAGACCATGCAGAAAGACTCGTTGCCA	864
VtoxRS.nuc	810	CCGTCATCGAACGTGCGTTAAAAAATACATGAAAGACATACTGGTGGCTCAAGCCG	870
	***	***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	864	GTGGAAGTAATTGCCACTGGCGACAAAATAACCAAGCTGATTTGAACTACATTGAC	924
VtoxRS.nuc	864	GTTGAAGTGATTGCCACTGGTGACAAAATAACCAAGCTGATTCGAACTACATTGAC	924
VtoxRS.nuc	870	ATAGAACGTCATTGCCACAGGTGACAAAATAACCAAGCTAACGCTGAATTACATTGAC	930
	*	*****	*****
VtoxRS.nuc	924	AGCAACCACCTCGTATGAGAACGTCACATTGCGTATTTCCAGGTCAAAATGATCCAACA	984
VtoxRS.nuc	924	AGTAACCACTCTTACGAGAACGTAACACTGCGTATTTCCAGGTCAAAACGATCCAACA	984
VtoxRS.nuc	930	CCTGAAGTTTCAGGGAAAACATAACCTTACGCATCGTGTAAACCTAACGATGCCATC	990
*	...**.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	...**.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	984	GACATCTGAAATAA-AGGAGGCCAGCATGAAGATTAAAGTAGCATCTCGGTTTGGCC	1043
VtoxRS.nuc	984	GACATCTGAAATAA-AGGAGGCCAATATGAAGATTAAATTAGCATCTCGGTTTGGCC	1043
VtoxRS.nuc	990	AAAGTGTGTAGTAGGATCTGCTATGCAAATAGACACATGCCATGGTATTCTCTG	1050
****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1043	GTATCTATCCTTTCACTGGTTGGTTGACTGGGGCAGTGACCTAAAGTTGAGCAAGTG	1103
VtoxRS.nuc	1043	GTATCCGTTCTTCACTGGTTGGTTGATTTGGGAAAGTGACCTAAAGTTGAGCAGCTC	1103
VtoxRS.nuc	1050	CTCTCTCTGCTGCTCAGTAGCTGGTTATTTGGGGAGTGACTTCAGCTGAGCAAGTG	1110
****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1103	CTTACATCAAATGAATGGCAGTCACCATGGTACTGTGATTACTGATAACCTGCCAGAC	1163
VtoxRS.nuc	1103	CTCACACAAACGAACTGGCAGTCGACCATGGTACAGTCATTACAGACAGCTTGCTGAC	1163
VtoxRS.nuc	1110	TTAACCTCTCGAGAACGTCACCATGGTCTCTGATTAAGACACAGCAACCGC	1170
****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1163	GATACTGTAGGCCGTTACGTCGTGAATGTTGAGTCGAACGTTAAGTACCTACCGAAT	1223
VtoxRS.nuc	1163	GATACTGTGCCCAACTACGCCGAGTTAATGTTGAATCAAACGTTAAACGCTCACTCCCTAAT	1223
VtoxRS.nuc	1170	CCGGCATAGGGCCACTACGCGGAGACTCGACTTCCAAATGTTGAATCAAACGCTCAAT	1230
****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1223	GGCGATTACATTCGCGTGGCAACATCAAACGTTCGCACAAGGCTCGACGGCTGAATCG	1283
VtoxRS.nuc	1223	GGTGACTATATTCGCGTAGCAAATATCAAACGTTACCGCTCAACCGCAGAACATCA	1283
VtoxRS.nuc	1230	GGCACTTATTACGGGTTCACTCGTAAAGCTATTCCGATGACAATAGTCAGAACAG	1290
	..***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	
VtoxRS.nuc	1283	ACAAATAATATTCAGAGAAAGGTCGCTGGGAAGTGGAGTCGATAACTATCTGCTTGTCT	1343
VtoxRS.nuc	1283	ACGATAAAATATCTGGAAAAGGCCGCTGGGAAGTGGAGTCGACAACTATTGTTGGCTCG	1343
VtoxRS.nuc	1290	GTCATTAATATCTCGAATTGGTGAATGGGATATCAGCGATAATTACCTTTGGTAGC	1350
***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1343	CCTTCTGAGTTCAAAGATATTCCTCTCAATCCAAGGATTTCTGAGCGCAACTA	1403
VtoxRS.nuc	1343	CCTTCGGAGTTAAAGATATTCCTCTCAATCAAAGACTTTCCGACAGCTA	1403
VtoxRS.nuc	1350	CCAGTCGAGTTAAAGATATTCGTCACCAACAAAGCAAAGACTTACTGACGGCAATTG	1410
	..***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.	
VtoxRS.nuc	1403	CGCTTAATTACTCAAATCTTAAAGCTAGATGCTGAACAAAGCCGCCGAAATTGACGTGGT	1463
VtoxRS.nuc	1403	CGTTGATTACTCAAATTAAAGCTAGATGCGGAGCAAAGTCGTCGTATTGACGTG	1463
VtoxRS.nuc	1410	CAGCTGAGTTACTCAACTGTCAGATGGATGCAACAAAGCTCGCAGTCGACATTGTT	1470
****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.
VtoxRS.nuc	1463	AATGAGAAGACTCTGCTATTAACTAGCCTAAATCACGGTTCTACGGTACTGTTAGAAC	1523
VtoxRS.nuc	1463	AACGAAAAAACACTATTGCTCACTAGCTTGAACACGGTTCTCGGTACTGTTAAAAC	1523
VtoxRS.nuc	1470	AACGAAAGAACATTCTTACAGCTTAAGTCATGGTCTACCGTACTGTTCACT	1530

		* * . * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .	
VptoRS.nuc	1523	TGAATTTATTAG-TGATAAGGGGCAAGATGCCCTTAATTTTCTCATGGATTGGT	1582
VatoRS.nuc	1523	TAATTTGATTGGATGATAAGGGGCAAGACGCCCTTGTGTTG-CTTATGGATTGGC	1582
VctoxRS.nuc	1530	TCTTAACCTGACTGAGCGTAGAATAGGACATAACAAGGACGTACGATGAACAAAGCCCA	1590
		* .	
VptoRS.nuc	1582	TAGA-----	1586
VatoRS.nuc	1582	TAGATACCCTAACCTTTTCGGTTCACTAACGCCAACACGCTGGCTTCACTTCTG	1642
VctoxRS.nuc	1590	AATCGA-----	1596
		*	
VptoRS.nuc	1586	---	1586
VatoRS.nuc	1642	GTGG	1646
VctoxRS.nuc	1596	---	1596