

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN / T 5225—2019

进出口食品中五种致泻大肠埃希氏菌快速检测方法 多重 PCR 法

Multiplex PCR for rapid identification of diarrheogenic Escherichia coli in food Multiplex PCR method

2019-12-27 发布

2020-07-01 实施

中华人民共和国海关总署

发布

前 言

本标准依照 GB / T 1.1—2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国郑州海关、解放军疾病预防控制中心、中国动物卫生与流行病学中心、中华人民共和国拱北海关、中华人民共和国福州海关。

本标准主要起草人：苗丽、王永亮、张灿、李阳、王俊杰、张秀平、党志浩、李轲、冯家旺、郑晶。

进出口食品中五种致泻大肠埃希氏菌快速检测方法多重 PCR 法

1 范围

本标准规定了进出口食品中肠致病性大肠埃希氏菌 (EPEC), 肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC, 又称产志贺毒素大肠埃希氏菌), 肠产毒性大肠埃希氏菌 (ETEC), 肠侵袭性大肠埃希氏菌 (EIEC), 肠集聚性大肠埃希氏菌 (EAEC) 五种致泻大肠埃希氏菌快速检测方法。

本标准适用于各种进出口食品及其原料, 有专门规定检验方法的除外。其它产品可参考使用本标准。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本 (包括所有的修改单) 适用于本标准。

GB / T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB / T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 多重聚合酶链式反应 (MPCR) Multiplex Polymerase Chain Reaction

又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系里加上两对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应, 其反应原理是模板基因序列先经高温变性成为单链, 在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下, 根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合, 接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核酸 (dNTP) 为底物, 使引物得以延伸, 然后不断重复变性、退火和延伸这一循环, 使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

3.2 致泻大肠埃希氏菌 *Diarrheogenic Escherichia coli*

致泻大肠埃希氏菌是一类能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希氏菌, 同时也是一种可经过污染食物引起人类发病的致病菌。根据毒力因子、致病机制、流行病学特征, 主要将致泻大肠埃希氏菌分为 5 类: 肠致病性大肠埃希氏菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 肠出血性大肠埃希氏菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC, 又称产志贺毒素大肠埃希氏菌), 肠产毒性大肠埃希氏菌 (enteroinvasive *E. coli*, ETEC), 肠侵袭性大肠埃希氏菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 肠集聚粘附性大肠埃希氏菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAEC)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEC 致泻大肠埃希氏菌 *Diarrheogenic Escherichia coli*

EPEC	肠致病性大肠埃希氏菌	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	肠侵袭性大肠埃希氏菌	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ETEC	产肠毒素大肠埃希氏菌	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EHEC	肠出血性大肠埃希氏菌	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EAEC	肠集聚粘附性大肠埃希氏菌	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>
<i>escV</i>	蛋白分泌物调节基因	gene encoding LEE-encoded type III secretion system factor
<i>bfpB</i>	束状菌毛 B 基因	bundle-forming pilus B
<i>stx1A</i>	志贺毒素 I 基因	Shiga toxin one
<i>stx2A</i>	志贺毒素 II 基因	Shiga toxin two
<i>elt</i>	热不稳定性肠毒素基因	heat-labile enterotoxin
<i>invE</i>	侵袭性质粒调节基因	invasive plasmid regulator
<i>astA</i>	集聚热稳定性毒素 A 基因	enteroaggregative heat-stable enterotoxin A
<i>estIa</i>	猪源热稳定性肠毒素基因	heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from pigs
<i>estIb</i>	人源热稳定性肠毒素基因	heat-stable enterotoxins initially discovered in the isolates from human
<i>aggR</i>	集聚粘附菌毛调节基因	aggregative adhesive fimbriae regulator
<i>pic</i>	肠定植因子基因	protein involved in intestinal colonization
<i>eae</i>	紧密素基因	gene encoding intimin for <i>Escherichia coli</i> attaching and effacing
<i>ipaH</i>	侵袭性质粒抗原 H 基因	invasive plasmid antigen H-gene
PCR	聚合酶链式反应	polymerase chain reaction
dNTP	脱氧核糖三磷酸	deoxyribonucleoside triphosphate

5 方法提要

本标准依据致泻性大肠埃希氏菌的致病机理，检测致病型 EPEC (*bfpB*、*escV*)、EIEC (*invE*)、ETEC (*elt*、*estIa*、*estIb*)、EHEC (*escV*、*stx1A*、*stx2A*)、EAEC (*astA*、*aggR*、*pic*)，采用多重 PCR 技术，根据 PCR 扩增产物的条带大小确定致泻性大肠埃希氏菌致病型别。

6 设备和材料

- 6.1 恒温培养箱，36℃ ± 1℃，42℃ ± 1℃。
- 6.2 均质器。
- 6.3 振荡器。
- 6.4 无菌均质杯或无菌均质袋；容量 500mL。
- 6.5 无菌培养皿；直径 90 mm。
- 6.6 一次性接种环。
- 6.7 移液器：量程分别为 1 mL、5 mL 和 10 mL，刻度为 0.1 mL。
- 6.8 微量移液器：0.5 μL ~ 2 μL、2 μL ~ 20 μL、20 μL ~ 200 μL。
- 6.9 灭菌 PCR 反应管。
- 6.10 电子天平：感量 0.1 g、0.01 g。
- 6.11 恒温水浴箱：100℃。
- 6.12 冷冻离心机：控温 4℃ ~ 8℃，最大转速不小于 13 000 r/min。
- 6.13 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.14 PCR 扩增仪。
- 6.15 核酸电泳仪，包括电源、电泳槽、制胶槽（长度 >10 cm）和梳子。

6.16 凝胶成像系统。

7 培养基和试剂

除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

- 7.1 营养肉汤：见附录 A 中 A.1.1。
- 7.2 肠道菌增菌肉汤：见附录 A 中 A.1.2。
- 7.3 麦康凯琼脂 (MAC)：见附录 A 中 A.1.3。
- 7.4 伊红美兰琼脂 (EMB)：见附录 A 中 A.1.4。
- 7.5 TE 缓冲液：见附录 A 中 A.1.5。
- 7.6 10×PCR 缓冲液：见附录 A 中 A.1.6。
- 7.7 50×TAE 缓冲液：见附录 A 中 A.1.7。

8 检验程序

食品中五种致泻大肠埃希氏菌检验程序见图 1。

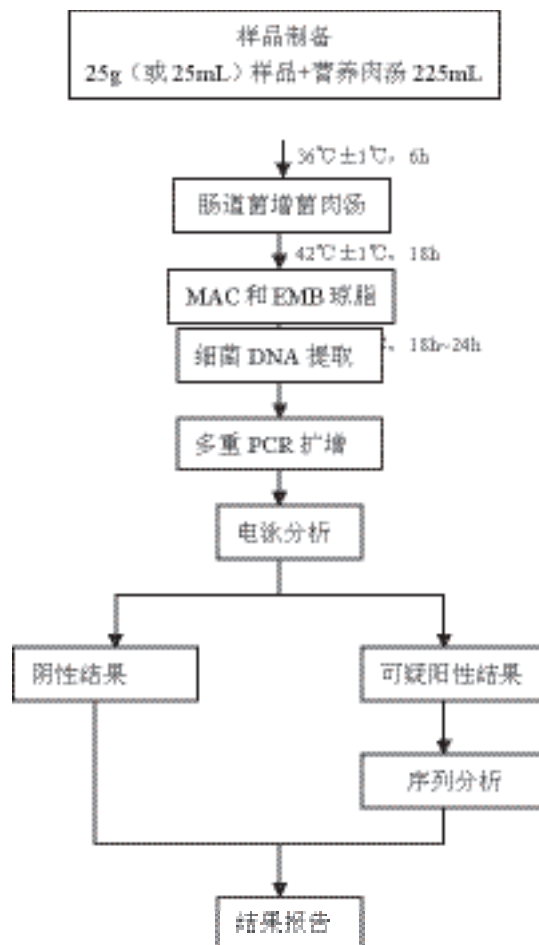


图 1 食品中五种致泻大肠埃希氏菌检验程序

9 操作步骤

9.1 样品制备、增菌培养和分离

以无菌操作取检样 25 g (或 25 mL), 加入装有灭菌 225 mL 营养肉汤的均质杯中, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min ~10 000 r/min 均质 1 min~2 min; 或加入装有 225 mL 营养肉汤的均质袋中, 用拍击式均质器均质 1 min~2 min。液体样品震荡混匀即可。于 36℃ ± 1℃ 培养 6 h。取 10 μL, 接种于 30 mL 肠道菌增菌肉汤管内, 于 42℃ ± 1℃ 培养 18 h。

将增菌液划线接种 MAC 和 EMB 琼脂平板, 于 36℃ ± 1℃ 培养 18 h~24 h, 观察菌落特征。在 MAC 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为砖红色, 不分解乳糖的菌落为无色或者是淡粉色。在 EMB 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为中心紫黑色带或不带金属光泽, 不分解乳糖的菌落为无色或者是淡粉色。

9.2 细菌模板 DNA 的制备

9.2.1 使用接种环挑取平板上可疑致泻性大肠埃希氏菌 10 个 ~20 个 (10 个以下全选), 挑取菌落时不但要挑取乳糖发酵的菌落, 同时也要挑取乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落, 打散至盛有 1 mL 0.85% 灭菌生理盐水的 Eppendorf 管内, 13 000 r/min 离心 (4℃ ~ 8℃) 2 min, 弃上清液。

9.2.2 加入 50 μL ~ 100 μL 1 × TE 缓冲液至 Eppendorf 管中, 充分混匀。

9.2.3 100℃ 水浴或者金属浴维持 10 min, 将 Eppendorf 管置于冰上冷却。

9.2.4 13 000 r/min 离心 10 min, 上清为 PCR 扩增模板, 用于 PCR 扩增。

9.2.5 每次 PCR 反应使用 EPEC、EIEC、ETEC、EHEC、EAEC 标准菌株作为阳性对照。同时, 使用大肠埃希氏菌 CICC 10003 或等效标准菌株作为阴性对照, 以灭菌去离子水作为空白对照, 控制 PCR 体系污染。致泻大肠埃希氏菌特征性基因见表 1。

也可使用商业化的 DNA 提取试剂盒并其按说明制备模板 DNA。

9.3 DNA 浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A₂₆₀ 和 A₂₈₀。DNA 的浓度按照公式 (1) 计算:

$$c=A \times N \times 50 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C —— DNA 浓度, 单位为微克每毫升 (μg/mL);

A —— 260 nm 处吸光值;

N —— 核酸稀释倍数;

1 OD₂₆₀ = 50 μg/mL 双链 DNA;

OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 之间时, 适于 PCR 扩增。

9.4 多重 PCR 扩增

9.4.1 PCR 反应体系 (25 μL): 10 × PCR 反应缓冲液 (含 Mg²⁺) 3 μL; 2.5 mM dNTP Mixture 3 μL; 5 U/μL Ex Taq DNA 聚合酶 0.4 μL; 10 μmol/L 引物对各 2 μL; 50 ng/μL 模板 DNA 2 μL; 水补足至 25 μL。

9.4.2 反应条件: 预变性 95℃ 4 min; 变性 95℃ 30 s; 62℃ 退火 30 s; 延伸 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存反应产物。

注: PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

9.5 多重 PCR 扩增产物的电泳检测

1 × TAE 电泳缓冲液制备 1.8% ~ 2% 琼脂糖凝胶；55℃ ~ 60℃ 时加入溴化乙锭至终浓度为 0.5 μg/mL。取 8 μL ~ 15 μL PCR 产物，分别和 2 μL 6× 上样缓冲液混匀后进行点样，用 DNA 分子 Marker 作参照。5 V/cm 电压，电泳 20 min ~ 40 min，电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

9.6 测序

当电泳结果出现可疑阳性时，将 PCR 扩增产物进行 DNA 测序。

10 结果判定及表述

10.1 质量控制

10.1.1 阳性对照：五种致泻性大肠埃希氏菌对照用阳性标准菌株扩增基因产物大小应符合表 1；

10.1.2 阴性对照：无相应条带出现；

10.1.3 空白对照：无条带出现。

10.2 结果判定和报告

在符合条款 10.1 的情况下，结果才能判为有效。在结果有效的前提下，样品出现表 1 中某种大肠埃希氏菌组合条带，则判定样品为该种大肠埃希氏菌可疑阳性，否则为阴性。

将可疑阳性的 PCR 扩增产物进行核酸序列测定，与附录 B 中基因相对应的序列比对，其片段大小正确，同源性达到 98% 以上，则确证为相应致泻性大肠埃希氏菌阳性。

表 1 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因片段对照表

标准菌株	毒力基因种类及片段大小	阳性判断结果组合
EAEC (CICC 24186)	<i>astA</i> (102 bp) <i>aggR</i> (400 bp) <i>pic</i> (1111 bp)	<i>astA</i> , <i>aggR</i> , <i>pic</i> 中一条或一条以上阳性
EPEC (CICC 24189)	<i>bfpB</i> (910 bp) <i>escV^a</i> (544 bp)	典型： <i>bfpB</i> (+), <i>escV^a</i> (+); 不典型： <i>bfpB</i> (-), <i>escV^a</i> (+);
EHEC (CICC 24187)	<i>escV^a</i> (544 bp) <i>stx1A</i> (244 bp) <i>stx2A</i> (324 bp)	<i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1A</i> (+), <i>stx2A</i> (-); <i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1A</i> (-) <i>stx2A</i> (+); <i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1A</i> (+), <i>stx2A</i> (+)
ETEC (CICC 24190)	<i>elt</i> (655 bp) <i>est1a</i> (157 bp) <i>est1b</i> (171 bp)	<i>elt</i> , <i>est1a</i> , <i>est1b</i> 中一条或一条以上阳性
EIEC (CICC 24188)	<i>invE^b</i> (766 bp)	<i>invE^b</i> (+)

a 在判定 EPEC 或 EHEC 时，*escV* 与 *eae* 基因等效；
b 在判定 EIEC 时，*invE* 与 *ipaH* 基因等效。
c CICC 24190 做 ETEC 的标准菌株时，毒力基因 *est1b* (171 bp) 为阳性，而 *est1a* (157 bp) 为阴性，因为一个菌株不可能既是人源又是猪源。

11 生物安全和防污染措施

生物安全要符合 GB 19489 的规定要求，检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 中的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
试剂和 PCR 引物检测序列

A.1 试剂

A.1.1 营养肉汤

A.1.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1000 mL

A.1.1.2 制法

称取以上成分加入蒸馏水中，搅拌加热煮沸至完全溶解，冷却至 25℃左右，调 pH 至 7.4 ± 0.2 ，分装适当的容器。121℃高压灭菌 15min，待冷至常温，备用。

A.1.2 肠道菌增菌肉汤

A. 1.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
牛胆盐	20.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.2 ± 0.2

A. 1.2.2 制法

称取以上成分加入蒸馏水中，搅拌加热煮沸至完全溶解，冷却至 25℃左右，调 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装每瓶 30 mL，115℃高压灭菌 20 min，待冷至常温，备用。

A.1.3 麦康凯琼脂

A.1.3.1 成分

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
3号胆盐	5.0 g
氯化钠	5.0 g
结晶紫	0.001g
中性红	0.075 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 值 7.4 ± 0.2

A.1.3.2 制法

称取以上成分于蒸馏水中，加热溶解，冷却至 25℃左右，调 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装，121℃高压灭菌 15 min，冷却至 45℃~50℃，倾注平板。

注：如不立即使用，在 2℃~8℃条件下可储备 2 周

A.1.4 伊红美蓝琼脂

A.1.4.1 成分

蛋白胨 10.0 g
 乳糖 10.0 g
 磷酸氢二钾 2.0 g
 琼脂 17.0 g
 2% 伊红 Y 溶液 20 mL
 0.5% 美蓝水溶液 13.0 mL
 蒸馏水 1000 mL
 pH 7.1 ± 0.2

A.1.4.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和乳糖溶解于 1000 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，冷却至 25℃ 左右，校正 pH 至 7.1 ± 0.2，再加入琼脂，121℃ 灭菌 15 min，冷却至 45℃ ~ 50℃，加入 2% 伊红 Y 溶液和 0.5% 美蓝水溶液，摇匀倾注平皿。

A.1.5 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0、1 mmol/L EDTA、pH 8.0、并进行高压灭菌。

A.1.6 10×PCR 缓冲液

200 mmol/L Tris-HCl、pH 8.4，200 mmol/L KCl，15 mmol/L MgCl₂。

A.1.7 50×TAE 缓冲液

称取 484 g Tris，量取 114.2 mL 冰醋酸，200 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)，溶于水中，定容至 2 L。分装后高压灭菌备用。

A.2 PCR 检测的靶基因和引物序列

表 A.1 五种致泻大肠埃希氏菌目标基因引物序列

目标基因	引物序列	片段大小 (bp)
<i>escV</i> - F	5' -CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC-3'	544
<i>escV</i> - R	5' -ATTCTGGCTCTCTTCTCTTTATGGCTG-3'	
<i>bfpB</i> - F	5' -GACACCTCATTGCTGAAGTCCG-3'	910
<i>bfpB</i> - R	5' -CCAGAACACCTCCGTTATGC-3'	
<i>stx1A</i> - F	5' -AATGCCACGCTTCCCAGAATTG-3'	244
<i>stx1A</i> - R	5' -CGATGTTACGGTTTGTTACTGTGACAGC-3'	
<i>stx2A</i> - F	5' -GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG-3'	324
<i>stx2A</i> - R	5' -AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC-3'	
<i>elt</i> - F	5' -GAACAGGAGGTTTCTGCCGTTAGGTG-3'	655
<i>elt</i> - R	5' -CTTTCAATGGCTTTTTTTTTGGGAGTC-3'	
<i>estIa</i> - F	5' -CCTCTTTTAGYCAGWMARCTGAATCASTTG-3'	157
<i>estIa</i> - R	5' -CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG-3'	
<i>estIb</i> - F	5' -TGTCTTTTTTCACCTTTTCGCTC-3'	171
<i>estIb</i> - R	5' -CGGTACAAGCAGGATTACAACAC-3'	

续表

目标基因	引物序列	片段大小 (bp)
<i>invE</i> - F	5' -CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCA-3'	766
<i>invE</i> - R	5' -CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG-3'	
<i>astA</i> - F	5' -TGCCATCAACACAGTATATCCG-3'	102
<i>astA</i> - R	5' -ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT-3'	
<i>aggR</i> - F	5' -ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG-3'	400
<i>aggR</i> - R	5' -AATACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'	
<i>Pic</i> - F	5' -AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG-3'	1111
<i>Pic</i> - R	5' -AGCCGTTTCCGCAGAAGCC-3'	
<i>eae</i> - F	5' -ATTACCATCCACACAGACGGT-3'	397
<i>eae</i> - R	5' -ACAGCGTGGTTGGATCAACCT-3'	
<i>ipaH</i> - F	5' -TTGACCGCCTTTCCGATACC-3'	647
<i>ipaH</i> - R	5' -ATCCGCATCACCGCTCAGAC-3'	

附 录 B
(资料性附录)

五种致泻大肠埃希氏菌 PCR 扩增产物参考序列

B.1 *escV*(544bp)

CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGCCCCGTCCATTGAACCATAAACTGGCTTTCCTTTTGCCTCGG
GAGCGAAGAAGCTTTTGCCTCAAGCGGGTCAATAACGCCTGCGCGCATATCACCATCAATACTCATTGCT
TTCCTGGCATAACCATCAAGGGAAAAACGAGCACTCACTTCAGCAACACGCTCGGCCCTTTTGTAAATAC
CATAAATTGAACAATGGTGATAATAGTAAAAATAACCAGGCCAACAACAATATTACCGCCAACAACAAA
GTTACCGAAGGAGTAAATAATGTCACCCGCATCGTGATGCAGCAGAATAAGTCTGGTTGTACTAACACTG
AGCGACAGGGCATCAACGTCGTAATCAACAGGATTGTGGGGAAAGAAGTTAGTTCAAGAGGATTTTTT
ATATAGATTGAGAGCATTAAATAAAAGTAAAGCTGTCGAAATATTAATCGCGATAATGATATCCACCACAA
CTGTTGGTAGTGGAATAATCATCATCATTACAGCCATAAAGAAGAAGAGAGCCAGAAT

B.2 *bfpB*(910bp)

GACACCTCATTGCTGAAGTCGAAGAATAAAGAACATTATAAAAGCAGTGATATGGTAAGCAAAAC
AGACAGTATTTATATAGGAAATAGCAGTTTTTCAGACATATCATGGAGAGCCCCTGCCCGGTAAATTAGA
AGGTGTACATGGAATTATTCTGAGATCAAGTACACCTCTGGGATTTGATGAAGTACTCTCTATGATTCAG
GATTCAGTGGTATTCCCATTGTAAACATACCACGAAAGATGTGATCAGTGGAGGGGTGTCCAGCAAA
AGTCTGGCCGAACTGTCGCGGAAAAAATGAACAGTGCAACAGGCGGAAAAAGTACTGATCAATTTGAT
CATCTACTGCTTGAGGTATCATCAGAACATCAGCTTATGGATGTTAATTATCAGGGCGCGCTTTCACGT
TTCTTGATAAAGTTGCGGCAAACTACAACCTGTACTGGACATATGAGTCTGGCAGGATTGCTTTTTCAA
CGAGGAAACTAAACGCTTCAGTATAAGTATATTACCGGGTGTAATATACATCAAAAAACTCTATCAG
TTCGGACAGCAATAGCAGTTCGGGAAGTTCGGGAAGTTCGGGCAGTAGTTCCAGTGATTCTGGAGCAGA
GTTGAAATTCGATTCAGATGTGGATTTCTGGAAGATATTGAGAAGTTCGATAAAACTGATACTGGGCAG
CGATGGTTCTGATTCAATATCGACAAGTACATCGTCTGTTATTGTGACAACATCTTCTGCAAACATGAAG
AAGATAAACGAATATATTAATACACTGAATGCACAGCTTGAAAGACAGGTTACCATTGATGTCCGATC
TATAATGTTACAACAAGTACAGCAGTGATCTGGCAATGTCTCTGGAAGCTTTGCTAAAGCATAACGGAG
GTGTTCTGG

B.3 *Stx1A* (244bp)

AATGCCACGCTTCCCAGAATTCATTAAATGCTTCCAAAAGAAATTCTTCTACACGAACAGAGTCTT
GTCCATGATAATCAGGCAGGACACTACTCAACCTTCCCCAGTTCAATGTAAGATCAACATCTTCAGCAGT
CATTACATAAGAACGCCACTGAGATCATCCAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGATTTGCCGAAAACGT
AAAGCTTCAGCTGTACAGTAACAAACCGTAACATCG

B.4 *Stx2A*(324bp)

GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAGCAAAATAATTTATATGTGGCCGGGTTTCGTTAATACGGCA
ACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGAC
AACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTGTGCGAGCGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGT
CACTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCA
GAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACACTGTCACAGCAGAAGCCTTACGCT

B.5 *elt*(655bp)

GAACAGGAGTTTTCTGCGTTAGGTGGAATACCATATTCTCAGATATATGGATGGTATCGTGTTAATT
TTGGTGTGATTGATGAACGATTACATCGTAACAGGGAATATAGAGACCGGTATTACAGAAATCTGAATAT
AGCTCCGGCAGAGGATGGTTACAGATTAGCAGGTTTCCCACCGGATCACCAAGCTTGGAGAGAAGAACC

CTGGATTCATCATGCACCACAAGGTTGTGGAAATTCATCAAGAACAATTACAGGTGATACTTGTAATGAG
GAGACCCAGAATCTGAGCACAATATATCTCAGGAAATATCAATCAAAAAGTTAAGAGGCAGATATTTTCA
GACTATCAGTCAGAGGTTGACATATATAACAGAATTCGGGATGAATTATGAATAAAAGTAAAATATTATGT
TTTATTTACGGCGTTACTATCCTCTCTATGTGCACACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATGTTCCG
AATATCGCAACACACAAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGCA
AAAGAGAAATGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGCAACATTTTCAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAAC
ATATAGACTCCCAAAAAAAAAAGCCATTGAAAAG

B.6 estIa (157)

B.6.1 CCTCTTTTAGCCAGAAAGCTGAATCAGTTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTACATTAGACACTAA
AAAGTGTAATGTTGTAACAAAACAGTGAAAAAAAATCAGAAAATATGAATAACACATTTTACTGCTGTG
AACTTTGTTGTAATCCTGCCTG

B.6.2 CCTCTTTTAGTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTACATTAGAGACT
AAAAAGTGATGTTGTAACAAAACAGTGAAAAAAAATCAGAAAATATGAACAACACATTTTACTGC
TGTGAACTTTGTTGTAATCCTGCCTG

B.7 estIb(171bp)

TGTCTTTTTACCTTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAAAGAAAAAATCACACTAGA
ATCAAAAAAATGTAACATTGCAAAAAAAGTAATAAAAAGTGGTCCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTA
CTGCTGTGAATTGTGTTGTAATCCTGCTTGTACCG

B.8 invE(766bp)

CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCATTAGCCGATATCATAAAAACTATAAAGCTACAACAAT
TCTTCCCTGTAATAGGAAGGGAGATTGATGGTAGAATTGAAATTCTGGATGGCACTCGTAGAAGAGCA
TCTGCAATATATGCAGGAGCAGATCTTGAAGTTCTATATTCAAAAAGAATATATATCTACTCTTGATGCC
AGAAAAGTAGCAAACGATATACAAACAGCAAAAAGAGCATAGCATCCGAGAAGTTGGTATTGGTCTTAA
TTTTCTGAAAGTATCAGGGATGTCCTATAAAGACATAGCCAAAAAAGAGAATCTGTCTCGCGCGAAAG
TCACTCGTGCCTTTCAGGCAGCAAGCGTTCACAGGAAATAATATCTCTATTTCCAATCGCGTCAGAAC
TTAAGTTAATGACTACAAGATATTATTCAATTATTATAAAGGACTTGAAAAGGCTAATGAATCTCTTA
GTTCTACACTACCAATATTAAGGAAGAAATAAAAAGACCTTGATACAAATTTGCCCCCGGACATATATA
AAAAAGAAATTTTAAACATCATAAAGAAAAGCAAAAACAGAAAAGCAAAACCCCTTCGCTAAAAAGTTGA
CTCGTTATTTATTTCTAAAGACAAAACGGACTTACATAAAAAGAAAAGAGAATAAAACAAAACAGAACTC
TAATATTTACATTATCTAAAATAAACAAAACAGTTCAGAGAGAAATAGATGAAGCTATTCGGGATATA
ATTTCTCGCCATCTATCG

B.9 astA(102bp)

TGCCATCAACACAGTATATCCGGAGACCCACATCCAGTTATGCATCGTGCATATGGTGGCACAACAGC
GTGGCTTCGTGTCATGGAAGGACTACAAAGCCGT

B.10 aggR(400bp)

ACCGAGAGTTGCCTGATAAAGACATTTTTTCATGTGAGAATGATATGAAATTTAAACAAAATATCGA
AAAAGAGATTATAAAAAATTAACAATATCAGAATACATCAGTACACTGTACTATATACATCTAATTGTACA
ATCGATGTATACACAAAAGAAGGAAGCAATACATATCTTAGAAATGAACTCATATTTCTTGAGAGAGGA
ATAAATATATCAGTAAGATTGCAAAAAGAAGAAATCAACAGTAAATCCATTTATCGCAATCAGATTAAGC
AGCGATACATTAAGACGCCTAAAGGATGCCCTGATGATAATATACGGAATATCAAAAAGTAGATGCTTGC
AGTTGTCCGAATTGGTCAAAAAGGAATAATTGTAGCTGATGCTGACGATTCTGTATT

B.11 Pic(1111 bp)

AAATGTCAGTGAACCGACGATTGGAAATATATCCCCCTTTGGTGGTACCGGCACTCCAGGAAACCTG
TACAGCATGATACTCAACAGCCAGACCCGCTTCTATATTTCTGAAATCTGCCAGCTATGGTAAACTCTGTG

GGGGAACAGCCTGAATGATCCGGCTCAGTGGGAGTTTGTGGCATGAACAAAAACAAAGCAGTTCAGAC
AGTAAAAGATAGGATCCTGGCCGGGCGGGCAAAACAACCCGTTATCTTTCATGGTCAGCTGACCGGGAA
TATGGATGTCGCCATTCCACAGGTGCCGGGGGAAGAAAGGTAATCTTTGATGGTAGCGTGAACCTGCCG
GAAGGTACCCTGAGTCAGGACACTGGCACCCCTGATATTCCAGGGACATCCGGTTATCCATGCCTCCATCA
GTGGCAGTGCACCGGTCAGCCTGAACCAGAAAAGACTGGGAAAACCGTCAGTTTACAATGAAAACACTGT
CGCTGAAAGACCGTGAATTCCATCTTTCACGTAACGCCTCGCTGAACAGTGACATTAAGTCGGATAACAG
CCATATCACACTGGGAAGTGACAGGGCATTGTGTGGATAAAAATGACGGAAACAGGAAATTATGTCATTCC
GGAGGAAGGTACCTCTGTCCCGACACCCGTGAATGACAGGAGCCAGTATGAAGGGAATATTACCGTGAA
CCATAACTCAGCCCTGGATATCGGCAGCAGGTTACCCGGGGGATTGACGCTTATGACAGTGCCGTCAGC
ATCACCTCTCCGGACGTCTGTGACAGCCCCGGGTGCTTTTGGCCGACGTTCACTGACAGTGATGATGG
CGGTCATCTTACAGCACTGAACGGTCTTTTCAGCGACGGGCATATTCAGGCCGGTAAAAACGGCAAAATC
ACCCTGAGCGGTACACCGGTTAAAGATACGGCTAATCAGTATGCCCTGCTGTATATCTGACGGACGGAT
ATGACCTGACCGGCGATAACGCAGCACTGAAAATTACCCGTGGAGCACATGCTTCCGGTGATATTCATGC
CTCTGCGGCATCAACAGTTACCATCGGGTCTGACACGCCGGCAGAACTGGCTTCTGCGGAAACGGCT

B.12 *eae*(397bp)

ATTACCATCCACACAGACGGTATTGTGATATTTATGACTCATGGGGGGCTGCAAATAAATATAGC
CATTATAGTTCTATGAACTCAATAACTGCTTGGATTAACAGACATCTAGTGAGCAGCGTTCTGGAGTAT
CAAGCACTTATAACCTAATAACACAAAACCCCTCTTCCCTGGGGTAAATGTTAATACTCCAAATGTCTATGCG
GTTTTGTGTAGAATAATTCATAACCACCCCGGCTAAAATATGTATTGTTTTAGTCGGGGCATAATTATTTT
TTCTTAAGAAATAACCTCTTATAATCAAATCTACTACTGGTCTTTTTATCTGCTTAATAGGTCTCTTTCAA
GAGACACATTCACGTTTTTCTCATGTAGGTTGATCCAACCACGCTGT

B.13 *ipaH*(647bp)

TTGACCGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCACGCAATACCTCCGGATTCCGTGAACAGGTGCTGCATG
GCTGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTTGCTGCTGATGCCACTGAG
AGCTGTGAGGACCGTGTGCGGCTCACATGGAACAATCTCCGAAAACCCCTCCTGGTCCATCAGGCATCAG
AAGGCCTTTTCGATAATGATACCGGCGCTCTGCTCTCCCTGGGCAGGAAATGTTCCGCCTCGAAATTCTG
GAGGACATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAGATAGAAGTCTACCTGGCCTTCC
AGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCTCTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTTCTATGGCGTGTGCGG
AGTGACAGCAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAATGAATTTATGGA
CTGGTTCTCCCTCTGGGGACCATGGCATGCTGTACTGAAGCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCAGGCA
GAAGAGCAGAAGTATGAGATGCTGGAGAATGAGTACTCTCAGAGGGTGGCTGACCGGCTGAAAGCATCA
GGTCTGAGCGGTGATGCGGAT