

Table 2. List of non-*Leptospira* strains used for specificity test

Strain	Source
<i>Bartonella henselae</i> (type I)	ATCC 49882
<i>Bartonella henselae</i> (type II)	U4
<i>Borrelia burgdorferi</i>	B31
<i>Bordetella pertussis</i>	Laboratory isolate
<i>Bordetella parapertussis</i>	Laboratory isolate
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Laboratory isolate
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Laboratory isolate
<i>Corynebacterium striatum</i>	Laboratory isolate
<i>Escherichia coli</i>	Laboratory isolate
<i>Haemophilus influenzae</i>	Laboratory isolate
<i>Legionella longbeachae</i>	ATCC 33462
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152
<i>Legionella pneumophila</i>	Laboratory isolate
<i>Neisseria meningitidis</i>	Laboratory isolate
<i>Salmonella typhi</i>	Laboratory isolate
<i>Salmonella paratyphi</i>	Laboratory isolate
<i>Shigalla dysenteriae</i>	Laboratory isolate
<i>Shigalla flexneri</i>	Laboratory isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratory isolate
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Laboratory isolate
<i>Vibrio cholerae</i>	Laboratory isolate
<i>Vibrio cholerae</i> (O139)	Laboratory isolate

Table 3. List of sequences used to design primers and probe of LipL32 real-time PCR assay

Species	Serovar	Accession Number
<i>L. borgpetersenii</i>	Hardjo-bovis	CP000348
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	AY609333
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	AY609330
<i>L. interrogans</i>	Wolffi	AY609332
<i>L. interrogans</i>	Paidjan	AY609329
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	AY609328
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	AY609323
<i>L. interrogans</i>	Lai	AY568679
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	AF121192
<i>L. noguchii</i>	Pomona	AY609326
<i>L. weilii</i>	Manhao	AY609331

# プロジェクト 3 : インド

## 平成 23 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

研究分担者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

### 研究要旨

*Vibrio cholerae* O1 El Tor variant が現在のコレラ流行株となっているが、その発生機序は不明である。そこで *V. cholerae* O1 El Tor variant の発生機序を明らかにするため、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの遺伝子配列の比較解析を行った。その結果、El Tor 型 CTX ファージと classical 型 CTX ファージには 97 ヶ所の 1 塩基多型が存在し、生物型特異的な CTX ファージが溶原化していることが明らかとなった。また *V. cholerae* O1 El Tor variant に溶原化している CTX ファージは El Tor 型と classical 型とのキメラ様 CTX ファージであったことから、*V. cholerae* O1 El Tor variant は *V. cholerae* O1 El Tor と *V. cholerae* O1 classical 間での遺伝子の水平伝播により出現したことが示唆された。

#### A. 研究目的

*Vibrio cholerae* は 200 以上の血清群に分類され、環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラ毒素産生性の血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* がコレラを引き起こす。また *V. cholerae* O1 には生化学的性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在し、それぞれ特有のコレラ毒素を産生する。現在、コレラは *V. cholerae* O1 生物型 El Tor による 1961 年からの第 7 次世界流行にあるが、1990 年代に classical 型コレラ毒素を発現する *V. cholerae* O1 El Tor (El Tor variant) が出現、その後アジア地域に蔓延し、流行株の遷移が確認されているが、その出現機序は明らかとなっていない。

インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases, NICED) には過去数十年間の *V. cholerae* 分離株が保存されている。そこで本研究課題では、NICED が保有する *V. cholerae* について、溶原化している CTX ファージをゲノム情報から分子系統解析を

行い、コレラ流行株の進化系統を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

*V. cholerae* O1 El Tor variant の CTX ファージについて全塩基配列を決定した。*V. cholerae* は染色体が 2 つ (chromosome 1 と chromosome 2) あるため、それぞれのファージ挿入位置に対して特異的なプライマーを設計した。増幅された遺伝子断片をシーケンスし、classical 型 CTX ファージ及び El Tor 型 CTX ファージと配列を比較した。なお NICED より菌株が提供されていないため、供試菌として輸入事例由来の分離株を用いた。

#### C. 研究結果

CTX ファージは *V. cholerae* O1 El Tor では chromosome 1 にのみ溶原化しているが、*V. cholerae* O1 classical では chromosome 1 及び 2 に溶原化している。また El Tor 型 CTX ファージと classical 型 CTX ファージの配列間には 97 ヶ所の

1 塩基多型 (SNP) が存在する。今回供試した *V. cholerae* O1 El Tor variant では chromosome 1 と 2 の両方に CTX ファージが溶原化していた。SNPs による型別を行ったところ chromosome 1 上の CTX ファージはコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) のみ classical 型であった。また chromosome 2 上の CTX ファージでは *ctxB* 遺伝子が classical 型であったのに加えて、ファージの溶原サイクルに参与する RS2 領域 (*rstR*, *rstA*, *rstB* 遺伝子) では El Tor 型と classical 型が入り組んだ状態であった (図)。

#### D. 考察

*V. cholerae* は自然環境中においてファージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播により、病原性に関わる因子や環境中での生存に有利な因子のやりとりをしていると考えられる。*V. cholerae* O1 El Tor variant の CTX ファージの遺伝子構成はキメラ型であり、ファージの感染、溶原化では説明できない状態である。このキメラ型 CTX ファージの生成にも、自然形質転換の寄与が考えられ、その結果、新しい流行株である *V. cholerae* O1 El Tor variant が出現した可能性が示唆される。しかしながら、今回は流行株の一例のみの結果であり、コレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑みると、NICED に保存さ

れている *V. cholerae* 分離株を対象として解析を行う必要がある。また自然形質転換では大規模な遺伝子変換が起きる可能性があり、*V. cholerae* O1 El Tor variant の出現機序の解明には、CTX ファージだけでなく全ゲノムを対象とした SNP による系統解析は、コレラ流行株の成り立ちを知るうえで重要である。

本研究課題では NICED との国際的な共同研究を行い、中長期的な連携体制を築くことを目指している。研究資料の授受だけでなく、我々の持つ分子タイピング法を提供することにより分子疫学解析ネットワークを構築し、新型 *V. cholerae* 流行株の出現に備えたい。

#### E. 健康危機情報

特に無し。

#### F. 研究発表

M. Morita, S. Yamamoto, E. Arakawa, M. Alam, M. Ohnishi, H. Izumiya, H. Watanabe. Transfer of genes for type III secretion system in *Vibrio cholerae* via natural transformation. 46<sup>th</sup> U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Kolkata, India, Dec. 2011.

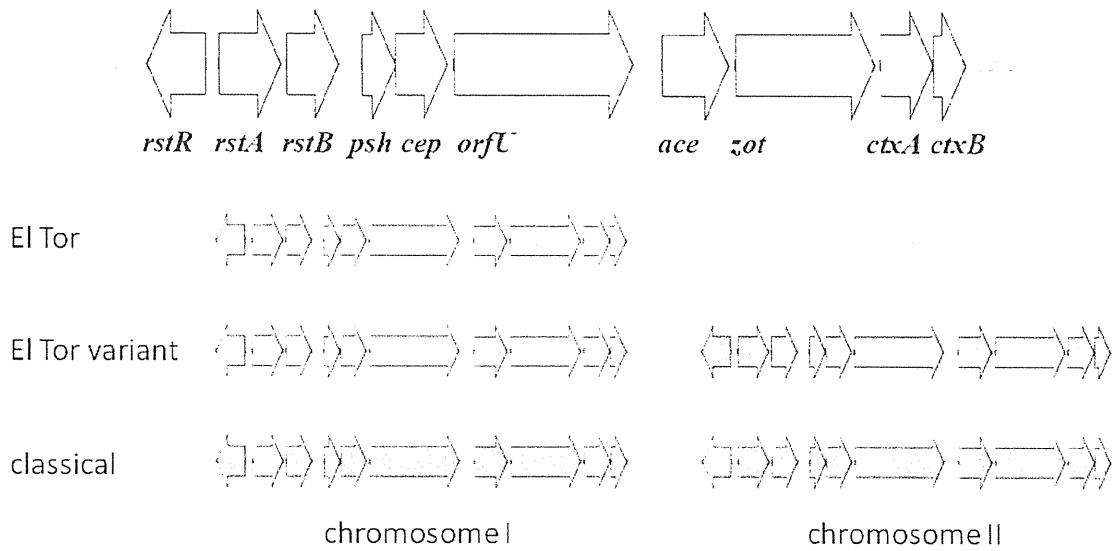


図 CTX ファージの構造。 *V. cholerae* O1 El Tor variant のに溶原化している CTX ファージは El Tor 型と classical 型のキメラ型であった。

新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究  
(H23-新興-指定-020 )

平成23年度 分担研究報告書

研究課題名：汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究  
分担研究者 三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部  
協力研究者 小泉信夫、志牟田健、寺嶋淳 国立感染症研究所・細菌第一部  
Hemanta Koley インド国立コレラ腸管感染症研究所・細菌部

研究要旨：

病原細菌に対するワクチンは一般的に血清型特異的な防御効果を主体としたものが多く、多様な血清型で構成される病原菌群全てに対するユニバーサルなワクチンは開発されていない。担当者は赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な研究に基づいたに血清型を超えた防御効果を示すワクチン候補の試験を行っている。赤痢はこれまで適当な動物実験モデルがないことが研究上のネックになっていた。本研究ではアジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークを活用し、モルモットを用いた新しい腸管感染モデルを開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を開始した。

A. 研究目的

細菌性赤痢に対して、種々の生ワクチン候補が開発され、幾つかのトライアルが行なわれている。これらのワクチン株は赤痢菌に代謝系の変異を導入したものか、大腸菌に赤痢菌の病原遺伝子群をプラスミドで導入したものであるが、一般的な細菌ワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない [1]。

その理由として血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている機構が考えられる。実際、幾つかの赤痢菌の病原蛋白は宿主細胞細胞へ侵入した後にしか発現しないことが報告されている。

ワクチン開発という側面からも、こうした赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は大変重要である。担当者は細菌のRNA結合蛋白として知られているHfqが赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した [2]。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS) の発現が脱抑制され、通常、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でも発現が起こり、通常発現の起こる高温 (37℃) では発現が増大し、HeLa細胞に対する侵入性が野生株の2～30倍以上に増加していることが分かった [3]。

一方、Hfqは細菌のストレス応答の制御因子でもあり、赤痢菌以外の病原細菌サルモネラ、コレラ、レジオネラの*hfq*欠損株では動物に対する病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス

条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfq* 欠損株も同様に動物実験における病原性が低下していた。このように、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している *hfq* 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。

分担者はこれまで、*S. flexneri* 血清型 2a の *hfq* 欠損株を用いて *S. sonnei* に対するワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価し、有意な防御能を認めた。一方、感染の場が腸管である赤痢菌に対して異所性の感染で評価することは限界があると考えられた。赤痢菌はこれまで、腸管感染の動物実験系が確立していなかったが、近年、胃酸を抑制し、盲腸を結索することでモルモット腸管でも赤痢を発症させることができることが報告されている [4]。当研究ではこの方法を開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所と共同研究を開始し、予備実験を行った。

## B. 研究方法

モルモットの腸管感染モデルは個体に免疫応答を惹起し、ワクチンの評価系として用いることができることが報告されている。ワクチン候補株とコントロールの野生型シーケンス株 2457T は、細菌第一部よりインド国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) に分与した。実験に先立って、NICED の実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認された。実験は NICED の動物実験施設の P 2 A 区画で飼育、感染実験を行った。

5 群計 20 匹の 4 週齢モルモットに、ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a 2457T 株の *hfq* 欠損変異株 (4 匹 × 2 群)、コントロールとして野生型 2457T 株 (4 匹 × 1 群)、お

よび PBS (4 匹 × 2 群) を二週間隔で  $1 \times 10^7$  個を計 4 回、麻酔下でカテーテルを用いて経口投与した (図 1)。投与に先立ち個体に H<sub>2</sub> ブロッカーを筋注し、重炭酸ナトリウムで胃酸を中和する処理を行った。初回、及び三回目投与後、糞便中の菌の定量と体重測定を行った。

4 週目、麻酔下で開腹し腸管の通過を妨げない形状に盲腸を結索した個体の回盲部に血清型の異なる *S. sonnei* 株もしくは Sd1 株  $1 \times 10^9$  個を投与したのち、閉腹し二日間症状を観察した。

## C. 研究結果

初回免疫後、便中の菌量を比較した。野性型菌は強い病原性を示し、3 日以内に全頭が下痢症状で死亡した。糞便 1 g 中の菌量は  $0.5 \sim 5 \times 10^7$  cfu であった (図 2)。同様にワクチン株も下痢症状を惹起したが、野性型と比較して糞便 1 g 中の菌量は  $1 \sim 5 \times 10^5$  cfu と少なく、投与後 4 日以内に検出されなくなった。三週間後 (day 22) の投与では菌量は約  $2 \times 10^4$  cfu と更に減少し、二日以内に全頭で不検出となり、免疫が付加されていることが予想された (図 3)。

免疫の体重の測定では、野生型投与群の体重減少が大きく、ワクチン株投与群では体重の回復が早いことが示され、ワクチン株は弱毒化されていることが明らかであった。

対照として用意した野生型投与群が全頭死亡したため、防御効果判定は攻撃株である *S. sonnei* および *S. dysenteriae* Type I を用いて PBS 投与群とワクチン株投与群との比較のみを行った。

*S. dysenteriae* Type I 投与群では PBS 投与群、ワクチン株投与群共に (4/4) 100% 下痢症状が発症した。PBS 投与群では 3 頭 (75%) が赤痢症状で死亡し、ワクチン株投与群では 2 頭 (50%) が死亡した (表 1)。

*S. sonnei* 投与群では PBS 投与群で (4/4) 100% 下痢症状が発症し、うち 2 頭が赤



痢症状で死亡した。ワクチン株投与群では(4/4) 100%発症が認められず、赤痢症状で死亡した個体はなかった(表2)。

#### D. 考察

汎赤痢菌群に有効なワクチン開発をめざしてモルモットの角結膜炎モデルで効果が認められたワクチン候補株に対して腸管感染モデルでの試験を行った。

経口でのワクチネーションの菌量に関して当初、免疫を惹起するには少なすぎるかと危惧されたが、野生型投与群が全頭死亡するなど、むしろ過剰であることが分かり今後の実験で検討する必要があると思われる。

糞便中の菌数の観察から、眼球に投与する実験と同様に明らかに*hfq*変異株は病原性が減弱していることが示された。初回免疫後、野生型と比較して糞中の菌数が100倍近く少ないことは、体内でかなりの数の菌が排除されていることが予想される。また、三週間後の免疫でさらに菌数が少なくなり、検出期間も短いことは有効な免疫が確立していることが予想される。

ワクチン効果の判定のため*S. sonnei*で攻撃した実験では血清型を超えた免疫効果を再現することができた。*S. dysenteriae* Type Iで攻撃した実験では死亡数では対照群を下回ったものの、全頭で下痢症状が認められ完全な防御は認められなかった。

過去に行われた眼球での感染実験ではワクチン免疫個体は*S. sonnei*で攻撃した後には*S. flexneri*の強毒株9268N(血清型1b)を再度眼球に感染させても、感染が起らなかった。また、この実験では観察個体数が、ワクチン3、コントロール6、PBSが6と揃

っていないため、眼球感染の再実験を行う必要がある。

今後の予定として、各群8匹に動物数を揃える再実験をNICEDで行うと共に、予備実験も兼ねて、*S. sonnei*に対して眼球での防御効果が認められた個体を用いて、*S. sonnei*以外の多くの血清型菌に対する防御能を調べる予定である。その後、効果があった血清型に対して、腸管での感染系で再試を行い、ワクチン効果のスペクトラムを調べられれば理想的である。腸管系実験では、免疫量を少量から徐々に増やす、Sd1で差が出やすいように攻撃量を調節するなどmodificationを行う予定である。

発表の為には以上の動物実験に加えワクチン作用の論理的背景を固める必要がある。実験動物の抗体価、サイトカイン価を調べる系を構築すると共に菌側の要因として、細胞内に侵入した*hfq*変異株において病原蛋白の発現量の動態を調べる実験を行う予定である。

#### E. 結論

汎赤痢菌群に効果があるワクチンの候補として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株を用いて、モルモットの腸管感染モデルで効果を判定した。過去に行われた角結膜炎モデルと同様に*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く血清型が異なる*S. sonnei*に対してワクチン効果が再現された。

#### F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

#### G. 研究発表(発表誌名巻号・頁・発行年等)

##### 1. 論文発表

Mitobe J., Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H. Bacterial cytoskeleton protein RodZ is involved in post-transcriptional processing of *Shigella* type III secretion system. EMBO reports 12, 911-916, 2011.

## 2. 学会発表

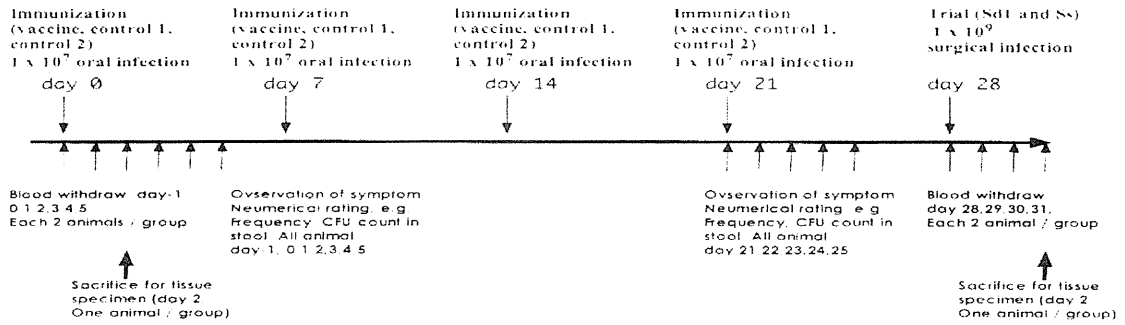
Jiro Mitobe. Itaru Yanagihara, Kiyouhisa Ohnishi, Shouji Yamamoto, Makoto Ohnishi, Akira Ishihama and Haruo Watanabe Bacterial cytoskeleton protein RodZ is involved in post-transcriptional processing of *Shigella* type III secretion system 2011, Sept. 6-10, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Sapporo Convention Center. Sapporo, Japan.

Jiro Mitobe. Hemanta Koley<sup>†</sup>, Ritam Sinha<sup>†</sup>, Ken Shimuta, Nobuo Koizumi, Jun Terajima, Makoto Ohnishi, G. Balakrish Nail<sup>†</sup> and Haruo Watanabe An attempt to develop experimental *Shigella* vaccine based on virulence gene expression. 2011, Dec. 13-15 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Annual Joint Panel Meeting for Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kolkata. India

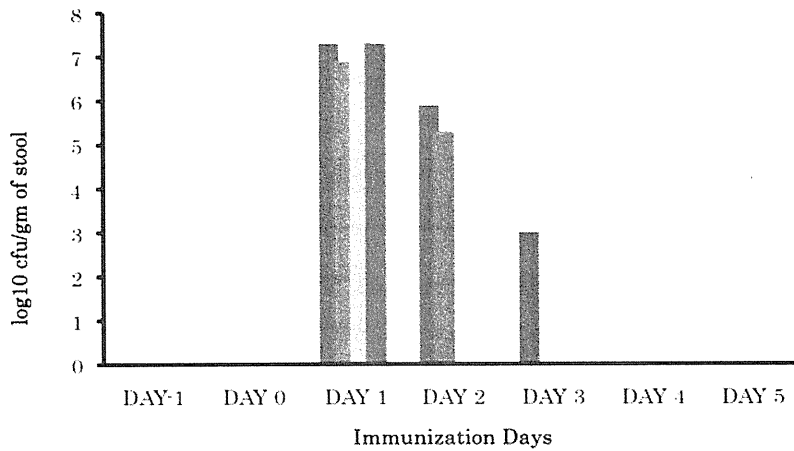
## <参考文献>

1. Kotloff, K.L., et al., Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ, 1999. 77 (8): p. 651-66.
2. Mitobe, J., et al., Involvement of RNA-binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. J Biol Chem, 2008. 283 (9): p. 5738-47.
3. Mitobe, J., et al., Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 110.
4. Barman, S., et al., Development of a new guinea-pig model of shigellosis. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. 62 (3): p. 304-14.

☒ 1



☒ 2



☒ 3

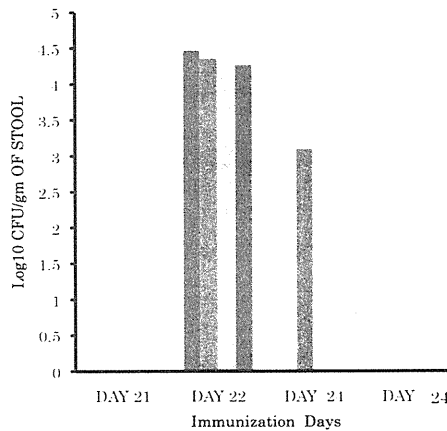
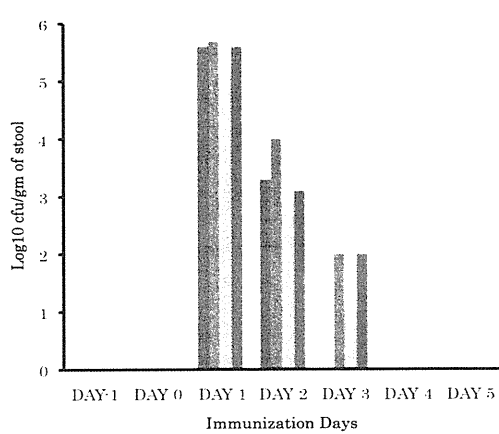


表 1

Experimental animal	Immunogen used	Challenged Strain used	Number of animal used	Disease symptoms	% of death with Shigellosis	% of protection against Shigellosis
PBS Control Group	Nil	Wild type <i>Shigella dysenteriae</i>	4	Shigellosis 100% ( 4/4)	75% (3/4)	0% ( 0/4)
Immunized Group	VACCINE STRAIN	Wild type <i>Shigella dysenteriae</i>	4	100% ( 4/4)	50% (2/4)	0% (2/2)

表 2

Experimental animal	Immunogen used	Challenged Strain used	Number of animal used	Disease symptoms	% of death with Shigellosis	% of protection against Shigellosis
PBS Control Group	Nil	Wild type <i>S. sonnei</i>	4	Shigellosis 100% ( 4/4)	50% (2/4)	0% ( 0/4)
Immunized Group	VACCINE STRAIN	Wild type <i>S. sonnei</i>	4	0% ( 0/2)	0% (0/4)	100% (4/4)

厚生科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業)  
分担研究報告書

腸管系寄生虫症の解析

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

**研究要旨** ジアルジア症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症のひとつである。本研究はインド NICED との共同研究を通じて、分子疫学的手法を用いたジアルジア症の感染実態調査を行うとともに、病原機構等の解明を目指す。初年度はコルカタ、西ベンガル州におけるジアルジア症の感染実態を明らかにするために、疫学・分子疫学的情報を獲得した。本年度の研究成果により、ジアルジア症の感染浸淫度、季節消長、遺伝子多様性、動物由来感染症としての重要性などが明らかにされた。

**A. 研究目的**

下痢性の腸管感染症は世界の死亡の 3.7% (216 万人) を占める (WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS の 3.5%、結核の 2.5% と同様に極めて重要な死因を占める。そのうち、アメーバ赤痢 (赤痢アメーバ症)、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、マイクロスポリジア症、イソスポーラ症などの腸管原虫症は、原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約 1% に感染し、年間 10 万人の死者を生む重要な killer である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を与え、高度な DALY の原因となる重要な腸管原虫症である。

本研究では、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強化し、情報ネットワークを構築することを主な目的として、インドコルカタにある Indian Council of Medical Research (ICMR) の感染症研究所のひとつである National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) と、腸管原虫症に関する共同研究を行っている。本研究では主にジアルジア症・クリプトスポリジウム

症・赤痢アメーバ症の疫学・分子疫学・病因学の共同研究を通じ、NICED との連携をこれまで以上に強化することを目指している。初年度は、東ベンガル州コルカタ周辺のジアルジア症の疫学、分子疫学情報を収集した。

**B. 研究方法**

1. 糞便検体

毎週無作為に抽出された 2 曜日に、NICED に近接する Infectious Disease Hospital (IDH) に、下痢で来院し入院した患者のうち、毎 5 人目の患者、合計 2421 人を対象とし、そのうち *Giardia lamblia* 陽性者 253 人のうちの無作為抽出された 30% (58 名) を対象とした。更に、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30% (17 名) を抽出した。これらの計 75 の糞便を対象とした。以下の PCR による確認の他に、糞便中抗原を特異的 ELISA (Techlab, Blacksburg) により検出されたことを条件に、確定診断とした。

ウシの便はインド西ベンガル州の酪農場の 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された。更に、51 人の酪農場労働者からも糞便を採取した。下痢症状の有無は聴取しなかった。

2. 遺伝子型別解析

糞便からの核酸の抽出は Stool DNA mini kit (Qiagen) を用いた。PCR は *Giardia lamblia* の beta giardin, glutamate dehydrogenase, triose phosphate isomerase 遺伝子を標的とし、既報のオリゴヌクレオチドプライマーと条件を用いて行った (Khan 2011)。データの優位性は Student t test、ANOVA にて検定した。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

### C. 研究結果

#### 1. コルカタ地区におけるジアルジアの感染実態調査

コルカタにある感染研様研究所である NICED に併設された IDH に来院した下痢症患者から無作為抽出された計 2421 人の対象のうち、顕微鏡検査、抗原捕捉試験、糞便 PCR のいずれかで *Giardia* 陽性と判定されたのは 253 人であった (診断法まとめを図 1 に示す)。

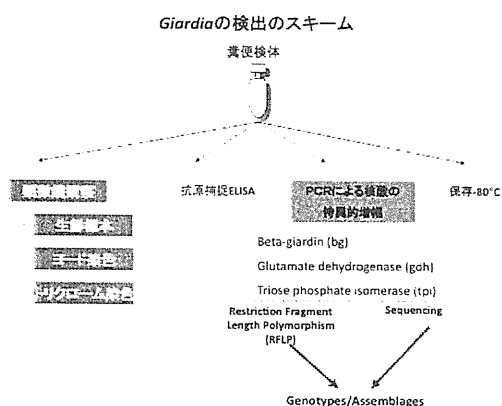


図 1 ジアルジア検出のスキーム

253 人のうち 195 人が有症者、58 人が無症候であった。その年齢内訳、並び年齢別の優位性、OR (図 2) は以下の通りである。

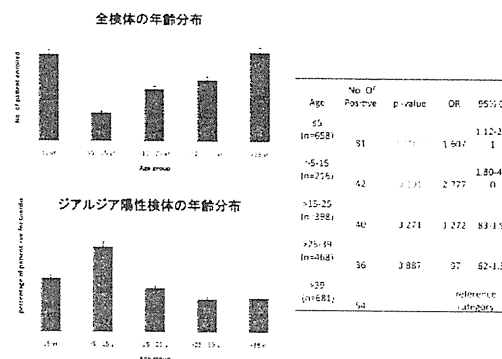


図 2 ジアルジア感染者の年齢分布と年齢別リスク

月毎の全体のモニター数、そのうちおん *Giardia* 陽性者数、陽性者の割合を図 3 に示す。6-10 月の post-monsoon 期に感染数と感染率の上昇が見られた。

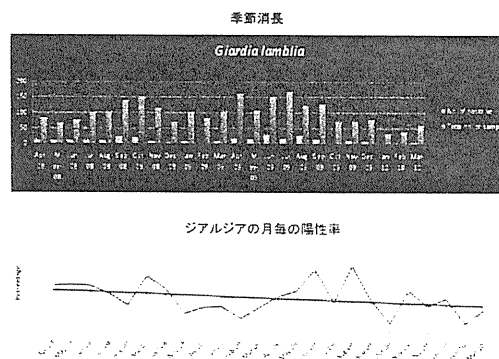


図 3 ジアルジア感染の月別感染状況

*Giardia* 感染者の 74% に他の細菌或いはウイルスとの混合感染が見られた (図 4)。

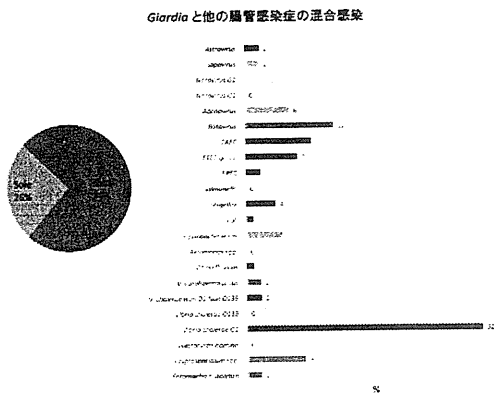


図4 ジアルジア感染における混合感染

2. コルカタ地区下痢症患者から分離されたGiardia株の遺伝子型別解析

Giardia 陽性者で有症者から無作為抽出された30% (58名)、下痢症状のない58症例から、同様に30% (17名)を抽出し、遺伝子型別を行った(図5)。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A 及び B が検出された。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A では AII と AIV が、Assemblage B では BIII と BIV が、発見された。サンプルサイズのため特定の遺伝子型への偏りは優位であると証明されなかった。

有症例からの59株

		Assemblages					
		A		B		D	E
No. of Samples		21		35			
Sub assemblage		AII	AIV	BIII	BIV	--	--
No. of Samples		12	9	29	6	1	2

無症例からの17株

		Assemblages			
		A		B	
No. of Samples		6		11	
Sub assemblage		AII	AIV	BIII	BIV
No. of Samples		2	4	7	4

図5 コルカタで分離されたジアルジアの遺伝子型別

3. 西ベンガル州の酪農場での家畜

と人の感染実態調査

計180の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された糞便のうち、全体で、7% (12/180)のウシにジアルジア感染が見られた。特に仔ウシに高い感染(20/112, 18%)が見られた(図6)。検出されたAssemblageは主にAssemblage Eであったが、Aも発見された。複数のAssemblageの同時感染も3例検出された。

一方酪農場の労働者でも高い感染が見られた(14/51, 27%)。AssemblageはAおよび、家畜からは発見されなかったBであった。Eは発見されなかった。

Source	Sample size	Giardia duodenalis			
		A	B	E	A+E
Pre-weaned calves	40	3	0	7	1
Post-weaned calves	72	2	0	5	2
Heifers and adult cattle	68	0	0	2	0
Dairy farm workers	51	6	8	0	0

図6 酪農場の家畜と労働者におけるジアルジア感染実態と検出されたAssemblage

更に subassemblage 型別の結果を図7に示す

Host assemblage	Cattle		Human	
	A	E	A	B
Subtype	A1 = 5 <sup>a</sup> A+E = 3 <sup>b</sup>	E1 = 10 <sup>a</sup> E1 = 3 E2 = 1	A1 = 4 A2 = 2	B1 = 1 B3 = 6 B4 = 1

図7 酪農場の家畜と労働者における

## 詳細な遺伝子型別の結果

### D. 考察及び結論

ジアルジア症は腸管原虫症の中で最も感染者が多いが、その病原機構・酸化ストレス耐性機構・細胞分化・遺伝子発現制御を始め不明な点が多い。下痢の原因疾患としての位置は認められている一方で、感染後発症を決定する因子・マーカーは特定されていない。従って、分子疫学的解析が極めて重要であり、本年度は東インドコルカタ周辺におけるジアルジアの感染実態調査に多くの時間を費やした。

その結果、ジアルジア症に関する多くの重要な知見が得られた。第1に、約10%の人の下痢症例からジアルジアが発見され、下痢の主要な原因病原体であることが確認された。第2に多くの感染例が他の病原細菌・ウイルスとの混合感染であり、他の病原体の感染の発症や重症度などを修飾する可能性が示唆された。第3に、人の感染は主に15才以下の小児に検出され、小児の栄養不良・身体と知育の成長阻害の要因となる可能性が確認された。第4に、酪農場のウシ並びに労働者から高い感染が確認され、コルカタ周辺地域でも動物由来感染症としての像が確認された。しかしながらウシから検出された遺伝子型と酪農場労働者から検出された遺伝子型とは大きな偏りがあり、酪農場でも Assemblage A 及び B のヒト—ヒト感染が主要であると考えられた。

以上本研究は初年度の目的をほぼ達成し、次年度以降の分離ジアルジア株からのウイルス感染の検出へ向けて準備を終了した。

### E. 健康危険情報

該当せず

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(i) Khan, S. M., Debnath, C.,

Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, S. (2011) Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 178, 342-345.

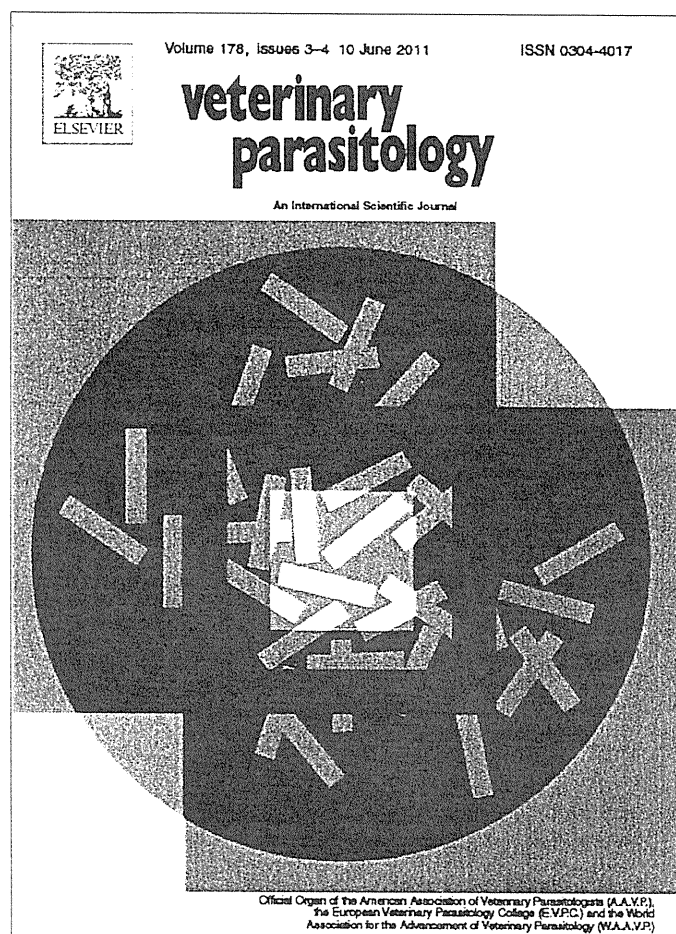
#### 2. 学会発表 なし

### G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当せず。
2. 実用新案登録  
該当せず



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

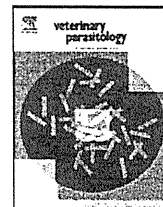


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Short communication

Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India<sup>☆</sup>Shahbaz Manzoor Khan<sup>a,b</sup>, Chanchal Debnath<sup>b</sup>, Amiya Kumar Pramanik<sup>b</sup>, Lihua Xiao<sup>c</sup>, Tomoyoshi Nozaki<sup>d</sup>, Sandipan Ganguly<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Division of Parasitology, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, P-33, C. I. T. Road, Beliaghata, Scheme-XM, Kolkata 700 010, West Bengal, India<sup>b</sup> West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, 37, K.B. Sarani, Belgachia, Kolkata 700 037, West Bengal, India<sup>c</sup> Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA<sup>d</sup> Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 July 2010

Received in revised form

24 December 2010

Accepted 17 January 2011

## Keywords:

*Giardia duodenalis*

Cattle

Dairy farm workers

Zoonoses

India

Genotyping

## ABSTRACT

No study in the past has examined the genetic diversity and zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in India. To assess the importance of these animals as a source of human *G. duodenalis* infections and determine the epidemiology of bovine giardiasis in India, fecal samples from 180 calves, heifers and adults and 51 dairy farm workers on two dairy farms in West Bengal, India were genotyped by PCR-RFLP analysis of the  $\beta$ -giardin gene of *G. duodenalis* followed by DNA sequencing of the nested PCR products. The overall prevalence of *G. duodenalis* in cattle was 12.2% (22/180), the infection being more prevalent in younger calves than in adult cattle. Zoonotic *G. duodenalis* Assemblage A1 was identified in both calves and workers although the most prevalent genotype detected in cattle was a novel Assemblage E subgenotype. These findings clearly suggest that there is a potential risk of zoonotic transmission of *G. duodenalis* infections between cattle and humans on dairy farms in India.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Protozoan parasites of the genus *Giardia* have a worldwide distribution and are emerging as one of the most frequent causes of diarrhoea in humans in both the developing and developed world. Giardiasis causes diarrhoea and nutritional deficiencies in children less than 10 years of age with the highest prevalence in developing countries (Islam, 1990). In addition to humans, they infect a wide variety of domestic and wild animals having emerged as important parasites of dairy cattle because of their

proven pathogenicity (Xiao et al., 1993; Ruest et al., 1997; O'Handley et al., 1999), and the potential public health significance of zoonotic transmission (Buret et al., 1990; Ey et al., 1997; Olson et al., 2004). *Giardia duodenalis* (syn *G. intestinalis*, *G. lamblia*) has been implicated as an etiological agent in dairy and beef calf diarrhoea, worldwide (O'Handley et al., 1999; Huetink et al., 2001; Olson et al., 2004). In fact, reduced rate of weight gain, impaired feed efficiency and decreased carcass weight were associated with giardiasis in a ruminant model of the disease (Olson et al., 1995).

*G. duodenalis* is the only species found in humans, although it is also found in other mammals (Thompson et al., 2000). Substantial evidence suggests *G. duodenalis* to be a species complex comprised of morphologically indistinguishable isolates which can genetically be differentiated into several major assemblages: Assemblages A and B mainly infect humans but are also found in a wide

<sup>☆</sup> Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the following accession numbers: GQ290390, GQ345009 and GQ345010.

\* Corresponding author. Tel.: +91 33 23633855; fax: +91 33 23632398. E-mail address: sandipanganguly@hotmail.com (S. Ganguly).

range of other mammals; C and D have been found in dogs; E has been isolated from livestock (cattle, sheep, and pigs); F and G have been reported from felines and rats, respectively (Monis et al., 2003). More recently, Assemblage H has been detected in marine vertebrates (Lasek-Nesselquist et al., 2010). Recent studies throughout the world have demonstrated that calves in dairy and beef herds may harbour more than one genotype of *G. duodenalis* (Trout et al., 2004, 2005; Itagaki et al., 2005; Lalle et al., 2005; Mendonca et al., 2007; Langkjaer et al., 2007; Winkworth et al., 2008). However, although the World Health Organization has considered *G. duodenalis* to have a zoonotic potential for around 30 years (WHO, 1979), direct evidence has been lacking.

A significant prevalence of *Giardia* isolates has been earlier reported in Indian dairy cattle based on microscopic findings (Deshpande and Shastri, 1981). However, surprisingly, there have been no prior molecular characterization studies of *Giardia* in Indian cattle although extensive molecular epidemiological studies have been carried out in a number of countries. There is also lack of data required for the assessment of zoonotic transmission of *G. duodenalis* between cattle and humans in India. Consequently, this study was conducted to understand the public health significance of this parasite from cattle and get a clearer epidemiological picture, with much information on the zoonotic potential and transmission mechanisms for humans.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of fecal samples

Bovine fecal samples used in this study were collected from 180 dairy cattle including 40 pre-weaned calves (0–2 months old), 72 post-weaned calves (3–12 months old) and 68 heifers and adults (>12 months) with and without diarrhoea from two dairy farms: the Harringhata Cattle Farm, Nadia and Ramakrishna Mission Dairy Farm, Narendrapur, 24 Parganas (N), West Bengal, India from October 2008 to August 2009. In addition to these, stool samples were also collected from 51 dairy farm workers of these two farms who were in direct or indirect contact with these animals but showed no visible clinical signs of giardiasis.

### 2.2. Parasite detection

Microscopic examination was performed on all fecal samples within 48 h after collection. Iodine wet mount staining and Trichrome staining were performed for the detection of trophozoites and cysts of *Giardia* according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) method (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>). For microscopic screening, parasite cysts and oocysts present in fecal samples were concentrated using a FPC<sup>®</sup> Fecal Parasite Concentrator (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA, USA). Antigen capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was also performed with all the frozen samples for detection of *Giardia* using a commercially available kit GIARDIA II (TECHLAB, Blacksburg, VA, USA).

### 2.3. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen samples from individuals that were positive by microscopy and ELISA using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The eluted DNA was quantified spectrophotometrically and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further PCR studies.

### 2.4. Nested PCR analysis

For the detection of DNA of *Giardia*, amplification of a fragment of the  $\beta$ -giardin gene was performed using primers described by Caccio et al. (2002) and Lalle et al. (2005). A 753 bp fragment was amplified in the primary PCR using the forward primer G7 and reverse primer G759. In the secondary PCR a 511 bp fragment was amplified. PCR mixtures and cycling conditions were identical to those previously described (Lalle et al., 2005) except that the primary PCR mixture also contained non-acetylated BSA (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) to a final concentration of  $0.1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ultrapure water was used as negative control. All PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualised after ethidium bromide staining.

### 2.5. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

Secondary PCR products were purified using the High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The restriction analysis was performed as described before (Lalle et al., 2005). Briefly,  $10\ \mu\text{l}$  of the nested PCR products of the  $\beta$ -giardin gene were digested with 10 units of restriction endonuclease *Hae*III (New England Biolabs) and  $2\ \mu\text{l}$  of  $10\times$  buffer in a total volume of  $20\ \mu\text{l}$ , at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 h. Restriction products were fractionated on a 2% agarose gel and visualised after ethidium bromide staining.

### 2.6. DNA sequencing

In order to determine *G. duodenalis* subgenotypes and to confirm the PCR-RFLP results, all purified secondary PCR products that were positive for *Giardia* were directly sequenced in both directions using an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with forward and reverse primers. Sequences obtained were analyzed and assembled using CLUSTAL W software (Higgins et al., 1994). The obtained nucleotide sequences were used to search the GenBank nucleotide sequence database for sequence similarities using BLAST software (NCBI, Bethesda, MD, USA). Multiple alignments of these sequences were made using the BioEdit program (Hall, 1999).

## 3. Results

The overall prevalence of *Giardia* in cattle was 12.2% (22/180, Table 1); 27.5% (11/40) pre-weaned calves, 12.5% (9/72) post-weaned calves and 2.9% (2/68) heifers and adults were positive for *Giardia* by both microscopy and

**Table 1**

Detection of different genotypes of *Giardia duodenalis* by PCR-RFLP of the  $\beta$ -giardin gene in fecal samples collected from different age groups of dairy cattle and dairy farm workers.

Source	Sample size	<i>Giardia duodenalis</i>			
		A	B	E	A+E
Pre-weaned calves	40	3	0	7	1
Post-weaned calves	72	2	0	5	2
Heifers and adult cattle	68	0	0	2	0
Dairy farm workers	51	6	8	0	0

ELISA. Among dairy farm workers, *Giardia* was present in 27.4% (14/51) of the screened samples. Successful PCR amplification of the *Giardia*  $\beta$ -giardin gene was accomplished for all the samples positive by microscopy and ELISA.

### 3.1. Genotyping and phylogenetic analysis of giardia

Among cattle, PCR-RFLP results identified *G. duodenalis* Assemblage E as the most prevalent genotype although a substantial number of the isolates from dairy calves were found to be Assemblage A (Table 1). Interestingly, *Giardia* isolates from one pre-weaned and two post-weaned calves produced four visible bands (201, 186, 150 and 110 bp) upon restriction digestion of the  $\beta$ -giardin nested PCR products by *Hae*III (Fig. 1). This result suggests that there was a mixed *G. duodenalis* Assemblage A and E infection in these calves since RFLP analysis of Assemblage A would have produced three visible bands (201, 150 and 110 bp) while Assemblage E would have generated three bands visible at 186, 150 and 110 bp, upon restriction analysis by *Hae*III (Lalle et al., 2005). DNA sequencing of most Assemblage E positive PCR products (10/14) showed a mismatch of two base pairs with the reference sequences for subtypes E1 (GenBank accession no. AY072729), E2 (Gen-



**Fig. 1.** Genotyping of *Giardia* isolates by RFLP analysis based on digestion of  $\beta$ -giardin gene PCR products by *Hae*III. Lanes 1 and 5: 100bp plus DNA ladders, lane 2: Assemblage E, lane 3: mixed Assemblage A and E, lane 4: Assemblage A (bovine source), lane 6: Assemblage A (human source) and lane 7: Assemblage B.

**Table 2**

*Giardia duodenalis* Assemblages A, B and E subtypes identified in dairy cattle and dairy farm workers by DNA sequencing of the  $\beta$ -giardin gene.

Host assemblage	Cattle		Human	
	A	E	A	B
Subtype	A1 = 5 <sup>a</sup>	En = 10 <sup>c</sup>	A1 = 4	B1 = 1
	A + E = 3 <sup>b</sup>	E1 = 3	A2 = 2	B3 = 6
		E2 = 1		B4 = 1

<sup>a</sup> Number refers to the isolates detected.

<sup>b</sup> Subtypes could not be determined.

<sup>c</sup> En refers to the novel subtype detected.

Bank accession no. AY545650) and E3 (GenBank accession no. AY653159), the mismatches being at two different positions for each subtype. However, E1 and E2 were also detected in a few samples (Table 2). Additionally, all the Assemblage A positive isolates in cattle were identified as subtype A1 by DNA sequencing of nested PCR products of the  $\beta$ -giardin gene.

*G. duodenalis* Assemblage B (57.1%, 8/14) was more prevalent than Assemblage A (42.9%, 6/14) in dairy farm workers (Table 1). DNA sequencing of the nested PCR products identified A1 and B3 as the dominant subtypes although a number of other subtypes were also found in a few samples (Table 2). Assemblage A1 found in humans and cattle showed a 100% homology with each other.

### 3.2. Nucleotide sequence accession numbers

Representatives for genotypes of *G. duodenalis* identified in this study have been submitted to GenBank under the accession numbers: GQ290390, GQ345009 and GQ345010.

## 4. Discussion

The present study represents the first report on the molecular characterization of *G. duodenalis* in Indian cattle. Overall, *Giardia* was detected in 12.2% (22/180) of the bovine fecal samples screened by microscopy, ELISA and PCR studies. The relatively higher prevalence of *Giardia* infection found in a previous study in Indian cattle (Deshpande and Shastri, 1981) can be explained by the fact that only calves were sampled in that study whereas both calves and adult cattle were screened for *Giardia* in the current study. Further, results from the present study indicate that infections by *G. duodenalis* are more prevalent in calves than in adult cattle, which agrees with previous reports (Huetink et al., 2001; Olson et al., 2004; Mendonca et al., 2007). A significant number of Assemblage E isolates detected in calves and adult cattle were shown to be genetically different from all the previous known Assemblage E subtypes namely E1, E2 and E3 (Lalle et al., 2005). This result suggests a novel subgenotype of *G. duodenalis* Assemblage E in Indian cattle. As expected, this livestock-specific assemblage was found more frequently in cattle sampled in this study, although the most common zoonotic genotype Assemblage A (Thompson et al., 2000) was also identified in a number of calves. Similar observations have been reported in previous studies from across the globe