

図 1

Immunization Protocol

CONTROL 1 (PBS): 6 Animals
 CONTROL 2 BY *S. flexneri* 2a wild-type: 6
 Animals
 VACCINATION BY *S. flexneri* 2a Δ hfq: 6
 Animals

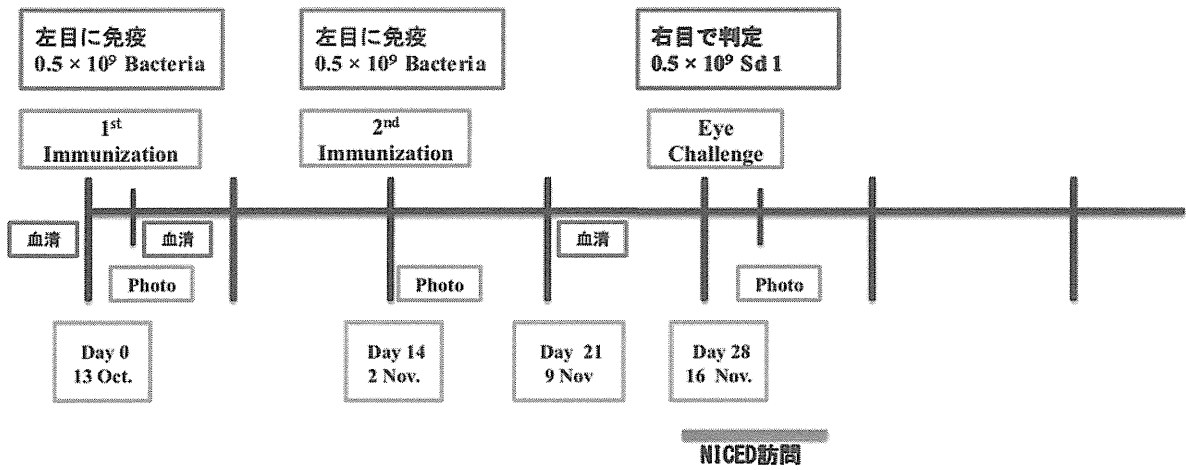
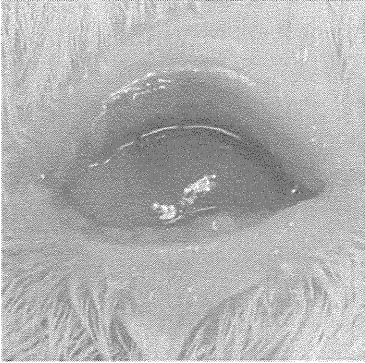
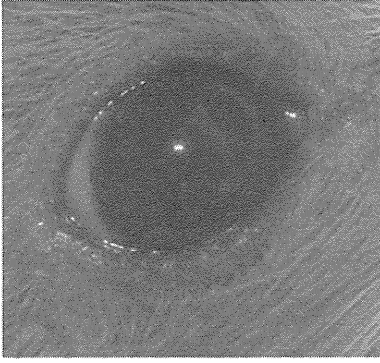
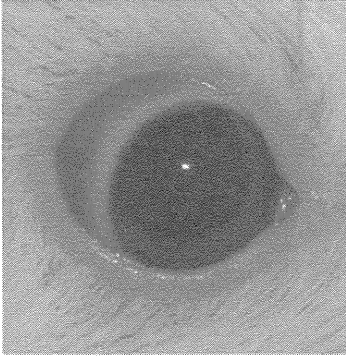


図 2

Effect of vaccination (Photo: 3 days after infection)

Control 1	Control 2	Vaccine
PBS Sd1	Wild-type <i>S.flexneri</i> Sd1	Δ hfq, <i>S.flexneri</i> Sd1
		
6 / 6 +++	2 / 5 + 3 / 5 -	0 / 6 -

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
(Analysis of enteric protozoan infections)

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長
Tomoyoshi Nozaki, Director, Department of Parasitology
National Institute of Infectious Diseases

研究要旨 ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。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、ジアルジア・赤痢アメーバ等の病原・寄生機構等の解明を行っている。2年度は、ジアルジアからの感染ウイルスの特定を目指すために、西ベンガル州におけるジアルジア症の病原株の確立を目指すと共に、赤痢アメーバにおける抗酸化機構の分子機構を明らかにした。

Abstract Giardiasis, Amoebiasis, and Cryptosporidiosis are the important enteric protozoa in Asia and Africa. The objective of the present study include molecular epidemiological survey of enteric protozoan infections in the state of West Bengal and molecular characterization of the mechanisms involved in parasitism and virulence of *Entamoeba* and *Giardia*. We, in the second year, investigated molecular mechanisms of anti-oxidative stress mechanisms by metabolic profiling of *Entamoeba* under the oxidative stress.

A. 研究目的

腸管感染症は世界の死亡の約 4% (216 万人)を占める重要な感染症である(WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める。腸管感染症のうち原虫症として重要なのは、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、マイクロスポリジウム症、イソスポーラ症などであり、これらが原虫が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原虫である。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、高い DALY の原因となる。

本研究では、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う。その目的は、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にある。人的交流を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築することを間接的な目的とする。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6 (Louis Buddy Diamond の分離による) の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. メタボローム解析

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析法 (CE-ToFMS) により行った。方法の詳細は Husain J Biol Chem 2010 に詳述した。Anion, Cation モードでの計測で、約 90 の中間代謝産物を定量した。

2. 過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1) 及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポフェクションを用い、常法に従った。

(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. 酸化ストレスによる細胞死と細胞内活性酸素種の産生

赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答をモニターした。パラコートや過酸化水素に対して図 1 に示すように感受性を示した。更に、1mM のパラコートによる処理により時間依存的に細胞内の ROS が上昇することが示された。

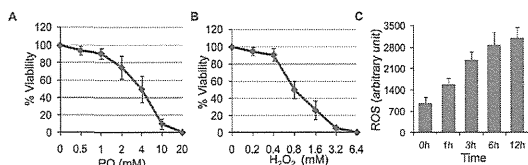


図 1 酸化ストレス (A, パラコート ; B, 過酸化水素) による細胞の生存率及び 1mM パラコート処理による細胞内 Reactive oxygen species の量

の動態

2. 代謝産物のプロファイリング

パラコート、過酸化水素を加え、継続的に 1, 3, 6, 12 時間後の代謝産物を抽出し、CE-ToFMS 解析により、全代謝産物を計測した。図 2 に示すように、パラコート及び過酸化水素の処理により様々な代謝物の増減が観察された。多くの変化はパラコートと過酸化水素に共通していたが、いずれかに選択的に観察された変化も見られた。

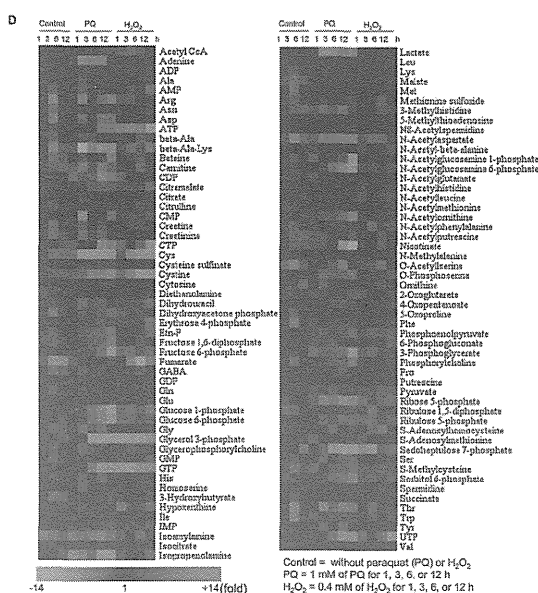


図 2 計測された全代謝産物の経時的変化 (ヒートマップ: time 0 を基準に減少を緑で増加を赤で示す) Control (無処理)、パラコート、過酸化水素処理でそれぞれ 1, 3, 6, 12 時間後の代謝産物の変化を示す

3. 酸化ストレスによる中心炭素代謝への影響

図 3 に図 2 に示したデータのうち、中心代謝 (解糖経路を中心として) を示した。パラコートで過酸化水素に比してより高度な変化が見られたが、増減の方向は多く近似していた。解糖経路の中間代謝物、特に上流の代謝物の多くは、酸化剤への暴露により、上昇した。更に Dihydroxyacetone

phosphate (DHAP)が高度に蓄積した。

N-acetylglucosamine 6-phosphate を始めとして中心代謝は多くキチンの生合成経路に redirect されていた。この傾向は特にパラコート処理により顕著で、酸化ストレスが細胞分化の誘因因子であることが示された。

更に Erythrose 4-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Ribose 5-phosphate などペントースリン酸経路への流入が増加していた。

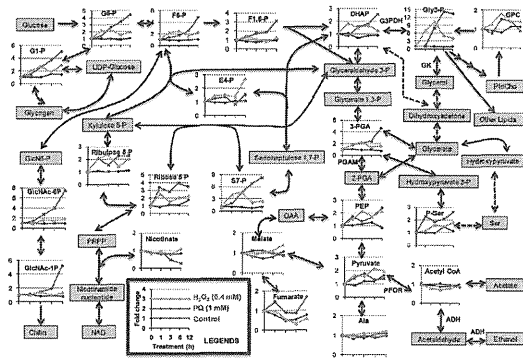


図3 酸化ストレス（赤，パラコート；緑，過酸化水素）による中心炭素代謝物の変化を示す

4. 酸化ストレスのヌクレオチドリン酸、エネルギー量への影響

酸化ストレスのヌクレオチドリン酸への影響は、パラコートと過酸化水素で似ていたが、増減は過酸化水素により、より強く見られた。過酸化水素暴露では、特に ATP が増減し、ADP, AMP は時依存的に減少した。同時に Energy charge は過酸化水素処理により、40-50%減少し、細胞内でのエネルギーの枯渇が生じていることが確認された。

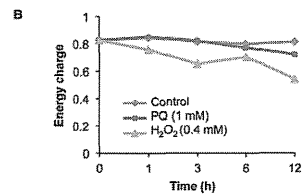
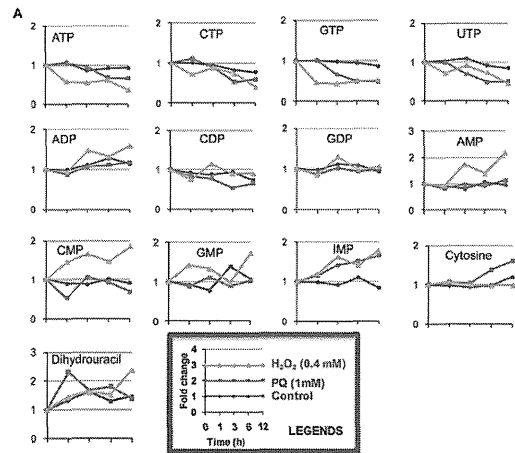


図4 ヌクレオチドリン酸、及びエネルギー量への酸化ストレスの影響（赤，パラコート；緑，過酸化水素）

4. 酸化ストレスによる解糖経路及び発酵に関する酵素の活性への影響

パラコートにより、解糖経路及び発酵（特にエタノール・酢酸発酵）に関する酵素の活性が影響されるか、検証した（図5）。特に、Phosphoglycerate mutase 及び Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase が強い活性阻害を受けた。

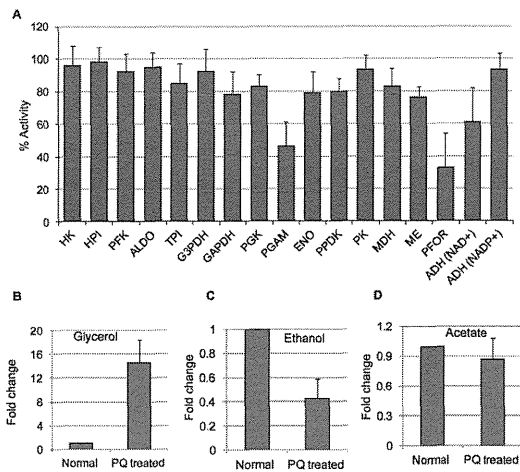


図5 パラコート暴露(1mM 12時間)による解糖経路及び発酵に関する酵素の活性の変化(A)、及びグリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度の変化(B-D)

5. 酸化ストレスのグリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度に対する影響

図5に示されるように、パラコート暴露はエタノール量を約半分に減らした、一方、グリセロールは14倍蓄積した。酢酸量は変化が見られなかった。

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。我々はNICED側が解析を進めるジアルジアの抗酸化ストレス機構の解析に直接的・間接的に協力を与え、同時に基盤的研究における相互作用を強化することを目的として、赤痢アメーバにおける同様の解析を実施した。

CE-ToFMSを用いた代謝産物の網羅的同定は、約100の極性を有する代謝物の同定・定量を効率よく行うことができ、原虫だけでなく、細菌・真菌、更にウイルス等に感染した哺乳動物細胞等の代謝変化を解析するために、極めて有効な手法である。

我々は原虫が哺乳動物に侵入し、組織傷害を起こす際に暴露される酸化ストレスに対して、原虫側がどのような代謝調節を行い、ストレス応答を行い、寄生・病害を達成しているかを理解するかを目的として、2種類の酸化物に暴露された赤痢アメーバ栄養型から代謝物を抽出し、CE-ToFMSを用いて網羅的代謝プロファイリングを行った。これにより、結果に詳述した極めて新規性の高い多くの発見をした。第一に、酸化ストレスにより解糖経路が停止し、その代謝フラックスが

キチン合成、ペントースリン酸経路へ方向転換されることを発見した。同時に細胞内エネルギー量が減少し、総合すると、酸化ストレスにより、エネルギーを消費するとともに、新規エネルギー合成を解糖経路で行わなくなることが示された。第二に、酸化ストレスにより、グリセロール3リン酸を介したグリセロールの合成、同時にATPの合成が行われることが明らかとなった。これにより、解糖経路、エタノール発酵によるATP合成がグリセロール発酵によるATP発酵に転化されていることが明らかとなった。今後これらの代謝変化が、ジアルジア等他の嫌気的原虫でも見られるかを、同様の方法により、NICEDとの共同研究により確認することができれば、嫌気的腸管原虫全般における代謝の抗酸化ストレス応答を一般化・普遍化できると予想される。

以上、本年度は赤痢アメーバにおける代謝解析により、赤痢アメーバにおける抗酸化ストレス応答の代謝に関する側面の解析をほぼ終えることができた。本成果は、NICEDとの代謝解析のプラットフォームの共有に資すると考えられる。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1831, 2012.
- (ii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions

between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.

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

厚生労働科学研究費補助金（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

エイズの流行とウイルス変異に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

HIV 感染症は世界三大感染症の一つであり、その克服は国際的最重要課題の一つである。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有するウイルスの選択は感染病態に大きく影響しうる。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症のコントロールに重要である。各 HLA アレル頻度は人種間で大きく異なるため、世界各地域の流行 HIV 株の HLA 関連変異同定が必要であり、特にインドはアジアの HIV 感染流行地域の一つとして重要な対象地域である。そこで本研究では、インド国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) との共同研究で、HLA 関連 HIV 変異同定に向け、インド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定法を確立し、解析を開始した。解析結果では、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見いだされた。今後、これらの HLA アレルに相関する HIV ゲノム変異同定に結びつくことが期待される。

A. 研究目的

世界三大感染症の一つである HIV 感染症は、宿主免疫によるウイルス複製抑制が困難で慢性持続感染を呈し、エイズ発症に至る致死感染症である。その克服は国際的最重要課題の一つであり、HIV 変異の伝播状況の把握は HIV 感染症のコントロールに結びつく基盤情報となる。特に HIV ゲノム塩基配列の解析研究は以下のように進められてきた。

(1) 1980年代からの主にenv領域の解析に基づく多様性に関する研究：各種サブタイプが同定され、HIVの各地域への経時的な伝播についての知見が得られてきている。

(2) 1990年代後半の抗レトロウイルス薬治療導入以降の主にpol領域の解析に基づく薬剤耐性変異に関する研究：逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等の抗レトロウイルス薬に対する耐性変異の同定が進められてきた。

(3) 近年の主に gag 領域の解析に基づく HLA 関連変異に関する研究：HIV 感染病態に最も影響の大きい宿主因子として知られている HLA (クラス I) の遺伝子型を各々の HIV 感染者について決定し、HIV ゲノム変異の解析結果とあわせて HLA 関連変異を同定するものである。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的抗原エピートプの提示に関与する HLA 分子の遺伝子型の違いは、CTL 標的の違いに直結するので、HLA 関連変異は CTL 逃避変異を反映するものとして、その解析研究が進められている。特に最近、Gag 抗原特異的 CTL の有効性が示唆されていることから、gag 領域の解析が先行している。

本研究はこの(3)の HLA 関連変異に着目するものである。CTL 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有するウイルスの選択は感染病態に大きく影響しうる。近年、抗 HIV 薬投与により HIV 複製のコントロールが可能となっ

たが、その複製抑制には CTL 反応が不可欠であることも知られている。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症のコントロールに極めて重要である。各 HLA アレルの頻度は人種間で大きく異なっているため、世界各地における流行 HIV 株の HLA 関連変異を同定することが必要であり、特にインドはアジアにおける HIV 感染流行地域の一つとして重要な対象地域である。そこで本研究では、インド国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) の Sekhar Chakrabarti 博士との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定と HIV ゲノム gag 変異同定を進め、HLA 関連変異同定に結びつけることとした。平成 24 年度はインド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型解析結果から、頻度の高い HLA アレルを検索した。

B. 研究方法

インド国の HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出されたゲノム DNA (インド NICED より供給) を用い、HLA タイピング (遺伝子型決定) を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いる研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い進めることとし、所属機関である国立感染症研究所の倫理委員会に申請し承認済みである。また、インドの共同研究者から所属機関である NICED の倫理委員会に申請し承認済みである。

C. 研究結果

インド国の HIV 感染者 14 名の末梢血リンパ球より得られた DNA を用い、東京医科歯科大学難治疾患研究所の木村先生・成瀬先生の協力のもと HLA-A、HLA-B、HLA-C 遺伝子型を同定し、頻度別に表にまとめた (表 1)。HLA-A*11:01:02、HLA-A*33:03、HLA-B*44:03、HLA-C*07:01、HLA-C*15:02 が、比較的頻度の高いアレルとして見出された。

D. 考察

本研究では、インド国 HIV 感染者の HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見いだされた。今後、これらの HLA アレルに相関する HIV ゲノム変異同定に結びつくことが期待される。

HIV 流行地域では、HIV 感染者集団における HLA 関連変異蓄積の可能性が示唆されている。HLA 関連変異の蓄積は、CTL による抑制がよりかかりにくい感染病態に結びつき、薬剤による治療効果に影響を及ぼす可能性も危惧される。したがって、本研究のようなアジア HIV 流行地域における HLA 関連変異情報の収集は、日本を含むアジア地域の HIV 感染症の制圧に貢献するものである。

E. 結論

インド NICED との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 関連変異同定に結びつけるべく、HLA 遺伝子型同定を行った。その結果、いくつかの比較的頻度の高い HLA アレルが見出された。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- (2) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbio* 3:234, 2012.

- (3) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. PLoS ONE 8:e54300, 2013.
- 2 学会発表
- (1) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/26/2012.
- (2) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012.
- (3) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗. SIV複製抑制マカクサルにおける CTL 逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- (4) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

表 1. インド人 HIV 感染者における HLA アレル頻度

HLA-A	frequencies
A*01:01	3
A*02:03	1
A*03:01	1
A*11:01	1
A*11:01/02	6
A*24:02	3
A*31:01	3
A*33:01	1
A*33:03	5
A*68:01	4

HLA-B	frequencies
B*07:02	3
B*13:01	1
B*15:32	1
B*27:07	1
B*37:01	1
B*39:01	1
B*40:06	4
B*44:03	6
B*48:04	1
B*51:01	1
B*52:01	3
B*55:01/03	1
B*57:01	2
B*58:01	2

HLA-C	frequencies
C*01:02	1
C*03:02	2
C*04:03	1
C*06:02	3
C*07:01	7
C*07:02	4
C*18:01	1
C*12:02	1
C*12:03	2
C*15:02	5
C*16:02	1

“Laboratory–based collaboration network of infectious diseases in Asia”

Funding Organization: National Institute of Infectious Diseases, *Tokyo, Japan*

Indian Investigators :

Principal Investigators: *Dr. S. Chakrabarti, Director in Charge, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata*

Co-Investigators:

Dr. Sekhar Chakrabarti, Scientist G
Dr. Banwarilal Sarkar, Scientist E
Dr. Asish K. Mukhopadhyay, Scientist D
Dr. Sandipan Ganguly, Scientist C
Dr. Hemanta Koley, Scientist C

Foreign Investigators :

Principal Investigators: *Dr. Haruo Watanabe, Director General, National Institute of Infectious Diseases, Japan & Ichiro Kurane, Deputy Director-General, National Institute of Infectious Diseases, Japan.*

1. Title of the Research Project :

“Laboratory –based collaboration net work of infectious diseases in Asia”

2. Objectives

The proposal has been developed with a broader objective to understand the evolution of pathogenesis of enteric pathogens and HIV that include phenotypic and genotypic characteristics of identified pathogens from diarrheal specimens as well as identification of novel factors for pathogenesis, to develop potential vaccine and to study mutations in HIV during infection which has an association with different genotypes and might be used as biomarkers; the study objectives will be covered though extensive work under the following areas and each of these areas will be covered by the Co-PIs of the project

- i) Retrospective analysis on the evolutionary aspects of Vibrio cholerae*
- ii) Differential pathogenesis of Giardia : Role of Giardia Virus*
- iii) Development of universal Shigella vaccine based on virulence gene expression.*
- iv) Analysis of HLA associated HIV-1 mutations in India and Japan.*

3. Summary of the research for fiscal year 2012-13

1. Retrospective analysis on the evolutionary aspects of Vibrio cholera

Second Year Report

1. Study Title: Retrospective analysis on the evolutionary aspects of *Vibrio cholerae*

2. Study facility:

National Institute of Cholera and Enteric Diseases
Division of Bacteriology
Kolkata, India

National Institute of Infectious Diseases
Tokyo, Japan

3. PI from Indian Side for this report: Asish K. Mukhopadhyay

Summary:

Our previous study on *Vibrio cholerae* strains isolated from Kolkata over 17 years from 1989 to 2005 depicted that in Kolkata, *V. cholerae* O1 strains with classical allele of *ctxB* have totally replaced seventh pandemic El Tor strains possessing El Tor allele of *ctxB* since 1995.

The recent devastating cholera outbreak in Haiti, for the first time in almost a century, placed this ancient scourge at the forefront of the global public health agenda. The causative agent of this outbreak *V. cholerae* contained a unique mutation at the 58th nucleotide of *ctxB* gene that has motivated us to investigate the emergence and dissemination of these new variants in Kolkata, India. Our newly developed double mismatch mutation assay and sequencing analysis showed that the Haitian *ctxB* first appeared in Kolkata during April, 2006 and 93.3% strains isolated in Kolkata during 2011 carried the new allele. This finding indicates that Haitian *ctxB* allele may have originated in Kolkata and then spread to the neighboring regions. Exploitation of this newly developed PCR assay will play important role in understanding the intercontinental spread of cholera. It has been hypothesized that the unique genetic composition of the new variants increases their relative fitness, perhaps as a consequence of increased pathogenicity.

Chronological analysis of one hundred twenty five *Vibrio cholerae* O139 strains isolated during 1993 - 2005 from Kolkata revealed the prevalence of two new genotypes of cholera toxin (CT) along with the different combinations of *ctxB* and *rstR* alleles resulting in variant CTX prophages. The prototype El Tor CTX phages gradually disappeared in O139 strains and the predominant CTX phages in O139 since 2002 are CTX Calcutta phages with genotype 4 and CTX El Tor phages with genotype 5. During the course of appearance and disappearance over a decade, five types of O139 strains have been detected based on CT genotypes. Very recently, we have found that few O139 strains contain CTX prophage in the small chromosome. These kinds of changes in O139 strains might be the probable reasons for their declining prevalence in human cases in Kolkata, India.

Purpose:

Genetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains from Kolkata

Materials and Methods:

Bacteriology and serology: One hundred and forty two *V. cholerae* O1 strains were selected for this study. These strains were selected from the strain repository of the National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata and were isolated from 2004 to 2011. All the strains were grown in Luria Bertani broth (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) for 18 hrs and then streaked on Luria agar (LA) plates. Identity of these strains was reconfirmed serologically by the slide agglutination with O1 specific polyclonal antiserum and serotype specific antisera (Becton Dickinson). *V. cholerae* O1 strains O395 (serotype Ogawa), N16961 (serotype Inaba) and EL-1786 (Ogawa, El tor) were used as standard strains for classical, El Tor and Haitian type, respectively.

Separately, one hundred and twenty five O139 strains were selected for this study. These strains were selected from the strain repository of National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata and these were isolated in different time frames from 1993 to 2005.

Preparation of template for PCR: One loopful of an overnight culture from LA plate was suspended in 200 μ L of Tris-EDTA buffer (pH 8.0) and then lysed by vigorous vortexing with mixture of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) saturated with 10 mM Tris and 1mM EDTA. (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) Supernatant was collected carefully following centrifugation at 12,000 rpm for 15 min and was extracted once with 100 μ L of mixture of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and centrifuged for 15 min at 12,000 rpm. The supernatant containing the DNA was used as template for PCR analysis.

PCR analysis: Double mismatch amplification mutation assay (DMAMA) PCR have been developed by exploiting *ctxB* sequence polymorphisms between CT genotype 1 (classical type) and genotype 7 (Haitian type). Briefly, PCR mixture (20 μ L) was set up in two sets, each containing 10 ng of template DNA, 200 nM of allele specific forward primers (i.e. either *ctxB*-F3 or *ctxB*-F4), and a reverse primer in common, Rv-cla, 200 μ M of each dNTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with 1 unit of Taq DNA Polymerase (Bangalore Genei, Bangalore, India) and 1.5mM MgCl₂ (Bangalore Genei, Bangalore, India). The optimal annealing temperature was determined using Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster city, USA) which generates a thermal gradient of annealing temperatures (from 54°C to 64°C). Initial standardization of the PCR was done with the control strains and best result was obtained using the protocol depicted in figure 1. *V. cholera* O1 strains O395 and N16961 were used as standard strains for classical and El Tor biotypes, respectively. Haitian strain, EL-1786 was used as the reference strain for CT genotype 7. The amplified fragments underwent agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and digitally recorded.

Nucleotide Sequencing of *ctxB*: To determine the nucleotide sequence of the *ctxB*, PCR amplification of *ctxB* locus of 12 *V. cholerae* O1 isolates was performed in a 25 μ L reaction mixture.

PCR primers and conditions used have been previously described. PCR amplicons were purified using the Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and both the strands were sequenced in an automated sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster city, USA). The entire coding sequences of the *ctxB* gene of three representative strains have been deposited in GenBank with accession numbers JN806157-JN806159. The deduced amino acid sequences of CTB from these three strains were aligned with corresponding sequences from N16961 (GenBank accession number NC-002505) and O395 (GenBank accession number CP001235) by using the online software Clustal W.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE):

Analysis of *NotI* digested PFGE patterns obtained with sixteen representative strains was carried out. The enzyme restricted the chromosomal DNA in to 15-27 fragments of different sizes ranging from 6 to 398 kb. Agarose-embedded genomic DNA from *V. cholerae* strains was treated with 50 U *NotI* (Takara Bio Inc, Otsu, Japan) and the resulted DNA fragments were separated by electrophoresis under the contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) on a CHEF Mapper system (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Run conditions were generated as described earlier. The resulting fragments were typically followed an electrophoresis time of 40 hrs 24 min. Following electrophoresis, the gels were stained for 30 min in Elix water (Millipore, Billerica, MA, USA) containing 1mg/mL ethidium bromide, destained in Elix water for 15 min and digitally recorded under UV light using the Gel Documentation System (Bio- Rad Laboratories). Dendogram analysis on the PFGE patterns was performed using Bionumeric software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Results and Discussion:

Development of a double mismatch mutation assay (DMAMA) PCR: In this study, we focused on the PCR detection of *ctxB* alleles in *V. cholerae* strains. Initial purpose of our study was to establish a PCR based assay which can discriminate the *V. cholerae* strains carrying Haitian, classical and El Tor alleles of *ctxB* in a simple and rapid way. Current methods for differentiating the biotype specific CTB subunit of *V. cholerae* O1 requires MAMA PCR of the *ctxB* gene with biotype specific primers, nucleotide sequencing of the *ctxB* allele or performing an ELISA using a specific monoclonal antibody to the classical or El Tor CT. Among these the first one has been the method of choice as it is simple and less time consuming. But the reports of influx of new variant strains of *V. cholerae* O1 with a classical CTB additionally mutated at the 20th amino acid (58th nucleotide position) clearly point out its limitation as this allelic discrimination is based on two biotype specific reverse primers each bearing a mismatch at nucleotide position 203 and so it was unable to discriminate between the classical and Haitian type *ctxB* allele. Therefore, for discriminating the classical, El Tor and Haitian type *ctxB* alleles in a simple, rapid and accurate way, DMAMA was designed and validated (Figure 1). We designed two allele-specific polymorphism detection forward primers, *ctxB*-F3 and *ctxB*-F4 each bearing a mismatch at their 3' ends. These allele-specific primers each carry specific nucleotide, A and C, for Haitian and classical type, respectively, at the 3' end. Furthermore, we enhanced the 3' mismatch effect by introducing another nucleotide alternation G (rather than A) at the second nucleotide (i.e, the 57th nucleotide) from the 3'end of both the primers. We used the *ctxB* reverse primer specific for the classical biotype (Rv-cla) as described by Morita *et al* as the conserved reverse primer. As shown in Figure 2, the DMAMA successfully discriminated the three different allelic subtypes of *ctxB*. *V. cholerae* O1 strains having the *ctxB* allele of genotype 7 yielded a 191 bp fragment of DNA with the primer pair *ctxB*-F3/Rv-cla but not with *ctxB*-F4/Rv-cla. An exact reversal of the first result was found in case of the classical control strain (O395), and the El Tor strain (N16961) did not produce any amplicon in both set PCR assays due to double mismatch in the forward and reverse primers. We have standardized the PCR to optimize both the specificity and sensitivity using the protocol depicted in figure 1.

Sequencing analysis to evaluate the PCR based result: To further reconfirm our PCR based result, 10 representative strains, which yielded positive bands for Haitian *ctxB* gene by DMAMA-PCR, were selected for DNA sequencing of *ctxB* gene. For sequencing, a separate pair of primer (*ctxB*-F: and *ctxB*-R) was used to provide the sequences of whole *ctxB* gene. Nucleotide sequence analysis of the *ctxB* genes of 10 representative strains of *V. cholerae* O1 revealed that the strains possessed DNA sequences identical to that of the classical type of *ctxB* with an additional mutation at the 58th position (C to A). The deduced amino acid sequences of all 10 representative strains were aligned with the CTB sequences of the reference strains N16961 (El Tor) and O395 (classical). The deduced amino acid sequences of all strains were found to be identical to the deduced amino acid sequence of the CTB of the O395 classical reference strain, with a histidine at position 39 and a threonine at position 68, except at 20th position with an asparagine instead of histidine (Figure 3). Thus, the result from DNA sequencing of *ctxB* gene confirmed the results of DMAMA-PCR and GenBank submission

ID is 1484711. Whole CTB is made up of 124 amino acids. A proteolytic cleavage between amino acids at position 21 and 22 results in generation of a 21 amino acids signal peptide and 103 amino acids mature CTB. New variant *V. cholerae* strains (with Haitian type of CTB) were mutated in signal peptide and histidine at position 20 was replaced by asparagine. We also sequenced *ctxB* gene from three representative strains those yielded amplicons with the classical specific primers (*ctxB*-F4/Rv-cla). The deduced amino acid sequences of all 3 strains were found to be identical to the classical reference strain, with a histidine at position 39 and a threonine at position 68 (data not shown). Thus, the result from DNA sequencing of *ctxB* gene confirmed the result of DMAMA-PCR.

Screening of the Kolkata strains using the DMAMA PCR: After standardizing the DMAMA, we extensively used it to investigate the emergence and dissemination of these new Haitian variant of *V. cholerae* strains in Kolkata, India. All the strains tested in 2004-05 were positive for classical type of *ctxB* indicating they are El Tor variant strains. Our analysis showed that first appearance of Haitian type *ctxB* was noted in Kolkata during April, 2006. There was a sudden decrease in the isolation profile of *V. cholerae* O1 strains with Haitian *ctxB* allele (CTB genotype 7) during 2007 and 2008. The percentage of the O1 isolates with CT B genotype 7 started to increase from 2009 (Figure 4) and more than 93% Kolkata strains carried Haitian *ctxB* allele in 2011.

Phylogenetic analysis based on PFGE: Results of DMAMA and the sequencing data clearly indicated arrival of novel variant among the circulating strains of *V. cholerae* O1 around Kolkata and motivated us to take a closer look on the relatedness of these variants with the Haitian isolates. The PFGE profiles of *V. cholerae* strains from Kolkata were compared using Bio Numeric software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (Figure 5). The similarity between strains was determined using the Dice coefficient, and cluster analysis was carried out using the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA). All the tested *V. cholerae* strains with classical *ctxB* (genotype 1) clustered together (cluster A), with a similarity matrix of > 95 (Figure 5). All the tested strains with Haitian *ctxB* (genotype 7) were also found to be closely related to each other, with a similarity matrix of >92 (cluster B). Dendrogram analysis showed two distinct PFGE pattern suggesting considerable diversities in genomic content between two groups (genotype 1 and genotype 7). Phylogenetic patterns indicate a close relationship between Haitian and Kolkata *V. cholerae* strains containing Haitian *ctxB* (genotype 7).

Conclusions: Our results not only signify a cryptic change in the circulating strains in Kolkata but also raise questions about the origin of these variants of *V. cholerae* O1 El Tor. This new type of *ctxB* (genotype 7) was first reported in *V. cholerae* O1 strains by Goel *et al* isolated from a cholera outbreak in Kalahandi, Orissa in 2007. But our results clearly show that in Kolkata genotype 7 prevailed since April 2006. This finding tempted us to speculate that Haitian type of *ctxB* may have originated from Kolkata and then disseminated to the neighboring regions like Orissa and other places, although confirmation of this hypothesis requires several other epidemiological and experimental validations, and then may have spread incontinently from Nepal to Haiti as shown by recent evidences. It has been hypothesized that the unique genetic composition of the new variants increases their relative fitness, perhaps as a consequence of increased pathogenicity.

Recent reports by several research groups showed a putative link between the strains associated with cholera in Haiti and in Nepal underscoring the speed at which infectious diseases can be transported globally and this situation puts at risk other non-endemic countries also. Implementing a coordinated, integrated multisectoral approach is the only efficient way to prevent and contain outbreaks among vulnerable populations living in high-risk areas. Prevention, preparedness, and response all depend upon an effective and holistic surveillance system and are linked and interdependent. We strongly believe that the DMAMA will be an easy and accurate tool for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant *ctxB* in *V. cholerae* O1 isolates and therefore will impart an integral role in understanding the cholera epidemiology around the globe.

Genetic analysis of CTX prophages of *Vibrio cholerae* O139 strains from Kolkata:

Analysis of *ctxB* by MAMA PCR: The results of MAMA-PCR showed that *V. cholerae* O139 strains isolated up to 1995 yielded amplicon only with El Tor allelic primer pair of *ctxB*. In case of strains isolated in 1996, along with El Tor *ctxB* among 54% of the strains, 18% of the strains yielded amplicon for classical *ctxB* primer pairs and 28% of the strains yielded amplicon with both classical and El Tor primer pairs of *ctxB*. This same trend continued in *V. cholerae* O139 strains isolated in 1997. In case of strains isolated in 1998, the result from MAMA PCR depicted that no strains yielded amplicon only with El Tor *ctxB* primer pair while 68% yielded amplicon with classical allele of *ctxB* primer pair and 32% yielded amplicons with both classical and El Tor allele of *ctxB* primer pairs. Since 1999 to 2005, the O139 strains yielded amplicon only with classical allelic primer pairs of *ctxB*.

Nucleotide sequence analysis and nested PCR: To confirm the results of MAMA-PCR, representative *V. cholerae* O139 strains isolated from 1993 to 2005 were selected for sequencing the *ctxB* loci. The results were depicted in Figure 6. Nested PCR results also depicted the schematic representation (Figure 7) of variable combination of CT genotypes and *rstR* alleles prevailed among O139 strains in Kolkata.

The prominent events in the changing profile of CTX prophages with respect to CT genotypes and *rstR* alleles among O139 strains over a decade were indicated in Figure 8, which demonstrated the graphical representation of isolation status of *V. cholerae* O139 strains from patients hospitalized due to acute secretory diarrhea at the Infectious Diseases Hospital, Kolkata from January 1993 to December 2005.

Chromosomal localization of CTX prophage: The schematic diagram displaying the chromosomal localization of CTX prophage among reemerged *V. cholerae* O139 strains during 1996 and 2003 are presented in Figure 9.

Conclusion: The diverse genotypes of *ctxB* as well as *rstR* alleles occurring among *V. cholerae* O139 strains along with the variations in other genetic segments of O139 strains which are not yet ascertained, perhaps consequences the temporal variation of incidence and prevalence of O139. The structural and functional aspects of these new CT genotypes will be the interesting areas to be explored in future, which may reveal vital information about the evolutionary phases of *V. cholerae* O139 strains. Frequent mutations thus acquired by *V. cholerae* O139 strains since its genesis may have an impact in their declining prevalence in cholera endemic areas like Kolkata.

Studies in progress:

We are presently perusing for expression study along with some animal model assay to make this work into a publication format.

Studying of O139 strains having CTX prophage in the small chromosome

Standardized PCR protocol used for this study

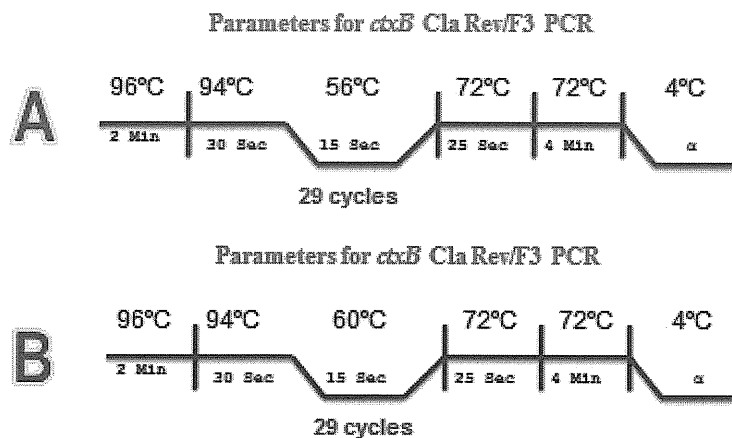
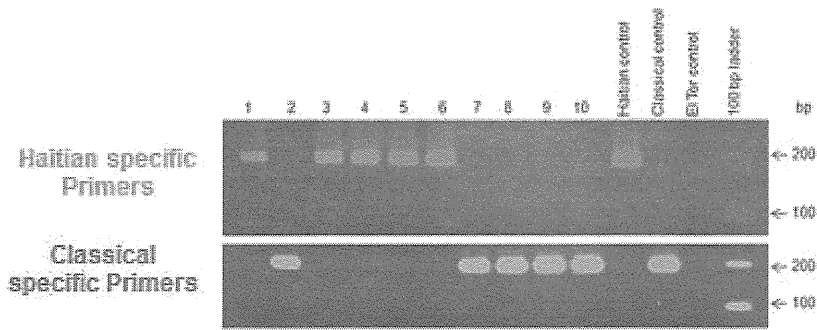


Figure 1



Double Mismatch amplification Mutation PCR assay to discriminate the classical, EI Tor and Haitian type *ctxB* alleles

Figure 2

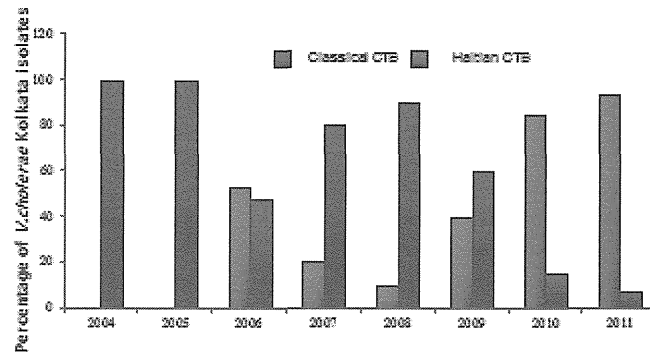
Sequence analysis of *ctxB*

	10	20	30	68
Classical§	MIKLLKPGVFF	...TVLLSSAYAH...	GTPQNTDLC...AEYHNTQIH...	TLNDKIFSY...FKNGATFQVEVPG
VOC2¶N.....	.H.....	.T.....
L21148 2006¶N.....	.H.....	.T.....
M12821 2007¶N.....	.H.....	.T.....
IDH 02003 2009¶N.....	.H.....	.T.....
EI TorH.....	.Y.....	.I.....

The deduced amino acid sequences of *ctxB* of representative IDH isolates were found to be identical to CT of the Haitian strain with a asparagine at position 20, histidine at position 39 and a threonine at position 68 confirming its identity with the Haitian type CT.

Figure 3

Isolation profile of *Vibrio cholerae* O1 strains with classical and Haitian type of *ctxB* in Kolkata



Naha et al; JCM, May 2012

***V. cholerae* O1 strain with Haitian type of *ctxB* was first time isolated in Kolkata during April 2006**

Figure 4

Dendrogram Analysis of the PFGE pattern using Bionumeric software (Applied Maths, Belgium)

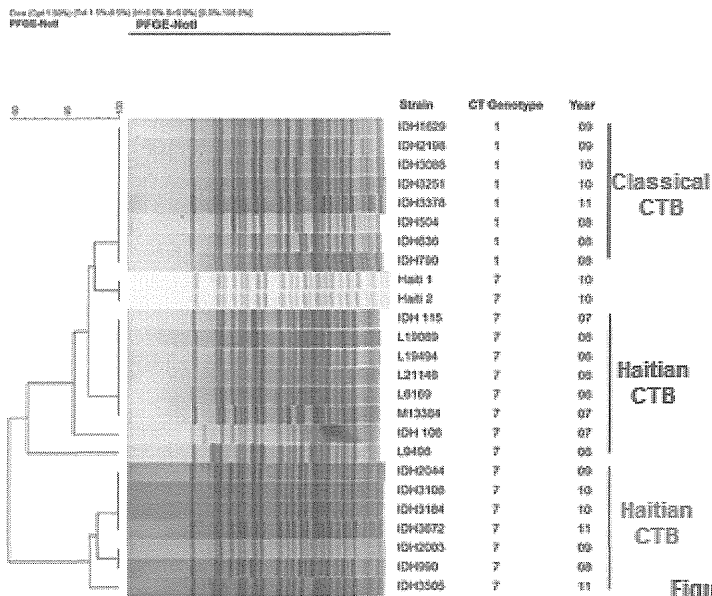


Figure 5

Analysis of *ctxB* and *rstR* of O139 strains isolated from Kolkata over a decade

Year	Nucleotide positions			Amino acid positions			CT genotype	<i>rstR</i> type
	83	115	203	28	39	68		
1993-1995	A	T	T	Asp	Tyr	Ile	Genotype 3	EI Tor
1996-1998	A	T	T	Asp	Tyr His	Ile	Genotype 3	EI Tor
	C	C	C	Ala		Thr	Genotype 4	Calcutta
1996-1997	C	C	C	Ala	His	Thr	Genotype 4	EI Tor
1998	C	C	C	Ala	His	Thr	Genotype 4	Calcutta
1998-2001	A	T	C	Asp	Tyr	Thr	Genotype 5	EI Tor
2000-2005	C	C	C	Ala	His Tyr	Thr	Genotype 4	Calcutta
	A	T	C	Asp		Thr	Genotype 5	EI Tor

Color coded year indicates that single strain contains two allelic type of *ctxB*

Figure 6

Different combinations of *rstR* alleles and *ctxB* genotypes prevailing among O139 strains isolated from Kolkata

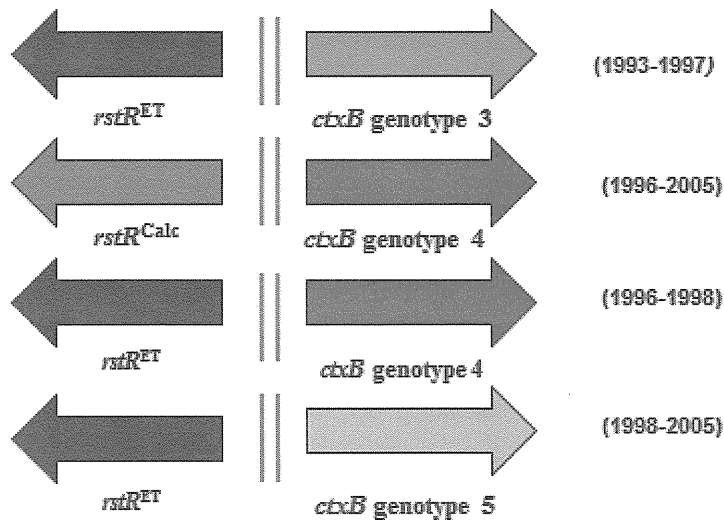


Figure 7

Changing profile of CTX prophage among O139 strains over a decade in Kolkata

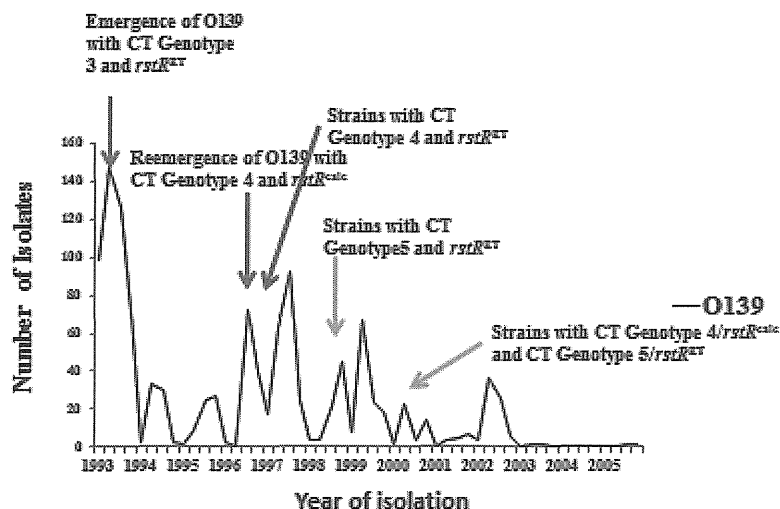


Figure 8

Schematic diagram showing copy number of CTX prophage and allelic combinations of *rstR* and *ctxB* in reemerged O139 of 1996 (A) and recent O139 (B) of Kolkata

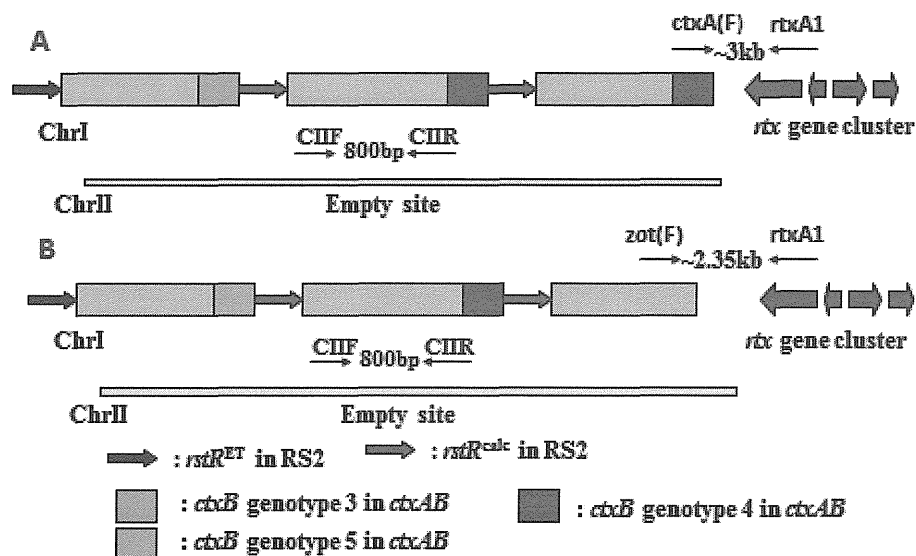


Figure 9