

日本人の三日熱マラリア・卵形マラリア症例に対する プリマキンの使用経験

¹⁾ 国立国際医療研究センター病院国際感染症センター, ²⁾ 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部
(*現 東京医科大学病院感染制御部)

小林泰一郎¹⁾ 加藤 康幸¹⁾ 山内 悠子¹⁾
氏家 無限¹⁾ 竹下 望¹⁾ 水野 泰孝^{1)*}
金川 修造¹⁾ 狩野 繁之²⁾ 大曲 貴夫¹⁾

(平成 24 年 9 月 27 日受付)

(平成 24 年 11 月 2 日受理)

Key words : primaquine, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*

要 旨

リン酸プリマキンは、三日熱マラリアと卵形マラリアの再発を予防するための根治療法薬であるが、近年、世界各地でプリマキンを標準量（15mg 塩基/日，14 日間）投与後に再発した三日熱マラリアが報告されている。投与量を増やすことで再発率は減少するが、諸外国のガイドラインとは異なり、我が国では、東南アジアとパプアニューギニアで感染した三日熱マラリアにのみ、高用量（30mg 塩基/日，14 日間）のプリマキンの投与が推奨されている。

2007 年から 2011 年に、国立国際医療研究センター病院において、プリマキンによる根治療法を行った日本人 18 例（三日熱マラリア 13 例，卵形マラリア 5 例）を、診療録を用いて後方視的に検討した。ブラジルで感染した三日熱マラリア 1 例で、標準量のプリマキン投与後に再発していたが、卵形マラリアでは再発は見られなかった。また、高用量を使用した 10 例を含む全例で副作用を認めなかった。

三日熱マラリアの根治療法としてプリマキンを標準量投与した後の再発は、東南アジアとパプアニューギニア以外の地域でも報告されている。高用量で増加するとされる消化器系の副作用が、食後内服により忍容可能で、日本人の G6PD 異常症が非常に稀であることも併せて考えると、高用量を用いることで生じ得る副作用よりも、再発率減少の有益性の方が優ると考えられる。日本人の三日熱マラリアにおいても、渡航先に関わらず高用量のプリマキンが適切と考えられる。

(感染症誌 87 : 22~26, 2013)

序 文

2010 年における世界のマラリア患者数は 2 億 1,600 万人で、死亡者数は 65 万 5 千人に上る¹⁾。死亡例のほとんどは熱帯熱マラリアによるが、三日熱マラリアは全マラリア症例の半数以上を占める²⁾。三日熱マラリアと卵形マラリアでは、急性期治療の 16 日から 4 年の後に肝細胞内の休眠体から再発し、度重なる発熱発作による経済的損失や小児における発育障害も無視できない^{3)~5)}。

また、三日熱マラリアは一般に致死率は低いとされ

ているが、近年、重症三日熱マラリア症例がしばしば報告され、その重要性が認識されてきている⁶⁾。

リン酸プリマキンは 8-アミノキノリン化合物で、ミトコンドリアの働きや DNA の結合を阻害することで、三日熱マラリアと卵形マラリアの休眠体を殺滅する。すなわち、クロロキンなどによる急性期治療の後に、再発予防のための根治療法として用いられる。一方、副作用としては、G6PD 異常症患者における溶血発作や腹痛、悪心、嘔吐、メトヘモグロビン血症などがある⁷⁾。

15mg 塩基/日を 14 日間投与する用法用量が標準療法とされるが、東南アジアやオセアニアの三日熱マラリアに対して標準量のプリマキンをを用いても、再発を

別刷請求先 : (〒162-8655) 東京都新宿区戸山 1-21-1
国立国際医療研究センター病院国際感染症センター
小林泰一郎

繰り返すことが多く、同地域で感染した三日熱マラリアに対して、再発率を減らすために高用量（30mg 塩基/日、14日間）のプリマキン投与が推奨されてきた⁵⁾。しかし、近年、同地域以外からも標準療法後の再発例が報告され、諸外国では、同地域以外で感染した三日熱マラリアに対しても高用量のプリマキンの使用が推奨されてきている⁶⁾⁹⁾。

日本における適切なプリマキンの使用法についての知見は少ないが、近年では木村ら¹⁰⁾や Miura, et al¹¹⁾の報告などがあり、東南アジアやオセアニアで感染した三日熱マラリアに対する、プリマキン標準療法後の再発率の高さについても言及されている。

今回、国立国際医療研究センター病院においてプリマキンを使用したマラリア症例について、副作用も含めて調査し、特にプリマキンの投与量について検討した。

対象と方法

2007年4月から2011年9月に、当院において、三日熱マラリアまたは卵形マラリアの根治療法としてプリマキンを用いた日本人患者について、診療録を用いて後方視的検討を行った。当院は、東京都新宿区にある病床数885床の主に急性期医療を担う教育病院で、トラベルクリニックを有し、特定感染症指定医療機関でもある。

対象は20歳以上の日本人成人で、三日熱マラリアまたは卵形マラリアの急性期治療終了後の根治療法としてプリマキンを使用した症例である。診断において、末梢血の薄層塗抹標本をギムザ染色し、光学顕微鏡を用いて観察した形態学的検討と、PCR法を相補的に用いた。G6PD活性はWST-8法により、定性的に評価した。

調査項目として、年齢や性別の他、体重、渡航先、感染原虫種、原虫寄生数、原虫寄生率、急性期治療薬、急性期治療終了からプリマキンの投与開始までの期間、プリマキンの用法用量、G6PD活性や副作用、再発の有無について検討した。

なお、日本国内では未承認であるリン酸プリマキン錠；Primaquine（Durbin PLC社）は、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業「国内未承認薬の使用も含めた熱帯病・寄生虫症の最適な診療体制の確立」に関する研究班（熱帯病治療薬研究班）より入手し、患者本人に対する説明と文書による同意の取得後に使用した。

成績

対象症例は18例で、男性が14例、女性が4例であった。年齢は20歳から62歳（中央値：25歳）、体重は46kgから86kg（中央値：62.25kg）に分布した。三日熱マラリアが13例で、原虫寄生率は0.005%から

0.74%（中央値：0.15%）に分布した。卵形マラリアは5例で、原虫寄生率は0.0009%から0.08%（中央値：0.01%）に分布した。渡航先は、インドとパプアニューギニア、ウガンダ、インドネシア、ブラジル、ガーナ、マレーシア、仏領ギアナであった。急性期治療薬は、クロロキンが9例、メフロキンが7例であり、治療開始時に熱帯熱マラリアとの鑑別が困難であった2例において、各々アーテメター・ルメファントリンとアトバコン・プログアニルが使用された。全例が治癒した。

急性期治療終了からプリマキン投与開始までの期間の中央値は2.7日で、急性期治療と同時に開始した症例から、薬剤の供給の問題から47日後に開始した症例まで見られたが、プリマキン投与前に再発を来した症例はなかった。当初から高用量を選択した9例は、パプアニューギニアとインド、インドネシア、マレーシアで感染した症例であった。G6PD活性を確認した16例は全員が正常で、副作用を呈した症例は確認されなかった。6カ月以上の経過観察中、17例では再発を認めなかったが、標準量を用いたブラジル帰国後の三日熱マラリアの1例（Case 15）に再発を認めた（Table 1）。同症例について詳細を以下に記す。

再発症例

症例：25歳、日本人男性。

既往歴・生活歴・アレルギー歴：特記事項なし。

渡航歴：ブラジルのアマゾン川流域のマナウス市周辺の森林地帯などに8日間、仕事で滞在した。マラリア予防薬は内服せず、トラベラーズワクチンの接種は受けなかった。

現病歴：ブラジルから帰国11日目に発熱し、頭痛を伴った。第9病日に当院を受診した。

身体所見：体温：40.1℃、意識清明、体重：63.5kg、結膜：貧血・黄染なし、胸部：正常肺胞呼吸音、腹部：肝脾腫なし。

検査所見：血液塗抹標本の鏡検/PCR：三日熱マラリア原虫（原虫寄生率：0.1%）、他 Table 2. 参照。

経過：メフロキン（総量1,250mg 塩基）で治療開始し、発熱消失時間（FCT；Fever clearance time）：22時間、原虫消失時間（PCT；Parasite clearance time）：33時間で軽快した。メフロキン投与終了6日後から、ブラジルが感染地であったことからプリマキン15mg 塩基/日（14日間）の標準量で根治療法を施行し、副作用なく完遂した。

プリマキン投与終了54日後に、再び発熱し、第5病日に当院を再診した。血液塗抹標本の鏡検とPCRにて、三日熱マラリアの再発（原虫寄生率：0.06%）と診断し、メフロキン（総量1,250mg 塩基）で再治療し、FCT：12時間、PCT：96時間で軽快した。メ

Table 1 Demographic features and clinical course of those treated with primaquine (n = 18).

Case	Age	Gender	Body weight (kg)	Contracted countries	Malaria species	Parasitemia (μ L)	(%)	Schizontocides	Time between completion of acute phase therapy and start of primaquine therapy (days)	Dose of primaquine (mg/day)	Duration of primaquine therapy (days)	G6PD activity	Adverse effect of primaquine	Relapse
1.	24	M	60	Uganda	P. ovale	690	0.02	cloroquine	4	15	14	N.D.	(-)	(-)
2.	35	M	55	Papua New Guinea	P. vivax	8,700	0.2	cloroquine	-2	30	14	N.D.	(-)	(-)
3.	35	M	59	Indonesia	P. vivax	9,080	0.2	mefloquine	7	30	14	Normal	(-)	(-)
4.	21	F	51	Malaysia	P. vivax	240	0.005	cloroquine	-2	30	14	Normal	(-)	(-)
5.	28	M	86	Brazil	P. vivax	32,000	0.74	cloroquine	1	15	14	Normal	(-)	(-)
6.	21	M	58	Uganda	P. ovale	50	0.0009	atovaquone/proguanil	0.5	15	14	Normal	(-)	(-)
7.	20	M	N.D.	India	P. vivax	3,190	0.06	cloroquine	1	15	14	Normal	(-)	(-)
8.	29	M	84	India	P. vivax	19,920	0.4	cloroquine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
9.	25	M	55	Papua New Guinea	P. vivax	4,980	0.1	artemether/lumefantrine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
10.	22	F	46	India	P. vivax	2,260	0.06	cloroquine	47	30	14	Normal	(-)	(-)
11.	22	F	61	Ghana	P. ovale	3,150	0.08	cloroquine	3.5	15	14	Normal	(-)	(-)
12.	62	M	70	French Guiana	P. vivax	15,700	0.34	cloroquine	3.5	15	14	Normal	(-)	(-)
13.	36	M	75	Uganda	P. ovale	170	0.0035	mefloquine	2.5	15	14	Normal	(-)	(-)
14.	23	F	N.D.	Ghana	P. ovale	470	0.01	mefloquine	3	15	14	Normal	(-)	(-)
15.	25	M	63.5	Brazil	P. vivax	5,260	0.1	mefloquine	6	15	14	Normal	(-)	(+)
15*	26	M	60	Brazil	P. vivax	2,920	0.06	mefloquine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
16.	30	M	67.7	Indonesia	P. vivax	4,260	0.09	mefloquine	2.5	30	14	Normal	(-)	(-)
17.	20	M	65	India	P. vivax	14,780	0.33	mefloquine	6.5	30	14	Normal	(-)	(-)
18.	36	M	80	Papua New Guinea	P. vivax	930	0.02	mefloquine	22.5	30	14	Normal	(-)	(-)

N.D.: No data; *Relapse

Table 2 Laboratory data on relapsed case admission

WBC	9920 μ L	LDH	537 IU/L
RBC	526×10^4 μ L	ALP	352 IU/L
Hb	15.9 g/dL	BUN	6.0 mg/dL
Hct	42.8 %	Cr	0.84 mg/dL
Pft	7.9×10^4 μ L	Na	137 mEq/L
T-Bil	1.7 mg/dL	K	3.6 mEq/L
AST	124 IU/L	BS	101 mg/dL
ALT	193 IU/L	CRP	3.76 mg/dL

フロキンを投与終了2日後から、プリマキン 30mg 塩基/日 (14日間) の高用量で根治療法を施行した。その後12カ月間、再発は認めていない。

考 察

ブラジルにおけるマラリアの患者数は30万6千人(2009年)とされる。99.8%の症例はアマゾン川流域で発生し、1960年代以降のアマゾン川流域への移民増加によりマラリアの患者数は増加傾向にある。マラリア症例の83.7%を三日熱マラリアが占め、16.3%を熱帯熱マラリアが占め、四日熱マラリアも時に報告される¹²⁾。

三日熱マラリア、および卵形マラリアの根治療法として、現在標準量とされているプリマキン 15mg 塩基/日を14日間投与する方法は、朝鮮戦争中の1952年

に米国医薬食品局 (FDA; Food and Drug Administration) が、朝鮮半島由来の三日熱マラリア原虫に対する有効性と、アフリカ系米国人に多い軽症から中等症のG6PD異常症患者における安全性を基に認可したものである⁷⁾。その後、東南アジアやパプアニューギニアなどのオセアニアの三日熱マラリアで、標準量のプリマキン投与後の再発症例が多く報告され、投与量を増やすことで再発率が下がることから、同地域で感染した三日熱マラリアに対しては、高用量の30mg 塩基/日を14日間投与する方法が推奨されてきた⁵⁾。その後現在までに、インドやアフガニスタン、ブラジル、コロンビア、ソマリア、エチオピアなど世界中で、標準量のプリマキンを投与した後に再発する症例が報告されている⁷⁾¹³⁾。

元来、プリマキンによる根治療法を行わない状況での三日熱マラリアの再発率は地域によって異なる、インドでは9~19%、タイでは63%、パプアニューギニアのChesson株では99%と、その地域差は大きい¹⁴⁾。そして、プリマキン標準療法を施行した後の再発率にも地域差があり、インドでは0~5.3%、タイでは18%、パプアニューギニアのChesson株は27~79%と報告されている¹³⁾¹⁴⁾。そして、本症例の感染したブラジルでは6.5~14%と報告されている¹³⁾。

再発率に影響する因子として、このような各地域で

異なる原虫株の再発性向やプリマキン感受性の他に、プリマキン投与量や原虫寄生率、患者体重などが知られている。本再発例は、体重過多や高原虫血症を認めず、原虫側の因子、すなわち、感染した三日熱マラリア原虫のプリマキン低感受性から生じたと推察している。

一般に、プリマキンを高用量投与することで三日熱マラリアの再発率は減少するため、諸外国ではより広範囲の地域における三日熱マラリアに対して、高用量のプリマキンが推奨されるようになった¹³⁾。現在、世界保健機関（WHO；World Health Organization）は、東南アジアとオセアニアの三日熱マラリアに高用量を推奨し、その他の地域の三日熱マラリアと卵形マラリアに標準量を推奨している⁵⁾。我が国の熱帯病治療薬研究班が作成した「寄生虫薬物治療の手引き 改訂（2010年）第7.0.1版」においても、高用量のプリマキンが推奨されるのは、東南アジアとパプアニューギニアで感染した三日熱マラリアのみであり、その他の地域で感染した三日熱マラリアと卵形マラリアの根治療法には、標準量が推奨されている¹⁵⁾。それに対し、英国保健庁（HPA；Health Protection Agency）は、全ての地域の三日熱マラリアに対して高用量を推奨し、卵形マラリアに対しては標準量を推奨している⁸⁾。米国疾病管理センター（CDC；Centers for Disease Control and Prevention）は、全ての地域の三日熱マラリアと卵形マラリアに対して高用量を推奨している⁹⁾。また、プリマキンはクリンダマイシンとの併用で、ニューモシスチス肺炎の治療にも使用されるが、15～30mg/日を21日間と、高用量をより長期に渡って使用することが推奨されている¹⁶⁾。

プリマキンによる嘔気や腹痛といった消化器系の副作用は用量依存性である。プリマキンによる腹痛の発症率は、15mg/日で0%、30mg/日で4%、60mg/日で33%、120mg/日で100%と報告されている¹⁷⁾。これらの消化器症状は食後内服により軽減し、30mg/日まででは忍容可能とされている。高用量でより重篤な溶血発作を発症するG6PD異常症患者は、日本人では0.1～0.5%と非常に稀であり、確認されたとしても軽症または中等症であることが知られている¹⁸⁾。今回の当院のマラリア診療における検討でも、高用量のプリマキン使用例も含め、副作用を呈した患者は見られなかった。

本検討でも示唆されたように、高用量プリマキンの副作用は、日本人においては稀であると考えられた¹⁰⁾¹¹⁾。高用量は明らかに三日熱マラリアの再発率を減少させるため、プリマキン低感受性株の分布が南米など様々な地域で報告されている状況を考慮すると、日本においても、英米の推奨に準じて、渡航先に関わ

らず高用量のプリマキンが推奨されるべきと考える。一方、プリマキン標準量使用後に再発した卵形マラリア症例の報告は稀であり¹⁹⁾、今回の検討でも再発例は見られなかった。卵形マラリアの根治療法には、一般に推奨されている標準量で十分と考えられる⁵⁾⁸⁾¹⁵⁾。

本検討における症例数は限られており、日本人における高用量のプリマキン使用例の報告も少ないことから、本邦における症例の集積による有効性と安全性の確認を今後も継続する必要がある。

謝辞：マラリアの検査・診断を担当していただいた国立国際医療研究センター研究所マラリア・熱帯医学研究部の石上盛敏、駒木加奈子、矢野和彦先生に感謝します。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「国内未承認薬の使用も含めた熱帯病・寄生虫症の最適診療体制の確立（H22-政策創薬一般-003）」の助成を受けた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) World Health Organization : The World Malaria Report. World Health Organization, Geneva, 2011.
- 2) Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R : The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 64 : 97—106.
- 3) Duarte EC, Pang LW, Ribeiro LC, Fontes CJ : Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 65 : 471—6.
- 4) Duarante Mangoni E, Severini C, Menegon M, Romi R, Ruggiero G, Majori G : Case report : An unusual late relapse of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; 68 : 159—60.
- 5) World Health Organization : Guidelines for the Treatment of Malaria—2nd edition. World Health Organization, Geneva, 2010.
- 6) Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, Lacerda MV, *et al.* : Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010 ; 16 : 1611—4.
- 7) Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ : Primaquine : report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 75 : 402—15.
- 8) Lalloo DG, Shingadia D, Pasvol G, Chiodini PL, Whitty CJ, Beeching NJ, *et al.* : UK malaria treatment guidelines. *J Infect* 2007 ; 54 : 111—21.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention : Treatment of Malaria (Guidelines For Clinicians). Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta 2011.
- 10) 木村幹男, 富沢 功, 滝沢慶彦, 大友弘士 : 三日熱マラリアにおけるプリマキン標準療法後の

- 再発例の検討. 感染症誌 1996 ; 70 : 1086—91.
- 11) Miura T, Kimura M, Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, *et al.* : Clinical characteristics of imported malaria in Japan: analysis at a referral hospital. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 73 : 599—603.
 - 12) Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Taulil PL, Daniel-Ribeiro CT : Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 2010 ; 30 : 115.
 - 13) Goller JL, Jolley D, Ringwald P, Biggs BA : Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* malaria to primaquine as anti-relapse therapy. *Am J Trop Med Hyg* 2007 ; 76 : 203—7.
 - 14) Baird JK, Hoffman SL : Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis* 2004 ; 39 : 1336—45.
 - 15) 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業「国内未承認薬の使用も含めた熱帯病・寄生虫症の最適な診療体制の確立」に関する研究班 (熱帯病治療薬研究班) : 寄生虫薬物治療の手引き—2010—. 2010. http://miyazaki-med.ac.jp/parasitology/orphan/docDL/tebiki_ver7.0.1.pdf.
 - 16) John GB, Joel EG, Paul AP : Medical management of HIV infection. 2009-2010 ed. Knowledge Source Solutions. 2009 ; p. 448—51.
 - 17) Clayman CB, Arnold J, Hockwold RS, Yount EH, Edgecomb JH, Alving AS : Toxicity of primaquine in caucasians. *JAMA* 1952 ; 149 : 1563—8.
 - 18) Nakatsuji T, Miwa S : Incidence and characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. *Hum Genet* 1979 ; 51 : 297—305.
 - 19) Bottieau E, Clerinx J, Van Den, Enden E, Van Esbroeck M, Colebunders R, *et al.* : Imported non-*Plasmodium falciparum* malaria: a five-year prospective study in a European referral center. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 75 : 133—8.

Clinical Experience of Primaquine Use for Treatment of Vivax and Ovale Malaria in Japanese Travelers

Taiichiro KOBAYASHI¹⁾, Yasuyuki KATO¹⁾, Yuko YAMAUCHI¹⁾, Mugen UJIIE¹⁾, Nozomi TAKESHITA¹⁾, Yasutaka MIZUNO^{1)*}, Shuzo KANAGAWA¹⁾, Shigeyuki KANO²⁾ & Norio OHMAGARI¹⁾

¹⁾Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine,

²⁾Department of Tropical Medicine and Malaria, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine,

*Present Affiliation : Department of Infection Control and Prevention, Tokyo Medical University Hospital

Primaquine phosphate has been used to prevent relapse as a radical cure after the acute-phase treatment of vivax and ovale malaria however. Many vivax malaria relapses have been reported following a standard dose of primaquine (15mg/day for 14 days). A higher dose of primaquine (30mg/day for 14 days) decreases the relapse rate, and the concomitant risk of gastrointestinal side effects tends to disappear when the drug is administered with food. G6PD deficiency is rare in the Japanese population. Although the relapsed phenomenon is reported globally, the higher dose of primaquine is currently recommended in Japan only for those returning from Southeast Asia or Papua New Guinea.

Cases of 18 Japanese, including 13 vivax malaria and 5 ovale malaria, prescribed primaquine at a referral center in Japan, were analyzed retrospectively from 2007-2011. Data on diagnosis, treatment, and outcome were extracted from medical records. Of the 18, 10 with vivax malaria were administered the higher dose of primaquine. We found that only one suffered relapse—a vivax malarial case returning from Brazil and treated with the standard dose of primaquine. No ovale malarial case suffered relapse. None, including the 10 prescribed the higher primaquine dose, experienced any adverse side effects.

Based on our findings, we recommend a higher dose of primaquine be used to prevent relapse when treating Japanese suffering from vivax malaria.

Ⅲ. 新興・再興感染症

4. 最近の注意すべき寄生虫症

加藤 康幸¹⁾ 狩野 繁之²⁾ 大西 健児³⁾

要 旨

最近、注目される新興・再興寄生虫症として、東南アジアの森林地帯で報告が増加しているヒト*Plasmodium knowlesi*感染症、移民により分布が拡大するシャーガス病（アメリカトリパノソーマ症）、豚レバー生食に関連したアジア条虫症、ヒラメを介したクドア食中毒、馬肉に関連した消化管ザルコシステイス症をとりあげた。いずれも、疫学、病態に不明の点が多く、今後の研究が待たれる。

〔J内会誌 101：3162～3167, 2012〕

Key words サルマラリア, アジア条虫, クドア, ザルコシステイス

はじめに

新興・再興感染症は1970年以降に新たに認識された感染症である。一般にHIV感染症、エボラ出血熱、重症急性呼吸器症候群（SARS）などウイルス性疾患が多いが、寄生虫症でも分子診断学の進歩や世界的な人的交流の増加などにより新たに認識されるようになった疾患がある。本項では、近年、注目を集めるようになった寄生虫症を紹介する。

1. ヒト*Plasmodium knowlesi*感染症

ヒトにマラリアを起こす原虫はこれまでに*Plasmodium*属の4種（熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫）が知られている。一方、サルを宿主とするマラリア原虫はおよそ30種が知られおり、一部の原虫ではヒトでも感染の成立することが実験室内感染などの事例を通じて報告されてきた。1965年にマレー半島の森林地帯に滞在した米国人でサルマラリア原虫の自然感染が初めて報告された。この原虫*P. knowlesi*は、東南アジアの森林地帯に生息するブタオザル等を宿主とし、

¹⁾ 国立国際医療研究センター国際感染症センター、²⁾ 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部、³⁾ 東京都立墨東病院感染症科

Infectious Diseases: Progress in Diagnosis and Treatment. Topics: III. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases: 4. Emerging parasitic diseases.

Yasuyuki Kato¹, Shigeyuki Kano² and Kenji Ohnishi³: ¹⁾ Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Japan, ²⁾ Department of Tropical Medicine and Malaria, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Japan and ³⁾ Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Bokutoh General Hospital, Japan.

トピックス

図 1. サルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* 末梢血塗抹標本像 (国立国際医療研究センター研究所)

森林地帯に生息するハマダラカ (*Anopheles leucosphyrus* group) により媒介される。ヒト症例の報告は以後限られていたが、マレーシア・ボルネオで 2000～2002 年に診断されたマラリア 208 例中 120 例で PCR 法により *P. knowlesi* が陽性であったことが 2004 年に報告され、注目を集めるようになった。その後、マレーシアを中心に、ミャンマー、タイ、シンガポール、フィリピン、ベトナム、インドネシアなどから報告がみられる。最近では、東南アジアの森林地帯に滞在歴のある旅行者の症例も少数ながら報告され続けており、我が国でも 1 例報告がある。

2006～2008 年にかけて、マレーシア・サラワク州の病院に入院した成人マラリア 152 症例の検討では、全体の 70% にあたる 107 例が *P. knowlesi* によるものであった。発熱、頭痛、悪寒戦慄、倦怠感などの症状や血小板減少はあるが貧血を認めないといった血液検査所見は、ほかのヒトマラリア原虫による急性マラリアのそれと一致した。10 例が世界保健機関による重症マラリアの基準を満たしたが、合併症は呼吸不全が最も多く、熱帯熱マラリアに多い脳マラリアの所見は認められなかった。重症度と末梢血塗抹標本から算出する原虫寄生率が相関するのは熱帯熱

マラリアと同様で、死亡した 2 例の寄生原虫数は 20 万/μl を越えていた。

本症の潜伏期は 2 週間程度と考えられている。本原虫の赤血球内増殖周期は 24 時間であることが特徴であり、発熱は連日認められる。三日熱・卵形マラリア原虫のような肝細胞内での休眠体は存在しない。末梢血塗抹標本における本原虫の早期栄養体は熱帯熱マラリア原虫の輪状体に似ており、後期栄養体は四日熱マラリア原虫のそれに似る (図 1)。このため、鏡検法では原虫種の鑑別が難しいため、遺伝子診断が必要となる。国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部などでは、PCR 法による診断が可能である。

本症の治療や予防に有効な抗マラリア薬は不明な点もあるが、他の原虫種によるマラリアと同様に考えてよい。我が国で承認されているメフロキン、キニーネは有効である。重症例では熱帯熱マラリアのそれに準じた治療が必要になる。我が国では、厚生労働科学研究費補助金「熱帯病治療薬研究班」薬剤使用機関に紹介することができる。渡航者が東南アジアでマラリアに罹患することは一般に少なくなっているのが現状だが、森林地帯に滞在した後に発熱をきたした患者では本症を疑い、速やかな診断と治療が望まれる。

2. 移民によって分布が拡大するシャーガス病

シャーガス病 (アメリカトリパノソーマ症) は中南米に常在する原虫クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) の慢性感染症である。中南米の貧困地域を中心に世界で 1,000 万人の患者がいる「顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases)」の一つである。吸血昆虫であるサシガメの糞便中に含まれる本原虫が刺し口や粘膜から擦り込まれ感染する。急性期は発熱、リンパ

トピックス

節腫脹などがみられることもあるが、原虫は完全に排除されず、筋肉・消化管神経節に潜伏感染する。この間に症状はないが、微量の原虫血症をきたすため、輸血を介した感染や母子感染が生じうる。その後、数年から十数年を経て、約30%の感染者に心臓障害(伝導障害、拡張型心筋症)がみられるようになる。心電図上、右脚ブロックと左脚前枝ブロックを同時に認めるのが特徴的とされる。巨大食道、巨大結腸などの消化管障害は、約15%の感染者にみられ、アマゾン川流域南部での罹患例に多い。

中南米の常在地では、媒介虫対策の改善などにより、罹患率は近年大幅に減少したが、2000年以降、欧米などの非常在地でこれらの常在地からの移民にシャーガス病が診断される機会が増えてきた。2006年の時点で、常在地から移住した本原虫の感染者は米国に30万人、スペインに6万人、我が国に数千人いると推定されている。これにあわせて、非常在地でも母子感染や輸血・臓器移植による感染事例も報告されるようになった。

中南米からの移住者、あるいは旅行者で、心臓障害、巨大食道・結腸の疑われる患者がいれば、本症を疑う。血清診断は、日赤中央血液研究所感染症解析部(担当:三浦左千夫、佐山勇輔)などに依頼することができる。慢性期における抗トリパノソーマ薬の効果は明らかでないが、50歳以下の症例で心臓障害が高度でない場合には使用が推奨されている。我が国では、厚生労働科学研究費補助金「熱帯病治療薬研究班」により、ニフルチモックスが保管されている。

3. 新たな食品媒介寄生虫症

1) 豚レバー生食に関連したアジア条虫症

台湾、韓国、中国、インドネシア、ベトナムでは、ウシを中間宿主とする無鉤条虫(*Taenia saginata*)によく似た条虫(サナダムシ)が、豚

を食す人から排泄されることが知られていた。この条虫は、近年の分子生物学的研究により、無鉤条虫と近縁だが、別種と考えられるアジア条虫(*T. asiatica*)と分類されるようになった。ブタを中間宿主とする有鉤条虫(*T. solium*)とは遺伝学的に大きく異なり、アジア条虫はヒトがその虫卵を摂取しても囊虫症はきたさない。

2010年以降、我が国にこれまで常在しないと考えられていたアジア条虫症が関東地方を中心に確認されるようになった。2011年2月までに15例が報告されているが、患者の多くは渡航歴がなく、豚レバーの生食歴があることから、国産豚の汚染が示唆されている。ブタを中間宿主とする点で同じだが、有鉤条虫の幼虫(囊虫)が筋肉内に寄生するのに対し、アジア条虫のそれは主に肝臓内に寄生する。

患者は肛門からの体節排泄を主訴に来院し、腹痛や下痢などの消化器症状は特に見られないことが多い。体節や虫卵の形態から無鉤条虫や有鉤条虫と鑑別することは難しいため、遺伝子検査による同定が必要である。国立感染症研究所寄生動物部第二室が窓口となる。駆虫にはブラジカンテル(10~20 mg/kg)を単回使用する(図2)。

2) ヒラメを介したクドア食中毒

食後数時間程度で発症し、一過性の下痢や嘔吐を呈するが、比較的軽症で終わり、既知の食中毒病因物質が検出できない事例が、2000年頃から中四国を中心に全国で報告されてきた。当初から原因食品の一つにヒラメが疑われていたが、2011年6月、厚生労働省は、原因をヒラメに寄生する*Kudoa septempunctata*とする調査結果を公表した。*K. septempunctata*はミクソゾア門に属する粘液胞子虫である(図3)。ヒラメの筋肉に寄生し、顕微鏡で容易に観察できるが、肉眼的には異常を認めない。ゴカイなどの環形動物とヒラメの間で生活環が形成されている。

ヒラメに寄生するクドアはこれまで人体に害

トピックス

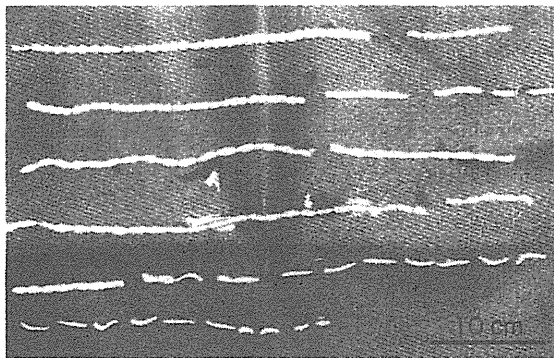


図2. ブラジカンテルの内服後に排泄されたアジアカ条虫 (東京都立墨東病院感染症科)

はないと考えられてきたが、*K. septempunctata* は乳のみマウスに下痢を引き起こし、unksに嘔吐を起こす。病態には不明の部分が多いが、*K. septempunctata*が腸管細胞に感染することが発症に関係することと示唆されている。

比較的明瞭な季節性があり、8~10月に多発する。ヒラメの消費が冬期に多いことと乖離が見られる。天然よりも養殖ヒラメに本寄生虫の感染が多く見られ、国産、輸入品の双方に認められる。2010年10月に発生した事例では、ヒラメを喫食した約500人のうち、約100人が発症し、平均潜伏期は約5時間であった。症状は下痢が最も多く(79.7%)、次いで嘔吐(57.6%)、発熱(19.6%)であった。下痢の回数は3回が最も多かったが、22回の症例もあった。予後は良好で、多くの場合、24時間以内に消失した。食中毒の診断は通常病歴により行われるが、喫食されたヒラメ残品や患者の便、吐物のPCR検査、顕微鏡検査が地方衛生研究所で行われる。

*K. septempunctata*の病原性は、冷凍、および加熱処理で失われる。養殖環境でのヒラメ間の水平感染はおこりえないことから、感染稚魚の排除や出荷時における感染ヒラメのスクリーニングが行われている。

3) 馬肉に関連した消化管サルコシステイス症
馬肉を喫食後数時間で発症する一過性の嘔吐・

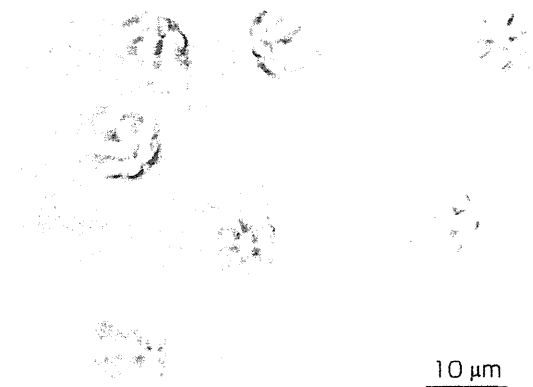


図3. *Kudoa septempunctata* (国立医薬品食品衛生研究所)

下痢症について、厚生労働省は2011年6月、*Sarcocystis fayeri*が関与している可能性が高いと公表した。サルコシステイス(住肉胞子虫)はコクシジウム目に属するトキソプラズマに近縁の原虫である。草食動物が中間宿主となり、筋肉内に多数のプラディゾイトを含んだ肉胞囊(サルコシスト)を形成する(図4)。サルコシストを摂食した終宿主(イヌ、ネコなど肉食動物)の消化管内で有性生殖が行われ、オーシストが排泄される。ヒトは中間宿主にも終宿主にもなりうるが、ヒトを終宿主とするサルコシステイスとして、ウシを中間宿主とする*S. hominis*、ブタを中間宿主とする*S. suis*が知られている。今回、食中毒の原因とされた*S. fayeri*はウマを中間宿主とする。国内で生まれて肥育されたウマより外国産馬の方に感染率が高い。

ヒトのサルコシステイス症は、筋肉サルコシステイス症と消化管サルコシステイス症に分類される。前者は、オーシストで汚染された水や食物を経口摂取することで感染し、発熱、好酸球増多、筋炎を伴うことが多い。後者はサルコシストを含有した生肉を摂食することで感染し、嘔吐、腹痛、下痢をきたし、馬刺しに関連したサルコシステイス症もこちらに分類される。ク

トピックス

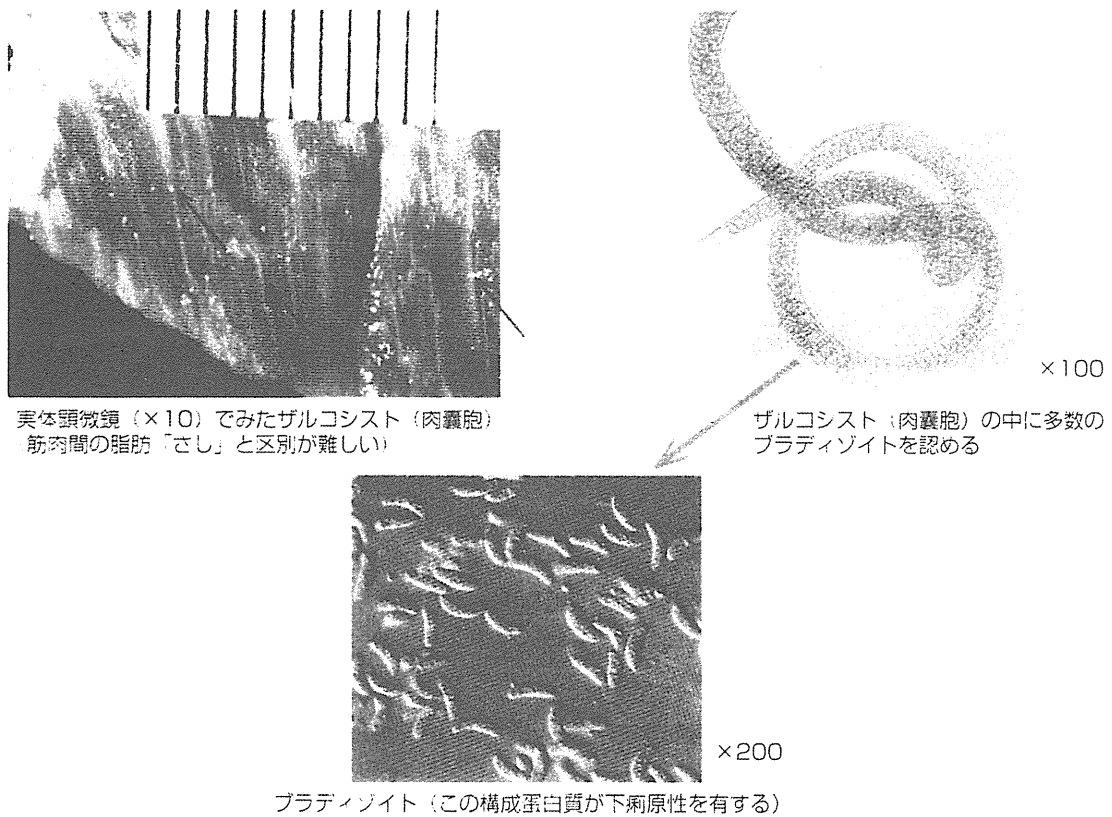


図4. *Sarcocystis fayeri* (国立医薬品食品衛生研究所)

ドア食中毒に比べて、嘔吐より下痢が目立つとされるが、潜伏期は約6時間と同様である。なお、*S. fayeri*の病原性は、分子量15 kDaの細胞骨格系タンパク質にあるとされ、原虫の組織侵入というより毒素型の食中毒と考えられ、研究が進められている。

病因微生物診断は、クドア食中毒と同様にPCR法と顕微鏡法により行われる。馬肉は冷凍、または加熱処理すると感染性は失われる。

おわりに

最近注目される寄生虫症として、ヒト*P. knowlesi*感染症、シャーガス病、アジア糸虫症、クドア食中毒、馬肉に関連したザルコシスティス症を取り上げて概説した。いずれも人獣共通感染症

としての側面を備えており、これらの感染症を制御するには、動物の疾病や環境・生態系を考慮した広い視野で対策を立てる必要がある。いずれも、疫学、病態などに未解明の部分が多く、今後の症例集積に基づいたさらなる研究が望まれる。

謝辞 原稿の査読、貴重な写真を提供していただいた山崎浩博士(国立感染症研究所)、小西良子博士(国立医薬品食品衛生研究所)に深謝いたします。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

参考文献

- 1) Singh B, et al: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024, 2004.

- 2) Kantele A, Jokiranta TS: Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis 52: 1356-1362, 2011.
- 3) 前田貴子, 他: 著名な血小板減少をきたした三日熱マラリアとサルマラリア重複感染の1例(第82回日本感染症学会学術講演会後抄録). 感染症学雑誌 82: 758, 2009.
- 4) Daneshvar C, et al: Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. Clin Infect Dis 49: 852-860, 2009.
- 5) Rassi A Jr, et al: Chagas disease. Lancet 375: 1388-1402, 2010.
- 6) Ito A, et al: Human taeniasis and cysticercosis in Asia. Lancet 362: 1918-1920, 2003.
- 7) 山崎 浩, 他: 2010年6月以降に続けて関東地方で発生が確認された新興寄生虫感染症としてのアジア条虫症. 病原微生物検出情報 (IASR) 32: 106-107, 2011.
- 8) 小西良子: 病因物質不明有症事例—提言までの道のり—. 食品衛生研究 61: 7-12, 2011.
- 9) 大西貴弘: *Kudoa septempunctata*を原因微生物とする食中毒. 食品衛生研究 61: 13-20, 2011.
- 10) 鎌田洋一: *Sarcocystis fayeri*を含んだ馬肉による食中毒. 食品衛生研究 61: 21-27, 2011.



Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*

Ayako Yoshida^a, Eiji Nagayasu^a, Anna Nishimaki^a, Akira Sawaguchi^b,
Sayaka Yanagawa^a, Haruhiko Maruyama^{a,*}

^a Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

^b Department of Anatomy, Division of Ultrastructural Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2010

Received in revised form 4 October 2010

Accepted 27 October 2010

Available online 5 November 2010

Keywords:

Strongyloides

Nematode

Infective larva

EST

ABSTRACT

Free-living infective larvae of *Strongyloides* nematodes fulfill a number of requirements for the successful infection. They need to endure a long wait in harsh environmental conditions, like temperature, salinity, and pH, which might change drastically from time to time. Infective larvae also have to deal with pathogens and potentially hazardous free-living microbes in the environment. In addition, infective larvae must recognize the adequate host properly, and start skin penetration as quickly as possible. All these tasks are essentially important for the survival of *Strongyloides* nematodes, however, our knowledge is extremely limited in any one of these aspects. In order to understand how *Strongyloides* infective larvae meet these requirements, we examined transcripts of infective larvae by randomly sequencing cDNA clones constructed from *S. venezuelensis* infective larvae. After assembling successfully sequenced clones, we obtained 162 unique singletons and contigs, of which 84 had been significantly annotated. Annotated genes included those for respiratory enzymes, heat-shock proteins, neuromuscular proteins, proteases, and immunodominant antigens. Genes for lipase, small heat-shock protein, globin-like protein and cytochrome *c* oxidase were most abundantly transcribed, though genes of unknown functions were also abundantly transcribed. There were no hits found against NCBI or NEMABASE4 for 37 (22.3%) EST out of the total 162 EST. Although most of the transcripts were not infective larva-specific, the expression of respiration related proteins was most actively transcribed in the infective larva stage. The expression of astacin-like metalloprotease, small heat-shock protein, *S. stercoralis* L3Nie antigen homologue, and one unannotated and 2 novel genes was highly specific for the infective larva stage.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Strongyloidiasis is endemic in tropical and subtropical regions, such as Southeast Asia, Latin-America, and sub-Saharan Africa, and endemic foci are present in temperate countries as well, e.g. Mediterranean coast of Spain, southern United States, and Satsunann-Ryukyu Islands in Japan [1–3]. Hundreds of millions of people have been possibly affected globally, though no precise estimate is available.

The key for the control of strongyloidiasis is in the infective larva because the infection starts with this stage of the worm. Free-living infective larvae develop from eggs deposited by free-living females in the soil or parasitic females in the infected host. Infective larvae then wait a host to be infected for some time in the external environment. Considering the life of infective larvae, they obviously face a number of hard tasks before they finally find the host.

First, they are required to endure physical and chemical conditions among them. Temperature, salinity, and pH might change drastically during the wait and chemical compounds could contaminate their surroundings. Second, they have to get rid of or get along with pathogens and potentially hazardous free-living microbes. Among them are various kinds of viruses, bacteria, parasites, and fungi. Infective larvae should be equipped with a kind of defense mechanisms as free-living nematodes are [4,5]. Otherwise they would be heavily infected before they infect the host. In addition to the protection against a number of environmental factors, they must recognize appropriate host animals and start skin penetration as quickly as possible. Failure in host-finding and infection processes would result in the extinction of the species.

Strongyloides infective larvae definitely have solutions to all of the problems and situations described above, however, little is known about their survival and infection strategies [6]. It would be of great scientific and practical significance to understand the biological processes taking place in *Strongyloides* infective larvae. For example, because infection control cannot be done solely with a mass treatment of humans and animals due to the adverse side effects of drugs on biological diversity, new strategies to control the infection have to be explored based on the biology of the nematodes [7,8].

* Corresponding author. 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan. Tel.: +81 985 85 0990; fax: +81 985 84 3887.

E-mail address: hikomaru@med.miyazaki-u.ac.jp (H. Maruyama).

In the present study, we examined the transcripts of infective larvae by randomly sequencing cDNA clones to clarify the biological processes activated in *S. venezuelensis* infective larvae. We found that the transcripts for respiratory enzymes, heat-shock proteins, neuromuscular proteins, proteases for infection, and an autophagy-related protein were observed. In addition, infective larvae of *S. venezuelensis* abundantly expressed genes which cannot be found in nucleotide databases with significant match. Further analysis of these molecules of unknown functions would greatly facilitate our understanding of the survival strategy of *Strongyloides* nematodes.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and animals

Strongyloides venezuelensis has been maintained in male Wistar rats in the Division of Parasitology, Department of Infectious Diseases, University of Miyazaki [9]. ICR mice and Wistar rats were purchased from Kyudo (Kumamoto, Japan). All animals were kept and handled under the approval of the Animal Experiment Committee, University of Miyazaki. The third-stage infective larvae (L3i) were obtained from faecal culture by the filter paper method [10]. L3i were used right after they emerged from the feces (2–3 days after starting faecal culture). Parasitic adult female worms were collected from infected rats 8–10 days post infection (p.i.) [11].

Preparation of larvae in different developmental stages was carried out as previously described [12]. Lung-stage larvae (LL3) were collected as follows; male ICR mice were subcutaneously inoculated with 30,000 L3i, and lungs were removed 72–75 h p.i., homogenized with a Polytron PT-MR3000 (Kinematica AG, Littau, Switzerland) at 20,000 rpm for a few seconds. Lung homogenates were wrapped with Kimwipe papers and incubated in phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C for 1.5 h and emerging worms were collected. Since *S. venezuelensis* has been reported to molt twice in the intestinal mucosa, we designated lung larvae as LL3 [13]. For the preparation of tissue-migrating larvae (L3tm), L3i were injected into the peritoneal cavity of ICR mice, and recovered 20 h p.i. from the peritoneal cavity.

Collected worms were washed with sterile distilled water or PBS extensively, pelleted at the bottom of 2 ml centrifuge tubes then stored at –80 °C until used for RNA preparation (see below).

2.2. cDNA library construction

Infective larvae were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with glass beads for 1.5–2.5 min by a Mini-BeadBeater (Bio Spec Products, Bartlesville, OK, USA), followed by total RNA purification according to the manufacturer's instruction. After treatment with DNaseI (Promega, Madison, WI), poly (A)⁺ RNA was purified with GenElute mRNA Miniprep Kit (Sigma, Saint Louis, MO).

A cDNA library was constructed using a SMART cDNA library construction kit (Clontech, Mountain View, CA). Reverse transcription (RT) of purified poly (A)⁺ RNA was performed using MMLV reverse transcriptase with the SMART IV oligonucleotide primer and the CDS III/3' PCR primer provided in the kit. Double-stranded cDNA (ds-cDNA) was synthesized by long distance PCR with the 5' PCR primer and the CDS III/3' PCR primer using the Advantage 2 PCR kit (Clontech). The ds-cDNA was treated with proteinase K and then digested with *Sfi*I. After size fractionation, cDNA was ligated to *Sfi*I-digested pDNR-LIB. The ligation product was then transformed into *Escherichia coli* ElectroMAX DH10B electrocompetent cells (Invitrogen).

2.3. DNA sequencing

Clones were transferred to LB agar plates containing 50 µg/ml chloramphenicol and grown for 20 h prior to colony direct PCR. Insert DNA was amplified from 500 randomly selected clones with a M13 primer set, and PCR products were purified with Post-Reaction Purification Columns (Sigma). Single-pass sequencing was performed from the 5'-end only using M13 forward primer (5'-GTAAAAC-GACGGCCAGT-3') in ABI PRISM 3130×1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), using ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4. EST processing, contig assembly and analysis

All ESTs were edited out flanking vector and adaptor sequences. After removing rRNA sequences, high quality ESTs longer than 250 bp (408 sequences) were assembled into clusters of contiguous sequences by using Sequencher software (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA). Reads with more than 99% identity were assembled into the same contig. The consensus sequences of contigs and singletons

Table 1
Primer sequences for real-time PCR.

NCBI accession	Associated annotation	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Expected product size
HO652180	FMRFamide-related peptide	CATTACCATCCGAGGTTACTT	GCAAGGCTTGTGTAGGG	115
HO652210	Cytochrome P450	GGGAAAAGAATATGTGCAGGA	TGATAACACCAGAATCGGATGA	132
HO652258	NADH dehydrogenase subunit 6	TGTTGGTTGTTTTGCCAGTT	CCATAACCACAAAATCCACTT	99
HO652261	Poly(A)-binding protein	GGTGTCAATGCAGGACAAGTTA	TTGGATAATTCTGTGGGTTTCC	94
HO652553	Hsp90	CCAAGAGGATGCTGGTGATT	TCGAGACAATGCCGACTGTA	84
HO652574	L3Nie Ag (SvL3Nie-2)	GAACCAGAAAATAAATTGGGAGA	ACTTCATCGTACCAACCTTTACTCC	87
HO652576	Astacin-like metalloproteinase	GGTGTGTTACACCCCAAGC	AACAACAATATATTAGTGAATCGTT	145
HP429054	Globin-like protein	TCCGGAATGGCAGATTATT	AGGCGGAAGAAACACTGAAA	111
HP429055	Novel ^a (SVC L3ist-1)	TAACTTAAATACTATCTTTACAATTCC	CAATTCAGTTAATTTCCCTCCA	89
HP429056	Novel ^a (SVC L3ist-2)	TGGAGAGAAAATAACTGAATGTTGG	TTTTCAATGTTTTATGCAGGTTT	114
HP429057	<i>S. stercoralis</i> Hsp20 (SvHsp-Ss2)	TGGGATTGGCCTTTAAGTCA	GCAGTGAATGTCAATTTTGCC	147
HP429058	None ^b (PIC 00570_1)	CGTAGAGGATCCACTGGACA	CATTGATACCAGTATCCATTACAGAGG	85
HP429059	<i>A. suum</i> Hsp20 (SvHsp20-As1)	TTTCCTCCGCCATTCCTAT	TTGAAACGCCCTCATCTCTAA	108
HP429060	Lipase, class 2	TGCAAGTGTGGTAAAGATTGCACATGT	CCTCACAACTTTTGATTCAGCACAGC	88
HP429062	Cytochrome c oxidase subunit I	TGCTGGTGGTAATCCTTTGA	ATCCCAAGGGTTCAAAAAC	151
HP429068	L3Nie Ag (SvL3Nie-1)	CTTGACAGAAAAGCACAAAA	CAATGGTGAACCAAATGCAA	117
HP429073	None ^c (FC810578.1)	TGGCCATGATGTAGCAAT	ACCCCTAATGATAGAAATCGAGTTGA	131
HP429091	<i>S. stercoralis</i> Hsp20 (SvHsp-Ss1)	TTGTGATTGGCCACTTAATGTA	CCTGAATATCCTGTGGGTCAA	113
AB453330.1	18S ribosomal RNA	CCAGCTTTCCAAGTGCAATAA	CATCCAAGATGCTCATTACACA	86

^a Novel; No hits were found in major databases.

^b Hits were found in NEMABASE4 with no associated annotation.

^c No hit in NEMABASE4. Match was found in NCBI EST database.

Table 2
S. venezuelensis L3 ESTs with significant annotation by homology search against NEMABASE4.

<i>S. venezuelensis</i> (singleton/contig)		Top hit in Nembase4 (tblstx)				
NCBI accession	Length (bp)	Identifier	Organism	Clade	E-value	Associated annotation
HO652177	601	SSC02297_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	4.00E–87	Proteasome, subunit alpha/beta
HO652179	576	CRC00223_1	<i>C. remanei</i>	V	5.00E–11	RNA recognition motif, RNP-1
HO652180	585	SSC04545_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	6.00E–45	FMRFamide-related peptide
HO652192	348	SSC00140_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	3.00E–27	FMRFamide-related peptide
HO652206	292	ACC15350_1	<i>A. caninum</i>	V	7.00E–19	Ammonium transporter
HO652209	759	HBC05087_1	<i>H. bacteriophora</i>	V	3.00E–83	Cytochrome b/b6
HO652210	406	SRC01426_1	<i>S. ratti</i>	IV	4.00E–51	Cytochrome P450
HO652222	427	SSC01666_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–48	Hydroxytetrahydrobiopterindehydratase
HO652225	342	CJC00147_1	<i>C. japonica</i>	V	3.00E–15	Signal recognition particle, SRP9 subunit
HO652234	761	SRC00984_2	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–153	Ras small GTPase, Ras type
HO652237	564	SSC03440_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	3.00E–48	LUC7 related
HO652242	636	MJC01056_1	<i>M. javanica</i>	IV	2.00E–17	DNA repair protein (XPGC)/yeast Rad
HO652258	389	SSC00005_1	<i>Caenorhabditis</i> sp.	V	1.00E–09	NAD Hdehydrogenase (ubiquinone)
HO652261	713	SRC00248_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–128	Poly(A)-binding protein
HO652283	707	SRC07549_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–108	Calcium-binding EF-hand
HO652285	867	XIC01943_1	<i>X. index</i>	I	2.00E–89	beta-1,4-mannosyltransferase activity
HO652301	574	SRC00826_1	<i>S. ratti</i>	IV	7.00E–38	Histone H1/H5
HO652303	620	PTC01840_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	4.00E–88	NIF system FeS cluster assembly, NifU, N-terminal
HO652319	687	SRC01269_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–111	Neural proliferation differentiation control-1
HO652339	828	SSC00792_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–103	Klarsicht/ANC-1/syne-1 homology
HO652341	817	LSC00488_1	<i>L. sigmodontis</i>	III	4.00E–90	Neurotransmitter-gated ion-channel
HO652363	569	PTC00864_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	2.00E–99	Isocitrate lyase and phosphorylmutase
HO652371	689	AYC01701_1	<i>A. ceylanicum</i>	V	1.00E–31	HSP20-like chaperone
HO652385	324	SRC00573_1	<i>S. ratti</i>	IV	2.00E–53	Ribosome maturation protein SBDS, N-terminal
HO652387	837	HGC09675_1	<i>H. glycines</i>	IV	8.00E–90	Peptidase C2, calpain
HO652391	682	SSC00507_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	6.00E–71	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH
HO652393	304	SRC06206_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–11	Lysosome-associated membrane glycoprotein (Lamp)/CD68
HO652397	702	SSC03354_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	4.00E–80	Ankyrin
HO652402	806	SRC01740_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–105	TRAF-like
HO652403	702	SSC01995_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–36	NLI interacting factor
HO652411	638	AAC00359_1	<i>A. cantonensis</i>	V	4.00E–39	Neurotransmitter-gated ion-channel
HO652429	713	SRC03434_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–96	Alpha/beta hydrolase fold-1
HO652446	591	PTC02320_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	6.00E–45	Zinc finger, C3HC4 RING-type
HO652452	642	ACC01684_2	<i>A. caninum</i>	V	7.00E–42	Globin-like
HO652470	681	PTC01361_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	2.00E–23	Bicarbonate transporter, eukaryotic
HO652471	586	SRC00877_1	<i>S. ratti</i>	IV	2.00E–99	NADH:ubiquinone oxidoreductase, 51 kDa subunit
HO652478	385	SSC01554_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	2.00E–41	Neuroendocrine 7B2 precursor
HO652504	687	CRC01991_1	<i>C. remanei</i>	V	1.00E–47	Oxysterol-binding protein
HO652510	481	SSC05747_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–44	Barrier to autointegration factor, BAF
HO652512	799	SRC00306_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–152	14-3-3 protein
HO652514	263	SRC02616_1	<i>S. ratti</i>	IV	2.00E–50	C2 calcium-dependent membrane targeting
HO652517	526	SSC02701_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–75	Histone H2B
HO652520	545	CBC03783_1	<i>C. brenneri</i>	V	2.00E–41	Glycosyl transferase, group 1
HO652521	479	CSC01296_1	<i>Caenorhabditis</i> sp.	V	1.00E–21	RhoGAP
HO652553	286	SSC00283_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	4.00E–29	Heat-shock protein Hsp90
HO652559	336	SSC02701_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	5.00E–36	Histone H2B
HO652574	361	SRC08538_1	<i>S. ratti</i>	IV	9.00E–31	L3Nie Ag (SvL3Nie-2)
HO652576	666	SSC00003_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–86	Astacin-like metalloproteinase
HO652580	406	MHC11486_1	<i>M. hapla</i>	IV	1.00E–07	Amino acid/polyamine transporter I
HP429054	589	HBC06265_1	<i>H. bacteriophora</i>	V	3.00E–47	Globin-like protein
HP429057	461	SSC01535_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	3.00E–19	<i>S. stercoralis</i> Hsp20 (SvHsp20-Ss2)
HP429059	565	ASC17349_1	<i>A. suum</i>	III	2.00E–23	<i>A. suum</i> Hsp20 (SvHsp20-As1)
HP429060	508	SSC00303_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	2.00E–15	Lipase, class 2
HP429061	455	SSC00007_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	7.00E–68	Aminotransferase, class I and II
HP429062	1558	OOC00027_4	<i>O. ostertagi</i>	V	0	Cytochrome c oxidase, subunit I
HP429068	655	SRC08538_1	<i>S. ratti</i>	IV	7.00E–70	L3Nie Ag (SvL3Nie-1)
HP429076	762	SSC02252_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–122	EF-hand
HP429077	441	SRC00553_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–35	Calcium-binding EF-hand
HP429078	524	TLC00048_1	<i>T. leonina</i>	III	3.00E–62	Cytochrome c oxidase, subunit III
HP429079	628	SRC00445_1	<i>S. ratti</i>	IV	6.00E–97	EF-hand
HP429083	889	SSC00456_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	1.00E–70	Proteinase inhibitor I33, aspin
HP429085	863	CJC01127_2	<i>C. japonica</i>	V	5.00E–45	NADH:ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase
HP429086	480	ASC00025_17	<i>A. suum</i>	III	4.00E–76	Cytochrome c oxidase subunit II C-terminal
HP429088	417	SRC04160_1	<i>S. ratti</i>	IV	4.00E–42	Light chain 3 (LC3)
HP429091	661	SSC01535_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	4.00E–78	<i>S. stercoralis</i> Hsp20 (SvHsp20-Ss1)
HP429092	1322	SSC05809_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	2.00E–62	Methyltransferase type 11
HP429094	277	NAC00065_1	<i>N. americanus</i>	V	3.00E–16	Cytochrome b/b6, C-terminal
HP429095	589	ASC24228_1	<i>A. suum</i>	III	2.00E–19	ATPase, F0 complex, subunit A

Genus designations used in the table are as follows: *A. caninum*; *Ancylostoma caninum*, *A. cantonensis*; *Angiostrongylus cantonensis*, *A. ceylanicum*; *Ancylostoma ceylanicum*, *A. suum*; *Acaris suum*, *C. brenneri*; *Caenorhabditis brenneri*, *C. japonica*; *Caenorhabditis japonica*, *C. remanei*; *Caenorhabditis remanei*, *H. bacteriophora*; *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. glycines*; *Heterodera glycines*, *L. sigmodontis*; *Litomosoides sigmodontis*, *M. hapla*; *Meloidogyne hapla*, *M. javanica*; *Meloidogyne javanica*, *N. americanus*; *Necator americanus*, *O. ostertagi*; *Ostertagia ostertagi*, *P. trichosuri*; *Parastromyloides trichosuri*, *S. ratti*; *Strongyloides ratti*, *S. stercoralis*; *Strongyloides stercoralis*, *T. leonina*; *Toxascaris leonina*, *X. index*; *Xiphinema index*.

Table 3
S. venezuelensis L3 ESTs with significant annotation against NCBI non-redundant protein database.

<i>S. venezuelensis</i> (singleton/contig)		Top hit in the NCBI non-redundant protein database (blastx)				Top hit in Nembase4 (tblastx)			
NCBI accession	Length (bp)	NCBI accession	Best identity descriptor	Organism	E-value	Identifier	Organism	Clade	E-value
HO652462	820	NP_501872.1	hypothetical protein F01G10.6	<i>C. elegans</i>	3.00E–12	N/F ^a	–	–	–
HO652207	396	XP_002636737.1	Hypothetical protein CBG23460	<i>C. briggsae</i>	4.00E–15	PTC02337_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	2.00E–21
HO652218	448	XP_002633793.1	Hypothetical protein CBG03485	<i>C. briggsae</i>	6.00E–22	HCC05184_1	<i>H. contortus</i>	V	4.00E–33
HO652251	849	XP_002632491.1	CBR-CCG-1 protein	<i>C. briggsae</i>	2.00E–49	SRC00347_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–140
HO652337	409	XP_001892281.1	hypothetical protein	<i>B. malayi</i>	6.00E–38	PPC05674_1	<i>P. pacificus</i> ^b	V	8.00E–50
HO652351	463	XP_002631908.1	hypothetical protein CBG07885	<i>C. briggsae</i>	2.00E–37	PTC00166_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	5.00E–53
HO652377	395	XP_001902589.1	putative salt tolerance protein	<i>B. malayi</i>	5.00E–19	PTC04384_1	<i>P. trichosuri</i>	IV	4.00E–61
HO652412	835	XP_002645282.1	CBR-AJM-1 protein	<i>C. briggsae</i>	3.00E–09	SSC03769_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	8.00E–65
HO652449	581	NP_499054.1	TransThyretin-Related family domain family member (ttr-5)	<i>C. elegans</i>	9.00E–33	SRC01281_1	<i>S. ratti</i>	IV	2.00E–84
HO652459	286	NP_510509.2	hypothetical protein F09B12.3	<i>C. elegans</i>	1.00E–14	SRC04118_1	<i>S. ratti</i>	IV	2.00E–34
HO652491	650	XP_001902568.1	hypothetical protein Bm1_55555	<i>B. malayi</i>	1.00E–27	SSC01022_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	2.00E–85
HO652499	797	NP_505173.2	hypothetical protein F52E1.13	<i>C. elegans</i>	3.00E–43	CR02974_1	<i>C. remanei</i>	V	5.00E–20
HO652537	528	NP_499054.1	TransThyretin-Related family domain family member (ttr-5)	<i>C. elegans</i>	2.00E–30	SRC01281_1	<i>S. ratti</i>	IV	4.00E–78
HO652548	533	XP_002646626.1	Hypothetical protein CBG11056	<i>C. briggsae</i>	8.00E–10	SR02345_1	<i>S. ratti</i>	IV	3.00E–57
HP429066	2081	NP_492698.2	hypothetical protein ZC247.1	<i>C. elegans</i>	1.00E–71	SSC03002_1	<i>S. stercoralis</i>	IV	6.00E–72
HP429084	856	CAR63582.1	Conserved Cystein/Glycine domain protein	<i>A. cantoniensis</i>	1.00E–41	SR00347_1	<i>S. ratti</i>	IV	1.00E–129

S. venezuelensis L3i ESTs that did not hit in NEMABASE4 or ESTs which had matches to NEMABASE4 ESTs without annotation, were further analysed against NCBI non-redundant protein database. Sixteen EST were given annotation by this search.

^a N/F: no hit in NEMABASE4.

^b *Pristionchus pacificus*.

comprised the unique sequences, which were compared against NEMABASE4 (<http://www.nematodes.org/nemabase4/>), using tBLASTx. ESTs that did not hit were further compared with the National Center

for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database using BLASTx (cut-off: $E < 1e-5$), and NCBI EST database using BLASTn (cut-off: $E < 1e-10$). The sequences of the transcripts in the

Hsp20

```

SvHsp20-Ss1 1:MAANNNNPSDSTDSSTXSNEEHXERTXSYY-APSKKDDKSSAFVFTLLEXGKDQIVCD 59
SvHsp20-Ss2 1:-----N-FTMSTSS-E-----K-L-VW-----D 14
SvHsp20-As1 1:IKXLR-----H-----RCVFPSAIPMLIHTTNSI--LNDLESSLNPRHVXS 39
          *
          .

SvHsp20-Ss1 60:WPLNVKNDGLFKSKELNDKITLTLDCRXFDQDIQVSVXGERVGIHCEHPKRKNSTT-CE 118
SvHsp20-Ss2 15:WPLSHSEEDGVFTSKEIDGKIGITVDCKLFKDKVNVIVDKDKIDIHCLHEVEKSGLVCK 74
SvHsp20-As1 40:LKIIRDEGVSIITNEGISLKFVDSQ----FKXEELSINVVDGVLVIEGKHEQMDDGKGIVS 95
          . . . . . * . . . . * . . . * * . . . .
          . . . . .

SvHsp20-Ss1 119:RKISRTYKXPQCYDINTLQHKVNSSGELII-----TANRXTXT--- 156
SvHsp20-Ss2 75:REISRCYRLPATLDPKTVKHSLKN-GELII-----TVEK--KA--- 109
SvHsp20-As1 96:RHFIRKFRLENLKAEDIKSELSKEGMLAIEGKCLDHEKTKVKSIPIDVK 145
          * . . * . . * . . . . * . . * . .

```

L3Nie

```

SvL3Nie-1 1:FDISKYKGNKFSNKIFDQIWKGYNYSDKQNKVFDMKRRFLLETNKYRRAQGVPLNVVD 60

SvL3Nie-1 61:SGLAAKAQKYAEYLAQIRQLVHRRNSIEKTGENLAFGSPLISHLAVKKWYDEIELYDFN 120
SvL3Nie-2 1: NQKNLGENLAFASPRIAHIQVKGWYDEVKDYDFN 35
          * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          . . . . .

SvL3Nie-1 121:RPGFSSATGHFTQLVWVKDSRKAGFGVAVSSDGKGVYVVKYTPPGNYNNKYSENVKRLSA 180
SvL3Nie-2 36:KQGFRHGIGHFTQLVWVKSSKVGCGVA--AGSKGVFTVCKYSPAGNLMGAFKKNVSPKKA 93
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          . . . . .

SvL3Nie-1 181:TKPSSKPKRRS

```

Fig. 1. Comparison of predicted amino acid sequences between three Hsp20s and two L3Nie antigens. In *S. venezuelensis* ESTs, three different Hsp20 and two L3Nie were found. In order to clarify the difference between these ESTs, they were aligned against each other by using the GENETYX-WIN software (GENETYX CORPORATION, Tokyo, Japan). Identical residues are marked with an asterisk, and conserved residues between two Hsp20s are marked with a dot. SvHsp20-Ss1 showed 40% identity to SvHsp20-Ss2. SvHsp20-Ss1 was found to have 29% identity with SvHsp20-Ss2, but no significant similarity with SvHsp20-Ss1. Identity between SvL3Nie-1 and 2 was 56%. Accession numbers for each genes: SvHSP20-Ss1; HP429091, SvHSP20-Ss2; HP429057, SvHSP20-As1; HP429059, SvL3Nie-1; HP429068, SvL3Nie-2; HO652574.

present study have been deposited into the GenBank under accession numbers HO652177–HO652584 and HP429054–HP429095.

2.5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was performed with worms of different developmental stages; infective larvae (L3i), tissue-migrating larvae (L3tm), lung larvae (LL3), and parasitic adult worms. For RNA isolation, worms were crushed manually using a freeze-crushing apparatus (SK Mill, Tokken, Chiba, Japan), followed by isolation with TRIzol reagent. After treatment with DNase I (Ambion, Austin, TX, USA), concentration of RNA was measured using a Quant-iT assay kit (Invitrogen). cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA by reverse transcription in 100 µl reaction using PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Shiga, Japan).

For 63 selected genes, PCR primers were designed to have theoretical Tm of 57–63 °C and amplicon sizes of 200–500 bp. One microliter of the prepared cDNA preparation was used for PCR amplification. The amplification program was as follows; initial denaturation at 94 °C for 2 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing 58 °C for 45 s and elongation at 68 °C for 30 s, followed by a final extension at 68 °C for 7 min. Five microliter of the PCR products was mixed with 1 µl of EZ-VISION DNA dye/buffer (AMRESCO, Solon, OH, USA), run on 1% agarose gel, then visualized by UV transillumination and photographed.

2.6. Real-time PCR analyses

Expression of selected transcripts was analyzed in real-time PCR. The regions amplified with each primer sets were shown in Table 1. Total RNA was extracted from different stages of larvae as described above, and cDNA was generated from 400 ng of RNA using Prime-Script 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio). Real-time PCR was then performed with an ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems and a Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Table 4
The most abundant transcripts in *S. venezuelensis* L3i cDNA library.

<i>S. venezuelensis</i> (singleton/contig)		Blast top hit against NEMABASE4			
NCBI accession	Number of clones	Identifier	Organism	E-value	Associated annotation
HP429060	38	SSC00303_1	<i>S. stercoralis</i>	2.00E–15	Lipase, class 2
HP429056	33	Novel ^a (SVC L3ist-2)	–	–	–
HP429054	29	HBC06265_1	<i>H. bacteriophora</i>	3.00E–47	Globin-like protein
HP429055	27	Novel ^a (SVC L3ist-1)	–	–	–
HP429057	26	SSC01535_1	<i>S. stercoralis</i>	3.00E–19	<i>S. stercoralis</i> Hsp20 (SvHsp20-Ss2)
HP429073	14	FC810578.1 ^b	<i>S. ratti</i>	5.00E–13	None
HP429058	10	PTC00570_1	<i>P. trichosuri</i>	3.00E–29	None
HP429062	8	OOC00027_4	<i>O. ostertagi</i>	0	Cytochrome c oxidase, subunit I
HP429064	7	Novel ^a	–	–	–
HP429079	6	SRC00445_1	<i>S. ratti</i>	6.00E–97	EF-hand
HP429066	5	SSC03002_1	<i>S. stercoralis</i>	6.00E–72	None
HP429070	5	SRC01349_1	<i>S. ratti</i>	2.00E–19	None
HP429075	5	SSC00031_1	<i>S. stercoralis</i>	5.00E–70	None
HP429076	4	SSC02252_1	<i>S. stercoralis</i>	1.00E–122	EF-hand
HP429085	4	CJC01127_2	<i>C. japonica</i>	5.00E–45	NADH:ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase
HP429072	4	SRC01349_1	<i>S. ratti</i>	2.00E–22	None
HP429067	4	Novel ^a	–	–	–
HP429069	4	Novel ^a	–	–	–
HP429059	3	ASC17349_1	<i>A. suum</i>	2.00E–23	<i>A. suum</i> Hsp20 (SvHsp20-As1)
HP429068	3	SRC08538_1	<i>S. ratti</i>	7.00E–70	L3Nie Ag (SvL3Nie-1)
HP429084	3	SRC00347_1	<i>S. ratti</i>	1.00E–129	None
HP429081	3	SRC07826_1	<i>S. ratti</i>	4.00E–37	None
HP429074	3	SSC04537_1	<i>S. stercoralis</i>	2.00E–07	None
HP429087	3	Novel ^a	–	–	–
HP429065	3	Novel ^a	–	–	–

^a Novel; No hits were found in major public databases.

^b All hits shown here were found against Nembase4 except for FC810578.1, which was found a match in NCBI EST database only.

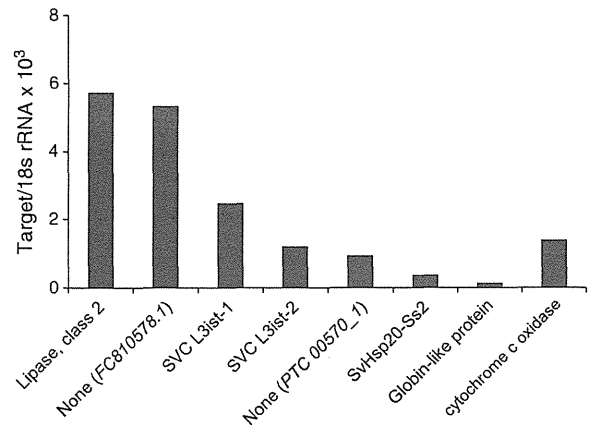


Fig. 2. Expression analysis of abundant transcripts in infective larvae. Quantification of transcripts was achieved by real-time PCR using gene-specific primer sets for the top 8 sequences (Table 4). The gene for a class 2 lipase was the most abundantly transcribed in L3i, which was followed by novel genes of unknown functions. The target values were normalized to 18S rRNA expression. Accession numbers for each gene: lipase; HP429060, FC810578.1; HP429073, SVC L3ist-1; HP429055, SVC L3ist-2; HP429056, PTC 00570_1; HP429058, SvHsp20-Ss2; HP429057, Globin-like protein; HP429054, cytochrome c oxidase; HP429062.

Relative quantification was assessed by normalizing the amount of the target transcript to 18S ribosomal RNA gene.

3. Results

A cDNA library was constructed from infective larvae of *S. venezuelensis*. A total of 500 clones were sequenced producing 408 high quality ESTs (250 bp cut-off) with an average of 490 ± 164 bp. Assembling the 408 ESTs resulted in 42 contigs (288 ESTs) and 120

singletons. tBLASTx analysis against NEMABASE4, a comprehensive resource for nematode transcriptome analysis holding 679,480 nematode EST, resulted in 114 (70.4%) *S. venezuelensis* L3i ESTs showing significant ($E < 1e-5$) matches to nematode EST, in which associated annotation was given to 68 sequences (Table 2).

S. venezuelensis L3i ESTs that did not hit in NEMABASE4 and the ones which had matches to NEMABASE4 ESTs without annotation, were further analyzed by BLASTx against the NCBI non-redundant protein databases. This search yielded 16 more genes with description (Table 3). Thus in total, 84 ESTs resulted in significant annotation against the major public databases. It should be noted that most of the hits in NEMABASE4 were genes of clade IV nematode, and a majority of the clade IV hits were with genes from *Strongyloides* (Tables 2 and 3).

Some *S. venezuelensis* L3i ESTs shown in Table 2 hit the same sequences in databases. For example, HP429091 and HP429057 hit *S. stercoralis* Hsp20 (SSC01535_1), and HP429068 and HO652574 hit *S. ratti* L3Nie Ag (SRC08538_1). Sequence alignment of these ESTs revealed that they differed significantly from each other (Fig. 1). Therefore, they were considered as different gene products and designated as shown in Fig. 1.

Of 162 *S. venezuelensis* L3i ESTs, 47 gave no hits in NCBI databases or NEMABASE4 in BLASTx and tBLASTx, respectively. We compared these sequences with NCBI EST division in BLASTn to find 7 more hits ($E < 1e-10$). Thus of 162 unique sequences, 37 (22.3%) had no hits against NCBI or NEMABASE4, indicating that these were novel genes.

Matched transcripts with significant annotation (84 sequences) could be grouped into some categories: genes for proteins involved in

oxidative phosphorylation, structural proteins, heat-shock proteins, neuromuscular proteins, and immunodominant proteins. Interesting transcripts were also found such as calpain (HO652387, Table 2), astacin-like metalloproteinase (HO652576, Table 2), salt tolerance protein (HO652377, Table 3), DNA repair protein (HO652242, Table 2), and autophagy-related LC3 (HP429088, Table 2).

The most abundant transcripts in *S. venezuelensis* infective larva, estimated from the frequency of clones, contained class 2 lipase, globin-like protein, and small heat-shock protein 20, SvHsp20-Ss2, similar to *S. stercoralis* Hsp20. However, a number of abundant transcripts had no hits even against NCBI EST using BLASTn (Table 4), suggesting that infective larvae probably express a number of species-specific genes. In order to examine the relative amount of expression of these seemingly abundant transcripts in L3i, we performed real-time PCR for the top 8 sequences containing 4 unannotated ESTs. We found that the gene for a class 2 lipase was the most abundantly transcribed in L3i, which was followed by novel genes and genes of unknown functions (Fig. 2). Two genes, *S. venezuelensis* L3i-specific transcript 1 and 2 (SVC L3ist-1 and SVC L3ist-2), had no hits in nucleotide databases by BLASTn analysis, indicating that these were novel genes.

Because infective larvae have to survive stressful environment, we examined in real-time PCR the gene expression of heat-shock proteins and energy-related proteins in different developmental stages. Expression profile of the heat-shock proteins differed from each other. As shown in Table 2, we obtained one Hsp90 and three Hsp20

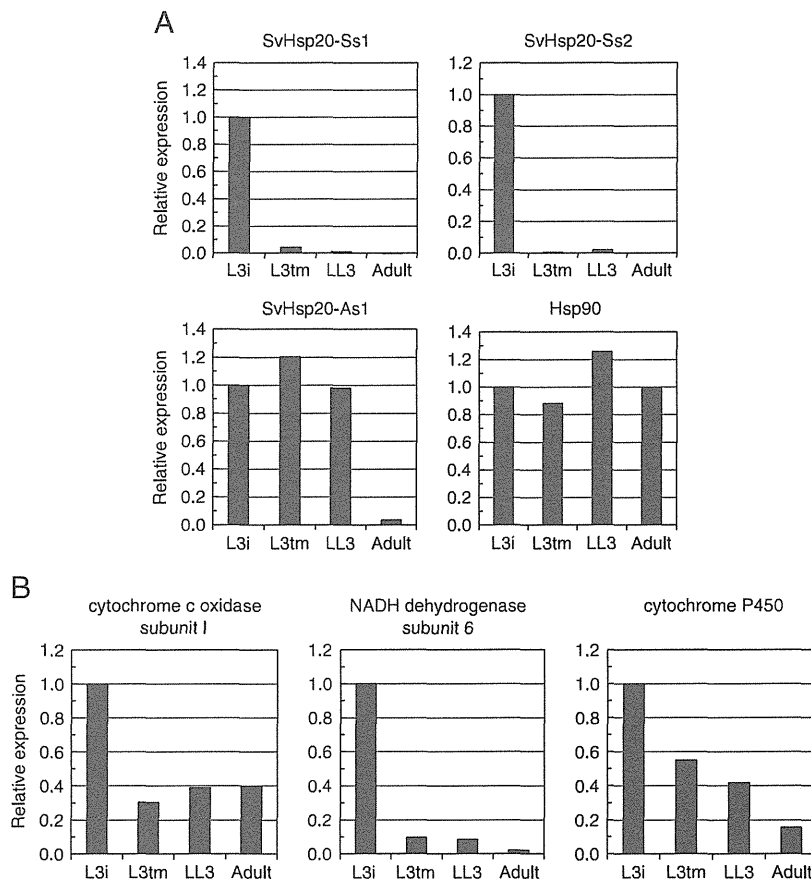


Fig. 3. Comparison of mRNA expression in developmental stages. Real-time PCR was performed with infective larvae (L3i), tissue-migrating larvae (L3tm), lung larvae (LL3) and adult female worms. (A) Expression profile of the heat-shock proteins. Hsp90 was evenly expressed through all developmental stages, while the expression of SvHsp20-As1 was decreased in adult worm. SvHsp20-Ss1 was expressed only in the infective larva stage differed from each other. (B) Gene expression of energy-related proteins. Genes, including cytochrome c oxidase subunit I, NADH dehydrogenase subunit 6, and cytochrome P450, were most actively transcribed in the infective larva stage. Relative expression of the target genes was assessed by normalizing to 18S rRNA expression. Gene expression in L3i was defined as 1.0. Accession numbers for each genes: SvHsp20-Ss1; HP429091, SvHsp20-Ss2; HP429057, SvHsp20-As1; HP429059, Hsp90; HO652553, cytochrome c oxidase; HP429062, NADH dehydrogenase; HO652258, cytochrome P450; HO652210.

sequences. Since these three Hsp20 (HP429091, HP429057, and HP429059) differed significantly from each other (Fig. 1), they were referred to as SvHsp20-Ss1, SvHsp20-Ss2, and SvHsp20-As1, respectively. While Hsp90 was expressed evenly from infective larvae to parasitic adult females, the expression of SvHsp20-As1 decreased when the worms reached maturity. In contrast, SvHsp20-Ss1 and SvHsp20-Ss2 were expressed only in the infective larva stage (Fig. 3A).

Genes for spiration-related proteins, including cytochrome c oxidase subunit I (HP429062), NADH dehydrogenase (HO652258), and cytochrome P450 (HO652210), were most actively transcribed in the infective larva stage (Fig. 3B), suggesting that infective larvae are active in producing ATP by oxidative phosphorylation. In fact, infective larvae had batteries of well-developed mitochondria immediately under the muscular layer demonstrated by transmission electron microscopy (data not shown).

In order to identify L3i-specific transcripts, which could be the clues to the elucidation of the survival strategy of infective larvae, we compared the expression pattern along the developmental stages of 62 genes by RT-PCR, containing 57 annotated and 5 non-annotated but highly abundant genes listed in Table 4. cDNA was prepared from infective larvae (L3i), tissue-migrating larvae (L3tm), lung larvae (LL3), and parasitic adult female worms, was amplified in PCR followed by the examination on agarose gel. PCR products were successfully obtained for 52 transcripts, revealing 7 transcripts being specific for infective larva stage (Table 5).

To confirm the stage specificity of these genes, we examined the expression in real-time PCR. Among 7 L3i specific transcripts listed in Table 5, the specific expression of SvHsp20-Ss1 and SvHsp20-Ss2, has been already demonstrated in Fig. 3. As shown in Fig. 4, the expression of the remaining 5 genes was highly specific as well for infective larvae. In addition to SvHsp20-Ss1 and SvHsp20-Ss2, L3i-specific transcripts were astacin-like metalloprotease, SvL3Nie-2, an unannotated gene (*PTC 00570_1*), and two novel transcripts (SVC L3ist-1 and SVC L3ist-2). Quite interestingly, SvL3Nie-1, which is similar to SvL3Nie-2, showed different expression patterns with SvL3Nie-2. SvL3Nie-1 was expressed constitutively from L3i to tissue-migrating L3tm stage (Fig. 4).

4. Discussion

Most cases of strongyloidiasis are subclinical, and chronic infections remain unrecognized for decades [14]. However, it might turn life-threatening when the patients are on immunosuppressive drugs [15] or have co-infections with HTLV-1 [16–18]. In severe strongyloidiasis, large numbers of infective larvae penetrate skin and intestinal mucosa causing disseminated infections. Understanding the biology of infective larvae would lead us to find a novel strategy for the control of severe infections.

Our present study on transcripts of *S. venezuelensis* infective larva revealed interesting features of their biology. First, in the present cDNA library, clones coding for lipase appeared repeatedly. Representation in a cDNA library generally reflects the abundance in the original transcriptome [19], and the real-time PCR results confirmed lipase as one of the most actively transcribed genes (Fig. 2). It appears that infective larvae of *S. venezuelensis* possibly degrade stored lipid for energy generation. Because infective larvae do not feed during wait [20], and express both an autophagosome marker LC3 (HP429088 in Table 2) and a proteasome protein (HO652177 in Table 2), infective larvae possibly depend on both the ubiquitin-proteasome system and autophagy processes for the energy sources. Recent study has revealed that autophagy regulates intracellular lipid metabolism [21], which is evoked when animals are under starvation [22–24].

Transcripts for several different heat-shock proteins were found in *S. venezuelensis* infective larvae cDNA. Hsp90, an evolutionarily

Table 5
Expression of transcripts along developmental stages.

<i>S. venezuelensis</i> (singleton/contig)		Best identity descriptor	
Expression	NCBI accession		
L3i only	HO652574	SvL3Nie-2	
	HO652576	Astacin-like metalloproteinase	
	HP429055	Novel ^a (SVC L3ist-1)	
	HP429056	Novel ^a (SVC L3ist-2)	
	HP429057	SvHsp20-Ss2	
	HP429058	None (PTC 00570_1) ^b	
	HP429091	SvHsp20-Ss1	
	HP429068	SvL3Nie-1	
	L3i to L3tm	HO652180	FMRamide-related peptide
		HO652403	NLI interacting factor
HO652411		Neurotransmitter-gated ion-channel	
HP429054		Globin-like protein	
HP429059		SvHsp20-As1	
HP429061		Aminotransferase, class I and II	
HP429076		EF-hand	
HP429077		Calcium-binding EF-hand	
HP429088		Light chain 3 (LC3)	
L3i to adult		HO652177	Proteasome, subunit alpha/beta
	HO652206	Ammonium transporter	
	HO652234	Ras small GTPase, Ras type	
	HO652242	DNA repair protein (XPGC)/yeast Rad	
	HO652251	<i>C. briggsae</i> CBR-CCG-1 protein ^c	
	HO652258	NADH dehydrogenase subunit 6	
	HO652261	Poly(A)-binding protein	
	HO652285	beta-1,4-mannosyltransferase activity	
	HO652301	Histone H1/H5	
	HO652303	NIF system FeS cluster assembly, NifU, N-terminal	
HO652319	Neural proliferation differentiation control-1		
HO652339	Klarsicht/ANC-1/syne-1 homology		
HO652341	Neurotransmitter-gated ion-channel		
HO652363	Isocitrate lyase and phosphorylmutase		
HO652371	HSP20-like chaperone		
HO652385	Ribosome maturation protein SBDS, N-terminal		
HO652387	Peptidase C2, calpain		
HO652397	Ankyrin		
HO652412	<i>C. briggsae</i> CBR-AJM-1 protein ^c		
HO652449	TransThyretin-Related family domain family member ^c		
HO652459	hypothetical protein F09B12.3 ^c		
HO652470	Bicarbonate transporter, eukaryotic		
HO652504	Oxysterol-binding protein		
HO652510	Barrier to autointegration factor, BAF		
HO652514	C2 calcium-dependent membrane targeting		
HO652517	Histone H2B		
HO652520	Glycosyl transferase, group 1		
HO652537	TransThyretin-Related family domain family member ^c		
HO652553	Heat-shock protein Hsp90		
HP429060	Lipase, class 2		
HP429062	Cytochrome c oxidase, subunit I		
HP429073	None ^b		
HP429083	Proteinase inhibitor I33, aspin		
HP429084	Putative conserved cysteine/glycine domain protein ^c		
HP429092	Methyltransferase type 11		

^a Novel; No hits were found in major databases.

^b Hits were found in NEMABASE4 with no associated annotation.

^c Hits were found in NEMABASE4 without associated annotation. Annotation was given in NCBI NR protein database.

conserved indispensable molecular chaperone, is involved in the folding, stabilization, activation, and assembly of a wide range of cellular proteins, playing a central role in many biological processes [25]. In *C. elegans*, Hsp90 is upregulated in dauer larvae, to which infective larvae of parasitic nematodes are often compared [26]. Our present study demonstrated that Hsp90 is abundantly and constitutively transcribed throughout the life of *S. venezuelensis* (Fig. 3A). In spite of a number of similarities between infective larvae and dauer larvae, recent comparative genomics between *C. elegans* and

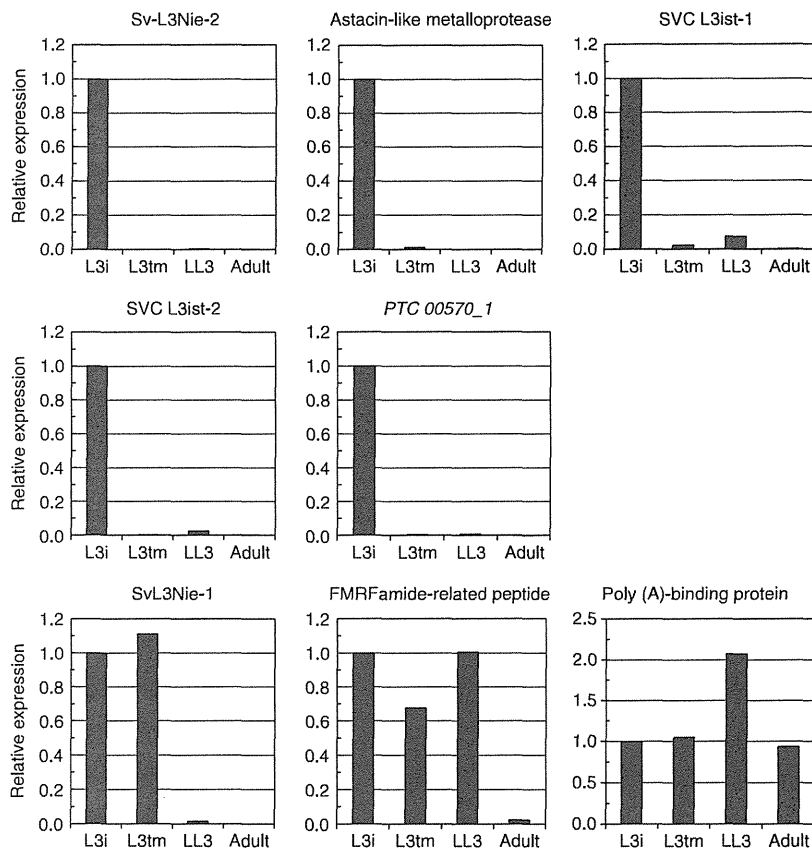


Fig. 4. Quantitative analysis of mRNA expression for infective larvae (L3i) specific transcripts. Quantitative real-time PCR validated the specific expression of six genes in infective L3 larvae. Relative expression of the target genes was assessed by normalizing to 18S rRNA expression. Gene expression in L3i was defined as 1.0. Accession number for genes analysed are as follows: Sv-L3Nie-2; HO652574, Astacin-like metalloprotease; HO652576, SVC L3ist-1 (novel gene); HP429055, SVC L3ist-2 (novel gene); HP429056, PTC 00570_1; HP429058, Sv-L3Nie-1; HP429068, FMR Famide-related peptide; HO652180, Poly (A)-binding protein; HO652261.

S. stercoralis has failed uncover evidence of an L3i/dauer expression signature conserved between the two species [27].

On the other hand, interesting expression patterns were observed in small heat-shock proteins, Hsp20. We found that infective larvae of *S. venezuelensis* had at least three Hsp20s, which were significantly different not only in the sequence but in the expression pattern along the developmental stages as well (Fig. 3A). In mammals, Hsp20 protects cells from the aggregation of denatured proteins, and is abundantly expressed in smooth muscle cells and cardiomyocytes [28,29]. In parasitic nematodes, small heat-shock proteins have been reported to have a role in muscle cells and muscle contraction [30]. Therefore these Hsp20 might be involved in different muscular functions, or they might have totally different roles in *S. venezuelensis*.

Upon infection, infective larvae must penetrate skin as quickly as possible. Infective larvae of *S. venezuelensis* have a zinc metalloprotease activity, which has been assumed to play a major role in skin penetration [12]. This metalloprotease activity at 40 kDa is presumably a *S. venezuelensis* homologue of Ss40 of *S. stercoralis*, a zinc metalloprotease deployed by infective larvae [31,32]. Recent study identified an astacin-like metalloprotease transcript in infective larvae of *S. stercoralis*, which has been referred to as 'strongylastacin' [33], to which one of the transcripts in the present study (HO652576) is highly homologous. The expression of this transcript is specific for infective larva stage, which perfectly matches to the metalloprotease activity previously reported [12].

The most significant results in this study were that the substantial portion of transcripts of *S. venezuelensis* infective larvae contained novel sequences. Especially, novel transcripts, SVC L3ist-1 and SVC L3ist-2,

were abundantly expressed and they were infective larva-specific (Table 5, Fig. 4). We could not find similar sequences in public nucleotide databases, even against NEMABESE4, the most comprehensive resource for nematode EST analysis. Because NEMABESE4 contains EST data on *S. stercoralis* as well as *S. ratti*, these two transcripts should be not only stage-specific but species-specific molecules. Transcriptome analysis of *Ancylostoma caninum* has revealed that more than 80% of infective larva-specific transcripts (66 out of 78) are species-specific [34]. Comparative genomics among hookworms and *Strongyloides* nematodes, that produce tissue penetrating infective larvae, should be one of the most exciting issues in the field of parasitology.

Apart from the biology of *S. venezuelensis* infective larvae, we could identify transcripts for candidate antigens for immunodiagnosis. We found two different transcripts homologous to *S. stercoralis* L3Nie antigen (SvL3Nie-1 and SvL3Nie-2) and proteinase inhibitor I33, which is similar to *Onchocerca volvulus* immunodominant antigen Ov33 (HP429083). L3Nie antigen is a member of the *Ancylostoma* Secretory Protein family, which was cloned with a patient serum [35], and has been shown to be useful in the diagnosis of strongyloidiasis [36]. Ov33, on the other hand, is recognized by more than 90% of onchocerciasis patient sera and has been used for immunodiagnosis as a single protein or fusion protein [37,38]. Gold standard for the diagnosis method for strongyloidiasis is the stool examination, however, the sensitivity of detecting larvae is not enough especially for chronic infections in immunocompetent hosts [39,40]. Because Ov33 homologue and L3Nie antigen appear to be abundantly transcribed in larvae, the combined use of the two antigens in immunodiagnosis might improve the sensitivity and specificity

significantly. Therefore further analysis is required of these antigens with strongyloidiasis patient sera.

5. Conclusions

A total of 408 EST were obtained from a cDNA library of *S. venezuelensis* infective larvae. Most abundant transcripts are those for lipase, respiration enzymes, and heat-shock proteins, however they contained 37 novel sequences which cannot be found in public nucleotide databases. Of seven transcripts which are infective larvae stage-specific, three have been unannotated and two were novel. Further research on these novel genes will clarify the biology of the infective larva.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (Grant-in-Aid for Scientific Research C 21590466, Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas 'Matrix of Infection Phenomena' 21022041), the Ministry of Health, Labour and Welfare (H20-Shinko-Ippan-016, H21-Kokui-Shitei-004), and the Japan Health Sciences Foundation (KHA2031).

References

- Román-Sánchez P, Pastor-Guzmán A, Moreno-Guillén S, Igual-Adell R, Suárez-Generoso S, Tornero-Estébanez C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain: analysis of the predictive factors of infection in developed countries. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:336–40.
- Safdar A, Malathum K, Rodriguez SJ, Husni R, Rolston KV. Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States. *Cancer* 2004;100:1531–6.
- Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, Zaha O, Kinjo N, Hokama A, et al. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:246–9.
- Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, et al. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 2004;5:488–94.
- Pujol N, Zugasti O, Wong D, Couillault C, Kurz CL, Schulenburg H, et al. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000105.
- Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Diemert D, Loukas A. New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol* 2006;22:327–31.
- Suarez VH. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet Res* 2002;33:563–73.
- De Lange HJ, Lahr J, Van der Pol JJ, Wessels Y, Faber JH. Ecological vulnerability in wildlife: an expert judgment and multicriteria analysis tool using ecological traits to assess relative impact of pollutants. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:2233–40.
- Maruyama H, Nawa Y, Ohta N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. *Exp Parasitol* 1998;89:16–20.
- Korenaga M, Nawa Y, Mimori T, Tada I. *Strongyloides ratti*: the role of enteral antigenic stimuli by adult worms in the generation of protective immunity in rats. *Exp Parasitol* 1983;55:358.
- Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunol* 2000;164:3749–54.
- Maruyama H, Nishimaki A, Takuma Y, Kurimoto M, Suzuki T, Sakatoku Y, et al. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology* 2006;132:1–8.
- Wertheim G. Growth and development of *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 in the albino rat. *Parasitology* 1970;61:381–8.
- Gill GV, Welch E, Bailey JW, Bell DR, Beeching NJ. Chronic *Strongyloides stercoralis* infection in former British Far East prisoners of war. *Q J Med* 2004;97:789–95.
- Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:208–17.
- Yamaguchi K, Takatsuki K. Adult T cell leukaemia-lymphoma. *Baillieres Clin Haematol* 1993;6:899–915.
- Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* 2007;7:266–81.
- Marcos LA, Terashima A, Dupont HL. Strongyloides hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:314–8.
- Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 1997;7:986–95.
- Ashton FT, Zhu X, Boston R, Lok JB, Schad GA. *Strongyloides stercoralis*: amphidial neuron pair ASJ triggers significant resumption of development by infective larvae under host-mimicking in vitro conditions. *Exp Parasitol* 2007;115:92–7.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131–5.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101–11.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004;432:1032–6.
- Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, et al. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:274–9.
- Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 2002;115:2809–16.
- Ogawa A, Streit A, Antebi A, Sommer RJ. A conserved endocrine mechanism controls the formation of dauer and infective larvae in nematodes. *Curr Biol* 2009;19:67–71.
- Mitreva M, McCarter JP, Martin J, Dante M, Wylie T, Chiapelli B, et al. Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 2004;14:209–20.
- Fan GC, Ren X, Qian J, Yuan Q, Nicolaou P, Wang Y, et al. Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, Hsp20, against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2005;111:1792–9.
- Salinthon S, Tyagi M, Gerthoffer WT. Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacol Ther* 2008;119:44–54.
- Raghavan N, Ghosh I, Eisinger WS, Pastrana D, Scott AL. Developmentally regulated expression of a unique small heat shock protein in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:233–46.
- McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam A, Stanton C, Neva FA. *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of the skin by the infective larvae. *Exp Parasitol* 1990;70:134–43.
- Brindley PJ, Gam AL, McKerrow JH, Neva FA. Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Exp Parasitol* 1995;80:1–7.
- Gomez Gallego S, Loukas A, Slade RW, Neva FA, Varatharajulu R, Nutman TB, et al. Identification of an astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitol Int* 2005;54:123–33.
- Wang Z, Abubucker S, Martin J, Wilson RK, Hawdon J, Mitreva M. *Ancylostoma caninum* transcriptome and exploring nematode parasitic adaptation. *BMC Genomics* 2010;11:307.
- Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:73–81.
- Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Infect Dis* 2008;198:444–51.
- Lucius R, Kern A, Seeber F, Pogonka T, Willenbacher J, Taylor HR, et al. Specific and sensitive immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov33). *Trop Med Parasitol* 1992;43:139–45.
- Nde PN, Pogonka T, Bradley JE, Titanji VP, Lucius R. Sensitive and specific serodiagnosis of onchocerciasis with recombinant hybrid proteins. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:566–71.
- Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:248–50.
- Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis* 2001;33:1040–7.