

Aus der Medizinischen Klinik-Innenstadt
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. Th. Löscher

Diagnostischer Wert der spezifischen IgG₄-Antikörperbestimmung bei der Toxocariasis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Wachinger
aus Freising
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. T. Löscher
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. A. Roggenkamp
Betreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. S. Eichenlaub
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	02.05.2002

Meinen Eltern

Meiner Frau Sumedha

Meiner Tochter Valerie Michelle

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Taxonomie und Epidemiologie	1
1.2	Ätiologie und Übertragung	2
1.3	Morphologie	5
1.4	Pathologie	7
1.5	Klinik	8
1.6	Therapie und Prophylaxe	10
	1.6.1 Beim Menschen	10
	1.6.2 Beim natürlichen Wirt	11
1.7	Diagnostik	11
2	Problemstellung	15
3	Zielsetzung	16
4	Material und Methoden	17
4.1	Serumproben	17
	4.1.1 Patienten mit klinischem und / oder serologischem Verdacht einer <i>Toxocariasis</i>	17
	4.1.2 Gesunde Personen (Blutspender)	17
	4.1.3 Patienten mit anderen Helminthosen	17
4.2	Antigen	18
4.3	IgG-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	18
	4.3.1 Reagenzien und Geräte	18
	4.3.2 Testmethodik	20
4.4	IgG ₄ -ELISA	21
	4.4.1 Reagenzien und Geräte	21
	4.4.2 Testmethodik	22
4.5	IgG-Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB)	22
5	Ergebnisse	24
5.1	Einteilung der Toxocariasis in klinische Gruppen	24
5.2	Untersuchung der Seren von Patienten mit Verdacht auf eine <i>T.canis</i> -Infektion	26
	5.2.1 Untersuchung der Patienten nach klinischen Einteilungskriterien	26
	5.2.2 EITB	28
	5.2.3 IgG ₄ -ELISA	28
5.3	Untersuchung der Seren von Blutspendern (Kontrollgruppe)	30
	5.3.1 IgG-ELISA	30
	5.3.2 IgG ₄ -ELISA	30

5.4	Untersuchung der kreuzreagierenden Seren von Patienten mit anderen Helminthosen	31
5.4.1	EITB	31
5.4.2	IgG ₄ -ELISA	32
5.5	Auswertung der mit Verdacht auf eine Toxocariasis untersuchten Proben aus dem eigenen Patientengut und anderen Zentren	34
6	Diskussion	35
7	Zusammenfassung	44
8	Abkürzungsverzeichnis	46
9	Literaturverzeichnis	47
10	Danksagung	64
11	Lebenslauf	65

1 Einführung

In Deutschland leben rund 5,1 Millionen Hunde in 14% der Haushalte (Zentralverband Zoologischer Fachgeschäfte 1998). Allein in München sind nach Daten der Landeshauptstadt etwa 35.000 Hunde gemeldet (die Dunkelziffer liegt bei 50.000 Hunden), die täglich ca. 6 Tonnen an Kot produzieren. Diese Situation ist nicht nur lästig, sondern stellt auch ein gesundheitliches Problem dar, insbesondere durch die im Kot befindlichen Eier des Hundespulwurms *Toxocara canis*.

1.1 Taxonomie und Epidemiologie

Der Hundespulwurm *Toxocara canis* ist dem Stamm Nematelminthes (Rundwürmer) und der Klasse Nematoda (Fadenwürmer), Familie Ascaridoidea, zugeordnet (Yorke und Maplestone, 1962; Areàn und Crandall, 1971; Hiepe, 1985). Als menschenpathogene Spezies dieser Familie sind, außer *Toxocara canis*, auch *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina* und *Baylisascaris procyonis* zu nennen.

Die Verbreitung dieses Helminthen ist weltweit (Abb.1) und liegt zwischen dem 53. nördlichen (Bryansk, Rußland) und dem 45. südlichen (Christchurch, Neuseeland) Breitengrad (Stürchler, 1988). Schätzungen nach sind 20 Millionen Menschen mit *T.canis* infiziert sind (Stürchler, 1988). In den USA werden jährlich etwa 10.000 Neuerkrankungen diagnostiziert (Becker, 1992).

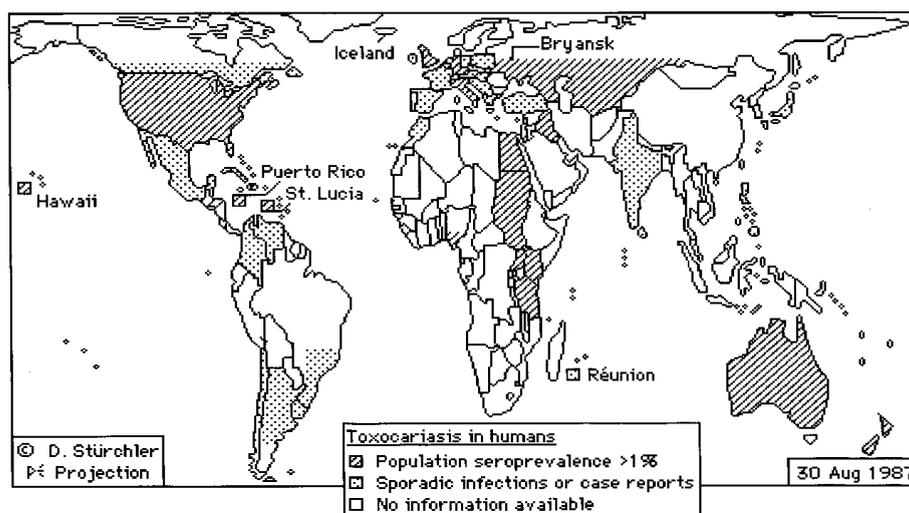


Abbildung 1: Verbreitung der Toxocariasis nach Stürchler, 1988

Insbesondere Welpen und Muttertiere von Hunden, ferner Füchse und andere Kaniden sind natürliche Wirte des Hundespulwurms, der Mensch dagegen ist ein Fehlwirt. Eine hohe Inzidenz zeigt sich bei Kindern zwischen 1 und 4 Jahren, da bei diesen oft Geophagie (Areà und Crandall, 1971) beobachtet wird. Die sozioökonomischen Verhältnisse und demzufolge das Hygieniveau, in dem das Kind lebt, können eine Rolle bei der Übertragung spielen (Areà und Crandall, 1971). Die im Kot abgesetzten widerstandsfähigen Eier verseuchen den Boden und können monatelang infektiös bleiben.

Die Prävalenz der kontaminierten Sandproben von Kinderspielplätzen in Deutschland schwankt zwischen 10 und 87% (Hörchner et al., 1981; Deumer, 1984). Ähnlich ist die Datenlage bei Untersuchungen im europäischen Ausland (Kutzer et al., 1995): In der Literatur finden sich Angaben zwischen 2,9% in Wien (Kasieczka, 1982) und 66% in London (Snow et al., 1987).

Etwa 4 bis 30% der erwachsenen Hunde sind Ausscheider von *Toxocara canis*-Eiern (Köhler et al., 1980; Becker, 1992). Unter Jungtieren ist die Zahl der Ausscheider noch größer: Bei Untersuchungen in Australien waren 9% der adulten Hunde (älter als 6 Monate) und 100% der untersuchten Welpen (jünger als 6 Monate) Ausscheider von Wurmeiern (Sprent und English, 1958); eine Untersuchung bei Hunden in Mexico City ergab 7,1% Infizierte unter Adulten und 76,5% unter jungen Hunden (Schantz und Biagi, 1968).

Die Seroprävalenz bei Blutspendern im Raum Süddeutschland betrug 4,8%, bei Kindern zwischen 1 und 7 Jahren 2,1% (Abb.2) (Kimmig et al., 1991). Vergleichbare Studien bei Kindern in anderen industrialisierten Ländern zeigten eine Seroprävalenz von 3,6% in Japan (Matsumura und Endo, 1982) und 6,4% in den USA (Herrmann et al., 1985); in Entwicklungsländern dagegen wie in der Karibik (St. Lucia) betrug die Prävalenz 86% (Thompson et al., 1986). Verschiedene sozioökonomische Faktoren (Areà und Crandall, 1971) sowie unterschiedliche Methoden der Probensammlung und Testung bedingen die große Streubreite der erhobenen epidemiologischen Daten.

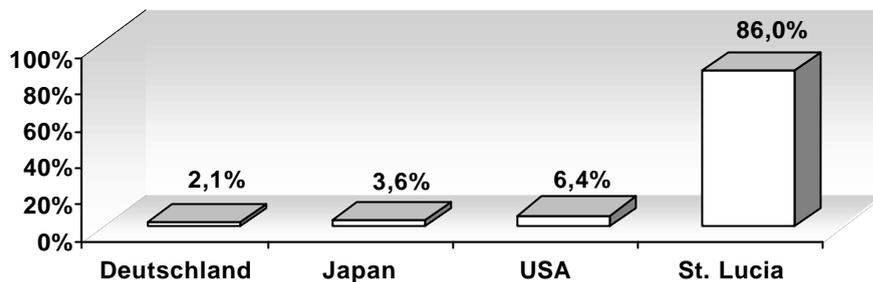


Abbildung 2: Seroprävalenz der Toxocariasis bei Kindern in verschiedenen Ländern nach Kimmig et al., 1991, Matsumura und Endo, 1982, Herrmann et al., 1985 und Thompson et al., 1986

1.2 Ätiologie und Übertragung

Erstmals gelang es Beaver und Mitarbeitern 1952, aus einem Leberbiopsat des Menschen die Larve von *T.canis* in einem Granulom nachzuweisen (Beaver et al., 1952). Er prägte den Begriff viszerale Larva migrans (VLM) für die Symptomatik, die bei einer solchen Infektion beim Menschen entstehen kann. Sprent erweiterte diesen Begriff auf andere Helminthenspezies (Sprent, 1963). Erreger des Syndroms der viszeralen Larva migrans können also auch der Familie der Ancylostomidae, Strongyloididae, Anisakidae, Gnathostomatidae, Spiruridae und Filaridae angehören (Lamina, 1968).

Der infizierte Hund scheidet mit dem Kot Eier von *T.canis* aus. Bei günstigen Feuchtigkeits- und Temperaturbedingungen reifen die Larven im Ei in 2 bis 7 Wochen heran. Doch auch unter nicht optimalen Bedingungen können die embryonierten Eier über Monate ihre Infektiosität bewahren (Gillespie, 1987; Sprent, 1958; Kazacos, 1991).

Die Infektion des Menschen erfolgt auf fäkal-oralem Weg durch kontaminierte Nahrung und Gegenstände, Umgang mit Welpen oder durch die Aufnahme von Erde, auch als Geophagie bezeichnet (Huntley et al., 1965; Areàn und Crandall, 1971; Kazacos, 1991). Nach der Aufnahme von embryonierten (Abb. 4d), also infektiösen Eiern, schlüpfen die Larven als Zweitlarven im Dünndarm aus. Unter Zweitlarve versteht man die Larve nach der 2. Häutung. Nach Penetration der Darmwand gelangen die Larven mittels Lymph- und Blutgefäßen über Leber, Herz und Lunge in den großen Kreislauf und von da in alle Organe. Da der Mensch

Fehlwirt ist, entwickeln sich die Larven nicht zum adulten Wurm, sondern nur bis zur Drittlarve weiter, bleiben aber trotzdem lange Zeit vital (Preisshofen, 1976; Kazacos, 1991). Je nach Alter, immunologischem Status, zusätzlichen individuellen Faktoren und Größe des Inokulums kommt es zur Larvenwanderung und Manifestation des VLM Syndroms (Areà und Crandall, 1971).

Im adäquaten Wirt, z.B. in einem Kaniden, erfolgt die Infektion ebenso auf oralem Weg durch die Aufnahme infektiöser Eier oder aber durch den Verzehr von Larven in Organen nicht adäquater (paratenischer) Wirtstiere, wie etwa Mäuse (Beaver, 1969; Dürr, 1969). Innerhalb von 2 Wochen nach Aufnahme wandern die Larven zum Lungengewebe. Dort dringen sie als Zweitlarve in die Alveolarräume ein und gelangen über den Respirationstrakt (Trachea und Bronchioli), durch den Schluckreflex wieder in den Gastrointestinaltrakt. Dort erfolgt die 3. und 4. Häutung, bevor die Larve sich dann im Dünndarm innerhalb von ca. 3 Wochen zu einem geschlechtsreifen Wurm entwickelt (Preisshofen, 1976). Nach der Paarung scheidet das Weibchen bis zu 200 000 Eier am Tag in das Darmlumen aus (Hagler et al., 1981). Bei diesem Weg der Wanderung spricht man von der trachealen Migration. Während der Migration allerdings kann sich eine kleinere Anzahl von Larven nach Penetration der Darmwand ihren Weg weiter durch die angrenzenden Gewebe bahnen (Done et al., 1960; Higashikawa, 1961); dies bezeichnet man als somatische Migration. In den meisten Fällen gelingt es dem Abwehrmechanismus des Wirtstieres, die Larven im Gewebe abzutöten. Einige Larven jedoch kapseln sich ab (Abb. 5b) und verharren für lange Zeit in diesem geschützten, aber infektiösen Stadium. Die Überlebensdauer wird mit Jahren angegeben (Beaver et al., 1962; Beaver, 1969).

Im trächtigen Tier kommt es zur Reaktivierung dieser Larven, die dann aus dem Gewebe des Muttertieres diaplazentar in das Gewebe des Fötus wandern (Aitken und Roy, 1953; Noda, 1961; Oshima, 1961). Je größer das Larveninokulum, desto eher erliegen die Welpen nach der Geburt der *Toxocara*-Infektion. Meistens jedoch ist die Anzahl der Larven nur so groß, daß die Jungtiere überleben können (Areà und Crandall, 1971). Nach trachealer Migration der Larven im Welpen entwickeln sie sich im Darm zu Adulten; bereits 21 Tage nachdem der Welpen zur Welt gekommen ist, können *T.canis*-Eier in seinen Fäzes nachgewiesen werden (Dürr, 1969). Nach Sprent hängt die Art der Migration, also somatisch oder tracheal, und somit die Weiterentwicklung der Larven weitgehend vom Alter des Wirtstieres ab (Sprent, 1958; Boch und Supperer, 1977); die tracheale Migration der Larven überwiegt bei Jungtieren, bei älteren Hunden allerdings wird die somatische Migration häufiger beobachtet (Sprent, 1958; Boch und Supperer, 1977).

Alternativ zu diesem pränatalen Infektionsweg sind auch Infektionswege durch Aufnahme infektiöser Eier durch das Muttertier kurz vor oder nach der Trächtigkeit möglich (Koutz

et al., 1966; Beaver, 1969): Der Nachweis einer massiven Larvenausscheidung mit der Milch (galaktogener Übertragungsweg) konnte bereits geführt werden (Stoye, 1976).

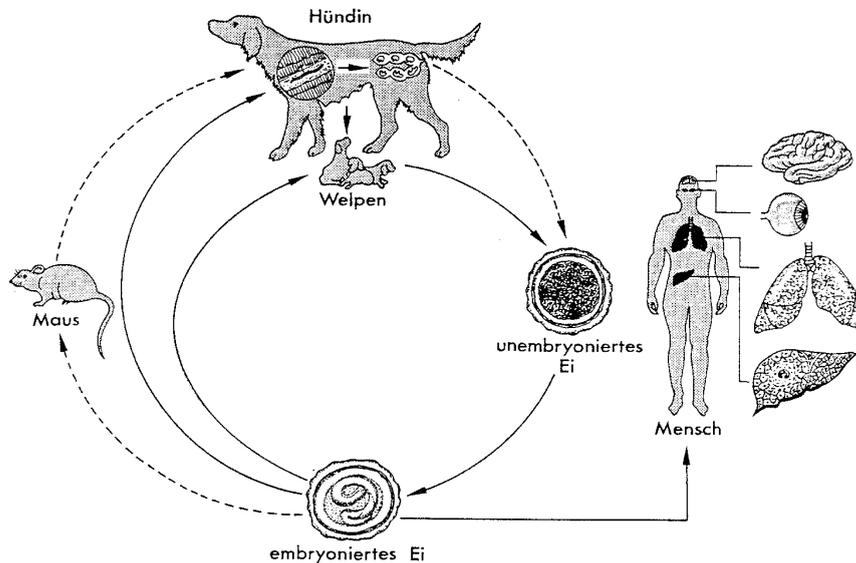


Abbildung 3: Lebenszyklus von *T. canis* nach Kimmig et al., 1991

1.3 Morphologie

Adulte:

Der männliche Wurm mißt 4 bis 10 cm und besitzt am hinteren Ende Kopulationsorgane, die Spicula (Abb.4a). Das Weibchen ist 5 bis 18 cm lang und besitzt ein stumpfes Hinterende (Yorke und Mapelstone, 1962). Am vorderen Ende besitzen beide Geschlechter zwei grobgestreifte Zervikalfügel von 2 bis 2,5 mm Länge und 0,5 mm Breite (Abb.4b) sowie gleich große Lippen an der Mundöffnung (Abb.4c). Die Kuticula ist bräunlich bis weiß und zeigt eine Querstreifung.

Eier:

Die Eier sind rund, dunkelbraun, haben einen Durchmesser von 75-80 µm und werden noch nicht embryoniert ausgeschieden. In ihrer äußeren Hülle zeigen sie dicht gelagerte, netzartige Dellen und eine gekörnte Oberfläche (Abb.4e) (Areàn und Crandall, 1971).

Infektiöse Zweitlarve:

Die Zweitlarven (Abb.4f) haben eine Länge von 260 bis 290 µm und einen Durchmesser von 12 bis 15 µm (Talluri et al., 1986). Diese mit dem Rasterelektronenmikroskop erhobenen Maße entsprechen in etwa denen, die bereits von anderen Autoren mit dem Lichtmikroskop bei der ganzen Larve oder histologischen Schnitten gemessen wurden (Nichols, 1956; Sprent, 1958). Die Abweichungen von den angegebenen Maßen können sich durch die Fixationsmethode oder Abwehrmechanismen im Wirtsgewebe, die der Larve entgegenwirken, ergeben.

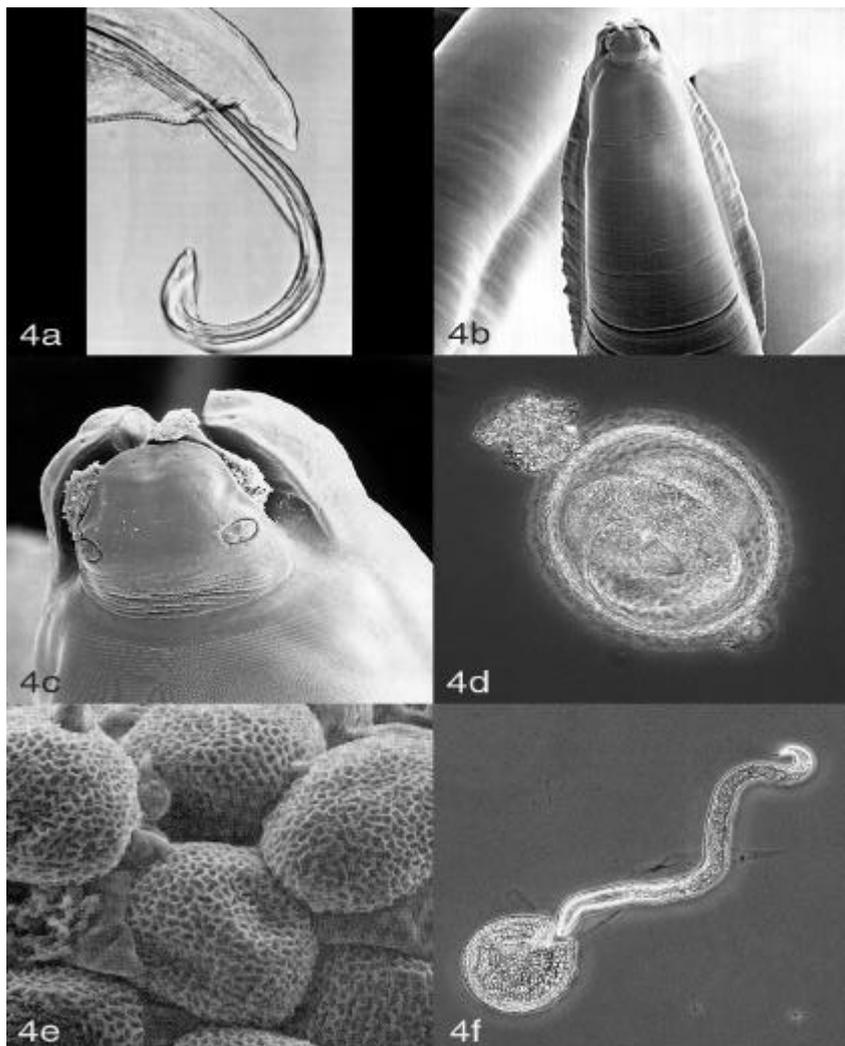


Abbildung 4a: Spicula von *T.canis* (Bowman und Lynn, 1995)

Abbildung 4b: Zervikalflügel von *T.canis*

Abbildung 4c: Mundöffnung mit Lippen von *T.canis*

Abbildung 4d: Embryoniertes *T.canis*Ei

**Abbildung 4e: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche von *T.canis*Eiern
(Ubelaker und Allison, 1975)**

Abbildung 4f : *T.canis*Larve

1.4 Pathologie

Die Pathologie von *T.canis* beim Menschen wird durch Lokalisation, Anzahl, Verweildauer der Larven und Intensität der Abwehrreaktion bestimmt. Im Zentrum der entstandenen Infiltrate befindet sich entweder eine intakte oder eine degenerierende Larve. Bereits 24 Stunden nach einer Infektion werden Epitheloidzellen und multinukleäre Riesenzellen im Bereich der Larve beobachtet; später findet eine Umorganisation in Pseudotuberkel statt. In der Peripherie wird der Herd durch proliferierende Fibroblasten zum umliegenden ödematös aufgetriebenen Gewebe abgegrenzt. In diese Kapsel wandern Plasmazellen, Lymphozyten und Mastzellen ein. Im Gewebe hat sich ein Granulom gebildet. Um die Larven sind nekrotisches Material, eosinophile und neutrophile Granulozyten (Abb.5a) sowie Makrophagen organisiert (Areà und Crandall, 1971). Die Larve kann zerstört werden und wird mit dem nekrotischen Material im Zentrum des Granuloms resorbiert. Können die Abwehrmechanismen des Wirts die Larve nicht zerstören, bleibt eine intakte Larve in einer dicken hyalinen Kapsel zurück (Abb.5b) (Areà und Crandall, 1971; Boch und Supperer, 1977). In der abgekapselten Form können die Larven für Monate bis zu Jahren überleben und infektiös bleiben (Beaver et al., 1962; Beaver, 1969).

Häufig werden die Larven in der Leber (Abb.5b) (Beaver et al., 1952; Milburn und Ernst, 1953), in der Lunge (Brill und Beaver, 1953; Dent et al., 1956), im Herzmuskel (Brill und Beaver, 1953; Dent et al., 1956; Vargo et al., 1977), in den Augen (Wilder, 1950; Nichols, 1956; Duguid, 1961a), in der Skelettmuskulatur (Griffiths, 1973) und im zentralen Nervensystem (Moore, 1962; Schochet, 1967; Hill et al., 1985) gefunden.

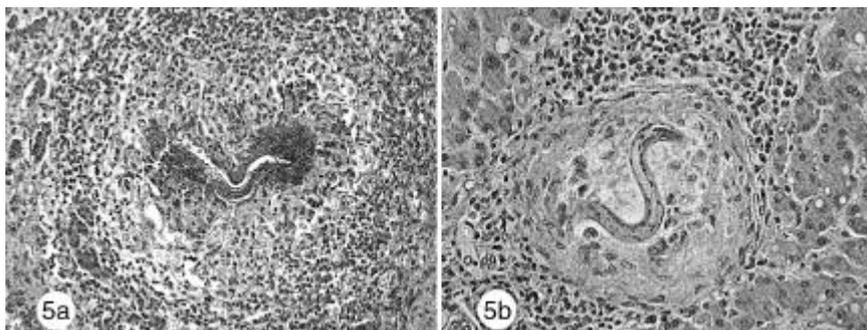


Abbildung 5a: Granulom mit Nekrosezone um eine Larve im Leberbiopsat Menschen (Areà und Crandall, 1971)

Abbildung 5b: Abgekapselte Larve in einem Leberbiopsat der Maus (Areà und Crandall, 1971)

1.5 Klinik

Klinisch lassen sich zwei Formen der Toxocariasis unterscheiden: viszerale Larva migrans (VLM) und okuläre Larva migrans (OLM). In der Literatur jedoch wird noch eine dritte Form der Toxocariasis erwähnt und als „asymptomatic toxocariasis“ bezeichnet. Diese Form der Toxocariasis weist eine positive Serologie und eventuell eine Eosinophilie auf, aber keine klinischen Krankheitssymptome (Bass et al., 1987). Taylor prägte für diese dritte Form der Toxocariasis auch den Begriff „covert toxocariasis“. Die seropositiven Patienten haben hierbei nur eine geringe Zahl von klinischen Symptomen, die allerdings unspezifisch sind und nicht auf eine OLM oder VLM schließen lassen (Taylor et al., 1988).

Viszerale Larva migrans:

Das klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit *T.canis* ist sowohl in der Ausprägung als auch in der Manifestation sehr variabel. Es handelt sich oft um Kinder im Alter von 1 bis 4 Jahren, bei denen Geophagie vorkommt. Ein grundlegendes Merkmal ist das Rezidivieren der Symptome und Befunde.

Der Allgemeinzustand ist reduziert durch Fieber, Nachtschweiß, Appetitlosigkeit, Leistungsminderung, Muskel- und Gelenkschmerzen (Snyder, 1961).

Bei Beteiligung des Respirationstraktes fallen bellender Husten, Bronchitis, Schnupfen, Rhinorrhoe und vor allem in den ersten 1 bis 2 Wochen zunehmende Dyspnoe und Orthopnoe sowie asthmatische Attacken auf. Man erhält nur dürrig schleimiges und mit Blut tingiertes Sputummaterial. Auskultatorisch drückt sich dies in Giemen und Rasselgeräuschen über den basalen Lungenfeldern aus. Diffuse miliare Infiltrate, Atelektasen und pneumonische Areale und eine vermehrte hiläre Zeichnung stellen das radiologische Korrelat der wandernden Larven dar (Lenczner et al., 1964; Engel et al., 1971; Beshear und Herdley, 1973). Die Dauer der Symptomatik reicht von kurz und flüchtig (Löffler und Maier, 1943) bis zu Monaten und Jahren mit andauernden eosinophilen Infiltraten (Beaver et al., 1962).

Trotz möglichem Befall des Herzens ergibt sich daraus meistens keine kardiologische Symptomatik. Vereinzelt lassen sich auffällige Elektrokardiogramme ableiten oder eine Herzdilatation und eine eingeschränkte Ventrikelkontraktion nachweisen (Friedman und Hervada, 1960; Vargo et al., 1977).

Gastrointestinal klagen die Patienten über Bauchmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Der Hämoccult-Test fällt oft positiv aus. Palpatorisch läßt sich eine Spannung der Bauchdecke, eine Vergrößerung der Leber (Fernandez et al., 1974; Wendler, 1972) und/oder der Milz (Snyder, 1961) erfassen.

Neurologisch erscheint der Befall unter dem Bild einer Enzephalitis mit hirnorganischen Krampfanfällen, einer Meningomyelitis mit Paresen oder mit Querschnittssymptomatik (Brain und Allan, 1964; Sumner und Tinsley, 1967) und einer eosinophilen Meningitis (Müller-Jensen, 1973; Engel et al., 1971).

Die verstreuten Läsionsherde und das klinisch variable Erscheinungsbild sind bedingt durch die erratische Wanderung, die mechanische Bohrtätigkeit, den Einsatz lytischer Enzyme der Larven und die toxisch-allergische Reaktion auf deren Antigene (Robertson et al., 1987; Robertson et al., 1989).

Okuläre Larva migrans

Eine okuläre Infektion mit *T.canis* ist wohl eine der schwerwiegendsten Komplikationen der Toxocariasis. Betroffen sind häufig junge Erwachsene. Klinisch zeigt sich zumeist eine unilaterale Einschränkung des Gesichtsfeldes bis zu einseitigem Sehverlust oder auch das Auftreten eines Strabismus. Ein Eindringen der Larven in den Glaskörperbereich führt zur chronischen Endophthalmitis (Duguid, 1961a), Chorioretinitis, Iridozyklitis und Synechien mit Netzhautablösung. Rundliche Granulome werden vor allem in der Retina im Bereich der Macula oder des Nervus opticus gefunden (Abb.6). Klinisch imitiert eine Toxocariasis der Augen somit oftmals eine Coat`s disease oder ein Retinoblastom (Shields, 1984; Glickman et al., 1985), weshalb in der Vergangenheit oftmals eine Enukleation des Auges vorgenommen wurde (Wilder, 1950; Ashton, 1960). Meist geben Routineuntersuchungen wie die Fundoskopie (Abb.6) oder die Spaltlampenuntersuchung den ersten Hinweis auf eine Infektion. Schmerzen ebenso wie eine systemische Manifestation gehen selten mit einer okulären Toxocariasis einher.



Abbildung 6: Granulom in der Netzhaut, Fundusskopie (Burchard und Löscher, 2000)

1.6 Therapie und Prophylaxe

1.6.1 Beim Menschen

Die VLM und die OLM werden in erster Linie symptomatisch behandelt. Der Stellenwert der antihelminthischen Therapie jedoch ist nicht definiert (Löscher, 1993). In den gebräuchlichen Verabreichungsformen und Dosierungen ist ein Abtöten der *T.canis*-Larven beim Menschen nicht eindeutig nachgewiesen. Klinische Symptome und Laborparameter können nach der antihelminthischen Therapie wieder auftreten bzw. ansteigen (Auer und Aspöck, 1995). Gute Erfolge in der Behandlung sind mit Diethylcarbamazin beschrieben, bei einer Verwendung von 6-9 mg/kg täglich auf 3 Tagesdosen verteilt über 2-3 Wochen (Hetrazan®) (Löscher, 1993). Alternativ finden auch Benzimidazolpräparate ihre Anwendung: Thiabendazol (Mintezol®), Albendazol (Zentel®), Mebendazol (Vermox®). Als Standardtherapeutikum wird Albendazol in einer Dosierung von 400 mg 2 mal täglich über 2-4 Wochen (Burchard und Löscher, 2000) eingesetzt; auch Thiabendazol, das in Deutschland als Medikament nicht mehr zugelassen ist, hat in einer Dosierung von 2x25 mg/kg täglich bei unterschiedlicher Behandlungsdauer zur Rückbildung von Organmanifestationen geführt (Nelson et al., 1966; Aur et al., 1971; Stürchler et al., 1989). Auch bei anderen Helminthosen ist Thiabendazol wirksam (Asshauer und Mohr, 1966). Andere Autoren zeigen sich skeptischer und sprechen den therapeutischen Erfolg nur der entzündungshemmenden Aktivität zu (Arman und Campbell, 1975) oder beschreiben sogar erfolglose Therapieversuche mit Thiabendazol (Zinkham, 1968).

Bei einer OLM kommt neben der medikamentösen Behandlung noch die Abtötung der Larven durch Photokoagulation mit Laser in Betracht (Duguid, 1961b). Hagler und Mitarbeiter (Hagler et al., 1981) haben versucht verschiedene chirurgische Vorgehensweisen, wie die Vitrektomie, an Hand von Fallbeispielen aufzuzeigen.

Nur bei schwerwiegenden Fällen mit dem Bild einer Enzephalitis oder Myokarditis ist die Verwendung von Kortikosteroiden wegen ihrer anti-allergischen und entzündungshemmenden Wirkung zu empfehlen (Beshear und Herdley, 1973), wenngleich die Immunsuppression den Larven ein weiteres Durchdringen der Gewebe ermöglicht (Lee und Min, 1974).

1.6.2 Beim natürlichen Wirt

Eine regelmäßige Entwurmung und Behandlung der Welpen, Beseitigung der Fäzes, Desinfektion der Stallungen durch Dampfstrahlreinigung oder - bei häuslicher Unterbringung - Säuberung mit heißem Wasser (>60 °C) sowie die Verwendung verschiedener Desinfektionsmittel helfen die Infektionsrate unter den Haustieren und die Gefahr für den Menschen einzudämmen (Mehlhorn et al., 1993; Boch und Supperer, 1977).

Als Antihelminthika haben sich Nitroscanat (Lopatul®), Flubendazol (Flubenol®), Levamisol (Citarin-L®), Pyrantel (Banminth®) und andere Breitspektrum-Antihelminthika, wie Fenbendazol (Panacur®) und Mebendazol (Telmin KH®) bewährt. Als weiteres Präparat steht Drontal Plus®, ein Mischpräparat aus Praziquantel, Pyrantel und Febantel zur Bekämpfung adulter Nematoden und Cestoden zur Verfügung. Allen Präparaten gemeinsam ist eine gute Wirkung auf die adulten Formen der Parasiten, die Larven im Gewebe dagegen werden weniger effektiv von den Medikamenten erfaßt (Mehlhorn et al., 1993).

1.7 Diagnostik

Bei den Laboruntersuchungen fallen eine länger anhaltende Leukozytose von 20.000 – 102.000/mm³ (Areà und Crandall, 1971; Schantz und Glickman, 1978), Hypergammaglobulinämie v.a. IgG, IgE und vereinzelt auch IgM, Hyperisohämagglutininämie (Huntley et al., 1965; Areà und Crandall, 1971) und eine oftmals persistierende Eosinophilie von 5-91% auf (Huntley et al., 1965; Zinkham, 1968; Schantz und Glickman, 1978). Beaver (Beaver et al., 1962) führt die Eosinophilie auf eine fortlaufende Antigenstimulierung durch Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte der Larve zurück. Die Leberwerte sind zumeist trotz des häufigen Befalls dieses Organs im Normbereich. Stuhluntersuchungen zum Nachweis von Eiern oder adulten Würmern sind wegen des selbstlimitierenden Lebenszyklus im Menschen in der Regel negativ. In zwei Publikationen wird jedoch auch über adulte Würmer beim Menschen berichtet: So konnte bei einem 16 Monate alten Mädchen in England der adulte Wurm im Stuhl nachgewiesen werden (Bisseru et al., 1966).

Bei der OLM ist eine Eosinophilie und eine Leukozytose nicht in aller Regel nachzuweisen (Remky und Kraft, 1965; Laqua, 1972).

Da das klinische Erscheinungsbild der viszeralen Form der Toxocariasis sehr variabel ist und da die Laborwerte unspezifisch sind, ist man zur Erhärtung der Diagnose oft histologische und serologische Untersuchungsverfahren angewiesen.

Der direkte Nachweis von Larven im Biopsat oder Punktat bedarf einer strengen Indikation und kann nur selten geführt werden (Beaver et al., 1952; Nelson et al., 1966; Sumner und Tinsley, 1967). Die Zuordnung der Spezies kann an Hand histologischer Schnitte durchgeführt werden (Nichols, 1956); allerdings ist eine exakte Schnittführung grundlegend (Nichols, 1956; Lamina, 1968).

In der Diagnostik der okulären Form spielt der direkte Nachweis der Larven eine entscheidende Rolle; serologische Verfahren liefern hier nur uneinheitliche und widersprüchliche Ergebnisse (Brown, 1971).

Bei der viszeralen Form dagegen kommt der Immundiagnostik eine besondere Bedeutung zu. Neben anderen Antigenen stimulieren v.a. somatische und exkretorisch-sekretorische (E/S) Antigene das Immunsystem des Wirtes. Erste Beschreibungen zur Antikörperbildung bei menschlichen Wurmerkrankungen datieren aus dem Jahr 1904 (Isaac und Felden, 1904; Fleckseder und Stejskal, 1904).

Zahlreiche serologische Verfahren zur Diagnostik der Toxocariasis wurden bislang eingesetzt:

- Intradermaltest: Für den Test wurde ein Extrakt aus adulten Würmern intradermal injiziert (Jung und Pacheco, 1959). Woodruff benutzte diesen Test um eine Infektion mit *T.canis* als mögliche Ursache oder Cofaktor bei einer Epilepsie oder einer Poliomyelitis nachzuweisen. Seine Untersuchungen ergaben 2,1% positive Ergebnisse bei einer Kontrollgruppe, 13,6% bei Poliomyelitis-Patienten und 7,5% bei Epilepsiepatienten. Woodruff postulierte deshalb die *T.canis*-Larve als möglichen passiven Überträger für das Poliomyelitis-Virus und als mögliche Ursache für eine Epilepsie durch die Bildung zerebraler Granulome. Zur Dauerhaftigkeit eines positiven Hauttests im Verlauf einer *T.canis*-Infektion wurden keine Daten erhoben (Woodruff et al., 1966; Kagan, 1968).
- Hämagglutination: Mit verschiedenen Antigen-Extrakten wurde ein Hämagglutinationstest durchgeführt; die Spezifität war mit 92% zwar zufriedenstellend, die Sensitivität mit 18% allerdings sehr schlecht (Jung und Pacheco, 1960; Krupp, 1974; de Savigny und Tizard, 1977).
- Bentonite flocculation: Dieser Test hatte zwar eine Spezifität von 97%, doch die Sensitivität war mit 26% sehr niedrig (Sadun et al., 1957; Glickman et al., 1978).
- Präzipitationstest in Agargel: An Hand verschiedener Extrakte von adulten Spulwürmern konnten zahlreiche Antigenkomponenten festgestellt werden; doch auch hierbei konnten

keine art- und gattungsspezifischen Unterscheidungen getroffen werden (Kagan, 1957; Huntley und Moreland, 1963; Lamina, 1968).

- Immunofluoreszenztest: Hierbei fanden somatische Antigene in Schnittpräparaten der Larve ihre Verwendung. Bei guter Spezifität läßt jedoch die Sensitivität zu wünschen übrig. Zudem erfolgte der Nachweis auch an der lebenden Larve mit fraglichem Ergebnissen (Hogarth-Scott, 1966; Bisseru und Woodruff, 1968; Annen et al., 1975; Smith et al., 1984).
- Mikropräzipitationstest an der lebenden Larve: Diese Methode scheint zwar gattungsspezifisch zu sein, jedoch schränken das Vorhandensein von A und B Blutgruppenantigenen bzw. der Antigen-Turnover an der Larvenoberfläche die Aussagekraft des Tests ein (Barna et al., 1962; Lamina, 1968; Kastrulin, 1971; Smith et al., 1984).
- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit somatischem Ei-Antigen (EE-Antigen): Die Sensitivität des ELISA mit somatischem Ei-Antigen beträgt nach den Untersuchungen von Glickman 78%, die Spezifität 92% (Glickman et al., 1978); um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten, muß eine Vorabsorption mit Ascaris-Ei-Antigen erfolgen (Cypess et al., 1977; Glickman et al., 1985; Gillespie, 1987). Glickman und Mitarbeiter äußerten den Verdacht einer VLM wenn mindestens 4 der 6 Kriterien erhöhter IgM-Spiegel, Hepatomegalie, erhöhter IgG-Spiegel, Leukozytose, Eosinophilie oder erhöhte Isohämagglutinine vorlagen (Glickman et al., 1978). Auch Cypess definiert eine VLM anhand der genannten Kriterien; lediglich der erhöhte IgM-Spiegel zählt nicht zu den Auswahlkriterien (Cypess et al., 1977).
- ELISA mit E/S-Antigen der Zweitlarve: 11 Seren von Patienten mit einer vom erfahrenen Ophthalmologen in der klinischen Untersuchung diagnostizierten unilateralen OLM und positivem Befund im ELISA mit EE-Antigen, 12 Seren von Patienten mit klinisch diagnostiziertem Retinoblastom und negativem Befund im ELISA mit EE-Antigen sowie 9 Seren von Patienten mit negativem Befund im ELISA mit EE-Antigen allerdings erst nach Vorabsorption mit EE- Antigen von Ascaris suum wurden für den Vergleichstest des ELISA mit E/S Antigen und des ELISA mit EE-Antigen verwendet. Die Untersuchung ergab eine höhere Spezifität und eine gleich hohe Sensitivität des ELISA mit E/S-Antigen gegenüber dem ELISA mit EE-Antigen (Glickman et al., 1985) sowie eine gute Korrelation zwischen positivem Laborergebnis und klinischem Befund angegeben.

Speiser und Gottstein gaben für diesen Test bei Patienten, bei denen aufgrund der klinischen Anamnese der Verdacht auf eine Infektion mit *Toxocara canis* bestand, eine gute Reproduzierbarkeit und eine Spezifität von 93% an (Speiser und Gottstein, 1984). Ein Zahlenwert für die Sensitivität wurde nicht explizit erwähnt. Eine Vorabsorption mit Ascaris-Antigen im Gegensatz zur Verwendung von EE-Antigen ist nicht notwendig (Carlier et al., 1982; Glickman et al., 1985). Dennoch können Kreuzreaktionen bestehen (de Savigny et al., 1979; Speiser und Gottstein, 1984; Lynch et al., 1988): Diese Antigengemeinschaft, umfaßt nicht nur andere Helminthenspezies, sondern auch andere Infektionserreger, wie Pilze und Bakterien, die unter anderem Phosphorylcholin, eine im Tierreich weit verbreitete antigene Determinante, besitzen (Kennedy et al., 1987; Lal und Ottesen, 1988; Kennedy et al., 1989).

- Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB): Magnaval gibt für diesen Test mit E/S-Antigen eine ähnlich hohe Sensitivität wie beim ELISA und eine etwas größere Spezifität an und wertet daher den EITB als verwendbaren Bestätigungstest. Die positiven Referenzseren stammten von Patienten, die neben typischen klinischen und laborchemischen Befunden wie Husten, Hepatomegalie, Leukozytose, Hypergammaglobulinämie, eine chronische Eosinophilie, eine Erhöhung der Immunglobuline der Klasse IgE und ein positives Ergebnis im E/S-ELISA aufwiesen. Als zusätzliche positive Referenz diente ein Serum eines Patienten mit einem als typisch für T.c. beschriebenen Netzhautgranulom sowie das Serum eines zuvor mit 2000 embryonierten *T.canis*-Eiern infizierten Kaninchens (Magnaval et al., 1991).

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich der ELISA und der EITB unter Verwendung von E/S-Antigen gegenüber den anderen Tests als zuverlässiger erwiesen haben. Dies beruht auf der höheren Sensitivität und Spezifität der Methoden und ihrer relativ leichten Handhabung.

2 Problemstellung

Eine Infektion mit *T.canis* verläuft vielfach asymptomatisch, kann aber auch zu einem viszeralen oder okulären Larva migrans-Syndrom mit einem sehr variablen klinischen Erscheinungsbild führen.

Populationsuntersuchungen von Kimmig mit dem E/S-ELISA zeigen eine variable Durchseuchung bei Blutspendern aus verschiedenen Ländern. So fand er bei deutschen Blutspendern einen Durchseuchungstiter von 4,8%, bei Spendern aus osteuropäischen Ländern 13,7% und bei Spendern aus Ländern außerhalb Europas 17,7% (Kimmig et al., 1991).

Da der direkte Nachweis der Larven in Biopsaten oder Punktaten nur selten gelingt, muß man sich in der Diagnostik vor allem auf die Immundiagnostik stützen. Die Wertigkeit und Aussagekraft der Immundiagnostik ist jedoch eingeschränkt durch die Durchseuchungsrate und durch mögliche Kreuzreaktionen. In bisherigen Untersuchungen ergab die Verwendung des exkretorisch-sekretorischen Antigens (E/S-Antigen) der Zweitlarve von *T.canis* die höchste Spezifität (Speiser und Gottstein, 1984). Daten von zahlreichen Untersuchungen bei der Toxocariasis zeigen, daß es zur Bildung spezifischer Antikörper insbesondere der Klassen IgG und IgE führt (Desowitz et al., 1981; Genchi et al., 1988; Smith, 1993).

Untersuchungen der Immunglobulin-G-Subklassen haben ergeben, daß IgG₄ bei einer lang andauernden Exposition zu einem bestimmten Antigen vermehrt produziert wird. IgG₄, das kaum eine Komplementaktivierung und Antigenvernetzung initiiert, konkurriert mit IgE um die Antigenbindung und vermag dadurch die IgE-vermittelte Immunantwort zu hemmen (Hamilton, 1987; Uhlikova et al., 1996). Es wird angenommen, daß IgG₄ bei einer IgE-Überstimulierung gegenregulatorisch wirksam ist. Bei einer Filariose z.B. werden also spezifische Antikörper dieser Subklasse in besonderem Ausmaße gebildet. Aus dieser Erkenntnis hat man an Hand von IgG₄-spezifischen monoklonalen Antikörpern einen IgG₄-ELISA für Filariosen entwickelt (Weil et al., 1990). Dies hat zu einer erheblichen Verbesserung der Spezifität der Immunodiagnostik der Filariosen geführt (Egweg et al., 1994). Auch in der Diagnostik der Echinokokkose gibt es erste Erfolg versprechende Ergebnisse mit Antikörpern der IgG₄-Klasse (Dreweck et al., 1997; Grimm et al., 1998). Daher liegt es nahe, auch bei anderen, protrahiert bis chronisch verlaufenden gewebeinvasiven Helminthosen, wie der Toxocariasis, zu untersuchen, ob der Einsatz eines IgG₄-ELISA spezifisch für *T.canis* zur Verbesserung der Immundiagnostik dieser Helminthose führt.

3 Zielsetzung

Angesichts des sehr variablen klinischen Bildes der Toxocariasis, der nur in einem kleinen Teil der Fälle zu erreichenden parasitologischen Sicherung der Diagnose und der begrenzten Aussagekraft ihrer Immundiagnostik war das Ziel dieser Arbeit zunächst eine knappe, aber strenge klinische und laborchemische Definition dieser Helminthose an Hand der Daten von 22 definitiv nachgewiesenen und in der Literatur beschriebenen Toxocariasis-Fällen zu erarbeiten.

Anhand der immundiagnostischen Daten von Patienten, die in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin auf IgG-Antikörper gegen *T.canis* untersucht wurden, sollte erkundet werden, welche Patienten einen erhöhten Antikörpertiter aufwiesen und welche von diesen unter die oben genannte strenge Definition einer klinisch manifesten Toxocariasis fielen.

Des weiteren sollte, eine repräsentative Anzahl gesunder Personen hinsichtlich IgG-Antikörper gegenüber *T.canis* untersucht werden, um die Durchseuchungsrate der Bevölkerung im Raum München abzuschätzen. Zudem sollten Seren von Personen mit anderen Helminthosen analysiert werden, um das Ausmaß der Antigengemeinschaft mit anderen Helminthen näher zu charakterisieren.

Die vorangehenden Untersuchungen waren die Basis für die Entwicklung und die Evaluierung eines IgG₄-ELISA mit E/S-Antigen der Zweitlarve von *T.canis*.

4 Material und Methoden

4.1 Serumproben

4.1.1 Patienten mit klinischem und / oder serologischem Verdacht einer *Toxocariasis*

Von 1988 bis 1997 wurden 4298 Seren auf *T.canis*-Antikörper mittels ELISA mit exkretorisch/sekretorischem Antigen (E/S-Antigen) untersucht. Aus diesem Serenpool wurden alle Seren von Patienten ausgesucht, bei denen der klinische Verdacht einer okulären oder einer viszeralen Toxocariasis bestand. Insgesamt ergaben sich 138 Personen, deren eingefrorene Seren noch vorhanden waren und die einen hohen Antikörpertiter, d.h. >100 Antikörpereinheiten (AKE), aufwiesen. 79 der Personen waren Männer und 59 Frauen. Pro Patient wurde nur ein Serum berücksichtigt. Das Durchschnittsalter der Patienten war 41 Jahre (1–81 Jahre). Informationen über die Patienten wurden mit einem von uns entworfenen Fragebogen an den behandelnden Arzt oder durch Einsicht in die Arztbriefe/Patientenakten gesammelt. Die Definition einer Toxocariasis wurde an Hand der seltenen histologisch nachgewiesenen und in der Literatur beschriebenen Toxocariasis-Fälle, 22 an der Zahl (s. Tab.1 S. 24), ermittelt.

4.1.2 Gesunde Personen (Blutspender)

Als negative Kontrolle dienten 997 Seren von Blutspendern im Alter zwischen 18 und 65 Jahren aus dem Raum München. Genauere Informationen zu Alter und Geschlecht waren nicht verfügbar. Andere Infektionen oder Erkrankungen wie Hepatitis B, C, HIV 1 und 2, Lues und Zytomegalie waren ausgeschlossen worden. Der Ausschluß akuter Lebererkrankungen erfolgte durch Überprüfung der Leberenzyme, der einer Malaria anamnestisch. Alle 997 Seren wurden im Jahr 1998 abgenommen.

4.1.3 Patienten mit anderen Helminthosen

59 Patienten, bei denen eine andere Helminthose nachgewiesen werden konnte, ergaben bei der serologischen Untersuchung auf *T.canis* mit dem IgG-ELISA eine positive Reaktion. Alle Seren stammten aus den Jahren 1988 bis 1997. 28 Personen waren Männer und 31 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 34 Jahre (1-81 Jahre). Seren von Patienten mit folgenden Helminthosen wurden untersucht: 3 Fälle von Ascariasis, 4 Fälle von zystischer

Echinokokkose, 5 Fälle von Schistosomiasis, 5 Fälle von Strongyloidiasis, 8 Fälle von Trichinose, 9 Fälle von Trichuriasis, 10 Fälle von alveolärer Echinokokkose und 15 Fälle von Hakenwurminfektionen.

4.2 Antigen

Als Antigen wurde für alle Untersuchungen das exkretorisch-sekretorische Antigen der in Kultur gehaltenen Zweitlarven von *T.canis* (E/S-Antigen) verwendet. Die Larven stammten von Welpen einer bayerischen Zucht. Die Anreicherung der *T.canis*-Eier, der Larvenschlupf, die Larvenhaltung und die Gewinnung des Antigens wurden nach der Methode von de Savingy (de Savigny, 1975) ausgeführt. Der Proteingehalt des Antigen wurde nach der Methode von Onishi und Barr (Onishi und Barr, 1978) bestimmt.

4.3 IgG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISA wurden IgG-Antikörper gegen E/S-Antigen von *T.canis* nachgewiesen.

4.3.1 Reagenzien und Geräte

Folgende Materialien und Geräte wurden verwendet:

ELISA Platten mit je 96 kobaltbestrahlten Vertiefungen aus Polystyrol in F-Form (Nr. M 17981000 B, Fa. Dynatech),
das Spektrophotometer Spectra Rainbow ELISA Platten Reader (Fa. Tecan) und die Software Version 7.17 (Fa. Tecan) sowie
das Waschgerät Wellwash für ELISA Platten (Fa. Dendley).

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Der Phosphatpuffer (PBS; phosphate buffered saline) pH 7,2, als Bestandteil verschiedener im Test verwendeter Lösungen, in folgender Zusammensetzung:

- Natriumchlorid (NaCl) (Fa. Merck 1.06404.1000) 72,0 g
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 14,8 g
(Fa. Merck 1.0686.500)
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) 4,3 g
(Fa. Merck 1.04873.1000)
- auf 10 Liter (l) Aqua dest. aufgefüllt,

der Waschpuffer, hergestellt aus den Komponenten:

- PBS 1 l
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) 1 ml
(Fa. Merck-Schuchardt Art. No. 8822184),

der Coating Puffer (0,1 M Natriumcarbonatpuffer) pH 9,6, mit folgenden Inhaltsstoffen:

- Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (Fa. Merck 6392) 3,1 g
- Hydrogencarbonat (NaHCO_3) (Fa. Merck 6329) 5,9 g
- Natriumazid reinst (NaN_3) (Fa. Merck 6688) 0,1 g
- auf 1 l Aqua dest. aufgefüllt,

der Inkubationspuffer (IKP), hergestellt aus:

- PBS 100 ml
- Bovine Serum Albumine Fraktion V (BSA) 5,0 g
(Fa. Boehringer Mannheim 735108)
- Tween 20 600 μl

der Anti-Human-IgG vom Kaninchen, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP; horseradish peroxidase) (Fa. DAKO P021402) in einer Verdünnung von 1:2000 mit IKP und der 0,1 M Phosphat-Zitrat Substratpuffer pH 5,0, bestehend aus:

- Na_2HPO_4 14,2 g
in 1 l Aqua dest. gelöst
- Zitronensäure Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 21,0 g
(Fa. Merck 1.00244.1000)
in 1 l Aqua dest. gelöst.

Zunächst werden 680 ml Phosphatpuffer mit 320 ml Zitronensäure vermischt; danach werden pro 100 ml Gemisch 100 µl Wasserstoffperoxid (Fa. Merck 1.08597) zugegeben.

Eventuell muß dann noch der pH-Wert justiert werden.

Eine Tablette (10mg) O-Phenylendiamin (Fa. Sigma P-8287) wird zur Herstellung der verwendeten Substratlösung in 60 ml Substratpuffer aufgelöst.

Als Stop-Lösung wurde eine 30%ige Schwefelsäurelösung (H₂SO₄) (Fa. Merck 1.9072.1000) verwendet.

4.3.2 Testmethodik

- Der Proteingehalt des verwendeten Antigens betrug 834,85 µg/ml. Die notwendige Antigenkonzentration für die Beschichtung der ELISA-Platten wird durch eine Verdünnungsreihe (chequer-board) ermittelt. Damit kann eine Standardkurve erstellt werden. Die ermittelte Proteinkonzentration betrug 3 µg/ml.
- Das Volumen des im Coating Puffer suspendierten Antigens ist 100 µl pro Napf. Für den Teil der Platte, der für die Proben bestimmt ist, werden pro Serum drei Näpfe vorbereitet, von denen der dritte nur mit Coating Puffer gefüllt ist, d.h. er wird nicht mit Antigen beschichtet. Somit kann man eine eventuelle unspezifische Bindung von Immunglobulinen im Testserum identifizieren.
- Die mit dem Antigen beschichteten Platten läßt man zunächst 1 h lang bei 37 °C und danach über Nacht bei 4 °C inkubieren, ehe man sie viermal mit dem Waschpuffer spült.
- Danach werden in jede Vertiefung 200 µl IKP pipettiert und die Platte eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Somit werden ungebundene Stellen mit Albumin benetzt. Darauf wird, wie oben beschrieben, gewaschen.
- Als Kontrollserum wird das Serum eines Patienten mit nachgewiesener Toxocariasis verwendet. Das Kontrollserum wird für die Erstellung einer Standardkurve verdünnt. Die erste Verdünnung beträgt 1:200 (Faktor 100), die zweite 1:600 (Faktor 33), die dritte 1:2000 (Faktor 10) und die vierte 1:20000 (Faktor 1). Die negative Kontrollprobe, bestehend aus einem Pool von negativen Seren, (klinisch, serologisch) wird 1:320 mit IKP verdünnt und entspricht dem Faktor 1 der Verdünnung des Kontrollserums. Auch die Verdünnung der zu untersuchenden Patientenseren erfolgte im Verhältnis 1:320. Die Konzentrationen der Patientenseren werden schließlich als Antikörpereinheiten (AKE),

das heisst als Vielfaches der normalen Aktivität (MONA), also als Faktor des negativen Serumpools ausgedrückt (Felgner, 1978).

- Kontrollseren und Patientenproben werden in einem Volumen von 100 µl in die Näpfe pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
Nach Ablauf der Zeit werden die Näpfe wie beschrieben gewaschen.
- Anschließend erfolgt die Beschichtung der Näpfe mit je 100 µl verdünntem Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Anti-Human-IgG vom Kaninchen. Nach einer weiteren Stunde bei 37 °C erfolgt ein erneuter Waschgang.
- Die Substratlösung wird erst kurz vor Gebrauch hergestellt; 100 µl dieser Lösung werden dann in alle Vertiefungen pipettiert und im Dunkeln bei Raumtemperatur für genau 30 Minuten inkubiert. Mit 100 µl 30%iger Schwefelsäurelösung (H₂SO₄) je Vertiefung wird der Vorgang schließlich gestoppt.
- Der Absorptionsindex der Proben wird mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.
- Der Grenzwert (Cut-off) dieses Tests liegt bei 20 AKE, definiert mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent aus Proben seronegativer Blutspender.

4.4 IgG₄-ELISA

4.4.1 Reagenzien und Geräte

Platten, PBS Puffer, Waschlösung, Coating Puffer und Substratpuffer entsprechen in der Zusammensetzung der des IgG-ELISA.

Der verwendete Inkubationspuffer enthält anstatt des BSA fetales Kälber-Serum (FKS) ebenfalls in 5%iger Konzentration (Fa. Biochem KG Berlin Cat. No. S 0115).

Abweichend vom IgG-ELISA wurden noch eingesetzt:

Das monoklonale murine Anti-Human IgG₄ (Fa. Sigma No. I9888) in einer Verdünnung von 1:2000 mit IKP.

Das Konjugat Anti-Mausimmunglobulin der Klasse IgG vom Kaninchen, gekoppelt mit HRP, (Fa. DAKO P026002) 1:1000 mit IKP verdünnt.

4.4.2 Testmethodik

- Die Beschichtungskonzentration für das Antigen ist 20 µg/ml. Das Volumen des im Coating Puffer suspendierten Antigens ist 100 µl pro Napf.
- Die Platten läßt man zunächst bei 37 °C über Nacht inkubieren, ehe man sie viermal mit dem Waschpuffer spült.
- Danach werden pro Vertiefung 200 µl IKP pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Darauf wird, wie oben beschrieben, gewaschen.
- In diesem Fall werden nur die Werte für das positive und negative Kontrollserum ermittelt; eine Standardkurve wird nicht erstellt.
- Das Kontrollserum und die negative Kontrolle werden im Verhältnis von 1:20 mit IKP verdünnt. Auch die Verdünnung der zu untersuchenden Patientenseren erfolgt im Verhältnis 1:20. Nun werden die Vertiefungen entsprechend dem Arbeitsprotokoll im Doppelansatz mit 100 µl der Kontrollseren und der Patientenproben befüllt und für 3 h bei Zimmertemperatur inkubiert, ehe sie dann bei 4 °C über Nacht aufbewahrt werden. Nach Ablauf der Inkubationsphase werden die Näpfe wie beschrieben ausgewaschen.
- Das monoklonale Maus Anti-Human IgG₄ wird in der erwähnten Verdünnung verwendet und in jede Vertiefung 100 µl einpipettiert. Danach wird wieder bei 37 °C 1 h inkubiert und gewaschen.
- Anschließend werden je Napf 100 µl des in IKP verdünnten Konjugats, hinzupipettiert. Nach 1 h Inkubation wird dann wie gewohnt gewaschen.
- Die Zugabe der Substratlösung, der Stoplösung und die Messung der Platten erfolgt wie bei der Testmethodik des IgG-ELISA.
- Der Cut-off Wert der Platte entspricht dem 2,5-fachen Wert des negativen Serumpools, ermittelt mit einem Konfidenzintervall von 95% aus Proben seronegativer Blutspender. Dieses ergibt eine rein qualitative Bewertung der Befunde. Der Cut-off Wert lag bei einer Extinktion von 0,110.

4.5 IgG-Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB)

Der IgG-EITB für *T.canis* wurde entsprechend der Anleitung der Firma LDBIO Diagnostics (Nr. Tx-WB24G) ausgeführt. Als erstes werden die mit E/S-Antigen von *T.canis* (nach der PAGE-SDS-Methode elektrophoretisch aufgetrennt) beschichteten Nitrocellulosestreifen auf die Behältnisse verteilt und jeweils mit 1,2 ml Puffer benetzt. Danach werden je 10 µl des positiven und des negativen Kontrollserums sowie der Testseren gesondert auf je einen Streifen hinzupipetiert und für 60 Minuten inkubiert. Daran schließen sich je 30 Minuten Inkubation mit Konjugatlösung und Substratlösung an; diesen Schritten geht jeweils ein dreimaliger Waschvorgang voraus. Gestoppt wird der Vorgang durch Eintauchen der Streifen in Aqua dest. Zum Schluß läßt man die Streifen auf Filterpapier trocknen. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des direkten Vergleichs der ermittelten Banden mit denen des Referenzstreifens. Schon zwei oder mehr (bis zu 4) Banden im niedermolekularen Bereich von 24 bis 35 kDa entsprechend denen des Referenzstreifens sind beweisend für eine Infektion mit *T.canis* (Abb.7). Hoch positive Seren können zusätzlich zu den erwähnten Banden noch eine Bande bei 26 kDa und/oder eine doppelte Bande bei 50 kDa aufweisen.



Abbildung 7: EITB positiver Referenzstreifen nach der Firma LDBIO Diagnostics

5 Ergebnisse

5.1 Einteilung der Toxocariasis in klinische Gruppen

22 Fälle von parasitologisch nachgewiesener Toxocariasis konnten in der Literatur gefunden werden. Folgende Befunde haben sich nach der Auswertung der Fallbeschreibungen als sehr häufig erwiesen:

Eosinophilie, Leukozytose, Lungeninfiltrate, Hepato-/Spleno-megalie, Fieber, eosinophile Granulome, pulmonale, abdominelle und neurologische Symptome (Tab.1, Abb.9 / Abb.10).

Tabelle 1: Übersicht der Publikationen zur viszeralen Larva migrans

Autor	Eosino- philie	Leuko- zytose	Lungen- Infiltrate	Hepato- /Spleno- megalie	Fieber	Granu- lome - Organ	Pulmo- nale Symp- tome	Abd. Symp- tome	Neurolog. Symp- tome	Antigen	Serolog- isches Test- verfahren
Auer, 1990	-	-	-	-	0	Rücken- mark	-	-	+	E/S- Antigen	ELISA +
Beautyman und Woolf, 1951	0	0	-	0	+	Gehirn	0	0	0	0	0
Beaver et al., 1952	+	+	0	+	+	Leber	+	0	+	0	0
Becroft, 1964	0	0	+	0	+	Leber	+	-	0	0	0
Brill et al., 1953	+	+	+	+	+	Lunge	0	+	0	0	0
Dent et al., 1956	+	+	+	+	+	Leber, Gehirn, Herz, Darm	+	0	+	0	0
Hedge et al., 1995	+	-	0	+	+	Leber	+	0	0	0	0
Hill et al., 1985	0	0	0	+	0	Gehirn'	0	0	0	0	0
Lee und Danaraj, 1972	+	+	-	-	0	Leber	-	-	0	0	Isohäm- agglutina- tionstest -
Mercer et al. 1950	+	+	+	+	+	Leber	0	+	0	0	0
Mikhael et al., 1974	+	+	+	+	+	Gehirn, Leber	+	0	+	0	0
Milburn und Ernst, 1953	+	+	-	+	0	Leber	+	0	0	0	0
Moore, 1962	-	+	0	0	-	Gehirn	+	0	+	0	0
Nelson et al., 1966	+	+	+	+	+	Leber	0	0	+	Soma- tisches Wurm- Antigen	Agar-Gel Diffusions- test +
Nelson et al., 1990	0	0	0	0	0	Gehirn	0	0	+	0	0
Schantz et al., 1979	+	0	0	+	0	Leber*	0	0	+	Embryo- nierte T.c.-Eier	IgG-ELISA +
Schochet et al., 1967	-	+	-	0	0	Gehirn	0	0	+	0	0
Snyder, 1961	+	+	+	+	+	Leber	+	0	0	0	0
Villano, 1992	0	0	0	0	0	Rücken- mark*	0	0	0	0	0
Vargo, 1977	+	0	0	0	0	Herz	+	0	0	0	0
Vortel et al., 1983	+	+	0	0	0	Leber	0	0	0	0	0
Wang et al., 1983	+	-	+	0	+	Rücken- mark* (Liquor)	0	0	+	0	0

Erklärung der Zeichen:

- + Kriterium war positiv
- Kriterium war negativ
- 0 Kriterium wurde nicht erwähnt
- * ein Granulom wurde nicht erwähnt

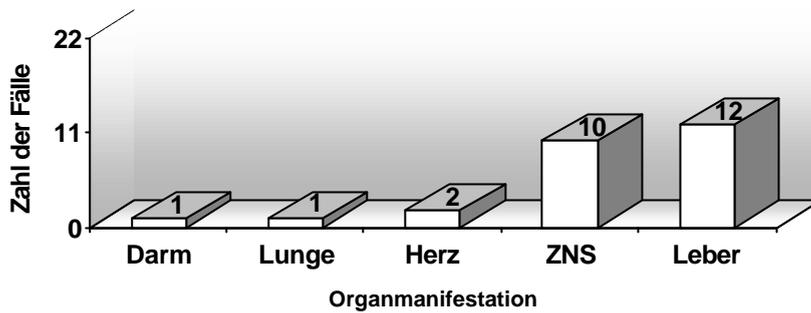


Abbildung 8: Organmanifestationen der nachgewiesenen *T. canis*-Larven

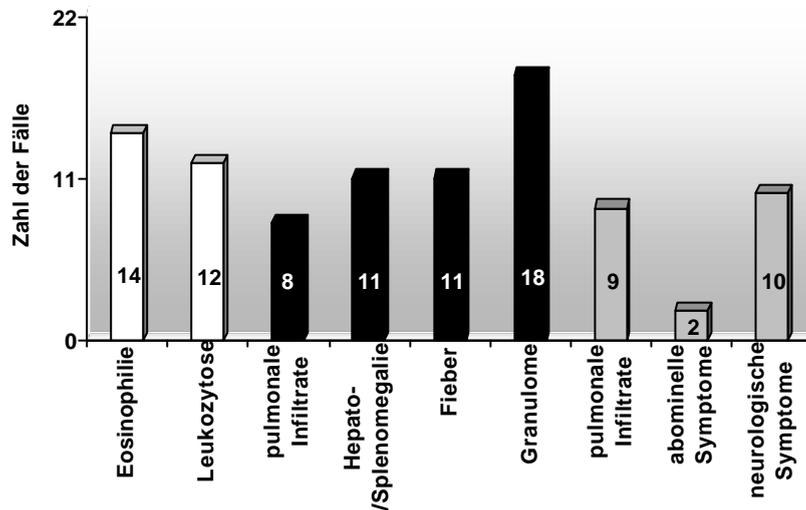


Abbildung 9: Übersicht der in den Publikationen genannten Laborbefunde (weiß), Befunde (schwarz) und Symptome (grau)

- Laborbefunde:
- Bluteosinophilie
 - Leukozytose

mindestens 1 Punkt

- Befunde:
- Pulmonale Infiltrate
 - Hepato-/Splénomegalie
 - Granulome
 - Fieber

zusätzlich mindestens 1 Punkt

- Symptome:
- Pulmonale Symptome: Husten, Dyspnoe
 - Abdominelle Schmerzen
 - Neurologische Symptome

zusätzlich mindestens 1 Punkt

Abbildung 10: Einteilung der Patientenseren

Folgende 5 klinische und labordiagnostisch positive Gruppen konnten daraus zusammengestellt werden:

1. Patienten mit histologisch nachgewiesener Larve, bei denen die Larve entweder als *T.canis* identifizierbar oder mit *T.canis* vereinbar war, ohne dass eine sichere Artdifferenzierung erfolgen konnte (confirmed case).
2. a) Patienten, die bei ophthalmologischen Untersuchungen einen Befund zeigte, der vereinbar ist mit einer okulären Larva migrans (OLM) (probable case).

b) Patienten mit viszeraler Larva migrans (VLM), bei denen das zentrale Nervensystem (ZNS) beteiligt war und der Nachweis einer intrathekalen Antikörpersynthese gegen *T.canis* geführt werden konnte (probable case).

c) Patienten, bei denen eine VLM ohne Beteiligung des ZNS, aber mit mindestens einem der Laborbefunde (Eosinophilie, Leukozytose) und mindestens einem der Befunde (Lungeninfiltrate, Hepato-/Splénomegalie, Fieber, Granulome) erhoben werden konnte. Darüber hinaus müssen sie mindestens eine pulmonale und/oder abdominelle und/oder eine neurologische Symptomatik aufweisen (probable case).
3. Patienten, die weniger als 3 der oben erwähnten Bedingungen erfüllten (possible case).

Bei keinem Patienten konnte die Larve von *T.canis* histologisch nachgewiesen werden, so daß der Gruppe 1 kein Patient zugeordnet werden konnte. Insgesamt lassen sich somit 2 Hauptgruppen gegenüberstellen: Gruppe 2 (2a, 2b, 2c): Patienten mit einer wahrscheinlichen (probable) Toxocariasis und Gruppe 3: Patienten mit einer möglichen (possible) Toxocariasis.

5.2 Untersuchung der Seren von Patienten mit Verdacht auf eine *T.canis*-Infektion

5.2.1 Untersuchung der Patienten nach klinischen Einteilungskriterien

Auswahlkriterium für die Patientenserum war ein hoher Antikörpertiter (>100 AKE) im IgG-ELISA. 138 Patienten erfüllten das geforderte Kriterium. 100 dieser Patienten konnten an Hand der Akten entsprechend den oben genannten klinischen Kriterien den Gruppen 2a, 2b,

2c und 3 wie folgt zugeordnet werden: der Gruppe 2a wurden 4 Seren, der Gruppe 2b 6, der Gruppe 2c 33 und der Gruppe 3 57 Seren zugeordnet.

Die Verteilung der Parameter bei der Auswertung der Patientenakten ergab, verglichen mit den Ergebnissen, die die Untersuchung der 22 Publikationen zeigten, nur geringe Unterschiede; abdominelle Symptome waren wesentlich seltener in den Publikationen, Granulome hingegen waren in diesen wesentlich häufiger (Abb.9 / Abb.11).

Stellt man dagegen die Häufigkeiten der einzelnen Parameter aus unseren Daten für die Gruppen 2 und 3 gegenüber, zeigt sich eine große Übereinstimmung in den subjektiven Kriterien (Symptome) und eine große Abweichung in den objektiven (Laborbefunde, Befunde) (Abb.12).

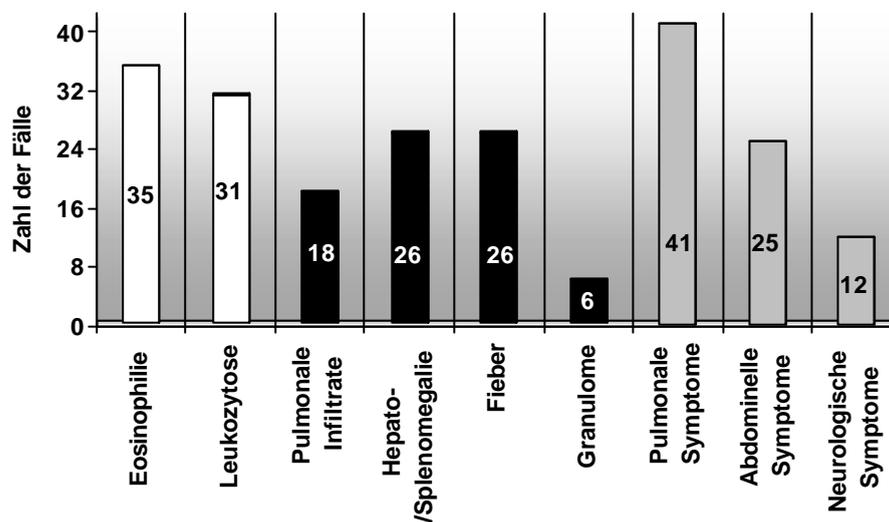


Abb.11 Häufigkeit der Laborbefunde (weiß), Befunde (schwarz) und Symptome (grau) unter den 100 Patienten

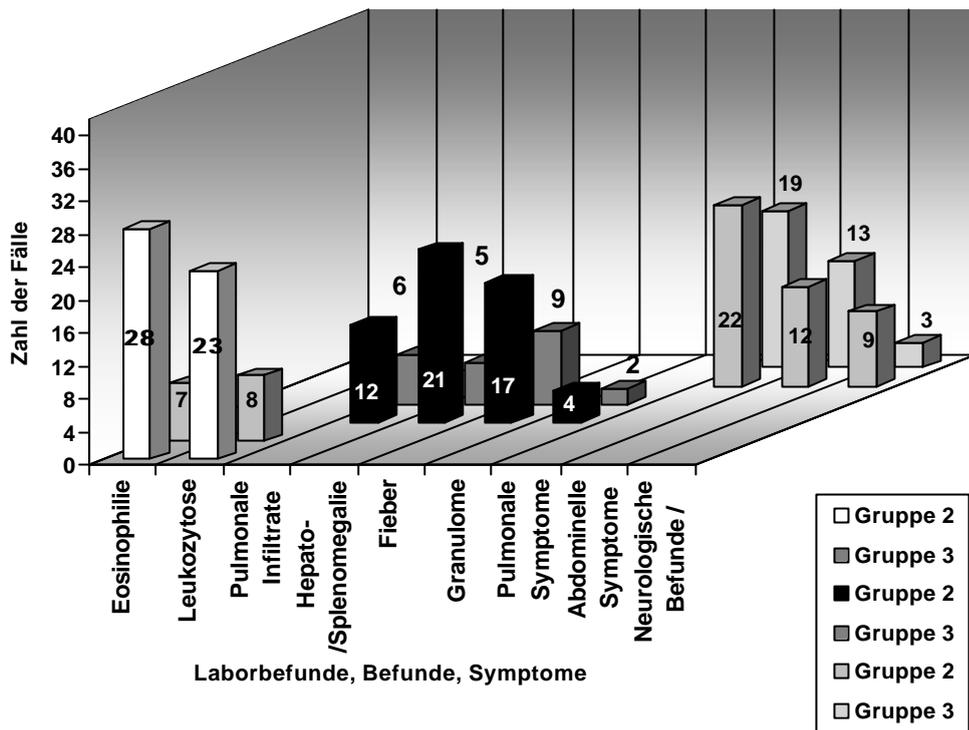


Abb. 12: Verteilung der Befunde und Symptome in den beiden Hauptgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 3)

5.2.2 EITB

98 der insgesamt 100 untersuchten Seren von Patienten mit *Toxocariasis* zeigten ein positives Ergebnis im Enzyme-linked Immunelectrotransfer blot (EITB) (Abb.13).

5.2.3 IgG₄-ELISA

Im IgG₄-ELISA waren 33 der untersuchten 100 Patienten (Abb.13) positiv. In der ersten Gruppe, 2a bezeichnet, war ein Serum IgG₄ positiv, in Gruppe 2b waren 2 Seren, in Gruppe 2c 11 und in Gruppe 3 waren 19 Seren positiv (Abb.14).

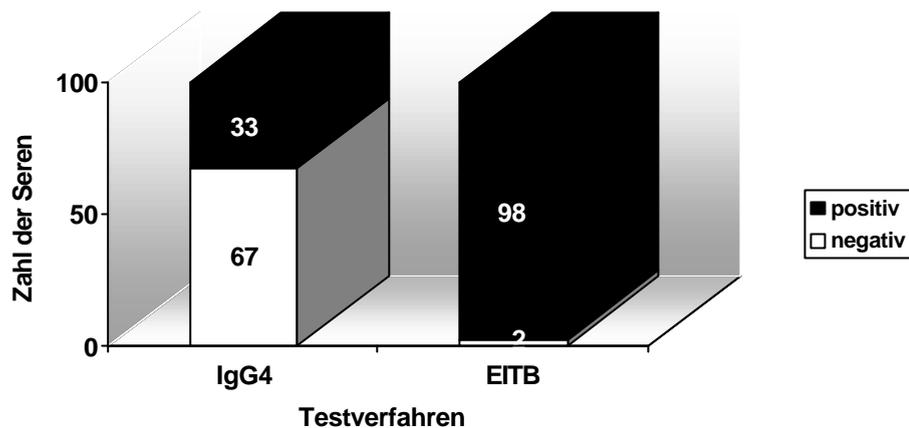


Abbildung 13: Übersicht der im IgG₄ und EITB getesteten 100 Seren von Patienten mit wahrscheinlicher Toxocariasis

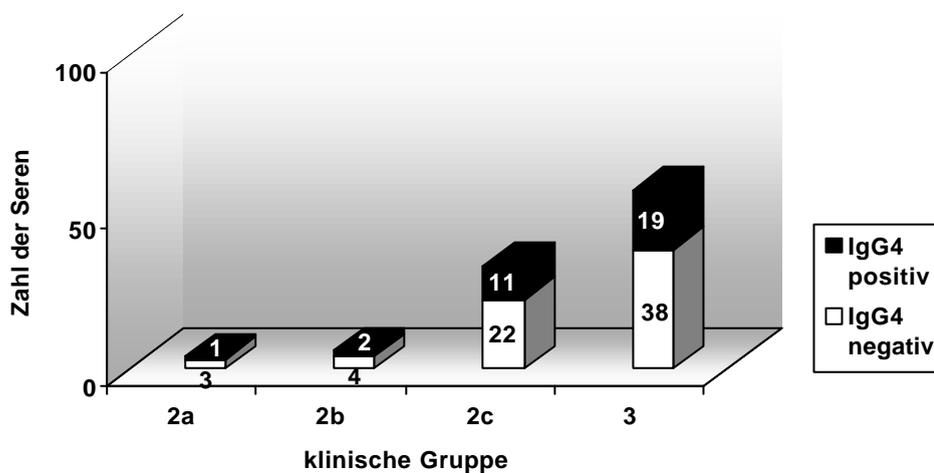


Abbildung 14: IgG₄ getestete Patientenserum, aufgeteilt nach klinischen Gruppen

Bei 7 der 100 Patienten war eine Verlaufs-Untersuchung möglich. Dazu wurden 2 Blutentnahmen im Abstand von mindestens einem Jahr analysiert. 2 der 7 Seren waren bei der ersten Blutabnahme im IgG₄-ELISA positiv, die restlichen Seren negativ. Das Ergebnis der zweiten Blutuntersuchung zeigte keine Veränderung des Befundes (Tab.2). Im IgG-ELISA zeigten alle Seren ebenfalls einen unveränderten Antikörpertiter von >100 AKE.

Tabelle 2: Übersicht über Antikörpertiter im IgG-ELISA von 7 Patienten im zeitlichen Verlauf

Personen / Verlauf	Extinktion	Extinktion
1. 1989-1991	0,551	0,619
2. 1992-1996	0,709	0,692
3. 1993-1994	0,057	0,009
4. 1992-1993	0,115	0,048
5. 1996-1997	0,106	0,117
6. 1992-1995	0,080	0,018
7. 1994-1995	0,072	0,015

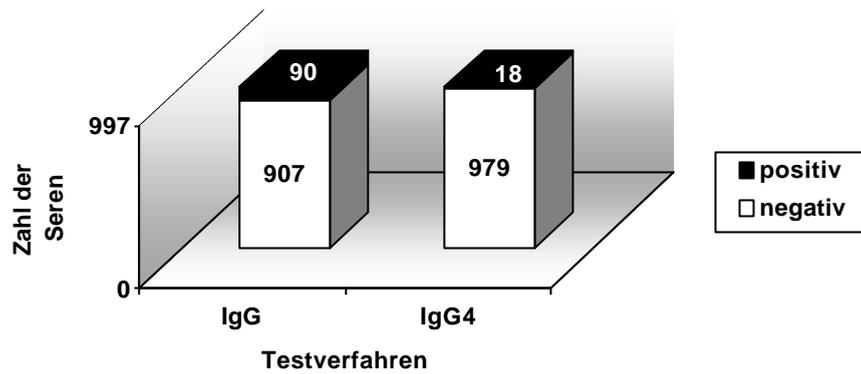
5.3 Untersuchung der Seren von Blutspendern (Kontrollgruppe)

5.3.1 IgG-ELISA

997 Seren des BRK Blutspendendienstes München standen zur Verfügung. 90 Seren waren positiv, d.h. wiesen einen AKE >20 auf, und somit ergab sich eine Prävalenz der Seropositivität in der Bevölkerung aus München und Umgebung von 9% (Abb.15). Um einen Vergleich mit den Patientenserum mit Verdacht auf eine Toxocariasis anstellen zu können, werden nur Seren mit einem AKE >100 berücksichtigt. Unter diesem Gesichtspunkt verbleiben 24 Seren (2,4%) positiv.

5.3.2 IgG₄-ELISA

Von 997 Blutspenderseren waren 18 Seren im IgG₄-ELISA positiv, dies entspricht 1,8%. Betrachtet man nur die im Screening positiven 90 Seren, so waren 14 Blutspenderseren (16%) im IgG₄-ELISA positiv und 5 Seren (21%) bezogen auf die im IgG-ELISA 24 hoch positiven Seren (Abb.15).



	IgG+	IgG-	
IgG ₄ +	14	4	18
IgG ₄ -	76	903	979
	90	907	997

Abbildung 15: Testung der Blutspenderseren mit IgG- und IgG₄-ELISA

5.4 Untersuchung der kreuzreagierenden Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose

Von 59 kreuzreagierenden Seren wiesen 18 Seren im IgG-ELISA einen AKE >100 auf (Abb. 16).

5.4.1 EITB

Im Western Blot war lediglich eines der 18 Seren, die im Test mit dem IgG-ELISA hoch positiv waren, d.h. einen AKE >100 aufwiesen, negativ (Abb.16 / Abb.17).

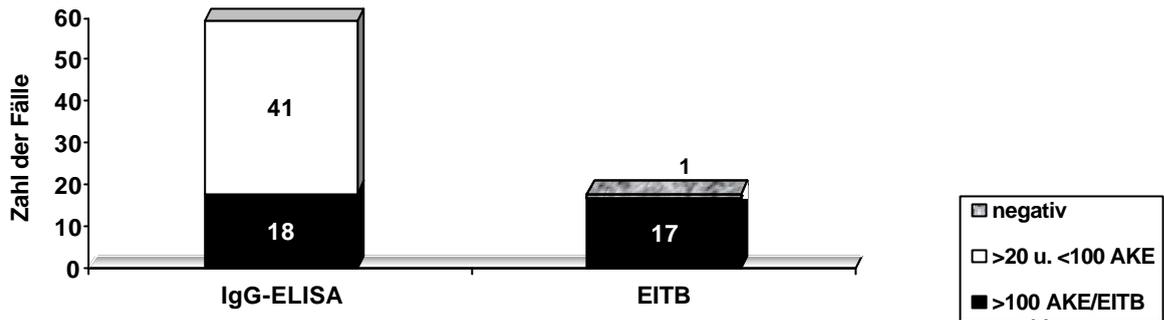
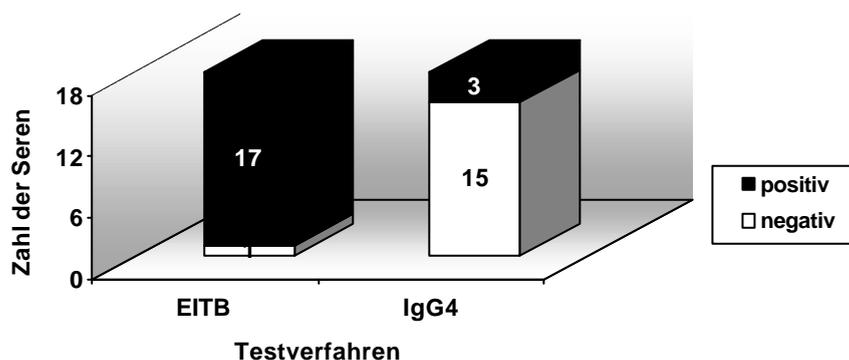


Abbildung 16: Aufteilung nach AKE im IgG-ELISA und Testung der Seren >100 AKE mit EITB

5.4.2 IgG₄-ELISA

In dieser Untersuchung waren drei (17%) der 18 Seren, bei denen sich im IgG-ELISA ein Titer von mehr als 100 AKE nachweisen ließ, positiv (Abb.16 / Abb.17). Von den übrigen 41 Seren (>20 AKE und <100 AKE) 2 (0,5%). Insgesamt waren somit 5 von 59 kreuzreagierenden Seren (8,5%) im IgG₄-ELISA positiv.



	EITB+	EITB-	
IgG ₄ +	3	0	3
IgG ₄ -	14	1	15
	17	1	18

Abbildung 17: IgG₄ und EITB der Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose und mehr als 100 AKE im IgG-ELISA

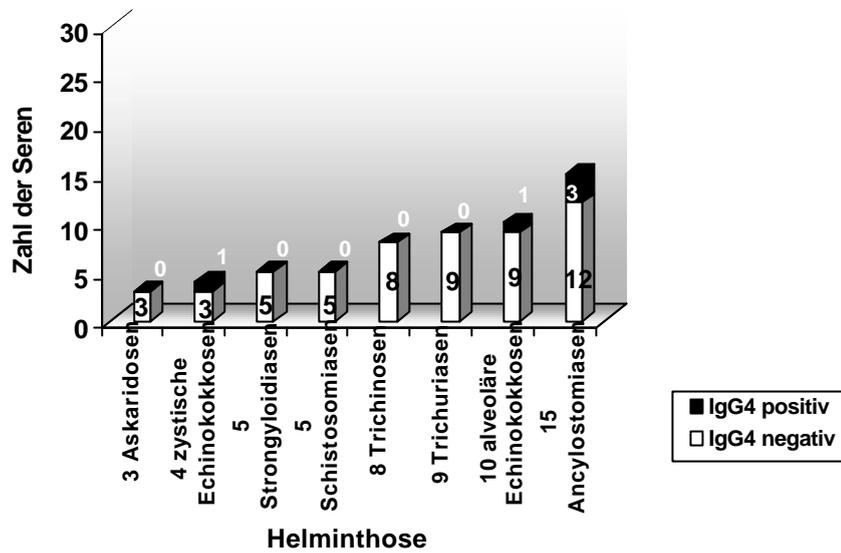


Abbildung 18 a: Verteilung nach Helminthosen und nach den Ergebnissen im IgG₄-ELISA (Gesamtübersicht, n=59)

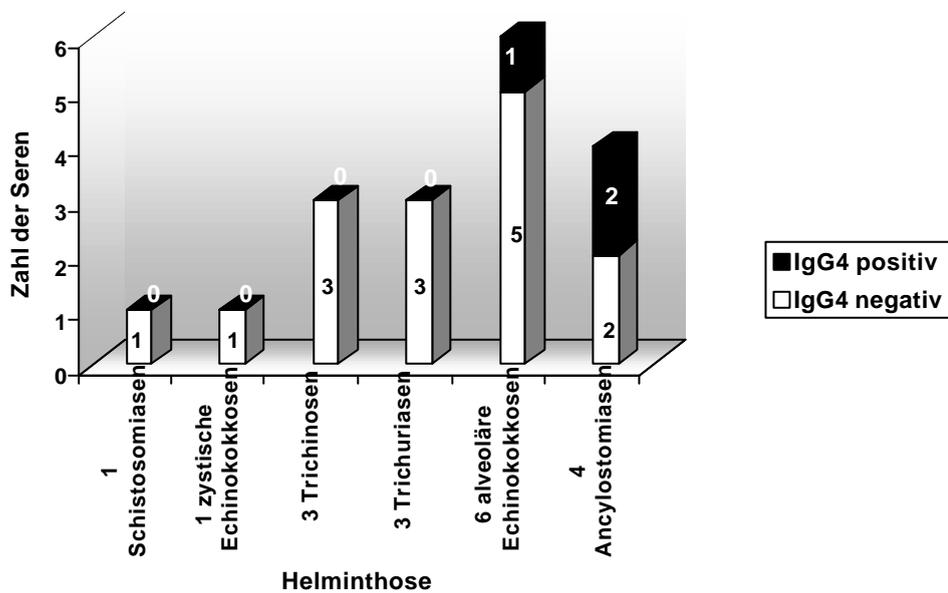


Abbildung 18 b: Verteilung nach Helminthosen und nach den Ergebnissen im IgG₄-ELISA (Übersicht der im IgG-ELISA hoch positiven Seren, n=18)

5.5 Auswertung der mit Verdacht auf eine Toxocariasis untersuchten Proben aus dem eigenen Patientengut und anderen Zentren

Insgesamt handelt es sich um 4298 Seren die in den Jahren 1988 bis 1997 in der Abteilung wegen des Verdachts auf eine Infektion mit *T.canis* mit dem IgG-ELISA auf Antikörper untersucht wurden. 1094 Seren reagierten positiv auf *T.canis*; 427 Proben davon wiesen einen Antikörpertiter von >100 AKE auf; das entspricht einem Prozentsatz von 9,9.

6 Diskussion

Die Toxocariasis ist eine weltweit vorkommende Erkrankung, die im klinischen Alltag nur selten differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen wird. Ein Grund dafür ist sicherlich das klinisch sehr variable Erscheinungsbild der Erkrankung. Die Diagnostik stützt sich vor allem auf serologische Untersuchungen wie den IgG-ELISA; Biopsien und Punktionen sind oft nicht indiziert und der direkte Larven-Nachweis im gewonnenen Material gelingt nur sehr selten. Die Aussagekraft der serologischen Verfahren wird jedoch durch einen hohen Anteil an falsch positiven Reaktionen nachhaltig beeinträchtigt. Ursächlich hierfür sind vor allem Kreuzreaktionen mit Antigenen verwandter Helminthenspezies oder auch anderen ubiquitär vorkommenden Antigenen wie etwa Phosphorylcholin. Die Möglichkeit eines Durchseuchungsgrades der gesunden Bevölkerung muss auch in Erwägung gezogen werden.

Der in dieser Arbeit entwickelte IgG₄-ELISA stellt den Versuch dar, v.a. Kreuzreaktionen zu vermindern oder sogar ganz zu eliminieren und dadurch zur Verbesserung der serologischen Diagnostik der Toxocariasis beizutragen.

Klinik

22 Publikationen über Fälle mit histologischem Nachweis von *T.canis* (s. Tabelle 1, S. 24) wurden nach Befunden und Symptomen ausgewertet und nach einem Scoresystem in Gruppen unterschiedlicher klinischer Wahrscheinlichkeit einer Toxocariasis abgestuft. Die Bezeichnung der Gruppen in nachgewiesene, wahrscheinliche und mögliche Toxocariasis, erfolgte konform dem Modell der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta (siehe Punkt 5.1). Die Betrachtung der 100 Patienten nach den verschiedenen Parametern (Abb.11), die sich bei der Auswertung der Publikationen ergaben, führt zu folgender Feststellung: Im Bereich Laborbefunde waren es v.a. eine Eosinophilie und etwas weniger eine Leukozytose, bei den übrigen Befunden eine Hepato-/Splénomegalie und Fieber, die häufig vorkamen. Bei den Symptomen überwiegen die pulmonalen Symptome, wie Husten und Atemnot; abdominelle Symptome, wie Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen dagegen traten seltener auf. Granulome fanden sich deutlich häufiger bei den publizierten Fällen, da bei diesen hier zumeist auch der Nachweis einer Larve geführt werden konnte. In unserem Patientengut dagegen wurden nur selten Granulome gefunden und keine Larven nachgewiesen (Gruppe 1 siehe Punkt 5.1). Die 100 Patienten konnten in 2 Gruppen mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung einer Toxocariasis eingeteilt werden. Die erste (Gruppe 2 siehe Punkt 5.1) umfasste 43 Patienten mit einer wahrscheinlichen

(probable) Toxocariasis, die zweite (Gruppe 3 siehe Punkt 5.1) 57 Patienten mit einer möglichen (possible) Toxocariasis.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Gruppen im Hinblick auf die verschiedenen Einteilungsparameter fand sich eine Übereinstimmung in den subjektiven Kriterien (Symptomen) und eine Divergenz in den objektiven Parametern (Laborbefunde, Befunde) (Abb.12); so traten pulmonale Symptome fast in gleicher Häufigkeit in beiden Gruppen auf, abdominelle waren sogar häufiger in der Gruppe 3. Lungeninfiltrate, Hepato-/Splénomegalie und Fieber dagegen waren doppelt so häufig in der Gruppe 2 vorhanden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen traten in den Untersuchungen mit serologisch nachgewiesener *T.canis*-Infektion von Harrison-Snyder (Harrison-Snyder, 1961) und denen von Huntley (Huntley et al., 1965) im Besonderen eine Hepatomegalie, Fieber und pulmonale Symptome auf. Abdominelle Symptome wie sie bei Taylor (Taylor et al., 1988) und auch bei Gillespie (Gillespie, 1988) gefunden wurden, fanden sie nicht. Eine unseren Untersuchungen ähnliche Frequenz und ein ähnliches Erscheinungsbild der neurologischen Symptome, wie Krämpfe, Schlafstörungen und Parästhesien wurden von Huntley, Taylor und Gillespie (Gillespie, 1993) beobachtet. Gillespie wies allerdings darauf hin, dass bei einigen Personen Fieber die Ursache für die Krämpfe war; auch Huntley und Taylor vermerkten in ihren Publikationen die Schwierigkeit, die gefundenen neurologischen Symptome auf eine Toxocariasis zurückzuführen. Daten zu Lymphadenopathien und Hautveränderungen, wie Huntley, Taylor und Gillespie sie in ihren Arbeiten angaben, wurden von uns nicht erhoben.

Seroprävalenz

Die Durchseuchung ist ein Faktor, der die Aussagekraft eines Tests beeinträchtigt. Durchseuchung bedeutet einerseits, dass eine infizierte Person keine Symptomatik aufweist, in den serologischen Untersuchungen auf *T.canis* jedoch einen positiven Befund hat. Andererseits kann die Person eine Infektion schon durchgemacht haben, aber dennoch eine jahrelange Persistenz des Antikörpertiters gegen *T.canis* zeigen (Nicholas et al., 1986). Eine serologische Unterscheidung zwischen einer akuten und einer chronischen Infektion ist bislang nicht möglich.

Blutspender

Die Auswertung der 997 Seren von Blutspendern aus dem Raum München auf Antikörper der Klasse IgG im ELISA ergab 90 (9,0%) positive Seren. Eine ähnlich hohe Durchseuchung (11,8%) stellte Havasiova bei ihrer Studie mit dem IgG-ELISA bei Blutspendern aus städtischen Gebieten in der Slowakei fest (Havasiova et al., 1993). Stürchler berichtet in

seinen Untersuchungen von Blutspendern aus der Region Basel, dem Jura und dem Raum Zürich auf *T.canis*-Antikörper über eine Durchseuchung von 5,1% (Stürchler et al.,1986). Kimmig gibt bei Blutspendern aus dem Raum Stuttgart eine Seroprävalenz von 4,8% an (Kimmig et al., 1991). Betrachtet man die einzelnen Angaben, so ist hier eine Tendenz von höheren Durchseuchungen in östlichen Gebieten Europas zu niedrigeren in westlicher gelegenen Regionen nachzuvollziehen. Unterstützt wird dies durch Kimmig, der in der bereits genannten Studie unter Probanden aus osteuropäischen Ländern eine Durchseuchung von 17,7% feststellte.

Da man sich in der helminthologischen Diagnostik weder national noch international auf Standards geeinigt hat, muss man zahlreiche Faktoren bedenken, die v.a. die Vergleichbarkeit der Studien und damit der Ergebnisse einschränken. Die verwendeten Antigene unterscheiden sich in ihrer Qualität und werden von Labor zu Labor in unterschiedlichen Beschichtungskonzentrationen verwendet. Ebenso sind die Kontrollseren und deren Verdünnungen unterschiedlich. Ein zentraler Punkt jedoch ist sicherlich der Cut-off, also der Extinktionswert, von dem an ein Testserum positiv oder negativ bewertet wird. Wir haben ein Serum ab 20 Antikörpereinheiten positiv bewertet; dies entspricht etwa einem Extinktionswert von 0,810. Bei den anderen Autoren schwankt der Extinktionswert des Grenzwertes zwischen 0,415 und 0,600.

Unter den positiv getesteten Blutspenderseren können durch unspezifische Reaktionen auch falsch positive Ergebnisse vorkommen, es ist daher interessant sich, die Antikörpertiter von kreuzreagierenden Seren, d.h. von Patienten mit einer nachgewiesenen anderen Helminthose, anzusehen. Die Antikörpertiter der 59 Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose lagen v.a. im Bereich zwischen >20 und <100 AKE (69,5%).

Deshalb schien es sinnvoll, unsere Kontrollseren (997 Blutspenderseren) in 2 Gruppen zu unterteilen. Sie wurden in eine schwach positive Gruppe (>20 AKE und <100 AKE), die möglicher Weise stärker mit Kreuzreaktivität belastet ist, und in eine hoch positive Gruppe (>100 AKE) unterteilt. Dadurch ergaben sich 66 (6,6%) schwach positive und 24 (2,4%) hoch positive Seren.

Stürchler unterscheidet 765 Blutspenderseren in 2 Gruppen mit unterschiedlichen Extinktionen im IgG-ELISA mit E/S-Antigen; in der Gruppe mit niedrigen Extinktionswerten waren 5,5% und in der Gruppe mit hohen Extinktionswerten 7,1% der 765 Seren positiv. Havasiova hingegen unterteilte die 908 Blutspenderseren in 3 Gruppen unterschiedlicher Absorption: Seren mit niedriger (7,8%), mit mittlerer (2,2%) und mit hoher Absorptionsrate (2,0%) im IgG-ELISA mit E/S-Antigen der Larve. Somit ergab sich bei diesen Untersuchungen für hoch positive Seren eine Prävalenz von 2%, 2,4% und 7,1% und für schwach positive Seren eine von 7,8%, 6,6% und 5,5%.

Patienten

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit Personen, bei denen der Verdacht auf eine Infektion mit *T.canis* besteht. Untersuchungen in Grossbritannien mit dem IgG-ELISA ergaben für Patienten (n=1403) mit dem Verdacht auf eine Toxocariasis Prävalenzen von 5,2% hoch positiver Befunde (Ree et al., 1984) und 7% bei einer retrospektiven Untersuchung der Seren von Patienten mit einer Eosinophilie (n=1836) in Frankreich (Gueglio et al., 1994). In unserer Abteilung wurden in den Jahren 1988-1997 4298 Seren von Personen, bei denen der Verdacht auf eine Infektion mit *T.canis* bestand, untersucht. Die Prävalenz betrug 9,9% hoch positiver Seren (>100 AKE).

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch der Vergleich der IgG-ELISA Ergebnisse (>100 AKE) der Gruppe von 4298 Patienten mit denen der Gruppe der Blutspender. Die Prävalenz für die erste Gruppe beträgt 9,9%, für die zweite ergaben unsere Studien den schon erwähnten Durchseuchungstiter von 2,4%. Die Wahrscheinlichkeit, auf Grund einer klinischen Symptomatik bei der serologischen Untersuchung auf *T.canis* einen positiven Befund zu erhalten, ist somit 4mal höher als bei Personen ohne eine verdächtige Symptomatik. Ein ähnliches Verhältnis mit 3:1 gibt Havasiova für die Gruppe der Patienten mit klinischem Verdacht zur Gruppe der Blutspender an (5,9% gegenüber 2%) (Havasiova et al., 1993).

Betrachtet man dagegen die schwach positiven Seren (>20 und <100 AKE) der oben genannten Gruppen, ergibt sich kein wesentlicher Unterschied; so stehen 15,6% schwach positive Patientenserum 17,9% schwach positiven Blutspenderseren gegenüber.

Laborbefunde und Wertigkeit des IgG₄-ELISA

Im Rahmen der Untersuchung der 22 Publikationen wurden auch entsprechende Laborparameter untersucht; häufig waren eine Eosinophilie und eine Leukozytose. In der Auswertung unserer Patientenakten nach diesen Kriterien waren Eosinophilie und Leukozytose 4mal häufiger in der Gruppe mit einer wahrscheinlichen (probable) Toxocariasis als in der Gruppe mit einer möglichen (possible) Toxocariasis. Um den Verdacht einer Infektion mit *T.canis* zu äußern, legen andere Autoren neben den genannten Parametern noch Wert auf den Nachweis von Isohämagglutininen Anti-A und Anti-B, Hypergammaglobulinämie und eine Erhöhung von IgE (Areà und Carandall, 1971; Fanning et al., 1981). Da die genannten laborchemischen Auffälligkeiten jedoch in der Folge zahlreicher Helminthosen, wie einer Schistosomiasis (Hagan et al., 1991) oder anderer Erkrankungen, wie Asthma (Feldman and Parker, 1992) auftreten können, kann man sie in

der Diagnostik insgesamt nur als Zusatzkriterien ansehen. In den meisten der 22 Referenzpublikationen wurden diese Parameter nicht beachtet; daher haben auch wir diese nicht berücksichtigt. Während es bei einer Infektion mit *T.canis* generell zu einer Eosinophilie und Leukozytose kommen kann, muß es in den zum Teil häufig befallenen Organen, wie etwa der Leber, nicht zu pathologisch veränderten organspezifischen Laborparametern kommen (Areà und Crandall, 1971).

EITB

Derzeit werden der IgG-ELISA und der EITB mit dem E/S-Antigen der Larve als die serologischen Verfahren der Wahl zur Diagnostik der Toxocariasis angesehen. Dieses Antigen hat sich gegenüber anderen, wie das somatische Antigen adulter Würmer, spezifischer und empfindlicher erwiesen (Glickman et al., 1985, Carlier et al., 1982).

Magnaval hat die Diagnostik der Toxocariasis mittels EITB etabliert und eine Korrelation zwischen dem IgG-ELISA und dem EITB insbesondere zwischen der Zahl der Banden im EITB und den Ergebnissen im IgG-ELISA gefunden. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse an einem Patientenkollektiv mit anderen Helminthosen postuliert er eine höhere Spezifität des EITB gegenüber dem IgG-ELISA und geht von einer gleich hohen Sensitivität der beiden Testverfahren aus (Magnaval, 1991). Demzufolge würde man eine Erhärtung der Diagnose einer Toxocariasis und eine deutliche Verminderung kreuzreagierender Seren von Patienten mit einer nachgewiesenen anderen Helminthose erwarten.

Der hoch positive IgG-ELISA war das Auswahlkriterium für die in die Studie eingeschlossenen 100 Patientenserumproben und - zum Vergleich - für 18 Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose. Diese insgesamt 118 Seren wurden getestet mit den Immunoblot (EITB)-Streifen, beschichtet mit dem E/S-Antigen der Zweitlarve von *T.canis* und hergestellt von der Firma LDBIO Diagnostics. Von den 100 Patientenserumproben waren wie erwartet lediglich 2 negativ. Von den 18 Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose, bei denen man weniger positive Befunde im Gegensatz zum IgG-ELISA erwartete, war nur ein einziger Befund negativ. Der EITB hilft also nicht weiter, Kreuzreaktionen zu identifizieren und ist als Bestätigungstest nicht zu empfehlen.

IgG₄-ELISA

Zur Evaluation des IgG₄-ELISA dienten 3 Kollektive. 100 Seren von Patienten, die im IgG-ELISA hoch positiv waren und die entsprechend dem bereits erläuterten Score in 2 Hauptgruppen eingeteilt werden konnten. Das zweite Kollektiv bestand aus 59 Seren von Patienten, bei denen eine andere Helminthose nachgewiesen werden konnte und das dritte aus 997 Blutspenderseren. Um die 3 Kollektive vergleichen zu können, wurden in allen Kollektiven nur die Seren mit einem AKE >100 berücksichtigt. Somit standen 100

Patientenseren, 18 Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose und 24 Seren von Blutspendern zur Verfügung.

Patientenseren

In der Untersuchung der beiden Hauptgruppen mit dem IgG₄-ELISA waren 14 von 43 Seren (32,6%) der Gruppe 2 positiv und 19 der 57 Seren (33,3%) der Gruppe 3. Für beide Gruppen mit Seren von Patienten mit einer ausgewählten Symptomatik ergaben sich somit 33% positive Befunde. V.a. in der Gruppe 2 sind die Laborbefunde wie Eosinophilie und Leukozytose und Befunde wie pulmonale Infiltrate, Hepato-/Splenomegalie und Fieber, die für ein akutes Geschehen sprechen, häufig anzutreffen. Bei den klinischen Erscheinungen, wie pulmonalen, abdominellen und neurologischen Beschwerden allerdings sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nur gering ausgeprägt. Vermutlich spiegeln sich in den Gruppen zwei unterschiedliche zeitliche Phasen einer Infektion mit *T.canis*, nämlich die akute (Gruppe 2) und die chronische (Gruppe 3) wider. Dennoch bleiben bei der Gruppe 3 folgende Fragen offen: Persistieren die Symptome einer Toxocariasis möglicherweise in der chronischen Phase? Liegt lediglich eine Serumnarbe vor und sind die fortbestehenden Symptome vielleicht eine Folge von Nebenerkrankungen oder anderen Erkrankungen? Handelt es sich möglicherweise nur um Kreuzreaktionen und die Symptome sind in Wirklichkeit einer anderen Ätiologie zuzuordnen?

Seren mit nachgewiesener anderer Helminthose

Von den 18 im Screening hoch positiven Seren waren im IgG₄-ELISA 3 (17%) positiv. Kreuzreaktionen traten im IgG₄-ELISA lediglich bei 2 Patienten mit einer Hakenwurminfektion und 1 Patient mit einer alveolären Echinokokkose auf. Das Spektrum an kreuzreagierenden Helminthenspezies umfasste somit weit weniger Spezies als im Screening mit dem IgG-ELISA. Schon im Screening deutete sich die Kreuzreaktivität der Seren von Patienten mit einer alveolären Echinokokkose an: 6 von 10 kreuzreagierenden Echinokokkose-Seren waren im Screening hoch positiv. Bei Hakenwurminfektionen hingegen waren es nur 4 von 15 Seren.

Die Zahl der Seren von Patienten mit verschiedenen Helminthenspezies war bezogen auf die einzelnen Spezies gering (3 bis 15 Seren pro Spezies, Abb.18a,18b), so dass sich nach dem Screening nur 18 hoch positive Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose ergaben.

Der Prozentsatz IgG₄-positiver Befunde der Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose betrug 17 Prozent und ist verglichen mit 33 Prozent IgG₄-positiver Seren von Patienten mit Verdacht auf eine Toxocariasis um nahezu die Hälfte geringer.

Ähnlich wie unsere Untersuchungen mit dem IgG₄-ELISA bei der Toxocariasis zeigen, hat die Verwendung des IgG₄-ELISA in der Diagnostik der Filariosen (*Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* und *Loa loa*) zur Verbesserung der Diagnostik beigetragen (Ottesen et al., 1985; Cabrera et al., 1986; Lal und Ottesen, 1988; Egwang et al., 1989; Weil et al., 1990; Kwan Lim et al., 1990; Egwang et al., 1994). Ein Grund dafür kann, wie Aalberse und auch Hamilton vermuten, die Bildung von Antikörpern der Subklasse IgG₄ bei chronischer Antigenexposition sein (Aalberse et al., 1983; Hamilton, 1987). Klinische Studien anderer Autoren zeigten ebenfalls eine Erhöhung von IgG₄-Antikörpern bei chronischer Schistosomiasis (Iskander et al., 1981), bei Echinokokkose (Wen und Craig, 1994; Grimm et al., 1998) und bei Dracunculiasis (Bloch und Simonsen, 1998). Auch bei zu *T.canis* näher verwandten Helminthenspezies wie dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides* (Chatterjee et al., 1996; Santra et al., 2001) und dem Hakenwurm *Necator americanus* (Palmer et al., 1996) zeigte sich mit dem ELISA unter Verwendung somatischer Antigene (Palmer et al., 1996) oder der E/S-Antigene (Chatterjee et al., 1996) eine vermehrte Nachweisbarkeit von Antikörpern der Subklasse IgG₄. Erste Untersuchungen wiesen auch bei einer Trichinellosis positive Ergebnisse auf (Pinelli et al., 2001). Obengenannte Spezies können jahrelang im Körper verweilen und stellen somit einen chronischen Stimulus zur Antikörperproduktion dar. IgG₄, das kaum eine Komplementaktivierung und Antigenvernetzung initiiert, konkurriert mit IgE um die Antigenbindung und vermag dadurch die IgE-vermittelte Immunantwort zu hemmen (Hamilton, 1987; Uhlikova et al., 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass Phosphorylcholin, ein weitverbreitetes Epitop unter Helminthen und anderen Organismen, das für zahlreiche Kreuzreaktionen bei IgG verantwortlich ist, im Menschen nicht zu einer Stimulation von IgG₄-Antikörpern führt (Lal und Ottesen, 1988). Vor allem durch die gute Spezifität des IgG₄-ELISA, wie unsere Beobachtungen bei Patienten mit einer Toxocariasis oder die Untersuchungen bei Patienten mit verschiedenen anderen Helminthosen zeigen, erscheint die Verwendung dieses Tests neben den herkömmlichen Testverfahren zur Verbesserung der Immundiagnostik sinnvoll und wegweisend.

Blutspenderseren

Unter den 24 im Screening hoch positiven Blutspenderseren fanden sich mit dem IgG₄-ELISA 5 positive Seren; und somit ist die Prävalenz der IgG₄-positiven Seren unter den IgG-hoch positiven Seren des Blutspenderkollektivs 21%. Die Zahl positiver Befunde bei den Patientenseren mit Verdacht auf eine Toxocariasis (33%) ist somit um mehr als ein Drittel größer als bei den Blutspenderseren (21%). Diese beiden Gruppen unserer Studie entsprechen den symptomatischen (VLM und OLM) Patienten und den asymptomatischen Personen, die Obwaller in seiner Studie mittels ELISA unter anderem auf IgG₄-Antikörper

untersucht hat. Auch seine Ergebnisse zeigen eine vermehrte, sogar signifikant höhere IgG₄-Antikörperproduktion bei symptomatischen Patienten gegenüber asymptomatischen Personen (Obwaller et al., 1998).

Schlussfolgerungen

1. Bei 33% der Patienten mit dem Verdacht einer Toxocariasis ergab sich eine Assoziation zwischen den hoch positiven Befunden im IgG-ELISA, den positiven Befunden im IgG₄-ELISA und den laborchemischen und den klinischen Befunden und Symptomen einer Toxocariasis. So dass nach zweimaliger Untersuchung, d.h. IgG-ELISA Screening und IgG₄-ELISA die Anzahl wiederholt positiver Befunde bei den Patienten mit dem Verdacht auf eine Toxocariasis (33%) annähernd doppelt so groß war wie bei den IgG hoch positiven Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose (17%) und um mehr als ein Drittel größer als bei den IgG hoch positiven Blutspenderseren (21%). Die Kombination beider Testverfahren kann daher bei zweifach positivem Befund als Indikator bezeichnet werden.
2. Auch bei Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose und Blutspenderseren war ein zweifach positiver Befund im IgG₄-ELISA und IgG-ELISA vereinzelt vorhanden. Diese Personen unterschieden sich aber von den Personen mit dem Verdacht auf eine Toxocariasis, in dem sie andere Symptome (Patienten) oder keine Symptome (Blutspender) aufwiesen. Für diese Gruppen ergab sich somit keine Assoziation zwischen den oben genannten positiven serologischen Befunden und den laborchemischen und klinischen Befunden und Symptomen.
3. Der IgG₄-ELISA trägt vor allem zur Verbesserung der Spezifität in der Diagnostik der Toxocariasis bei. So wird zum Einen in der Literatur beschrieben, dass weitverbreitete Epitope wie Phosphorylcholin nicht zu einer Stimulation von IgG₄ führen und zum Anderen zeigen unsere Untersuchungen der Seren von Patienten mit anderen Helminthosen eine deutliche Reduzierung von Kreuzreaktionen in Vergleich zum IgG-ELISA.
4. Der EITB weist bei der Untersuchung von 118 Seren (100 Seren von Patienten mit dem Verdacht einer Toxocariasis und 18 Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose) nahezu identische Ergebnisse zum IgG-ELISA auf, so dass der EITB demzufolge in der Diagnostik der Toxocariasis dem IgG-ELISA gleichwertig ist und nicht als Bestätigungstest zu empfehlen ist.

7 Zusammenfassung

Die Toxocariasis des Menschen ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit. Die Übertragung erfolgt auf fäkal-oralem Weg durch Aufnahme von Wurmeiern, die von den natürlichen Wirten - Hunden und Füchsen - ausgeschieden werden. Die Pathologie wird durch Wanderung, Lokalisation, Anzahl der Larven und durch die Intensität der Abwehrreaktion des Wirtes bestimmt. Diese bedingt beim Menschen, der eigentlich Fehlwirt ist, ein klinisch sehr variables Erscheinungsbild. Unterschieden werden können das klinisch meist schwerwiegendere okuläre und das klinisch eher polymorphe viszerale Larva migrans-Syndrom. Aber nicht nur die klinische Diagnostik angesichts unterschiedlich häufiger und unterschiedlich ausgeprägter klinischer und laborchemischer Befunde und Symptome erscheint schwierig. Der Nachweis der Larve im Biopsat oder Punktat kann nur selten geführt werden, so dass der Immundiagnostik eine besondere Bedeutung zukommt. Die Aussagekraft der Antikörpernachweismethoden, wie der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder der Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot (EITB) mit dem exkretorisch/sekretorischen (E/S) Antigen der Zweitlarve werden durch den fehlenden Goldstandard, durch die Kreuzreaktionen mit Antigenen verwandter Helminthen oder auch mit weit verbreiteten Antigenen wie dem Phosphorylcholin (PC) und durch den Durchseuchungstiter eingeschränkt.

Da sich der IgG₄-ELISA bereits in der Immundiagnostik anderer Helminthosen, wie den Filariosen und Echinokokkosen bewährt hat, erschien die Untersuchung des IgG₄-ELISA auch bei einer Toxocariasis ein sinnvoller Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik. Auf der Basis des bereits etablierten IgG-ELISA wurde daher ein IgG₄-ELISA getestet.

Als Untersuchungsmaterial standen uns 4298 Patientenserum mit dem Verdacht auf eine Toxocariasis, 59 kreuzreagierende Seren von Patienten mit einer nachgewiesenen anderen Helminthose und 997 Blutspenderseren zur Verfügung.

Diese drei Kollektive wurden mit dem IgG-ELISA auf Antikörper gegen *T.canis* getestet. Auswahlkriterium war ein Antikörpertiter >100 Antikörpereinheiten (AKE). Das erste Kollektiv reduzierte sich dadurch auf 427 Seren. An Hand von 22 histologisch nachgewiesenen und publizierten Toxocariasis-Fällen haben wir ein klinisches Scoresystem entwickelt und konnten schließlich aus den 427 Patienten 100 gemäß Kriterien der CDC in eine Gruppe mit 43 wahrscheinlichen und eine Gruppe mit 57 möglichen Toxocariasis-Fällen einteilen.

Für die Evaluation des IgG₄-ELISA standen somit schließlich 100 Seren von Personen mit dem Verdacht einer Toxocariasis zur Verfügung. An Hand des Auswahlkriteriums reduzierte sich das zweite Kollektiv von 59 auf 18, und das dritte Kollektiv von 997 auf 24 Personen.

Die Untersuchung dieser Kollektive schließlich mit dem IgG₄-ELISA ergab: 33% positive Ergebnisse bei den Seren von Patienten mit dem Verdacht einer Toxocariasis (ohne

Unterschied zwischen den beiden klinischen Gruppen), 17% bei den Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose und 21% bei den Blutspenderseren.

Das bedeutet, dass nach Untersuchung mit zwei Testverfahren (IgG- und IgG₄-ELISA) die Anzahl positiver Befunde bei den Patienten mit Verdacht einer Toxocariasis doppelt so groß wie bzw. um mehr als ein Drittel größer ist als bei den anderen Kollektiven. Ein positiver Befund in beiden Testverfahren kann somit als Indikator für eine Toxocariasis dienen und stellt zusammen mit klinischen und laborchemischen Befunden und Symptomen das beste Verfahren zur Diagnostik einer Toxocariasis dar, zumal bei den anderen beiden Kollektiven (Blutspenderseren, Seren von Patienten mit einer anderen Helminthose) keine Assoziation zwischen den Testverfahren, laborchemischen und klinischen Befunden und Symptomen besteht. Der IgG₄-ELISA trägt hierbei, wie die Untersuchungen zeigen, zu einer Verbesserung v.a. der Spezifität der serologischen Untersuchungen bei.

8 Abkürzungsverzeichnis

AKE	Antikörpereinheiten
BRK	Bayrisches Rotes Kreuz
BSA	Bovine Serum Albumin
CMV	Zytomegalie-Virus
EITB	Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot = Immunoblot = Western Blot
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E/S	exkretorisch/sekretorisch
Fa.	Firma
h	hora = Stunde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horse-radish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IgG ₄	Immunglobulin G ₄
kDA	kiloDalton
MONA	Multiple of normal activity
OLM	okuläre Larva migrans
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
SDS	Na Dodecylsulfat
VLM	viszerale Larva migrans
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

Aalberse R., van der Gaag R., van Leeuwen J.

Serologic aspects of IgG₄ antibodies, I. Prolonged immunization results in an IgG₄-restricted response. J Immunol 1983; 130: 722-726

Aitken W.J., Roy K.P.

The eosinophilic syndrome. An epidemiological study. Trans R Soc Trop Med Hyg 1953; 47: 418-422

Annen J.M., Eckert J., Hess U.

Eine einfache Methode zur Gewinnung von Toxocara canis Antigen für die indirekte Immunfluoreszenz-Technik. Acta Trop 1975; 32: 37-40

Areán V.M., Crandall C.A.

Toxocariasis, In: Marcial-Rojas R.A.: Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. The Williams & Wilkins Company 1971; 808-842

Arman G. von, Campbell W.C.

Anti-inflammatory activity of Thiabendazole and its relation to parasite disease. Tex Rep Biol Med 1975; 33: 2-4

Asshauer E., Mohr W.

Thiabendazol in der Behandlung von Wurminfektionen. Arzneim Forsch 1966; 16: 428-431

Ashton N.

Larval granulomatosis of the retina due to Toxocara. Brit J Ophthal 1960; 44: 129-148

Auer H., Benke T., Maier H., Russegger L., Schmutzhard E., Aspöck H.

Toxokarose des Rückenmarks - ein Fallbericht. Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol 1990; 12: 61-68

Auer H., Aspöck H.

Toxokarose in Österreich - Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol 1995; 17: 61-70

Barna R., Olson L.J., Box Q.T.

Survey of Galveston children of antibodies to *Toxocara canis*. *J Parasitol* 1962; 48: 501-505

Bass J.L., Mahta K., Glickman L.T., Blocker R., Eppes B.M.

Asymptomatic Toxocariasis in children. *Clin Pediat* 1987; 26: 441-446

Beautyman W., Woolf A.L.

An ascaris larva in the brain in association with acute anterior poliomyelitis. *J Path Bact* 1951; 63: 635-647

Beaver P.C., Snyder C.H., Carrera G.M., Dent J.H., Lafferty J.W.

Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. *Pedia* 1952; 9: 7-19

Beaver P.C., Snyder H., Carrera G., Dent J., Lafferty J.

Toxocariasis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bull Soc Pathol Exot* 1962; 4: 555-562

Beaver P.C.

The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969; 55: 3-12

Becker W.

Zoonosen-Fibel. Hoffmann, Berlin 1992

Becroft D.M.O.

Infection by the dog roundworm *Toxocara canis* and fatal myocarditis. *N Z Med J* 1964; 63:729-732

Beshear J.R., Herdley J.O.

Severe pulmonary involvement in visceral larva migrans. *Am J Dis Child* 1973; 125: 599-600

Bisseru B., Woodruff A.W., Hutchinson R.I.

Infection with adult *Toxocara canis*. *Brit Med J* 1966; 1:1583-1584

Bisseru B., Woodruff A.W.

The detection of circulating antibody in human toxocara infections using the indirect fluorescent antibody test. *J Clin Pathol* 1968; 21: 449-455

Bloch P., Simonsen P.E.

Studies on immundiagnosis of dracunculiasis. I. Detection of specific serum antibodies. Acta Trop 1998; 70: 73-86

Boch J., Supperer R.,

Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey, Berlin 1977

Bowman D.D., Lynn R.C.

Georgis`Parasitology for Veterinarians, 6th editon. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1995

Brain R., Allan B.

Encephalitis due to infection with *Toxocara canis*. Report of a suspected case. Lancet 1964; 1: 1355-1357

Brill R.,Churg J., Beaver P.C.

Allergic granulomatosis associated with visceral larva migrans. Am J Clin Pathol 1953; 23: 1208-1215

Brown D.H.

Ocular *Toxocara canis*. Ann Ophthalmol 1971: 907-910

Burchard G.D., Löscher T.

Intestinale und larvale Nematodeninfektionen, In: Lang W., Löscher T.: Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 3. Auflage. Thieme, Stuttgart 2000: 160-161

Cabrera Z., Parkhouse R.M.E., Forsyth K., Priego A.G., Pabon R., Yarzahal L.

Specific detection of human antibodies to *Onchocerca volvulus*, Trop Med Parasitol; 40:454-459

Chatterjee B.P., Santra A., Karmakar P.R., Mazumder D.N.G.

Evaluation of IgG₄ response in ascaris by ELISA for serodiagnosis. Trop Med Int Health 1996, 1: 633-639

Carlier Y., Yang J., Bout D., Capron A.

The use of an excretory-secretory antigen for an ELISA specific serodiagnosis of Visceral Larva Migrans. BIMDB 1982; 36: 39-42

Cypess R.H., Karol M.H., Zidian J.L., Glickman L.T., Gitlin D.

Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans. *J Infect Dis* 1977; 135: 633-640

Dent J.H., Nichols R.L., Beaver P.C., Carrera G.M., Staggars R.J.

Visceral larva migrans: With a case report. *Am J Pathol* 1956; 32: 777-803

Deumer J.W.

Untersuchungen über den Endoparasitenbefall von Hunden in München, die Kontamination von öffentlichen Sandspielplätzen mit parasitären Entwicklungsstadien und ihr Verhalten gegenüber Umwelteinflüssen. Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München, 1984

Desowitz R.S., Rudoy R., Barnwell J.W.

Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981; 65: 361-366

Done J.T., Richardson M.D., Gibson T.E.

Experimental visceral larva migrans in the pig. *Res Vet Sci* 1960; 1: 133-140

Dreweck C.M., Luder C.G., Soboslay P.T., Kern P.

Subclass-specific serological reactivity and IgG₄-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 779-787

Duguid I.M.

Chronic Endophthalmitis due to *Toxocara*. *Brit J Ophthal* 1961a; 45: 705-717

Duguid I.M.

Features of ocular infestation by *Toxocara*. *Brit J Ophthal* 1961b; 45: 789-796

Dürr U.,

Zum Askaridenbefall der Hunde. *Kleintier-Prax* 1969; 3: 108-112

Egwang T.G., Dupont A., Leclerc A., Akue J.P., Pinder M.

Differential recognition of *Loa loa* antigens by sera of human subjects from a loiasis endemic zone. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 664-673

Egwang T.G., Duong T.H., Nguri C., Ngari P., Everaere S., Richard-Lenoble D., Gbakima A.A., Kombila M.

Evaluation of Onchozercia volvulus-specific IgG₄ subclass serology as an index of onchocerciasis transmission potential of three Gabonese villages. Clin Exp Immunol 1994; 98: 401-407

Engel H., Spickermann D.A., Tismer R., Möbius W.

Akute Meningomyelitis durch Toxocara-Larven. Dtsch Med Wschr 1971; 38: 1498-1505

Fanning M., Hill A., Langer H.M., Keytone J.S.

Visceral larva migrans (toxocariasis) in Toronto. CMAJ 1981; 124: 21-26

Feldman G.J., Parker H.W.

Visceral larva migrans associated with the hypereosinophilic syndrome and the onset of severe asthma. Ann Int Med 1992;116: 838-840

Felgner P.

Stepless antibody determination with the stick-ELISA technique. Results expressed as multiple of normal activity (MONA). Zbl Bakt Hyg 1. Abt Orig A 1978; 242: 100-105

Fernandez B., Lopez A., Gonzales H., Stichao N.

Visceral larva migrans. A report of seven cases from the „Dr. Carlos J. Finlay„ Military Teaching Hospital. Rev Cubana Med Trop 1974; 26: 67-68

Fleckseder R., Stejskal K.von

Biologische Reaktionen mit Bandwurmextrakt. Wien Klin Wschr 1904; 17: 793-796

Friedman S., Hervada A.R.

Severe myocarditis with recovery in a child with visceral larva migrans. J Pediatr 1960; 56: 91-96

Genchi C., Falagiani P., Riva G., Tinelli M., Brunello F., Boero M., Almagiva M.

IgE and IgG antibodies in Toxocara canis infection. A clinical evaluation. Ann Allergy 1988, 61; 43-46

Gillespie S.H.

A review human Toxocariasis. J Appl Bact 1987; 63: 473-479

Gillespie S.H.

Epidemiology of toxocariasis. *Parasitol today* 1988; 4:180-183

Gillespie S.H.

The clinical spectrum of human toxocariasis, In: Lewis J.W., Maizels R.M. (eds.): *Toxocara and Toxocariasis*, Institute of Biology and the British Society for Parasitology 1993: 55-61

Glickman L.T., Schantz P., Dombroske R., Cypess R.

Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 492-498

Glickman L.T., Grieve R.B., Lauria S.S., Jones D.L.

Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of two antigens. *J Clin Pathol* 1985; 38: 103-107

Glickman L.T.

The epidemiology of human toxocariasis, In: Lewis J.W., Maizels R.M.: *Toxocara and Toxocariasis*, Institute of Biology and the British Society for Parasitology 1993: 3-10

Griffiths R.W.

Human Toxocariasis (visceral larva migrans) causing an abscess of the rectus sheath in an infant, *Brit J Surg.* 1973; 60:977-979

Grimm F., Maly F.E., Lu J., Llano R.

Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 613-616

Gueglio B., de Gentile L., Nguyen J.M., Achard J., Chabasse D., Marjolet M.

Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. *Parasitol Res* 1994; 80: 531-536

Hagan P., Blumenthal U.J., Dunn D., Simpson A.J.G., Wilkins H.A.

Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 1991; 349: 243-245

Hagler W.S., Pollard Z.F., Jarrett W.H., Donnelly E.H.

Results of surgery for ocular *Toxocara canis*. *Ophthalmol* 1981; 88: 1081-1086

Hakim S.L., Mak J.W., Lam P.L.W., Nazma S., Normaznah H.

Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies among Orang asli (Aborigines) in Peninsular Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23: 493-496

Hamilton R.G.,

Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1987; 33: 1707-1725

Harrison-Synder C.

Visceral larva migrans. *Ped* 1961; 28: 85-91

Havasiova K., Dubinsky P., Stefancikova A.

A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helmintol* 1993; 67: 297-304

Hedge S., Maiya P.P., Dandekar C., Vishwanath D., Rao S.G., Benakappa N.

Visceral larva migrans. *India Pediatr* 1995; 32: 1245-1246

Herrmann N., Glickman L.T., Schantz P.M., Weston M.G., Domanski L.M.

Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States 1971-1973; *Am J Epidemiol* 1985; 122: 890-896

Hiepe T., Buchwalder R., Nickel S.

Lehrbuch der Parasitologie, Band 3: Veterinärmedizinische Helminthologie, Gustav Fischer Verlag, 1985

Higashikawa H.

Experimental studies of visceral larva migrans. *Shikoku Acta Med* 1961; 17: 1-12

Hill I.R., Denham D.A., Scholtz C.L.

Toxocara canis larvae in the brain of a British child. *Trans Ry Soc Med Hyg* 1985; 79: 351-354

Hogarth-Scott R.S.

Visceral larva migrans- an immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the ES antigens of the second stage larva of *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina* (Nematoda). *Immunol* 1966; 10: 217-223

Hörchner F., Unterholzner J., Frese K.

Zum Vorkommen von *Toxocara canis* und anderen Endoparasiten bei Hunden in Berlin (West). *Berl Muench Tierärztl Wschr* 1981; 94: 220-223

Huntley C.C., Moreland A.

Gel diffusion studies with *Toxocara* and *Ascaris* extracts. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12: 204-209

Huntley C.C., Costas M.C., Lyster An.

Visceral larva migrans syndrome: clinical characteristics and immunologic studies in 51 patients. *Pediat* 1965; 36: 523-527

Iskander R., Das P.K., Aalberse R.C.

IgG₄ antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981; 66: 200-207

Isaac S., Felden F., von den.

Eine spezifische Präzipitinreaktion bei *Bothriocephalus latus* beherbergenden Menschen. *Dtsch Med Wschr* 1904; 30: 982-986

Jung R.C., Pacheco G.

The use of intradermal and indirect hemagglutination tests for the diagnosis of visceral larva migrans. *Proc* 1959; 2: 586-591

Jung R.C., Pacheco G.

Use of a hemagglutination test in visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 1960; 9: 185-192

Kagan I.G.

Serum agar double diffusion studies with *Ascaris* antigens. *J Infect Dis* 1957; 101: 11-16

Kagan I.G.

Serologic diagnosis of visceral larva migrans. Clin Pediat 1968; 7: 508-514

Kasieczka J.

Zur Kontamination öffentlicher Grünflächen und Kinderspielplätze in Wien mit Dauerstadien humanpathogener Endoparasiten vom Hund, Dissertation, Vet. Med. Univ. Wien, 1982

Kastryulin P.G.

Untersuchungen über die Spezifität und Empfindlichkeit der Mikropräzipitationsreaktion an lebenden Larven von *Ascaris suum*, *Strongyloides ransomi* und *Ösophagostomum dentatum*. K.J. Skrjabina 1971; 18: 99-105

Kazacos K.R.

Visceral and ocular larva migrans. Semin Vet Med Sur 1991; 6: 227-235

Kennedy M.W., Maizels R.M., Meghji M., Young L., Qureshi F., Smith H.V.

Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol 1987; 9: 407-420

Kennedy M.W., Qureshi F., Fraser E.M., Hasell-Elkins M.R., Elkins D.B., Smith H.V.

Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. Clin Exp Immunol 1989; 75: 493-500

Kimmig P., Naser K., Frank W.

Seroepidemiologische Untersuchungen zur Toxokariosis des Menschen. Zbl Hyg 1991: 406-422

Koutz F.R., Grouves H.F., Scothorn M.W.

The prenatal migration of *Toxocara canis* larvae and their relationship to infections in pregnant bitches and in pups. Am J Vet Res 1966; 27: 789-800

Köhler G., Jörren R., Kapen F.von

Untersuchungen zur Kontamination von Spielkastensänden mit Eiern von Fleischfresseraskariden. Bundesgesundhbl 1980; 23: 6-9

Krupp I.M.

Hemagglutination test for the detection of antibodies specific for *Ascaris* and *Toxocara* antigens in patients with suspected visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23: 378-384

Kutzer E., Krauthauf J., Seiler A., Hejny-Brandl M.

Öffentliche Grünflächen und Kinderspielplätze als potentielle Infektionsquelle für die Toxokarose des Menschen. *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 1995; 17: 71-76

Kwan-Lim G.-E., Forsyth K. P., Maizels R.M.

Filarial-specific IgG₄ response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. *J Immunol* 1990; 12: 4298-4305

Lal R.G., Ottesen E.A.

Enhanced diagnostic specificity in human Filariasis by IgG₄ antibody assessment. *J Infect Dis* 1988; 158: 1034-1037

Lamina J.

„Larva migrans visceralis“ Entwicklung und Möglichkeit der Diagnostik am Beispiel von *Ascaris lumbricoides* var. *suus* (Linnè, 1758) und *Toxocara canis* (Werner, 1782) *Habil.-Schrift, Med Fakultät Frankfurt/M, 1968*

Laqua H.

Intraokuläre *Toxocara canis*-Infektion. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1972; 161: 215-220

Lee H.-F., Danaraj T.J.

Visceral larva migrans in Malaya. *Am J Trop Med Hyg* 1972; 21: 174-177

Lee K.T., Min H.K.

Experimental study on the effect of cortisone in mice infected with *Toxocara canis*: histopathological findings of granuloma in the liver. *Korean J Parasitol* 1974; 12: 126-150

Lenczner M., Spaulding W.B., Saunders D.E.

Pulmonary manifestations of parasitic infestations. *Can Med Assoc J* 1964; 91: 421- 428

Löffler W., Maier C.

Das flüchtige Infiltrat mit Eosinophilie. *Med Kinderheilk* 1943; 63: 195-201

Löscher T.

Toxokariasis (viszerale Larva-migrans-Syndrom), In: Lang W. (Hrsg.): Tropenmedizin Klinik und Praxis, Thieme, Stuttgart 1993

Lynch N.R., Wilkes L.K., Hodgen A.N., Turner K.J.

Specificity of Toxocara ELISA in tropical populations. Parasite Immunol 1988; 10: 323-337

Magnaval J.-F., Fabre R., Maurières P., Charlet J.-P., Larrard B. de

Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Res 1991; 77: 697-702

Matsumura K., Endo R.,

Enzyme-linked immunosorbent assay for toxocariasis, its application to the sera of children. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1982; 253: 402-406

Mehlhorn H., Düwel D., Raether W.

Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. erweiterte und aktualisierte Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1993

Mercer R.D., Lund H., Bloomfield R., Caldwell R.

Larval ascariasis as a cause of chronic eosinophilia with visceral manifestations. Am J Dis Child 1950; 80: 46-58

Milburn C.L., Ernst K.F.

Eosinophilia-hepatomegaly syndrome of infants and young children. Report of a case due to invasion of liver by nematode larvae. Pediat 1953; 11: 358-367

Mikhael N.Z., Montpetit V.J.A., Orizaga M., Rowsell H.C., Richard M.T.

Toxocara canis infestation with encephalitis. Can J Neuro Sci 1974; 1:114-120

Moore M.T.

Human Toxocara canis encephalitis with lead encephalopathy. J Neuropath Exp Neurol; 1962; 21: 201-218

Müller-Jensen A., Schall J., Weisner B., Lamina J.

Eosinophile Meningo-enzephalo-myelitis und viszerale Syndrom durch Askaridenlarven beim Erwachsenen. Dtsch Med Wschr 1973; 98: 1175-1180

Nelson J.D., McConnell T.H., Moore D.V.

Thiabendazole therapy of visceral larva migrans. A case report. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15: 930-933

Nelson J.D., Frost J.L., Schochet S.S.

Unsuspected cerebral *Toxocara* infection in a fire victim. *Clin Neuropathol* 1990; 9: 106-108

Nicholas W.L., Stewart A.C., Walker J.C.

Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian capital territory together with observations on the risks on infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 217-221

Nichols R.L.

The etiology of visceral larva migrans, I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae, *J Parasitol* 1956; 42: 349-361

Noda P.

Studies on the development of eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis* (Werner 1782), with an observation on its infection in mice. *Bull of the University of Osaka Prefecture Series B, Agr Biol* 1961; 11: S.65-78

Obwaller A., Jensen-Jarolim R., Auer H., Huber A., Kraft D., Aspöck H.

Toxocara infestations in humans: symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complexes. *Parasite Immunol* 1998; 20: 311-317

Onishi S., Barr J.A.

A simplified method of quantitating proteins using the biuret and phenol reagents. *Ann Biochem* 1978; 86: 93-201

Oshima T.

Influence of pregnancy and lactation on migration of the larvae of *Toxocara canis* in mice. *J Parasitol* 1961; 47: 657-663

Ottesen E.A., Skvaril F., Sriram P.T., Poindexter R.W., Hussain R.

Prominence of IgG₄ in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol* 1985; 134: 2707-2712

Palmer D.R., Bradley M., Bundy D.A.

IgG₄ responses to antigens of adult *Necator americanus*: potential for use in large-scale epidemiological studies. Bull WHO 1996, 74: 381-386

Pinelli E., van der Lugt H., Homan W., van der Giessen J., Kortbeek L.M.

Antigen recognition by IgG₄ antibodies in human trichinellosis. Parasite 2001; 8: 168-171

Preissshofen L.

Larva migrans visceralis-Infektion beim Menschen hervorgerufen durch *Toxocara canis* (Werner, 1782) und *Toxocara mystax* syn. *T. cati* (Zender, 1800), Dissertation, Universität München, 1976

Ree G.H., Voller A., Rowland G.A.K.

Toxocariasis in the British Isles 1982-3. Brit Med J 1984; 288: 628-629

Remky H., Kraft H.

Intraokuläre *Toxocara canis*-Infestation. Klin Monatsbl Augenheilkd 1965; 147: 692-695

Robertson B.D., Rathaur S., Maizels, R.M.

Antigenic and biochemical analyses of the excretory-secretory molecules of *Toxocara canis* infective larvae. In: Geerts S., Kumar V. Brandt J (eds.): „Helminth Zoonoses, Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science“ 1987: 167-174

Robertson B.D., Bianco A.T., McKerrow J.H., Maizels R.M.

Toxocara canis: Proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. Exp Parasitol 1989; 69: 30-36

Sadun E., Norman L., Allain D.

The detection of antibodies to infections with the nematode , *Toxocara canis*, a causative agent of visceral larval migrans. Am J Trop Med Hyg 1957; 6: 562-568

Santra A., Bhattacharya T., Chowdhury A., Ghosh A., Ghosh N., Chatterjee B.P.

Serodiagnosis of ascariasis with specific IgG₄ antibody and its use in an epidemiological study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001, 95: 289-292

De Savigny D.H.

In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol* 1975; 61: 781-782

De Savigny D.H., Tizard I.R.

Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71: 501-507

De Savigny D.H., Voller A., Woodruff A.W.

Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979; 32: 284-288

Schantz P.M., Biagi F.F.

Coexistence of *Toxocara* and *Toxascaris* in dogs in Mexico City. *J Parasitol* 1968; 54:185 - 190

Schantz V.M.D., Glickman L.T.

Toxocaral visceral larva migrans. *N Engl J Med*; 1978:436-439

Schantz P.M., Meyer D., Glickman L.T.

Clinical, serologic, and epidemiologic characteristics of ocular Toxocariasis. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 24-28

Schantz P.M.

Toxocara larva migrans now. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 21-34

Schochet S.S.

Human *Toxocara canis* encephalopathy in a case with visceral larva migrans. *Neurol* 1967; 17: 227-229

Shields J.A.

Ocular Toxocariasis. A review. *Surv Ophthalmol* 1984; 28: 361-381

Smith H.V., Girwood R.W.A., Kusel J.R.

Misinterpretation of toxocaral serodiagnostic tests. *Brit Med J* 1984; 288: 1235

Smith H.V.

Antibody reactivity in human toxocariasis, In: Lewis J.W., Maizels R.M.: *Toxocara and Toxocariasis*, Institute of Biology and the British Society of Parasitology; 1993: 91-109

Snow K.R., Ball S.L, Bewick J.A.

Prevalence of *Toxocara* species eggs in the soil of five east London parks. *Vet Rec* 1987;120: 66-67

Snyder C.H.

Visceral larva migrans: Ten years`experience. *Pediat* 1961; 28:85-91

Speiser F., Gottstein B.

A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immundiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop* 1984; 41: 361-372

Sprent J.F.A.

Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Parasitol* 1958; 48:184-198

Sprent J.F.A., English P.B.

The large roundworms of dogs and cats- a public health problem. *Aust Vet J* 1958; 34: 161-171

Sprent J.F.A.

Visceral larva migrans. *Aust J Sci* 1963; 25: 344-352

Stoye M.

Galaktose und pränatale Infektionen mit *Toxocara canis* beim Hund (Beagle). *Dtsch Tierärztl Wschr* 1976; 83: 89-98

Stürchler D., Bruppacher R., Speiser F.

Epidemiologische Aspekte der Toxocariasis in der Schweiz. *Schweiz Med Wschr* 1986; 116: 1088-1093

Stürchler D.

Endemic Areas of Tropical Infections. 2nd Edition, Hans Huber Publishers; 1988: 272-274

Sumner D., Tinsley E.G.F.

Encephalopathy due to visceral larva migrans. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1967; 30: 580-588

Talluri V.M., Paggi L., Orecchia P., Dallai R.

Fine structure of buccal cavity and esophagus in *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae) infective larvae. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1986; 97: 144-157

Taylor M.R.H., Keane C.T., O'Connor P., Mulvihill E., Holland C.

The expanded spectrum of toxocaral disease. *Lancet* 1988: 692-695

Thompson D.E., Bundy D.A.P., Cooper E.S., Schantz P.M.

Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. *Bull WHO* 1986; 64: 283-290

Ubelaker J.E., Allison V.F.

Scanning electron microscopy of the eggs of *Ascaris lumbricoides*, *A. suum*, *Toxocara canis*, and *T. mystax*. *J Parasitol* 1975; 61: 802-807

Uhlikova M., Hubner J., Kolarova L., Polackova M.

Immunological studies on human larval toxocarosis. *Cent Eur J Public Health* 1996; 4: 242-245

Vargo T.A., Singer D.B., Gillette P.C., Fernbach D.J.

Myocarditis due to visceral larva migrans. *J Pediat* 1977: 322-323

Villano M., Cerillo A., Narciso N., Vizioli L., Del Basso de Caro M.

A rare case of *Toxocara canis* arachnoidea. *J Neurosurg Sci*; 36: 67-69

Vortel V., Pavelka I., Uhlikova M., Hubner J., Zezulka B.

Larval toxocariasis in a 40 year old man with detection of larvae in a liver biopsy. *Cesk Patol* 1983; 19: 193-198

Waldner M., Aspöck H.

Untersuchungen über Häufigkeit und Bedeutung von *Toxocara*-Infektionen des Menschen in Österreich. *Mitt Österr Ges Tropmed Parasitol* 1988; 10: 159-174

Wang C., Huang C.Y., Chan P.H., Preston P., Chau P.Y.

Transverse myelitis associated with larva migrans finding of larva in cerebrospinal fluid. Lancet 1983;422-3

Weil G.J., Ogunrinade A.F., Chandrashekar R., Kale O.O.

IgG4 subclass antibody serology for Onchocerciasis. J Infect Dis 1990;161: 549-554

Wen H., Craig P.S.

Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis, Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 741-748

Wendler H.

„Larva migrans visceralis-Syndrom“ durch *Toxocara canis*. Münch Med Wschr 1972; 114: 1634-1640

Werner P.C.

Verminium intestinalium brevis expositionis continato. Lipsiae 1782: 28-35

Wilder H.C.

Nematode endophtalmits. Trans Am Acad Ophthalmol Oto-Laryn 1950; 55: 99-109

Woodruff A.W., Bisseru B., Bowe J.C.

Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. Brit Med J 1966; 1: 1576-1580

Yorke W., Maplestone P.A.

The Nematode Parasites of Vertebrates. Hafner Publishing Company, New York, 1962: 255-269

Zinkham W.H.

Visceral larva migrans due to *Toxocara* as a cause of eosinophilia. Johns Hopkins Med J 1968; 123: 41-47

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Rösel des BRK Blutspendendienstes möchte ich für die Überlassung der Serumproben danken.

Besonderer Dank gilt auch Frau H. Schöl für die Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen des Wurmes und Frau Dr. B Reimer für die Beratung zur statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Ausdrücklich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. W. Samtleben für sein Verständnis und das Entgegenkommen hinsichtlich der Arbeitszeit das mir die Fertigstellung der Arbeit in der AiP-Zeit erst ermöglicht hat.

Frau Dr. S. Eichenlaub möchte ich sehr herzlich für die Anleitung, die immer freundliche Unterstützung und Geduld in allen Phasen der Arbeit danken.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. T. Löscher für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.