

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urška JUVAN

**PRESKUS ENCIMSKEGA TESTA IN METODE
PRENOSA WESTERN ZA UGOTAVLJANJE
TOKSOKAROZE PRI ČLOVEKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urška JUVAN

**PRESKUS ENCIMSKEGA TESTA IN METODE PRENOSA
WESTERN ZA UGOTAVLJANJE TOKSOKAROZE PRI ČLOVEKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DIAGNOSIS OF HUMAN TOXOCARIASIS BY ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY AND WESTERN BLOT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Parazitološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Jerneja Logarja in za recenzentko prof. dr. Jožico Marin.

Mentor: prof. dr. Jernej Logar

Recenzentka: prof. dr. Jožica Marin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jernej Logar
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Jožica Marin
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Juvan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 616.993-078(043) =863
KG zoonoze/paraziti/toksokaroza/*Toxocara canis*/*Toxocara cati*/diagnostične metode/serološki testi/ELISA/Western blot/Slovenija
AV JUVAN, Urška
SA LOGAR, Jernej (mentor)/MARIN, Jožica (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN PRESKUS ENCIMSKEGA TESTA IN METODE PRENOSA WESTERN ZA UGOTAVLJANJE TOKSOKAROZE PRI ČLOVEKU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 39 str., 8 pregl., 4 sl., 78 vir.
IJ sl
JI sl/en
AL Toksokaroza je bolezen, ki jo pri človeku povzročajo ličinke glist *Toxocara canis* in *Toxocara cati*. Za ugotavljanje okužbe so na voljo različne metode. V nalogi smo si zadali cilj, da ovrednotimo dve izmed njih: encimski test (ELISA) in test Western blot (WB). Dvesto sedeminsedemdeset serumov bolnikov s sumom na toksokarozo, ki so jih zdravniki iz vse Slovenije poslali v parazitološki laboratorij, smo najprej testirali s testom ELISA. Vse serume smo nato pregledali še s testom WB. S testom ELISA je 160 serumov pokazalo pozitiven rezultat, 68 negativen in 49 mejni rezultat. Pri štiridesetih serumih z mejnim rezultatom ELISA je test WB pokazal pozitiven rezultat, kar predstavlja 81,6 %. Devet serumov, ki so s testom ELISA pokazali mejni rezultat, pa je s testom WB pokazalo negativen rezultat. Oba testa sta pri 179 serumih pokazala enak rezultat, pri 98, kar znaša 35,4 %, pa različnega ($\chi^2=26,685$, $P= 0,0001$). Na podlagi proizvajalčevih podatkov o občutljivosti in specifičnosti testov in naših ugotovitev menimo, da je test ELISA zaradi svoje dobre občutljivosti primeren predvsem kot presejalni test pri dokazovanju toksokaroze, test WB pa zaradi dobre specifičnosti kot potrditveni test toksokaroze.

KEY WORDS DOKUMENTATION

DN DN
DC UDC 616.993 -078(043) =863
CX zoonosis/parasites/toxocariasis/*Toxocara canis*/*Toxocara cati*/diagnostic methods/serologic tests/ELISA/Western blot/Slovenia
AU JUVAN, Urška
AA LOGAR, Jernej (supervisor)/MARIN, Jožica (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI DIAGNOSIS OF HUMAN TOXOCARIASIS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND WESTERN BLOT
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 39 p., 8 tab., 4 fig., 78 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Toxocariasis is a disease, caused in humans by roundworm *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. Various methods are available for diagnosis of this infection. The objective of this study was to evaluate two of these methods: the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the Western blot (WB). Medical doctors from all over Slovenia sent 277 sera of patients with suspicion of toxocariasis to the parasitological laboratory. Two hundred seventy seven sera were tested with ELISA. From these 160 were positive, 68 negative and 49 showed unclear results, they were in the grey zone. All sera were than examined with WB test. Out of 49 sera in grey zone, 40 were positive by WB test and 9 were negative. Using the two tests we gained equal results in 179 cases and different in 98 cases; which means in 35,4 % ($\chi^2=26,685$, $P= 0,0001$). On the basis of manufacturer data and our findings, we suggest that the ELISA test is suitable as a screening test for diagnosis of toxocariasis due to its high sensitivity and the WB test, because of its specificity, as a confirmation test for toxocariasis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOKUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV PARAZITA IN SPLOŠNE ZNAČILNOSTI	2
2.2.1 Osnove	2
2.2.2 Morfologija in življenjski krog	3
2.2.3 Klinična slika	6
2.2.4 Diagnoza	8
2.2.5 Zdravljenje	11
2.2.6 Epidemiologija in preprečevanje	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MATERIAL	16
3.2 METODE	16
Encimsko imunski test- ELISA	16
Imunska blot metoda (test Western Blot-WB)	19
4 REZULTATI	23
5.1 RAZPRAVA	29
5.2 SKLEPI	31
6 POVZETEK	32
7 VIRI	33
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Priporočeno zdravljenje toksokaroz (Holland in Smith, 2006: 121)	13
Pregl. 2: Seroprevalenca človeške toksokaroz (Holland in Smith, 2006: 92)	15
Pregl. 3: Rezultati, dobljeni pri testiranju serumov s testoma ELISA in WB; negativni (-), pozitivni (+) in mejni rezultati (+/-). Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo in obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	24
Pregl. 4: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov ter rezultatov z mejnimi vrednostmi, dobljenih pri testiranju serumov s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	26
Pregl. 5: Število in delež rezultatov z mejnimi vrednostmi s testom ELISA, ki so pokazale pozitiven ali negativen rezultat s testom WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	27
Pregl. 6: Število in delež pozitivnih in negativnih rezultatov pri obeh testih ter število in delež rezultatov z različnimi vrednostmi. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	27
Pregl. 7: Število pozitivnih in negativnih rezultatov s testoma ELISA in WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	28
Pregl. 8: Število pozitivnih in negativnih rezultatov s testoma ELISA in WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.	28

KAZALO SLIK

Sl. 1: Razvojne stopnje <i>T. canis</i> . (Webster,1958)	4
Sl. 2: Življenjski krog <i>T. canis</i> in <i>T. cati</i> v človeku. (Despommier, 2003)	5
Sl. 3: Prikaz rezultatov toksokarnega testa ELISA	19
Sl. 4: Prikaz rezultatov toksokarnega testa Western blot z označenimi visoko in nizko molekularnimi pasovi	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABZ	albendazol (angl., albendazole)
BFT	bentonitni flukolacijski test
DEC	dietilkarbamazin (angl., diethylcarbamazine)
FAT	test s fluorescenčnimi protitelesi (angl., fluorescent antibody test)
HMW	visoko molekularni pasovi (angl., high molecular weight zone)
IHA	posredni hemaglutinacijski test (angl., indirect hemagglutination test)
LMW	nizko molekularni pasovi (angl., low molecular weight zone)
MBZ	mebendazol (angl., mebendazole)
OD	absorbanca ali optična gostota (angl., optical density)
OLM	okularna larva migrans
PCR	verižna reakcija s polimerazo <i>Taq</i> (angl., polymerase chain reaction)
RFLP	polimorfizem restrikcijskih fragmentov glede na velikost (angl., restriction fragment length polymorphism)
TBM	tetrametilbenzen (angl., thiabendazole)
TES	toksokarni eksekretorno-sekretorni antigen
VLM	visceralna larva migrans

1 UVOD

Toksokaroza oziroma toksokariaza je bolezen, ki jo povzročata helminta *Toxocara canis* in *Toxocara cati*. Njuna glavna gostitelja sta pes in mačka, človek pa predstavlja naključnega gostitelja. Pri človeku pride največkrat do okužbe z jajčeci, ki potujejo v črevesje in se pretvorijo v ličinke druge stopnje. Te potujejo po krvi v jetra in druge organe, kjer encistirajo. Na tem nivoju se razvoj toksokare pri človeku zaključi. V glavnem gostitelju (mlade mačke ali pasji mladiči), pa ličinke potujejo po dihalih v sapnik in nato nazaj v prebavila. Na poti odrastejo v odrasle gliste, ki proizvajajo jajčeca.

Potovanje ličink v različne organe povzroči t.i. visceralno larvo migrans, če ličinke zaidejo v oči, pride do razvoja t.i. okularne toksokaroz. Simptomi se razlikujejo glede na to, kateri organ ličinka prizadene, lahko pa okužba poteka tudi asimptomatsko.

Za laboratorijsko dokazovanje toksokaroz največkrat uporabljamo serološke teste. Včasih uporabimo tudi različna slikanja (ultrazvok, magnetna resonanca ali računalniška tomografija).

Zdraviti je potrebno le osebe z akutno visceralno in okularno toksokarozo. Uporabljajo antihelmintike in kortikosteroide, v primeru okularne toksokaroz pa včasih tudi kirurški poseg.

Bolezen je razširjena povsod po svetu, tudi v Sloveniji. Okužbo lahko preprečimo z osebno higieno ter z odstranjevanjem pasjih in mačjih iztrebkov.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je bil, da preskusimo in ovrednotimo serološka testa (encimsko imunski test-ELISA in metodo prenosa Western-WB) za dokazovane toksokaroz. Z obema testoma smo pregledali serume bolnikov s sumom na toksokarozo. Dobljene rezultate testov smo statistično preverili s testom χ^2 .

2 PREGLED OBJAV

2.1 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV PARAZITA IN SPLOŠNE ZNAČILNOSTI

Toxocara je glista ali nematod in sodi v deblo *Aschelminthes*, razred *Secernentea*, podrazred *Spiruria*, red *Ascaridida* ter družino *Toxocaridae*.

Predstavnike tega debela najdemo prosto v naravi (v zemlji in vodi) ali pa kot zajedavce na rastlinah in živalih. Pri slednjih lahko predstavljajo črevesne ali tkivne zajedavce. Valjasti črvi imajo belkasto telo, ki je pokrito s kutikulo in kožno mišično cev s sprednjo oralno in zadnjo analno odprtino. Notranjost cevi je izpolnjena z rahlo veznino, v kateri so prebavila in splovila. Živčevje in žleze imajo zakrnele. Nekateri predstavniki imajo ustno odprtino obdano s kožnimi gubami in papilami, ki vodijo v požiralnik in ustno kapsulo s kaveljčki, zobčki ali sekalnimi ploščicami.

Gliste so ločenih spolov, pri čemer so samci manjši od samic. Nekatero gliste lahko ležejo žive ličinke, so viviparne, druge pa ležejo jajčeca, npr. *T. canis* in *T. cati* in so oviparne gliste (Logar, 1999).

2.2.1 Osnove

Toksokaroza je zoonoza, ki jo povzročata parazita *T. canis* in *T. cati*. Glavna gostitelja sta pes in mačka, pri katerima se v tankem črevesju razvije odrasla žival. V človeku se lahko razvije le do stopnje ličinke in potuje v različne notranje organe. Kadar je v očeh, povzroča sindrom okularne larve migrans. V drugih organih, kot so ledvice, jetra, možgani in srce, pa povzroča viscelarno larvo migrans (Logar, 1999).

V preteklosti je toksokaroza veljala za malo znano okužbo oz. bolezen, danes pa je zaradi boljših možnosti diagnosticiranja ena izmed najbolj razširjenih helmintskih bolezni v industrializiranem svetu. Njena seroprevalenca je najvišja v tropskih in subtropskih krajih. Na Baliu znaša 63,2 %, v Francoski koloniji La Reunion pa celo 92,8 %. V razvitem svetu je seroprevalenca precej nižja, v urbanih predelih okoli 2-4 % ter na podeželju med 14 in 37 %. Za boleznijo največkrat obolevajo otroci, predvsem zaradi zaužitja zemlje. Poznamo

jo tudi pri odraslih, pri katerih največkrat ni specifičnih simptomov (Magnaval in sod., 2001).

2.2.2 Morfologija in življenjski krog

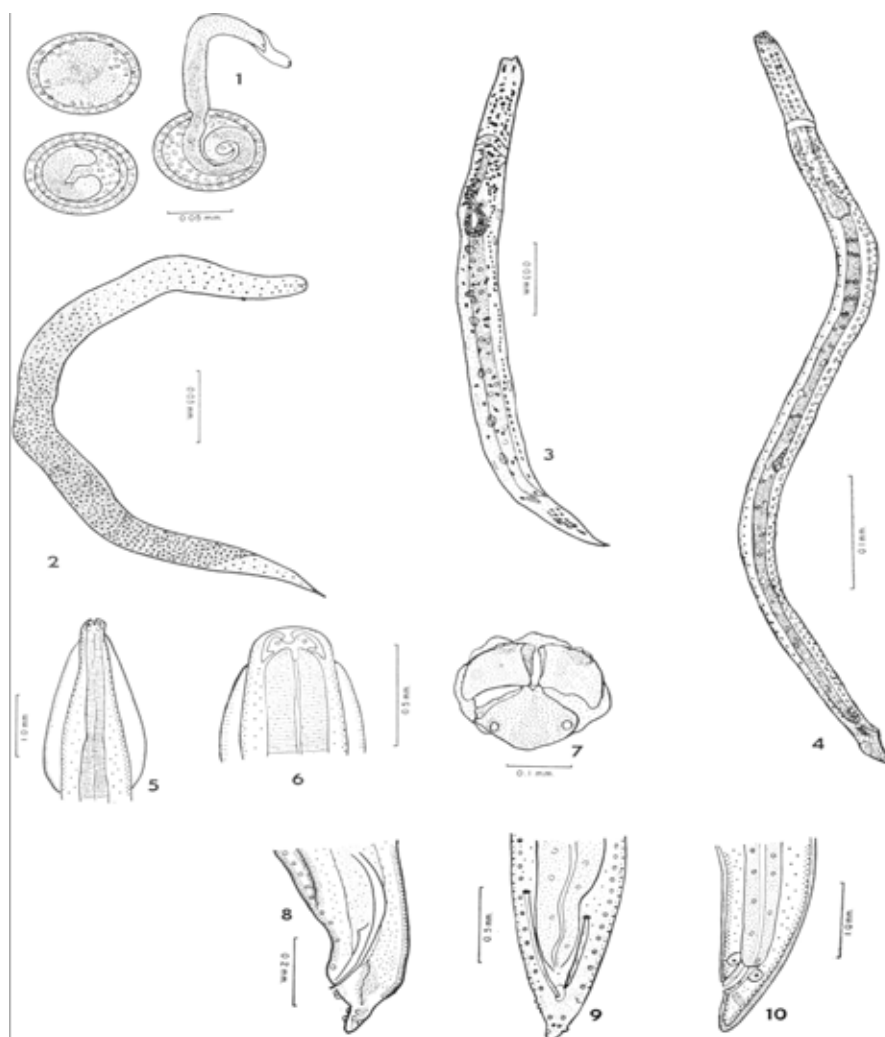
Odrasle gliste *T. canis* in *T. cati* so ločenih spolov, pri čemer so samice večje od samcev. Toksokare imajo cevasto črevo z usti na sprednjem in anusom na zadnjem koncu. Usta so obdana s tremi ustnicami, vsaka ustnica ima po eno papilo. Nimajo priveskov, oči in segmentov, ki bi jim omogočala življenje zunaj gostitelja. Gibanje jim omogočata hidroskelet in posebna vratna krilca. Slednja so iz tanke kutikule in se raztezajo od sprednjega konca na obeh straneh telesa ter se nenadoma končajo in zato dajejo glisti obliko puščice. Hidroskelet predstavlja votlina, napolnjena s tekočino, ki se z vzdolžnimi mišicami skrči in povzroči kontraktilne valove, s katerimi se glista premika (Jeanfaivre in sod., 1996; Takayanagi in sod., 1999; Xi in Jin, 1998; Roberts in sod., 2000; Schierenberg, 1997; Uga in sod., 2000). Zgradbo in razvojne stopnje gliste *T. canis* lahko vidimo na sliki 1.

Samce lahko ločimo od samic po tem, da so manjši ter da imajo top in zavrt zadek. Imajo cevast testis ter spikul (*T. cati* ima par spikulov), ki jim omogoča kopulacijo. Samica ima vulvo, ki se razteza do ene tretjine telesa ter velike ovarije in uterus, ki lahko vsebuje do 27 milijonov jajčec. Ta so temno rjave barve, okrogle do ovalne oblike in so velika med 75 in 90 mikrometrov. Na površini imajo lahko jamice (Roberts in sod., 2000; Schierenberg, 1997; Uga in sod., 2000). So zelo odporne na zunanje vplive ter lahko v okolju preživijo tudi do nekaj let. Vlaga in temperatura sta pomembna dejavnika pri dozorevanju jajčec, ki v idealnih pogojih postanejo infektivna po 2-4 tednih (Logar, 1999).

V infektivnem jajčecu je ličinka druge stopnje. Ko infektivno jajčece poje pes ali mačka, se v črevesju izleže ličinka druge stopnje, ki je velika okrog 0,41-0,49 milimetra. Ta potuje v limfne žleze do limfnih vozlov, od tam pa v kri in po krvi v jetra. Večina ličink v jetrih encistira, nekatere pa gredo po krvi naprej do srca in pljuč. Kadar gre za odraslega psa ali mačko ter za naključnega gostitelja, kot je človek, ostanejo ličinke na tej stopnji ter s krvjo

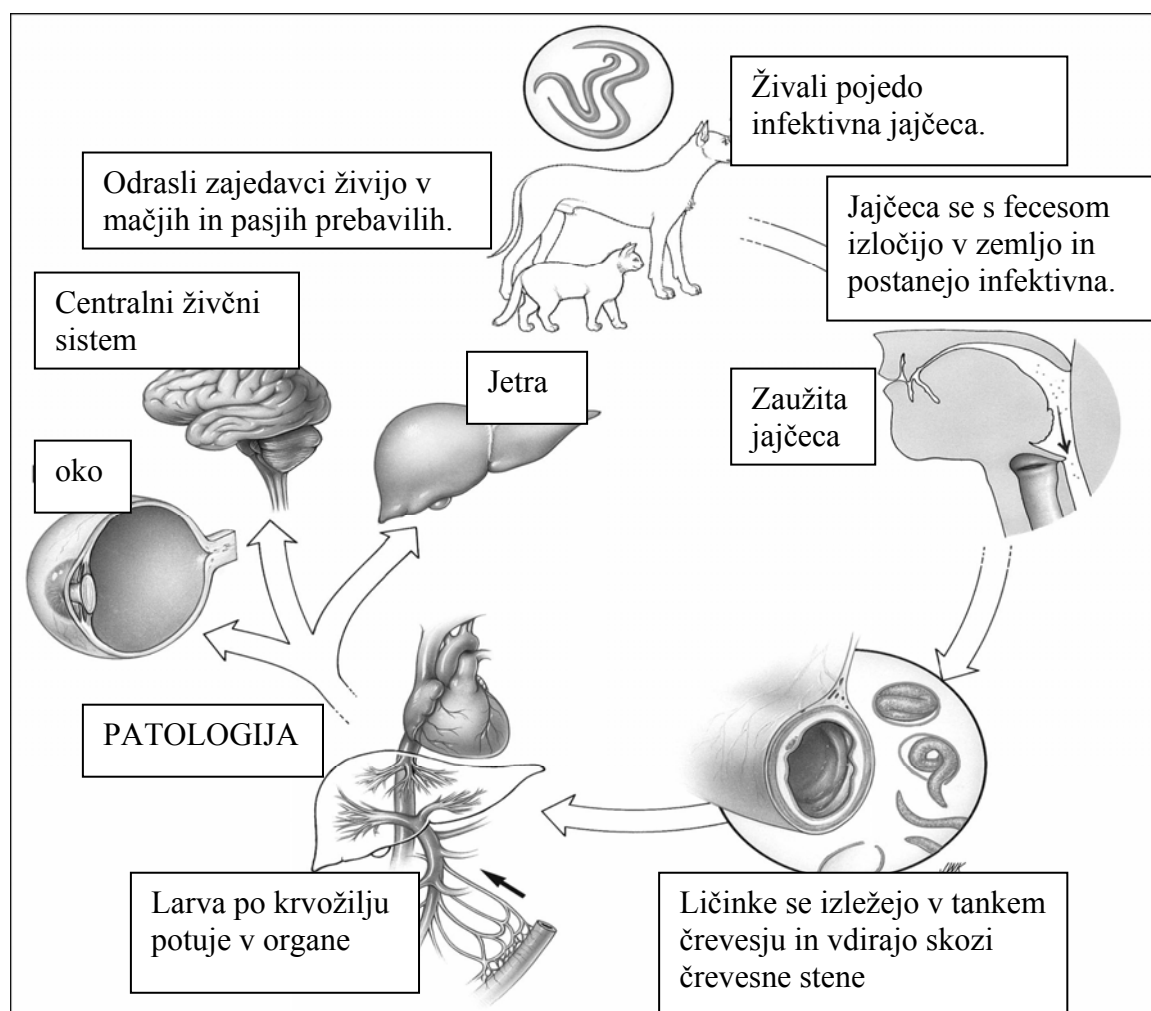
potujejo v srce in druge organe, kjer encistirajo. Te ličinke ne zaključijo svojega življenjskega kroga.

V primeru, da so ličinke v pljučih pasjega ali mačjega mladiča, potujejo v sapnik in navzgor po dihalih, nato jih žival pogoltne in pridejo do želodca. Na poti pride do levitve v ličinko tretje stopnje (0,8-0,95 milimetra). V želodcu pride do ponovne levitve v ličinko četrte stopnje, ki jo lahko najdemo v dvanajstniku. Na koncu se razvije iz ličinke odrasla glista, ki četrty ali peti teden po okužbi že odlaga jajčeca.



Slika 1:Razvojne stopnje *T. canis* 1-jajčeca. 2-ličinka druge stopnje. 3-ličinka tretje stopnje. 4-ličinka četrte stopnje. 5-sprednji del odrasle gliste z vidnimi stranskimi krilci. 6-hrbtna stran sprednjega dela odrasle gliste. 7-prečni prerez odrasle gliste. 8-zadek samca z vidnim spikulom. 9-zadek samca s trebušne strani. 10-zadek samice. (Webster,1958: 273)

Zanimivo je, da pri samicah več ličink kot pri samcih potuje v somatsko tkivo. Posledično lahko pride (kasneje) pri brejih psicah do prenatalne okužbe mladičev, kajti encistirane ličinke se reaktivirajo in potujejo skozi placento v tkivo zarodka. Tako so pasji mladiči že takoj okuženi s *T. canis*. Pri mačkah ne pride do prenatalne okužbe, temveč se mladiči okužijo po skotitvi s pitjem matrinega mleka. Ličinke druge stopnje se naselijo v mlečnih žlezah in se z mlekom prenesejo v prebavila mladih mačk. Tam nato nadaljujejo svoj življenjski cikel (Webster, 1958). Življenjski krog *T. canis* in *T. cati* je shematsko prikazan na sliki 2.



Slika 2: Življenjski krog *T. canis* in *T. cati* v človeku. (Despommier, 2003)

2.2.3 Klinična slika

Ličinka potuje po telesu in pušča za sabo migracijske sledi z krvavitvami, nekrozami in vnetnimi celicami. Nekatere ličinke encistirajo, druge pa gostitelj uniči in jih obda z granulacijskim tkivom. Encistirane ličinke so v mirujočem stanju in lahko tako preživijo več let. Iz neznanih razlogov lahko pride do reaktiviranja teh ličink, ki začnejo ponovno potovati po telesu (Gillespie, 1987; Woodruff, 1970).

Potujejo v različne organe: v jetra, možgane, pljuča, mišice in oči. Večina okužb je asimptomatskih, lahko pa pride tudi do akutnega vnetja. Ali bo prišlo do pojava kliničnih znakov, je odvisno od števila ličink v organizmu, od starosti gostitelja ter od vrste tkiva, ki je napadeno (Despommier, 2003). Kadar je število ličink oziroma breme ličink majhno, telo ne tvori zadostnega števila zaščitnih protiteles, zato ličinke potujejo dalj časa po organizmu. Takšne osebe so asimptomatske (razen v primeru, da pride do razvoja okularne larve migrans-OLM). Menijo, da je za nastanek visceralne larve migrans (VLM) potreben večji infektivni odmerek ličink. Takrat nastane veliko število protiteles, ki larve uničijo. To sproži nastanek kliničnih znakov (Glickman in Schantz, 1981).

2.2.3.1 Viscelarna larva migrans (VLM)

Viscerlna larva migrans je sistemski sindrom, ki se večinoma pojavlja pri otrocih med 2 in 7 letom starosti. Povzročja ga potovanje ličinke druge stopnje po telesu, pri čemer pride do poškodb različnih organov. Simptomi so: bolečina v trebuhu, zmanjšan apetit, nemirnost, povišana temperatura, kašelj, sopihanje, astma in hepatomegalija (povečanje jeter). Pride do hipereozinofilije (povečanje števila eozinofilcev; >2000 celic/mm³), hiper-gamaglobulinemije (povečanje gamaglobulinov v krvi) in levkocitoze (povečanje števila levkocitov) (Magnaval in sod., 2001).

Od prizadetega organa je odvisno, kakšni simptomi se bodo pokazali. Dokazano je, da potovanje ličinke v pljuča poveča rizik za razvoj astme (Buijs in sod., 1997).

Klinični znaki cerebralne toksokaroze še niso poznani, ker običajno obstaja še drug dejavnik kot je epilepsija, demenca ali mentalna zaostalost, zato je določanje le teh oteženo. Woodruff in sod. (1966) navajajo, da je incidenca toksokaroze trikrat večja pri

osebah z epilepsijo kot pri zdravih osebah. Povezava med toksokarozo in nastankom epilepsije ni znana. Lahko okužba povzroča nastanek epilepsije ali pa so ljudje z epilepsijo bolj podvrženi okužbi s toksokaro. Pri človeku so našli granulome z larvo ter lezije v različnih predelih centralnega živčnega sistema (malih možganih, mozgu, talamusu in možganskem deblu). V cerebrospinalni tekočini pa so opazili povišanje levkocitov in eozinofilcev (Moreira-Silva in sod., 2004).

Tudi na koži lahko povzroča znake, kot so: izpuščaji, koprivnica ali podkožni vozli (Despommier, 2003; Piarroux in sod., 2006).

2.2.3.2 Okularna larva migrans (OLM)

Kadar ličinka zaide v oko, povzroči sindrom okularne larve migrans. Za okularno toksokarozo zbolevalo predvsem otroci in mladostniki. Okužba lahko poteka asimptomatsko ali pa se pojavijo simptomi, kot je izguba vida. Pride do uveitisa (vnetje beločnice in notranjosti očesa), horioretinitisa (vnetje očesne mrežnice in žilnice), endoftalmitisa (vnetje notranjosti zrkla) in vnetja optičnega živca. Simptomi se lahko pojavljajo in izginjajo, kar je povezano z migracijo ličinke. Ko se vnetje umiri, se lahko pojavi v predelu makule bela lisa, ki jo opazimo pri pregledu z biomikroskopom ali pri oftalmoskopiji. Eozinofilije običajno pri OLM ni (Logar, 2004; Magnaval in sod., 2001; Good in sod., 2004).

2.2.3.3 Prikrita toksokaroza

Novo obliko, t.i. prikrito in običajno toksokarozo, so odkrili v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Prikrita toksokaroza se pojavlja pri otrocih z naslednjimi simptomi povišana temperatura, pomanjkanje teka, glavobol, bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje, zaspanost, motnje v obnašanju, vnetje grla, pljučnica, kašelj, bolečine v udih in hepatomegalija. Pride tudi do povišanja titra protiteles proti toksokari, medtem ko eozinofilije navadno ni (Magnaval in sod., 2001).

2.2.3.4 Običajna toksokaroza

Za običajno toksokarozo obolevajo odrasli, pri katerih se pojavijo naslednji simptomi: oslabelost, srbež, kožni izpuščaj, težave pri dihanju in bolečine v trebuhu. Pojavi se eozinofilija, pride pa tudi do povišanja skupnega števila protiteles IgE in protiteles proti toksokari (Magnaval in sod., 2001; Piarroux in sod., 2006).

2.2.4 Diagnoza

Diagnoza toksokaroz je otežena, zaradi potovanja ličinke v različne organe. Glista ostane na stopnji ličinke, zaradi česar v blatu ne iščemo jajčec (Woodruff, 1970). Klinična slika te bolezni je precej nespecifična, zato jo hitro lahko zamenjamo za okužbo z drugimi helminti, z alergijo ali z astmo.

Najprej je potrebno pridobiti podatke o pacientu: poklic, izpostavljenost kemikalijam, izpostavljenost zdravilom, astma, potovanja v tropske dežele, stik z domačimi živalmi, predvsem s psi, zaužitje surovega ali premalo kuhanega mesa in zaužitje zemlje. Nato je potrebno narediti serološke teste s katerimi dokažemo povišanje titra protiteles ter preskusiti ali je prišlo do povišanja števila eozinofilcev v krvi, kar je lahko znak za okužbo s helminti (Lewis, 2006).

Pri odkrivanju bolezni si pomagajo tudi s tehnikami slikanja. Z ultrazvokom iščejo granulome v trebušni votlini in očeh. Z rentgensko računalniško tomografijo lahko določijo granulome v jetrih in z magnetno resonanco v centralnem živčnem sistemu (Magnaval in sod., 2001). Pri okularni toksokarozii lahko larvo neposredno opazujejo z oftalmoskopom in biomikroskopom, z ultrazvokom pa lahko odkrivajo granulome in druge poškodbe očesa (Schantz in Glickman, 1978). Čeprav lahko granulom lokaliziramo, je ličinke v granulomu težko najti. Lahko se zgodi, da je ličinka migrirala in je ni več v granulomu. Zato so metode PCR, RFLP, sekvenciranje DNA in histopatološke preiskave večinoma neuporabne, kajti za izvedbo teh testov potrebujemo ličinko. Najbolj uporabni testi za dokazovanje toksokaroz so zato serološki testi (Smith in Noordin, 2006).

2.2.4.1. Serološki testi

V preteklosti so toksokarozo dokazovali s kožnim testom. Antigen, pridobljen iz odrasle gliste, so vbrizgali pod kožo. Če je nastal edem, je bil to znak pozitivne reakcije. Problem so predstavljale navzkrižne reakcije s številnimi helminti, kot so: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Shistosoma mansoni*, *Strongyloides stercoralis* in drugimi. Poleg kožnega testa so uporabljali tudi test s fluorescenčnimi protitelesi (FAT), posredni hemaglutinacijski test (IHA) in bentonitni flukolacijski test (BFT). Glavna problema teh testov sta bili premajhna občutljivost in specifičnost (Woodruff in sod., 1964). Uporabljali so vodotopni somatski antigen, pridobljen iz odrasle gliste, iz ličinke ali iz oplojenega jajčeca gliste *T. canis*. Ti antigeni so ravno tako premalo občutljivi, kajti pride lahko do navzkrižnih reakcij s helminti iz rodu *Ascaris*.

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je prišlo do razvoja nove metode, imenovane encimsko imunski test-ELISA ter uporabe toksokarnega eksekretorno-sekretornega antigena (TES), ki ga izloča ličinka druge stopnje (de Savigny, 1975; de Savigny 1979). To je omogočilo razvoj standardizirane metode, ki je visoko občutljiva, specifična in ponovljiva (Smith in Noordin, 2006).

Vendar vseh okužb ni mogoče dokazati s serološkimi testi. Pri majhnemu bremenu larve tvori telo premalo protiteles. S testi ne zaznamo pomembnega povišanja titra protiteles. Dobimo lažno negativen rezultat (Glickman in Schantz, 1981).

Antigen-Ag

Antigen TES pridobivamo tako, da ličinko druge stopnje kultiviramo na gojišču. Ta začne izločati eksekretorno- sekretorne glikoproteine oziroma TES. Gre za mozaični antigen, ki je sestavljen iz različnih komponent, predvsem mucinov in lektinov. TES tvori nestabilen plašč okrog ličinke in ob sekreciji sproža močan imunski odziv, ki verjetno igra pomembno vlogo pri dolgoročnem preživetju toksokare (Smith in Noordin, 2006).

Morales in sod. (2002) so metodo WB identificirali antigenske molekule: 28 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 80 kDa, 92 kDa, 116 kDa in 200 kDa. Magnaval in sod. (1991) so pasove uvrstili v dve skupini: nizko molekularni pasovi (LMW) od 28-55 kDa in

visoko molekularni bendi (HLW), ki so med 66 in 200 kDa. LMW so specifični za rod *Toxocara*, HLW pa so manj specifični in so pogosto vzrok za navzkrižne reakcije s paraziti *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* in *Strongyloides stercoralis*.

Zaradi navzkrižnih reakcij so Yamasaki in sod. (2000) pripravili rekombinantni antigen, ki se ujema z antigenom 30 kDa iz TES. Rekombinantni antigen mora bit podoben naravnemu po antigeni in imunogeni strukturi. Z njegovo uporabo se testu povečata tako občutljivost kot tudi specifičnost. Pri uporabi rekombinantnega antigena se pojavlja manj navzkrižnih reakcij, poleg tega pa ga lahko uporabljamo tudi pri diagnostiki OLM. S testi, ki so nam danes na voljo, ne moremo ločiti med okužbo s *T. canis* ali s *T. cati*. S tem problemom so se spopadli Iddawela in sod. (2007) ter odkrili, da je frakcija 57 kDa iz TES (TcES-57) vrstno specifična za *T. canis*. Razvili so metodo dvojni sendvič ELISA, ki je uporabna za diagnostiko visceralne larve migrans, ki jo povzroča *T. canis*.

ELISA in WB

Danes se pri diagnostiki toksokaroze najpogosteje uporablja test posredna IgG TES ELISA, zato lahko najdemo na trgu številne komercialne komplete (Smith in Noordin, 2006).

Diagnostiko za dokazovanje toksokare so razvili predvsem v deželah zmernega pasu, kjer so bolniki ponavadi inficirani le z enim helmintom. Problem pa se pojavlja v deželah tropskega in subtropskega pasu, kjer je pogosta okužba z več paraziti (Lynch in sod., 1988). Tam zato prihaja do navzkrižnih reakcij z drugimi helminti, tako da test TES ELISA v tem območju lahko uporabljamo le pri diferencialni diagnozi. Možne so navzkrižne reakcije s paraziti *Echinococcus sp.*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepatica*, *Taenia solium* in *Schistosoma mansoni*. Kadar je rezultat testa negativen, lahko trdimo, da oseba ni okužena s toksokaro, vendar pa pozitiven rezultat ne pomeni okužbe s toksokaro, kajti lahko je prišlo do navzkrižne reakcije.

Poleg testa ELISA se uporabljamo lahko tudi test Western blot-WB. Ta ima ravno tako dobro občutljivost in boljšo specifičnost kot test ELISA. Nizko molekularni pasovi (LWM), tega testa kažejo na okužbo s toksokaro (Magnaval in sod., 1991).

Pri okužbi (s toksokaro) se poleg protiteles IgG v telesu pojavijo tudi protitelesa IgE in IgM. Povišanje titra protitelsa IgE je znak za okužbo s helminti. Magnaval in sod. (1992) so pripravili test IgE TES ELISA, ki se je kot samostojni test pokazal za premalo specifičnega in premalo občutljivega, vendar je lahko dobro dopolnilo testu IgG TES ELISA. Dokazovanje protiteles IgM pri toksokarozni nima diagnostičnega pomena. Titer protiteles IgM ostane tudi po zdravljenju dalj časa povišan (do 2 leti, zato s pomočjo njih ne moremo sklepati o stanju bolezni).

Razvili so tudi nove teste, npr. potrditveni test IgG4 TES ELISA, ki ima sicer nižjo občutljivost, vendar višjo specifičnost kot test IgG TES ELISA (Holland in Smith, 2006).

Razvili so tudi test za določanje avidnosti protiteles proti toksokarozni. Avidnostni indeks so določili kot razmerje med protitelesi IgG seruma tretiranega z ureo, proti protitelesom IgG seruma, ki ni tretiran z ureo. Če je razmerje večje od 40, gre za staro okužbo, če pa je manjše od 40, gre za svežo okužbo (Smith in Noordin, 2006).

Slabost omenjenih testov je, da niso dovolj natančni za diagnostiko OLM. Pri okularni toksokarozni, je v serumu premalo protiteles, zato jih serološke metode ne zaznajo. Bolj primerna vzorca kot serum sta očesna vodica in steklovina, kajti tam je titer protiteles višji. Za precej uspešno metodo se je izkazal test IgE TES ELISA v kombinaciji z IgG TES ELISA ali v kombinaciji z IgG WB, pri čemer je potrebno obe metodi izvesti istočasno. Testirati je treba tako serum bolnika kot tudi očesno vodico. (Genchi in sod., 1986; Smith in Noordin, 2006)

2.2.5 Zdravljenje

Zdraviti je treba osebe z akutno VLM ter osebe z okularno toksokarozo. Osebe z običajno ali prikrito toksokarozo ni potrebno zdraviti, kajti največkrat pride do samoozdravitve. Pri teh je zdravljenje potrebno le, kadar klinični znaki ne izginejo. Zdraviti ni potrebno asimptomatskih oseb s kronično eozinofilijo.

Toksokarozo zdravimo s kortikosteroidi, antihelmintiki in operativno. Ličinka, ki potuje po telesu, povzroča poškodbe tkiva tako, da vzpodbudi vnetni odziv telesa. Kortikosteroidi zmanjšajo moč imunskega odziva in s tem zmanjšajo vnetje.

Antihelmintiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju toksokaroze so, derivati benzimidazola. Selektivno se vežejo na parazitski β -tubulin in na ta način preprečijo nastanek mikrotubula. Najpogosteje uporabljajo dietilkarbamazin (DEC). Kadar se ob njegovi uporabi pojavi preveč stranskih učinkov, ga zamenjajo z mebendazolom (MBZ). Albendazol (ABZ) je slabo učinkovito zdravilo proti toksokarози, vendar ga zaradi dobre dostopnosti uporabljajo pri lažjih okužbah.

Viscelarno toksokarozo zdravijo izključno z zdravili, medtem ko okularno toksokarozo lahko zdravimo tudi operativno. S pars plana vitrektomijo in kriopleksijo zdravijo granulome, z lasersko koagualacijo pa povzročijo koagualcijo tkiva okoli ličinke. Okularno toksokarozo zdravijo tudi s kortikosteroidi. S tem zmanjšajo vnetje v očesu in možnost za nadaljnje poškodbe. Kadar kortikosteroidi niso uspešni, si pomagajo z antihelmintiki. Najbolj uspešen je dietilkarbamazin (DEC), ki se ga ne sme dajati hkrati s kortikosteroidi, ker ti zavirajo delovanje DEC (Magnaval in Glickman, 2006).

V preglednici 1 lahko vidimo, kakšno zdravljenje je priporočljivo za določeno obliko bolezni.

Preglednica 1: Priporočeno zdravljenje toksokaroze (Magnaval in Glickman, 2006: 121)

Sindrom	Zdravilo	Priporočen odmerek	Stranski učinki	Lastnosti zdravila	Alternativa	Dodatna terapija
VLM	dietilkarbamazin	3-4*, 21 dni	Šibkost, omotičnost, bljuvanje, alergične reakcije, želodčne bolečine	Topen v vodi, kortikosteroidi ga inhibirajo, nevrolški stranski učinki	mebendazol	Kortikosteroidi
Običajna / prikrita	dietilkarbamazin mebendazol ^a	Glej zgoraj 25*, 21 dni	Glej zgoraj Omotičnost, slabost, bolečine v trebuhu	Glej zgoraj Netopen v vodi, potrebno zaužiti z maščobnim obrokom	albendazol albendazol	Ne obstaja Ne obstaja
OLM	Kortiko-steroidi dietilkarbamazin albendazol	1*, 1mesec Glej zgoraj 400* otroci 800* odrasli 10-14 dni	Martindale [®] Glej zgoraj Rahla omotičnost, slabost	Martindale [®] Glej zgoraj Za lažje okužbe, slabo se absorbira iz prebavil	Ne obstaja albendazol	Operativni poseg ^b

* mg/kg teže na dan

mebendazol^a: kadar dietilkarbamazin ni dostopen ali ob pojavu močnih stranskih učinkov.

Operativni poseg^b: cryopexy, fotokoagulacija in pars plana vitrektomija.

2.2.6 Epidemiologija in preprečevanje

Toksokaroza je kozmopolitska zoonoza, ki se sporadično pojavlja v mestih in na podeželju. V preglednici 2 so podani podatki za seroprevalenco toksokaroze v nekaterih državah. V Evropi je okuženih med 2,8 % do 15 % ljudi ter okoli 7 % otrok, v Sloveniji pa približno 6,6 % prebivalstva. Bolj izpostavljene osebe, kot so na primer rejci psov in mačk, pa so lahko okuženi tudi do 25 % (Logar, 1990; Ljungstrom in Knapen, 1989; Clemett, 1985;). O'Lorcain (1994) navaja, da je na Irskem 82 % pasjih mladičev in 20 % odraslih psov okuženih s parazitom *Toxocara canis* ter 42 % mačk s parazitom *Toxocara cati*, pri čemer so pregledali tudi potepuške pse in mačke.

Najbolj podvrženi okužbam s toksokaro so otroci, ki z neumitimi rokami vse "nesejo" v usta. Poleg njih sodijo v rizično skupino tudi veterinarji in osebe, ki imajo več stika s psi in mačkami (Despommier, 2003; Magnaval, 2001).

Toksokaro širijo predvsem psi, mačke in lisice. Ti s svojimi iztrebki kontaminirajo zemljo in posledično lahko tudi vodo. Pomembni prenašalci pa so tudi glodavci, ptiči in črvi v zemlji (Despommier, 2003).

Pri preprečevanju okužbe je najpomembnejša osebna higiena, predvsem umivanje rok pred jedjo in po uporabi sanitarij. Pasje mladiče je potrebno po 2 do 3 tednih dehelmintizirati, odrasle pse in mačke pa dvakrat letno.

Preprečiti je potrebno iztrebljanje mačk in psov na otroških igriščih, priporočljivo pa je tudi peskovnike čez noč pokriti. Glistave pse in mačke moramo zdraviti in odstraniti okuženo zemljo. Zelenjavne vrtove moramo ograditi ter zelenjavo dobro oprati pred zaužitjem (Despommier, 2003; Magnaval, 2001; Lewis, 2006).

Preglednica 2: Seroprevalenca humane toksokaroze (Lewis, 2006: 92)

Država/ regija	Seroprevalenca (%)	Vir
La Reunion, Indijski Ocean	92,8	Magnaval in sod., 1994
Katmandu, Nepal	81	Rai in sod., 1996
Bali, Indonezija	63,2	Chomel in sod., 1993
Sidoarijo, Vzhodna Java, Indonezija	63	Uga in sod., 1996
Havaji, ZDA	45(IgE); 17,5 (IgG)	Desowitz in sod., 1981
Kuala Lumpur, Malezija	57,8	Hakim in sod., 1997
La Plata, Buenos Aires, Argentina	39	Radman in sod., 2000
Espirito Santo, Brazilija	39	Moreira- Silva in sod., 1998
Resistencia, Subtropsko mesto, Argentina	37,9	Alonso in sod., 2000
Campo Grande, Mato Grosso, Argentina	35,6	Matos in sod., 1997
Provinca Cordillera, Bolivija	34	Cancrini in sod., 1998
Otoška Malezija	31,9	Hakim in sod., 1993
Jos, Država Plateau, Nigerija	29,8	Ajayi in sod., 2000
Salamanka, Španija	29,4- 33,1	Conde Garcia in sod., 1989
Republika Slovaška	27,4	Havasiova in sod., 1993
Campinas, Sao Paulo, Brazilija	23,9	Anaruma Filho in sod., 2002
Durham, Severna Karolina, ZDA	23,1	Ellis in sod., 1986
Država Harnett, Severna Karolina, ZDA	23,1	Worley in sod., 1984
Kuala Lumpur, Malezija	21,2	Patrick in sod., 2001
Malezija	19,6	Hakim in sod., 1993
Campinas, Sao Paulo, Brazilija	17,9	Anaruma Filho in sod., 2003
Halifax, Nova Škotska, Kanada	17	Embil in sod., 1988
Francija (jugozahod)	15 (13/89) Srednji Pirineji 4,8 (8/166) Toulouse	Caucanas in sod., 1988
Japonska	14	Yoshida in sod., 1999
Irbid, Jordanija	10,9	Abo-Shehada in sod., 1992
Haag, Nizozemska	11	Buijs in sod., 1994
Rotterdam, Nizozemska	6	Buijs in sod., 1994
Pokrajina Turkana, Kenija	7,5 (17/ 228)	Kenny in sod., 1995
Canberra, Avstralija	7,5	Nicholas in sod., 1986
Lima, Peru	7,3	Lescano in sod., 1998
ZDA	7,3-4,6	Herrmann in sod., 1985
Havana, Kuba	5,2 (8/156)	Montalvo in sod., 1994
Gwang-do, Koreja	5,1	Park in sod., 2002
Švica (Basel, Jura, Zürich)	5,1 (765)	Sturchler in sod., 1986
Švica	2,7	Jacquier in sod., 1991
Marche, Italija	1,6	Habluetzel in sod., 2003

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Glede okužbe s parazitom *Toxocara spp.* smo s serološkimi testi pregledali 277 serumov bolnikov. Vzorce iz vse Slovenije so zdravniki poslali v parazitološki laboratorij na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v času od 23. aprila 2003 do 9. marca 2006.

3.2 METODE

Za dokazovanje parazitov *T. canis* in *T. cati* smo uporabili dve serološki metodi: encimski test-ELISA (proizvajalca BIOTRIN International iz Francije) in test Western blot-WB (proizvajalca LDBIO Diagnostics iz Francije). Rezultate obeh testov smo ovrednotili, med sabo primerjali in poskušali ugotoviti, kateri je bolj občutljiv in specifičen.

Encimsko imunski test- ELISA

Kot presejalni test uporabljajo kvalitativni test *Toxocara canis* IgG- ELISA. Test dokazuje specifična protitelesa IgG proti ličinkam gliste *Toxocara spp.*.

Material

Za izvedbo testa potrebujemo:

- mikrotitrsko ploščo: vdolbinice so prekrte s toksokarnim ekskretorno sekretornim (ES) antigenom
- pufer za redčenje vzorcev (vrednost pH= 7,2 ±0,2)
- spiralni pufer za spiranje nevezanih komponent (vrednost pH= 7,2±0,2)
- konjugat anti-IgG, ki je sestavljen iz kozjih protiteles in hrenove peroksidaze
- substrat tetrametilbenzen (TMB)
- pozitivno kontrolo IgG
- negativno kontrolo IgG

- raztopina za ustavitev reakcije
- notranjo kontrolo oziroma pool kontrolo
- destilirano vodo
- folijo
- štoparico
- spektrofotometer za merjenje absorbance
- pipete z nastavki
- rokavice

Priprava reagentov

- Reagente in vzorce moramo imeti pred začetkom izvajanja testa na sobni temperaturi.
- Pufer za spiranje redčimo z destilirano vodo v razmerju 5+95.

Priprava vzorcev

- Vzorce in notranjo kontrolo redčimo s pufrom v razmerju 5+315 μ l.
- Pozitivne in negativne kontrole ni potrebno redčiti.

Izvedba testa

- V mikrotitrsko ploščico odpipetiramo po 100 μ l:
 - negativno kontrolo v vdolbinico A1
 - pozitivno kontrolo v vdolbinico B1
 - notranjo kontrolo v C1
 - razredčene vzorce v druge vdolbinice

Razporeditev kontrol in vzorcev v mikrotitrski ploščici je vidna na sliki 3.

- Inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
- Posrkamo vso vsebino iz vdolbinic in trikrat speremo s spiralnim pufrom. Tudi tega na koncu posrkamo iz vdolbinic.
- V vsako vdolbinico dodamo 2 kapljici konjugata.
- Pri sobni temperaturi inkubiramo 6 minut.

- Ponovimo korak 3.
- V vsako vdolbinico damo 2 kapljici substrata TMB ter mikrotitersko ploščico pokrijemo s folijo.
- 10 minut inkubiramo pri sobni temperaturi.
- Dodamo 2 kapljici raztopine za ustavitev reakcije. V vdolbinicah, kjer se je po dodatku substrata razvila modra barva, se ta po dodatku raztopine za ustavitev reakcije spremeni v modro. Intenzivnost modrega produkta je premosorazmerna količini specifičnih toksokarnih protiteles IgG.
- S spektrofotometrom izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Odčitavanje rezultatov

Za pravilnost testa morajo biti izpolnjeni naslednji kriteriji: absorbanca negativne kontrole mora biti nižja od 0,300 (absorbanca ali OD mejne vrednosti); absorbanca pozitivne kontrole mora biti višja od 0,500.

Vrednosti serumov:

- absorbanca višja od 0,300 → pozitiven rezultat
- absorbanca med 0,300 in 0,500 → nejasen rezultat oz. območje sive cone

Test je potrebno s svežim vzorcem čez 2 do 4 tedne ponoviti. Če je rezultat ponovno nejasen, ga smatramo kot negativnega.

- Absorbanca je med 0,000 in 0,300 → negativen rezultat



Slika 3: Prikaz rezultatov toksokarnega testa ELISA

Slika 3 prikazuje test ELISA. V vdolbinici A1 je negativna kontrola, kjer mora biti OD vrednost nižja od 0,200. V vdolbinici B1 je pozitivna kontrola, kjer mora biti OD vrednost višja od mejne vrednosti. Z obema kontrolama zagotovimo pravilno izvedbo testa. V tretji vdolbinici je pool kontrola oz. notranja kontrola, ki predstavlja pozitiven vzorec, katerega smo v preteklosti večkrat zamrznili. Z notranjo kontrolo preverjamo kakovost vzorca po večkratnem zamrzovanju. Sledijo vzorci, ki so na zgornji sliki negativni.

Imunska blot metoda (test Western Blot-WB)

Test ima sposobnost odkrivanja protiteles proti *T. canis* in tudi *T. cati*.

Material

Za izvedbo testa potrebujemo:

- trakove iz nitrocelulozne membrane z nanesenimi toksokarnimi antigeni
- pufer

- tekočino za spiranje
- konjugat anti-IgG: kozja protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo
- substrat
- pozitivno kontrolo: človeški serum, ki vsebuje protitelesa proti toksokari
- pinceto
- plastično pihalko
- rokavice
- banjico
- stresalnik
- aluminijsko folijo
- pipete in nastavke za pipete
- filter papir

Priprava reagentov

Koncentrirano tekočino za spiranje redčimo z destilirano vodo v razmerju 1:10.

Priprava vzorca

Za izvedbo testa potrebujemo 10 µl seruma ali 20 µl likvorja. V primeru, da vzorcev ne pregledamo takoj, jih moramo spraviti na 2-8°C do tri dni, oziroma na -20°C za daljši čas.

Izvedba testa

- Vzorce in kontrolo si pripravimo po vrstnem redu, kateremu bomo sledili skozi ves postopek.
- V kanalčke banjice nalijemo po 1,2 ml vzorčnega pufra.
- Z rokavicami na rokah, ravnilom in pinceto izrežemo nitrocelulozne lističe ter jih posamično prenesemo v vsak kanalček po enega. Pri izrezovanju moramo biti previdni, da ostane številka lističa na traku.
- Banjico rahlo pretresemo ter 5 minut inkubiramo pri sobni temperaturi, da se trakovi dobro namočijo.
- Dodamo po 10 µl seruma oz. 20 µl likvorja ter 10 µl pozitivne kontrole. Rahlo pretresemo ter inkubiramo na stresalniku 60 minut pri sobni temperaturi.

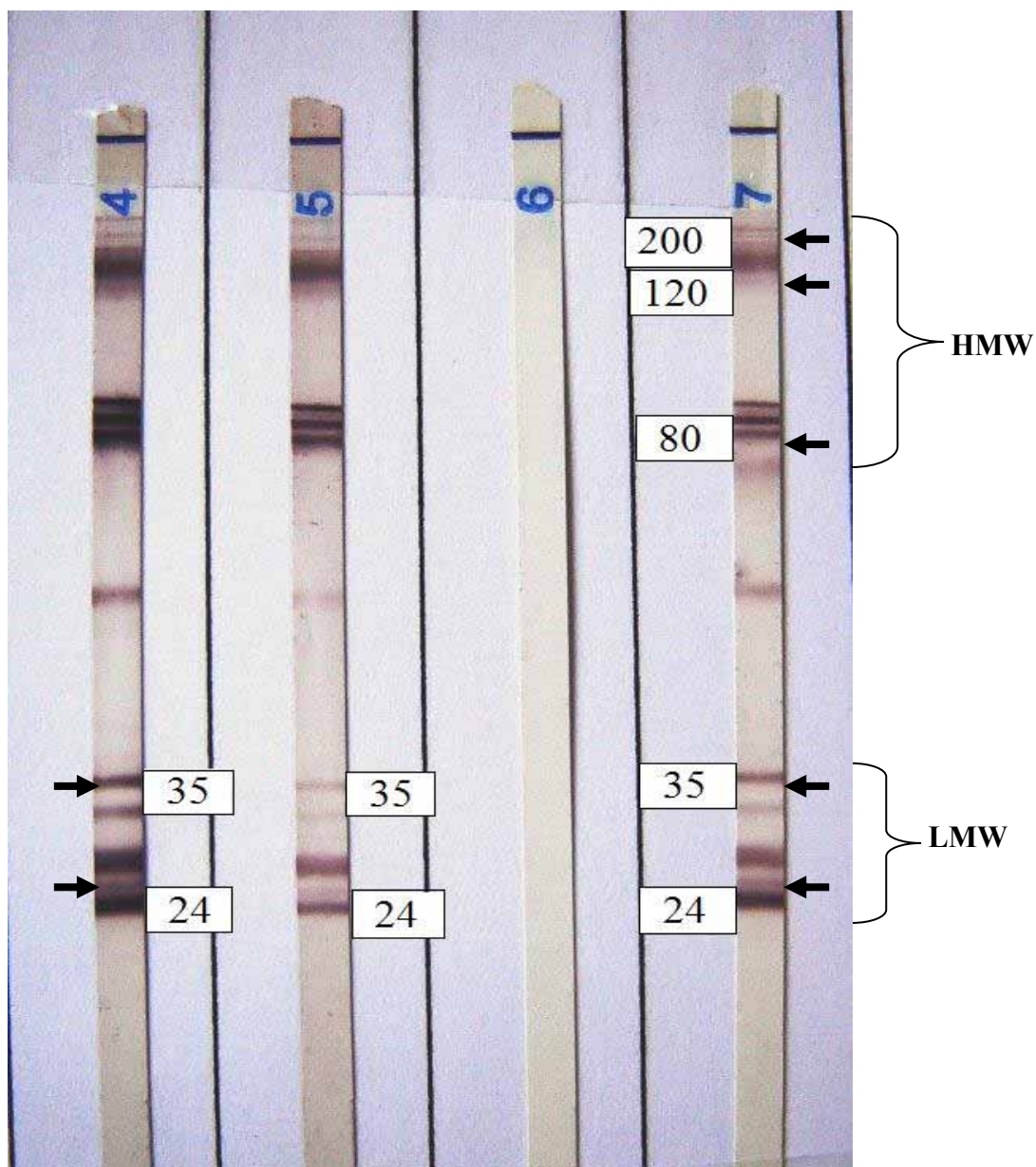
- Sledi izpiranje: s plastično pihalko posesamo vso tekočino iz kanalčkov. Nato damo v vsak kanalček po 2 ml spiralne tekočine, pretresemo in ponovno posrkamo vso tekočino. Postopek ponovimo še dvakrat z razliko, da po dodatku spiralne tekočine inkubiramo 3 minute pri sobni temperaturi.
- V kanalčke dodamo 1,2 ml konjugata anti-IgG. Banjico rahlo pretresemo in 30 minut inkubiramo na stresalniku pri sobni temperaturi.
- Ponovimo postopek izpiranja iz točke 6.
- V kanalčke dodamo 1,2 ml substrata, rahlo pretresemo, pokrijemo z aluminijasto folijo ter 30 minut inkubiramo na stresalniku pri sobni temperaturi.
- Reakcijo ustavimo tako, da posesamo vso tekočino, dodamo 2 ml destilirane vode, ponovno posesamo vso tekočino in še enkrat speremo z destilirano vodo.
- S pinceto prenesemo vsak trak posebej na filtrirni papir in pustimo približno 15 minut, da se posušijo.
- Posušene trakove nalepimo na papir z lepilnim trakom. Papir nato vložimo v mapo, kjer imamo shranjene trakove kot arhiv.

Odčitavanje rezultatov

V kitu dobimo poleg nitroceluloznih trakov tudi trak z nanesenimi standardi. S tem trakom, lahko določimo velikosti vidnih lis na našem traku. Pri okužbi s toksokaro se lahko pojavita 2 ali več vidnih lis velikosti od 24 do 35 kDa. To so nizko molekularne vidne lise (LMW). So pokazatelji navzočnosti specifičnih protiteles IgG proti toksokari. Pojavijo se lahko tudi visoko molekularne vidne lise (HMW) in sicer v dveh območjih: med 70 in 90 kDa ter pri 200 kDa. HMW so manj specifični za toksokaro in so lahko rezultat navzkrižnih reakcij z drugimi helminti.

Na sliki 4 so prikazani rezultati testa WB. Listič 7 predstavlja pozitivno kontrolo. Nizko molekularni pasovi (LMW), ki so specifični za toksokarno okužbo, so veliki med 24 in 35 kDa. Visoko molekularni pasovi (HMW) pa so za toksokarno okužbo specifični. Lističa 4 in 5 kažeta pozitiven rezultat, listič 6 pa negativnega.

POZITIVNO POZITIVNO NEGATIVNO KONTROLA



Slika 4: Prikaz rezultatov toksokarnega testa Western blot z označenimi visoko in nizko molekularnimi pasovi

4 REZULTATI

Preiskali smo 277 serumov bolnikov s sumom na toksokarozo, ki so jih zdravniki poslali v laboratorij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v času od 23. aprila 2003 do 9. marca 2006.

Zanimalo nas je, kako učinkovita sta pri dokazovanju humane toksokaroze testa ELISA in Western blot.

Vse serume smo najprej preiskali s testom ELISA. Nato smo vse serume z negativnim rezultatom s testom ELISA, serume z rezultati mejnih vrednosti in s pozitivnimi rezultati pregledali še s testom Western blot.

Test ELISA

Rezultate pregledanih serumov s testom ELISA smo ovrednotili glede na podatke (kontrolne) in navodila proizvajalca testa.

Test Western blot

V primeru, da so se pri testiranju seruma s testom WB pojavile značilne vidne lise kot pri pozitivni kontroli, smo tak vzorec opredelili kot pozitiven.

Preglednica 3 prikazuje rezultate obeh testov. S testom ELISA je imelo 160 serumov pozitiven rezultat, 68 negativen in 49 mejne vrednosti; s testom WB je 151 serumov imelo pozitiven rezultat, 126 pa negativnega.

Preglednica 3: Rezultati, dobljeni pri testiranju serumov s testoma ELISA in WB; negativni (-), pozitivni (+) in mejni rezultati (+/-). Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo in obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB
1	+	+	34	+	+	67	+	+
2	+	+	35	+	+	68	+	+
3	+	+	36	+	+	69	+	-
4	+/-	-	37	+/-	-	70	+	+
5	+	-	38	+	-	71	+	+
6	+/-	+	39	+/-	+	72	+/-	+
7	+	-	40	+	-	73	+/-	-
8	-	-	41	+/-	-	74	+/-	-
9	+	+	42	+/-	-	75	+	-
10	+	+	43	+	-	76	+	+
11	+	+	44	+	-	77	+	+
12	+/-	+	45	+	-	78	+	-
13	+	+	46	+/-	-	79	+	-
14	+	+	47	+/-	+	80	+/-	+
15	+/-	+	48	+	-	81	+	-
16	+	+	49	-	-	82	+	-
17	+	+	50	+	+	83	+/-	+
18	+/-	+	51	+/-	+	84	+	-
19	+/-	+	52	+	-	85	+	-
20	-	-	53	+	+	86	-	-
21	+	-	54	+	-	87	+/-	+
22	+	+	55	+	+	88	+	+
23	+	-	56	+	+	89	+	+
24	-	-	57	+	+	90	+	+
25	+/-	+	58	+	+	91	+	+
26	+/-	+	59	-	-	92	+	+
27	+	+	60	-	-	93	-	-
28	+/-	+	61	+	-	94	-	-
29	+	+	62	+	-	95	-	-
30	+	-	63	+	+	96	+	+
31	+	+	64	+	-	97	+	-
32	-	-	65	-	-	98	+	+
33	+	+	66	+	-	99	-	-

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 3: Rezultati, dobljeni pri testiranju serumov s testoma ELISA in WB; negativni (-), pozitivni (+) in mejni rezultati (+/-). Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo in obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB
100	-	-	133	-	-	166	+	+
101	-	-	134	+	-	167	+	+
102	+	-	135	-	-	168	-	-
103	+	+	136	+/-	+	169	+	+
104	+	+	137	+	+	170	+	-
105	+	-	138	+	+	171	+	+
106	+	+	139	+/-	-	172	+	+
107	+/-	+	140	+/-	-	173	+	+
108	-	-	141	+/-	+	174	+	+
109	+	+	142	+	+	175	+	-
110	+	+	143	+/-	+	176	+/-	+
111	+	-	144	+	+	177	-	-
112	+	+	145	+	-	178	+/-	+
113	-	-	146	-	-	179	+	+
114	+	+	147	+	+	180	+	+
115	+	+	148	-	-	181	-	-
116	-	-	149	-	-	182	-	-
117	+	+	150	+	+	183	+	+
118	+	+	151	+	+	184	+	+
119	+	-	152	+	+	185	+	+
120	-	-	153	+	+	186	+	-
121	+	+	154	+	-	187	+	+
122	+	+	155	+	+	188	+	+
123	+	-	156	+	+	189	+	+
124	+/-	+	157	-	-	190	-	-
125	+	+	158	+/-	+	191	+	+
126	+	-	159	+	+	192	-	-
127	+	-	160	-	-	193	+	+
128	-	-	161	+	+	194	+	+
129	+	-	162	-	-	195	+/-	+
130	+	-	163	-	-	196	+	+
131	+	+	164	+	+	197	+	+
132	-	-	165	+	-	198	+	-

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 3: Rezultati, dobljeni pri testiranju serumov s testoma ELISA in WB; negativni (-), pozitivni (+) in mejni rezultati (+/-). Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo in obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB	Številka vzorca	ELISA	WB
199	+	+	226	+	-	253	-	-
200	-	-	227	+	-	254	-	-
201	-	-	228	-	-	255	-	-
202	-	-	229	+	+	256	-	-
203	+	-	230	-	-	257	+/-	+
204	-	-	231	+	+	258	-	-
205	+	+	232	-	-	259	+/-	+
206	-	-	233	+	-	260	-	-
207	-	-	234	-	-	261	+	+
208	+	-	235	+	+	262	+/-	+
209	+	+	236	+	+	263	+/-	+
210	+/-	+	237	+/-	+	264	+/-	+
211	+	+	238	-	-	265	+/-	-
212	+	+	239	+	-	266	+	+
213	-	-	240	+	+	267	-	-
214	+	+	241	+	+	268	-	-
215	-	-	242	-	-	269	+	+
216	+	+	243	+	+	270	+	+
217	+/-	+	244	+	+	271	+	+
218	+	+	245	+	+	272	+/-	+
219	-	-	246	-	-	273	+/-	+
220	-	-	247	+/-	+	274	-	-
221	-	-	248	-	-	275	+	+
222	+/-	+	249	-	-	276	+/-	+
223	+/-	+	250	+/-	+	277	+	+
224	+/-	+	251	-	-			
225	+	+	252	-	-			

V preglednici 4 so rezultati dobljeni s testoma ELISA in WB, razvrščeni v skupine glede na to ali so pozitivni, negativni ali mejni.

Preglednica 4: Število in delež (%) pozitivnih in negativnih rezultatov ter rezultatov z mejnimi vrednostmi, dobljenih pri testiranju serumov s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

Test	pozitivni(%)	Negativni (%)	Mejni(%)	skupaj
ELISA	160 (57,8%)	68 (24,5%)	49 (17,8%)	277
WB	151 (54,5%)	126 (45,5%)	/	277

Serume, ki so s testom ELISA pokazali mejni rezultat, smo v preglednici 5 razvrstili glede na rezultat s testom WB.

Preglednica 5: Število in delež rezultatov z mejnimi vrednostmi s testom ELISA, ki so pokazale pozitiven ali negativen rezultat s testom WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

	pozitivni (%)	negativni (%)	skupaj
WB	40 (81,6)	9 (18,4)	49

Test ELISA je pri 160 serumih pokazal pozitiven rezultat, pri 68 serumih negativnega, pri 49 pa je pokazal mejni rezultat. Ko smo z WB testom pregledali vse serume, ki so s testom ELISA pokazali pozitiven, negativen ali mejni rezultat, smo dobili 151 pozitivnih in 126 negativnih rezultatov. Devetinštirideset serumov, ki so pokazali pozitiven rezultat s testom ELISA, so s testom WB pokazali negativen rezultat. Od devetinštiridesetih serumov, ki so s testom ELISA imeli mejni rezultat, jih je s testom WB 40 pokazalo pozitiven, 9 pa negativen rezultat.

Oseminpetdeset serumov je s testom ELISA pokazalo lažno pozitiven rezultat. To so serumi, ki so s testom ELISA pokazali pozitiven ali mejni rezultat, s testom WB pa negativnega.

V preglednici 6 so razvrščeni serumi v skupine glede na to ali so z obema testoma pokazali pozitiven, negativen ali pa različen rezultat.

Preglednica 6: Število ter delež pozitivnih in negativnih rezultatov dobljenih pri obeh testih ter število in delež serumov z različnimi vrednostmi. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

	pozitivni (%)	negativni (%)	različni (%)
ELISA in WB	110 (39,7)	69 (24,9)	98 (35,4)

Število rezultatov, kjer sta bila oba testa bodisi pozitivna ali negativna, je bilo 179 od skupno 277. To pomeni, da se testa ujemata v 64,6 %. V 98 (35,4%) primerih so se rezultati testov razlikovali, pri čemer je serum s testom ELISA pokazal pozitiven ali mejni rezultat, s testom WB pa negativnega in obratno. Iz teh rezultatov je razvidno, da testa ELISA in WB dajeta v 35,4% različne rezultate.

V preglednici 7 smo razvrstili serume v štiri skupine na podlagi rezultatov s testoma WB in ELISA. Serume, ki so pokazali mejni rezultat s testom ELISA, smo prišteli serumom, ki so imeli pozitiven rezultat s testom ELISA.

Preglednica 7: Število pozitivnih in negativnih rezultatov s testoma ELISA in WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

	+	-	Skupaj
WB	151	126	277
ELISA	209	68	277
Skupaj	360	194	554

Opomba: mejne vrednosti, dobljene pri testu ELISA, smo prišteli k pozitivnim vrednostim

S χ^2 - testom smo rezultate statistično ovrednotili in ugotovili, da je med testoma statistično značilna razlika ($\chi^2=26.685$, $P=0.0001$).

V preglednici 8 smo serume razvrstili podobno kot v preglednici 7, le da smo serume, ki so pokazali mejni rezultat razvrstili glede na rezultat s testom WB.

Preglednica 8: Število pozitivnih in negativnih vrednosti s testoma ELISA in WB. Testirani so bili serumi s sumom na toksokarozo iz obdobja med aprilom 2003 in 9. marcem 2006.

	+	-	Skupaj
WB	151	126	277
ELISA	200	77	277
Skupaj	351	203	554

Opomba: 40 serumov, ki so s testom ELISA pokazali mejni, s testom WB pa pozitiven rezultat, smo prišteli k serumom s pozitivnim rezultatom s testom ELISA; 9 serumov, ki so s testom ELISA pokazali mejni in s testom WB negativen rezultat, pa smo prišteli k serumom z negativnim rezultatom s testom ELISA.

V primeru, da smo število serumov z mejnim rezultatom s testom ELISA in pozitivnim rezultatom s testom WB prišteli k številu serumov s pozitivnim rezultatom s testom ELISA, serume z mejnim rezultatom s testom ELISA in negativnim rezultatom s testom WB pa k negativnim rezultatom serumov s testom ELISA, je χ^2 - test pokazal statistično značilno razliko med testoma ($\chi^2=18,668$, $P=0.0001$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Toksokaroza je zoonoza, ki jo povzročata helminta *Toxocara canis* in *Toxocara cati*. Razširjena je povsod po svetu, tudi v Sloveniji. Dokazovanje gliste temelji na različnih seroloških testih. Na inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete uporabljajo testa ELISA in WB. V nalogi smo ocenjevali zanesljivost obeh.

Serume bolnikov smo najprej pregledali s testom ELISA. Od 277 vzorcev jih je 49 pokazalo mejne rezultate, 160 pozitivne in 68 negativne rezultate. Vse vzorce smo nato testirali še s testom WB. Pri sto enainpetdesetih serumih smo dobili pozitiven rezultat, pri 126 pa negativnega. Od 49 vzorcev, ki so s testom ELISA pokazali mejni rezultat, jih je 40 pokazalo z WB testom pozitiven rezultat, 9 sevov pa negativnega.

Osemindeset serumov je s testom ELISA pokazalo lažno pozitiven rezultat; t.i. serumi, ki so s testom ELISA pokazali mejen ali pozitiven rezultat, s testom WB pa negativnega.

Oba testa sta pokazala enak rezultat pri 179 primerih. Sto deset serumov je z obema testoma pokazalo pozitiven rezultat, 69 pa negativnega. Oba testa sta pokazala torej v 64,6% enak rezultat, v 35,4% pa različnega.

Zanesljivost testov smo statistično ovrednotili s χ^2 -testom. Rezultati testov ELISA in WB se z majhno verjetnostjo napake statistično razlikujejo. χ^2 znaša 26,685 in P 0,0001. P vrednost je zelo majhna, kar pomeni, da se rezultati testov ELISA in WB ne razlikujejo zaradi naključja, temveč gre za resnično razliko med njima. V primeru, da smo serume, ki so pokazali mejno vrednost s testom ELISA in pozitiven rezultat s testom WB prišteli k številu serumov s pozitivnim rezultatom s testom ELISA, serume z mejnim rezultatom s testom ELISA in negativnim rezultatom s testom WB pa k negativnim rezultatom serumov s testom ELISA, je χ^2 -test ravno tako pokazal statistično značilno razliko med testoma ($\chi^2=18,668$, P =0.0001).

Podatki o specifičnosti in občutljivosti testov ELISA ter WB so navedeni v navodilih proizvajalca. Specifičnost testa ELISA znaša 95%, občutljivost pa 92,3%. Test WB je 100% specifičen. Občutljivost testa nam pove delež obolelih, katere je test pravilno identificiral za pozitivne. Specifičnost testa pa nam pove delež nebolelih, ki so bili s testom pravilno identificirani za negativne.

Vzroki za različne rezultate, dobljene s testoma ELISA in WB, so naslednji: pri testu ELISA lahko pride do navzkrižne reakcije z drugimi helminti, kot sta npr. *Ascaris lumbricoides* ali *Schistosoma sp.*. Antigen TES, ki ga uporabljamo pri testu ELISA, ima namreč specifične in nespecifične frakcije, ki so lahko vzrok za navzkrižne reakcije, ki vplivajo na rezultat testa. Na rezultat pa vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. ponavljajoče zamrzovanje vzorcev, ki vpliva na količino protiteles v vzorcu in s tem spremeni izmerjeno absorbanco, bakterijska kontaminacija ter napaka pri izvedbi testa.

Test ELISA je v nalogi pokazal dobro občutljivost in malce slabšo specifičnost, kot jo navaja proizvajalec. Test ELISA je pokazal pozitiven rezultat pri obolelih in pri nekaterih zdravih osebah ter tako pokazal lažno pozitiven rezultat. Serume teh preiskovancev smo s testom WB ponovno preverili. WB test je pokazal dobro specifičnost in je zato primeren predvsem kot potrditveni test, test ELISA pa je zaradi dobre občutljivosti primeren predvsem kot presejalni test. Podobno so ugotovili tudi Magnaval in sod. (1991).

5.2 SKLEPI

- *Toxocara canis* in *Toxocara cati* sta helminta, ki povzročata bolezen toksokarozo. Diagnostika bolezni temelji na prepoznavanju kliničnih znakov in na seroloških testih. V nalogi smo preskusili in ocenili serološka testa ELISA in WB.
- Testa ELISA in WB sta pokazala v 35,4% testiranih serumov različne rezultate. To smo potrdili tudi s χ^2 -testom.
- Ugotovili smo, da je ELISA test primeren predvsem kot presejalni test, to pa zato, ker je dobro občutljiv, tako da z njim odkrijemo zelo veliko obolelih oseb. Pokaže tudi določeno število lažno pozitivnih rezultatov, ki pa jih nato s testom WB bodisi potrdimo bodisi za pozitivne ali negativne.
- Zaradi zgoraj omenjenih dejstev tako kot Magnaval (1991) tudi mi menimo, da je test WB v diagnostiki toksokaroz uporaben predvsem kot potrditveni test.

6 POVZETEK

Toksokaroza je bolezen, ki jo pri človeku povzročajo ličinke glist *Toxocara canis* in *Toxocara cati*. Razširjena je povsod po svetu, najbolj pa v tropskem in subtropskem pasu. Človek se lahko okuži z jajčeci, iz katerih se v črevesju razvijejo ličinke. Te potujejo po telesu in pri tem poškodujejo različna tkiva. Ličinke povzročajo sindrom visceralno larvo migrans, pri katerem pride do poškodbe različnih organov (jetra, srce, možgani itd.) ter okularno toksokarozo, kadar ličinka zaide v oči.

Toksokaroza je v svetu in pri nas bolj pogosta, kot so mislili v preteklosti. K temu spoznanju je pripomogel predvsem razvoj seroloških diagnostičnih testov. V nalogi smo ovrednotili dva izmed njih: ELISA in WB. Pri obeh metodah dokazujemo specifična protitelesa IgG proti toksokari. Poskusili smo ugotoviti, katera metoda je za dokazovanje toksokaroze bolj ustrezna. Testirali smo serume bolnikov s sumom na toksokarozo, ki so bili poslani na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, v parazitološki laboratorij. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili s χ^2 -testom.

Od 277 serumov je s testom ELISA 160 vzorcev pokazalo pozitiven, 68 negativen, 49 vzorcev pa mejni rezultat. Nato smo serume pregledali še s testom WB. Sto enainpetdeset serumov je pokazalo pozitiven rezultat, 126 pa negativnega. Od 49 serumov, ki so s testom ELISA pokazali mejni rezultat, jih je 40 pokazalo s testom WB pozitiven rezultat, 9 pa negativnega. Test ELISA je pri 58 serumih pokazal lažno pozitiven rezultat.

S primerjavo rezultatov obeh testov smo izračunali, da sta testa pri 179 (64,6%) serumih pokazala enak rezultat, pri 98 oz. 35,4% vzorcih pa sta testa pokazala različne rezultate. Ugotovili smo statistično značilno razliko med obema testoma.

Izračunali smo občutljivost in specifičnost testa ELISA, ki sta znašali 76,8% in 54%. Pri tem smo kot zlati standard uporabili rezultate testa WB v kombinaciji s klinično sliko bolnika. Ugotovili smo, da je test ELISA zaradi svoje dobre občutljivosti zelo dober kot presejalni test, test WB pa pri serumih z nejasnimi rezultati kot potrditveni test.

7 VIRI

- Abo-Shehada M.N., Sharif L., El-Shukon S.N., Abuharfeil N., Atmah R.F. 1992. Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in humans in northern Jordan. *Journal of Helminthology*, 66: 75-78
- Aguiar- Santos A.M., Andrade L.D., Madeiros Z., Chieffi P.P., Lescano S.Z., Perez E.P. 2004. Human toxocariasis: frequency of anti- *Toxocara* antibodies in children and adolescents from an outpatient for lymphatic filariasis in Recife, northeast Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46, 2: 81-85
- Ajayi O.O., Duhlińska D.D., Agwale S.M., Njoku M. 2000. Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 147-149
- Alonso J.M., Bojanich M.V.I., Chamorro M., Gorodner J.O. 2000. *Toxocara* seroprevalence in children from subtropical city in Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42: 235-237.
- Anaruma Filho F.A., Chieffi P.P., Correa C.R.S., Camargo E.D., Silveria E.P., Real de, Aranha J.J.B., Ribero M.C. 2002. Human toxocariasis: seroepidemiological survey in municipal of Campinas (SP), Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44: 303-307
- AnarumaFilho F.A., Chieffi P.P., Correa C.R.S., Camargo E.D., Silveria E.P., Real de, Aranha J.J.B., Ribero M.C. 2003. Human toxocariasis: incidence among residents in the outskirts of Campinas State of Sao paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45: 293-294
- Buijs J., Borsboom G., van Gemund J.J., Hazebroek A., van Dongen P.A.M., van Knapen F., Neijens H.J. 1994. *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. *American Journal of Epidemiology*, 140: 839-847
- Buijs J., Borsboom G., Renting M., Hilgersom W.J.A., van Wieringen J., Jansen G., Neijens J. 1997. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *European Respiratory Journal*, 10: 1467-1475
- Cancrini G., Bartoloni A., Zaffaroni E., Guglielmetti P., Gamboa H., Nicoletti A., Genchi C. 1998. Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parassitologia*, 40: 473-475
- Caucanas. J.P., Magnaval J.F., Pascal J.P. 1988. Prevalence of toxocaral disease. *Lancet*, 1, 8593: 1049-1049

- Chomel B.B., Kasten R., Adams C., Lambillote D., Theis J., Goldsmith R., Koss J., Chioinoi C., Widjana D.P., Sustina P. 1993. Surosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 24: 321-326
- Clemett R.S., Hidajat R.R., Allardyce R.A., Stewart A.C. 1985. Toxocaral infection in hydatid control officers: diagnosis by enzyme immunoassay. *New Zealand Medical Journal*, 98, 786: 737-739
- Coêlho R.A.L., Yamasaki H., Perez E., Carvalho Jr L.B. 2003. The use of polysiloxane/polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 3: 391- 393
- Conde Garcia L., Muro Alvarez A., Simon Martin F. 1989. Epidemiological studies on toxocariasis and visceral larva migrans in a zone of western Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83: 615-620
- Dayan A.D. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non- clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86: 141-159
- De Savigny D.H. 1975. *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. *Journal of Parasitology*, 61: 781-782
- De Savigny D.H., Voller A., Woodruff A.W. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32: 284-288
- Desowitz R.S., Rudoy R., Barnwell J.W., 1981. Antibodies of canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 65: 361-366.
- Despommier D. 2003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 2: 264-272
- Ellis G.S., Paklanis V.A., Worley G., Green J.A., Fortingham T.E., Sturmer R.A., Walls K.W. 1986. *Toxocara canis* infection. Clinical and epidemiological associations with seropositivity kindergarten children. *Ophthalmology*, 93: 1032-1037
- Embil J.A., Tanner C.E., Pereira L.H., Staudt M., Morrison E.G., Gualazzi D.A. 1988. Seroepidemiologic survey of *T. canis* infection in urban and rural children. *Public Health*, 102: 129-133
- Genchi C., Tinelli M., Brunello P., Falagiani P. 1986. Serodiagnosis of ocular toxocariosis: a comparison of specific IgE and IgG. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 6: 993-995
- Gillespie S.H. 1987. Human toxocariasis. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 6: 473-479

- Gillespie S.H., Bidwell D., Voller A., Robertson B.D., Maizels R.M. 1993. Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Pathology*, 46: 551-554
- Glickman L.T., Schantz P.M. 1981. Epidemiology and pathogenesis of toxocariasis. *Epidemiologic Reviews*, 3: 230-250
- Glickman L., Grieve R.B., Lauria S.S., Jones D.L. 1985. Serodiagnosis of ocular toxocariasis: a comparison of two antigens. *Journal of Clinical Pathology*, 38: 103-107
- Good B., Holland C.V., Taylor M.R.H., Larragy J., Moriarty P., O'Regan M. 2004. Ocular toxocariasis in school children. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 173- 178
- Habluetzel A., Traldi G., Ruggieri S., Attili A.R., Scuppa P., Marchetti R., Menghini G., Esposito F. 2003. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Veterinary Parasitology*, 113: 243-252
- Hakim S.L., Mak J.W., Lam P.L.W. 1993. ELISA seropositivity for *Toxocara canis* antibodies in Malaysia, 1989-1991. *Medical Journal of Malaysia*, 48: 303-307
- Hakim S.L., Thadasavanth M., Raden Shamilah R.H., Yogeswari S. 1997. Prevalence of *Toxocara canis* antibody among children with bronchial asthma in Klang Hospital, Malaysia. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 528-528
- Havasiova K., Dubinsky P., Stefanickova A. 1993. A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *Journal of Helminthology*, 67:291-296
- Herrmann N., Glickman L.T., Schantz P.M., Weston M.G., Domanski L.M. 1985. Seroprevalence of zoonotic toxocariasis in the United States: 1971-1973. *American Journal of Epidemiology*, 122: 890-896
- Iddawela R.D., Rajapakse R.P.V.J., Perera N.A.N.D., Agatsuma T. 2007. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean Journal of Parasitology*, 45, 1:19-26
- Jacquier P., Gottstein B., Springelin Y., Eckert J. 1991. Immunodiagnosis of toxocariasis in humans: evaluation of new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1831-1835
- Jeanfaivre T., Cimon B., Tolstuchow N., de Gentile L., Chabasse D. 1996. Pleural effusion and toxocariasis. *Thorax*, 51, 1:106-107

- Kenny J.W., MacCabe R.J., Smith H.V., Holland C. 1995. Serological evidence for the presence of toxocariasis in the Turkana District of Kenya. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 377-378
- Kwon N.H., Oh M.J., Lee S.P., Lee B.J., Choi D.C. 2006. The prevalence and diagnostic value of toxocariasis in unknown eosinophilia. *Annals of Hematology*, 85: 233-238
- Lescano S.A.Z., Chieffi P.P., Peres B.A., de Mello E.O., Velarde C.N., Salinas A.A., Rojas C.E. 1998. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. In the urban area of Lima, Peru. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 733-734
- Lewis J.W. 2006. Epidemiological surveillance of *Toxocara* and toxocariasis. V: *Toxocara: the enigmatic parasite*. Holland C.V., Smith H.V. (eds.). Wallingford, Cambridge: 195-210
- Ljungström I., van Knapen F. 1989. An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 21, 1: 87-93
- Logar J., Knapen van F. 1990. Ugotavljanje toksokariaze v Sloveniji. *Zdravstveni vestnik*, 59: 193-194
- Logar J., Kraut A., Likar M. 1993. *Toxocara* antibodies in patients with visceral or ocular disorder in Slovenia. *Infection*, 21, 1: 27-29
- Logar J. 1999. *Parazitologija v medicini*. 1. izdaja. Ljubljana, Državna založba Slovenije, 123, 140-143
- Logar J., Šoba B., Kraut A., Strin-Kranjc B. 2004. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia. *Korean Journal of Parasitology*, 42, 3: 137-140
- Lynch N.R., Wilkes L.K., Hodgen A.N., Turner K.J. 1988. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunology*, 10: 323-337
- Magnaval J.F., Fabre R., Maurieres P., Charlet J.P., de Larrard B. 1991. Application of the western blotting procedure for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research*, 77, 8: 697-702
- Magnaval J.F., Fabre R., Maurieres P., Charlet J.P., Larrard B. 1992. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 9: 2269-2274
- Magnaval J.F., Michault A., Calon N., Charlet P. 1994. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 531-533

- MagnaVal J.F., Glickman L.T., Dorchies P., Morassin B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, 39, 1: 1-11
- MagnaVal J.F., Glickman L. 2006. Management and treatment options for human toxocariasis. V: *Toxocara: the enigmatic parasite*. Holland C.V., Smith H.V. (eds.). Wallingford, Cambridge: 113-126
- Matos M. de F.C., Militao D.N.A., Brum M.A.R., Omais M., Quiliao M.E., Dorval M.E.C., Pereira A. de C., Possi L.A., Sauer L., Camargo E.D., Tundisi R.N. 1997. Presence of anti-*Toxocara* antibodies in children selected of Hospital Universitario, Campo Grande, MS, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 93: 49-50
- Montalvo A.M., Espino A.M., Escalante G., Finlay C.M. 1994. Study of the seroprevalence of toxocariasis in an infantile population in the city of Havana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 46: 156-158
- Morales O.L., Lopez M.C., Nicholls R.S., Agudelo C. 2002. Identification of *Toxocara canis* antigens by western blot in experimentally infected rabbits. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 4: 213-216
- Moreira-Silva S.F., Leao M.E., Medonca H.S.F., Pereira F.E.L. 1998. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of patients at children's hospital in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40: 263-264
- Moreira-Silva S.F., Rodrigues M.G., Pimenta J.L., Gomes C.P., Freire L.H., Pereira F.E.L. 2004. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Revista de Sociedade de Medicina Tropical*, 37, 2:169-174
- Nicholas W.L., Stewart A.C., Walker J.C. 1986. Toxocariasis: a serological survey of blood donors in the Australian Capital Territory together with observations on the risks of infection. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 217-221
- Nunes C.M., Tundisi R.N., Garcia J.F., Heinemann M.B., Ogassawara S., Richtzenhain L.J. 1997. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris summa* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39, 5: 253-256
- O'Lorcain P. 1994. Epidemiology of *Toxocara spp.* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *Journal of Helminthology*, 68, 4: 331-336
- Park H.Y., Lee S.U., Huh S., Kong Y., Magnaval J.F. 2002. A seroepidemiology survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gwang-do, Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 40: 113-117

- Patrick W.K.C., Abdullah K.A., Mun Y.F., Jessie A.D., Jamaiah I. 2001. *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. *Pediatrics International*, 43: 350-353
- Piarroux R., Gavignet B., Hierro S., Humbert P. 2006. Toxocariasis and the skin. V: *Toxocara: the enigmatic parasite*. Holland C.V., Smith H.V. (eds.). Wallingford, Cambridge: 145-157
- Radman N.E., Archelli S.M., Fonrouge R.D., Guardis M.V., Linzitto O.R. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 281-285.
- Rai S.K., Uga S., Ono K., Nakanishi M., Shrestha H.G., Matsumura T. 1996. Seroepidemiological study of *Toxocara* infection in Nepal. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 27: 286-290.
- Roberts L.S., Janovy Jr. J., Schmidt P. 2000. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 6th ed. Boston, McGraw-Hill: 670 str.
- Robertson B.D., Burkot T.R., Gillespie S.H., Kennedy M.W., Wambai Z., Maizels R.M. 1988. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clinical and Experimental Immunology*, 74: 236-241
- Roldan W., Cornejo W., Espinoza Y. 2006. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 1: 71-74
- Schantz P.M., Glickman L.T. 1978. Toxocaral visceral larva migrans. *New England Journal of Medicine*, 298, 8: 436-439
- Smith H., Noordin R. 2006. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. V: *Toxocara: the enigmatic parasite*. Holland C.V., Smith H.V. (eds.). Wallingford, Cambridge: 89-112
- Song K.H., Hayasaki M., Cho K.W., Lee S.E., Kim D.H. 2002. Cross-reaction between sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and crude extract of *Toxocara canis*. *Korean Journal of Parasitology*, 40, 4: 195-198
- Sturchler D., Bruppacher R., Speiser F. 1986. Epidemiological aspects of toxocariasis in Switzerland. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 116: 1088-1093
- Takayanagi T.H., Akao N., Suzuki R., Tomoda M., Tsukidate S., Fujita K. 1999. New animal model for human ocular toxocariasis: ophthalmoscopic observation. *British Journal of Ophthalmology*, 83, 8:967-72

- Uga S., Ono K., Kataoka N., Hasan H. 1996. Seroepidemiology of five major zoonotic parasite infections in inhabitants of Sidoarjo, East Java, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and public Health*, 27: 556-561.
- Webster G. 1958. A report on *Toxocara canis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 22, 8: 272-277
- Woodruff A.W., Thacker C.K., Shah A.I. 1964. Infection with animal helminths. *British Medical Journal*, 1: 1001-1005
- Woodruff A.W., Bisseru B., Bowe J.C. 1966. Infection with animal helminths as factor in causing poliomyelitis and epilepsy. *British Medical Journal*, 1, 5503: 1576-1579
- Woodruff A.W. 1970. Toxocariasis. *British Medical Journal*, 3: 663-669
- Worley G., Green J.A., Forthingham T.E., Sturmer R.A., Walls K.W., Pakalnis V.A., Ellis G.S. 1984. *Toxocara canis* infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. *Journal of Infectious Diseases*, 149: 591-597
- Xi W., Jin L. 1998. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *Journal of Helminthology*, 72: 183-184
- Yamasaki H., Araki K., Lim P.K.C., Zasmy N., Mak J.H., Taib R., Aoki T. 2000. Development of a high specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4: 1409-1413
- Yoshida M., Shirao Y., Asai H., Nagase H., Nakamura H., Okazawa T., Kondo K., Takayanagi T.H., Fujita K., Akao N. 1999. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. *Journal of Helminthology*, 73: 357-361

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jerneju Logarju za nasvete pri izvedbi in pisanju diplomske naloge in recenzentki prof. dr. Jožici Marin za temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala Jožetu Kastelicu za vso pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu ter ostalim sodelavcem parazitološkega laboratorija Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Hvala tudi Špeli za vzpodbudo ter pomoč in nasvete pri pisanju naloge.

In še na koncu hvala mojim staršem za spodbudo in podporo tekom študija.