

## *Die diagnostische Bedeutung des Nachweises spezifischer IgE-Antikörper bei Toxocara-Infestationen*

A. Obwaller<sup>1</sup>, H. Auer<sup>1</sup>, Erika Jensen-Jarolim<sup>2</sup>, Agnes Leitner<sup>2</sup>, D. Kraft<sup>2</sup>, H. Aspöck<sup>1</sup>

### **Einleitung**

Der Hundespulwurm *Toxocara canis* ist einer der häufigsten parasitischen Nematoden bei Säugern. Seroprävalenzen zwischen 1,4% und 7% (3, 12, 18, 19) zeigen, daß Infestationen des Menschen auch in Mitteleuropa – trotz des hohen Hygienestands – ein häufiges Ereignis darstellen. Schwere Krankheitsverläufe sind allerdings selten (1, 16), in den meisten Fällen verläuft eine Infestation mit *Toxocara canis* subklinisch oder klinisch völlig inapparent.

Die Infektion sowohl des natürlichen Wirtes (Hund) als auch der paratenischen Wirte (z. B. Mensch) erfolgt durch die orale Aufnahme embryonierter *Toxocara*-Eier, beim Menschen vor allem über kontaminierte Nahrung (Vegetabilien) oder Schmutz- und Schmierinfektion. Die Larven schlüpfen im Dünndarm, penetrieren die Darmwand und wandern aktiv oder gelangen via Blutkreislauf in andere Gewebe und Organe. Während der Parasit im Hund und anderen Kaniden den vollständigen Entwicklungszyklus durchläuft und sich im Darm zum Adultus entwickelt, kann er sich in anderen Säugern – so auch im Menschen – nicht vom 3. in das 4. Larvenstadium entwickeln und ist ontogenetisch arretiert. Infektionsversuche an Labortieren haben gezeigt, daß die eingeschlossenen Larven über Jahre hinweg am Leben bleiben können, wobei sie permanent das Immunsystem stimulieren.

Die klinische Symptomatik der Toxokarose ist abhängig von der Lokalisation der wandernden Larven. Man unterscheidet zwei typische klinische Manifestationen, nämlich das Larva migrans visceralis-Syndrom (VLM), das durch Fieber, Bauchschmerzen, Bronchitis, Hepatomegalie, Eosinophilie und Hypergammaglobulinämie charakterisiert ist und das durch Visusverlust, Uveitis, Retinitis oder Endophthalmitis geprägte okuläre Larva migrans-Syndrom (OLM) (11).

Die Diagnose einer *Toxocara*-Infestation bzw. einer Toxokarose basiert heute im wesentlichen auf dem serologischen Nachweis von spezifischen (IgG)-Antikörpern mittels eines Enzymimmuntests (ELISA) und eines Immunoblot-Verfahrens (IB) unter Verwendung von exkretorisch-sekretorischem (E/S) *Toxocara canis*-Antigen (2, 3). Eine Aussage über die Aktivität der Toxokarose ist mit diesen Verfahren jedoch nur beschränkt möglich.

Die begrenzte Aussagekraft dieser auf dem Nachweis spezifischer IgG-Antikörper beruhenden Tests hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz (Eingrenzung des Infektionszeitpunktes, Bestimmung des Infektions- oder Krankheitsstadiums, Aussage über Therapieerfolg oder -mißerfolg) hat uns dazu veranlaßt, zu überprüfen, ob Tests zum Nachweis spezifischer IgE-Antikörper die klinische Relevanz der Toxokarose-Serologie wesentlich verbessern könnten. Die erhöhte Expression von spezifischem IgE gilt ja allgemein als typische Reaktion des Immunsystems auf eine Infestation/Infektion des Menschen mit Würmern.

Wir haben daher in einer Vergleichsstudie die Expression von spezifischem IgE bei Patienten mit Toxokarose-assoziiierter Symptomatik einerseits und bei einem Kollektiv gesunder Probanden andererseits mittels eines Immunoblot-Verfahrens untersucht.

<b>Material und Methoden</b>	Die Gewinnung des Antigens erfolgte nach der von BOWMAN et al. (4) modifizierten Methode von DE SAVIGNY (7). Die Larven wurden in „essential minimum medium“ (Gibco, Wien) bei 37°C gehalten, der mit exkretorischen/sekretorischen Proteinen der <i>Toxocara</i> -Larven (TES-Antigen) angereicherte Überstand wurde nach jeweils 14 Tagen gewechselt und gesammelt. Nach einer Dialyse gegen Aqua destillata wurde der Proteingehalt nach BRADFORD (5) gemessen, das Antigen aliquotiert, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.
Antigen	
SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Die Auftrennung des TES-Antigens erfolgte mittels SDS-PAGE nach MAGNAVALL et al. (14) unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Das Antigen wurde in Probenpuffer (0,3 g Tris, 0,1 g SDS, 1,425 g Glyzin ad 100 ml A. dest.) in einer Konzentration von 250 µg/ml gelöst und 5 Minuten gekocht. Die Auftragsmenge betrug 8 µg/cm Gel. Die Elektrophorese wurde in einem „vertical slab gel apparatus“ (Höfer, San Francisco/USA) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 50 mA/Gel durch ein 5% Sammelgel und ein 12% Trenngel nach LAEMMLI (13). Die relativen Massengewichte der einzelnen Proteinbanden wurden nach den jeweils mitgeführten Proteinstandards (Amersham Int./England) bestimmt.
IgE-Immunoblot (IB)	Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese in einem Tris-Glyzin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% Methanol pH 8,3) auf Nitrozellulose (0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schüll, Kassel/Deutschland) bei 150 mA, 6 h überführt. Die Nitrozellulose wurde dann in je 5 mm breite Streifen geschnitten und in Probenpuffer (7,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5% BSA, 0,05% Na-Azid, 0,5% Tween) 2 Stunden präinkubiert. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Streifen mit den Patientenseren (1:4 in Probenpuffer verdünnt) über Nacht bei 4°C überschichtet. Nach dem Abwaschen ungebundener Antikörper mit Probenpuffer (30 Minuten) wurden die Streifen mit dem in Probenpuffer 1:10 verdünnten Sekundärintikörper ( <sup>125</sup> J-Kaninchen Antihuman-IgE, Pharmacia/Österreich) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Pool von Humanseren, in denen keine spezifischen gegen <i>Toxocara canis</i> -Antigen gerichteten IgG-Antikörper nachweisbar waren.  Die Streifen wurden nach einem weiteren Waschgang auf Papier geklebt und in Exponierkassetten (X-Omatic, Kodak) bei 70°C auf einen „hyperfilm MP“ (RPN6, Amersham Int./England) gelegt.
Patienten- und Probandenkollektive	Patientenkollektiv: Es wurden 43 Seren von Patienten mit Toxokarose-assoziiierter Symptomatik und <i>Toxocara</i> -spezifischem IgG-Nachweis (ELISA und Immunoblot) auf spezifisches IgE getestet. 37 Patienten zeigten das Larva visceralis migrans- und 6 Patienten das okuläre Larva migrans-Syndrom. Art und Häufigkeit der klinischen Symptome der 43 Patienten sind im Detail in Tabelle 1 zusammengefaßt.  Vergleichsgruppe: Es wurden 34 Seren von gesunden Tierärzten aus der Steiermark getestet, bei denen im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie <i>Toxocara</i> -spezifisches IgG nachgewiesen werden konnte (9).
<b>Ergebnisse</b>	Sowohl in der Patienten- als auch in der Vergleichsgruppe fanden sich Seren, in denen spezifisches IgE im Immunoblot nachgewiesen werden konnten, bei Patienten mit Toxokarose-assoziierten Symptomen ergab sich eine etwas höhere Reaktivität (35%) als in der Vergleichsgruppe der klinisch unauffälligen Tierärzte, bei denen 24% der Seren IgE-reaktiv waren. Das Bandenmuster der Toxokarose-Patienten zeigte große Ähnlichkeit mit jenem der asymp-

Tabelle 1:

Art und Häufigkeit der klinischen Symptome und der erhobenen Befunde der 43 Toxokarose-Patienten (Zusammenstellung der Krankheitssymptome in Anlehnung an SMITH et al. (17).

Klinische Symptome und Befunde	Anzahl der Patienten	Klinische Symptome in %
Eosinophilie (> 5%)	25	58,1
Unwohlsein	11	25,6
Husten	9	20,9
Neurologische Beschwerden	9	20,9
Abdominalschmerzen	8	18,6
Leukozytose	8	18,6
Pneumonie	6	14,0
Thoraxschmerzen	6	14,0
Allergische Reaktionen	4	9,3
Fieber	4	9,3
Urticaria	4	9,3
Asthma	3	7,0
Bronchitis	2	4,7
Diarrhoe	2	4,7
Ödeme	2	4,7
Abszeß	1	2,3
Chorioretinitis	1	2,3
Konjunktivitis	1	2,3
Lungeninfiltrate	1	2,3
Iridozyklitis	1	2,3
Rheumatische Beschwerden	1	2,3

tomatischen und umfaßte drei „cluster“ im Bereich von 26–35 kD, um 90 kD und um 400 kD. Die Polypeptidbande mit einer Molekularmasse von 26 kD zeigte sowohl in der Patienten- als auch in der Vergleichsgruppe die höchste Reaktivität. Die 400 kD-Bande wurde hingegen nur von 5% Tierärzte-Seren und von je 15% der VLM- bzw. OLM-Patienten erkannt, die 90 kD-Bande wurde von IgE-Antikörpern der OLM-Patienten überhaupt nicht detektiert (Abb. 1).

## Diskussion

Ziel der Untersuchung war es, zu überprüfen, ob die klinische Relevanz der Toxokarose-Serologie durch den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper erhöht werden kann. Die Expression von Antikörpern der IgE-Klasse gilt als typische Reaktion des Immunsystems auf Helminthen-Infektionen; tatsächlich konnten spezifische IgE-Antikörper bei den verschiedensten durch Würmer verursachten Infestationen/Infektionen oder Krankheiten des Menschen nachgewiesen werden. Dem Nachweis von spezifischem IgE kommt auch in der Diagnostik, insbesondere bei extraintestinalen Wurmerkrankungen, große Bedeutung zu.

Auch in unserem untersuchten Patienten- bzw. Probandenkollektiv konnten spezifische, gegen *Toxocara* E/S-Antigen gerichtete Antikörper der IgE-Klasse nachgewiesen werden. Allerdings war der Anteil der IgE-positiven Seren, im Gegensatz zu BRUNELLO et al. (6) und GENCHI et al. (10), die eine hohe qualitative Übereinstimmung zwischen IgG- und IgE-Titern feststellten, auffallend niedrig: Nur 35% der Seren in der Toxokarose-Patientengruppe und 24% der Seren in der Vergleichsgruppe zeigten IgE-Reaktivität. Eine mögliche Erklärung dieser Divergenzen mag in der unterschiedlichen Behandlung des Antigens liegen; OLIVER et al. (15) konnten nämlich zeigen, daß Erhitzen des Antigens – wie dies bei Durchführung einer SDS-PAGE der Fall ist – eine Reduktion des IgE-Titers zur Folge haben kann. Auch die heterogene Zusammensetzung des Patientenkollektivs, die aufgrund des sehr breiten Krankheitsspektrums der Toxokarose nicht wirklich zu vermeiden ist, kann mit ein Grund für die niedrige IgE-Reaktivität in diesem Untersuchungskollektiv sein.

Trotz der Tatsache, daß der IgE-Immunoblot eine hohe Testspezifität aufweist (umfangreiche Untersuchungen mit Seren von Allergikern mit erhöhtem IgE und zahlreichen Seren von Patienten mit anderen Parasitosen, insbesondere Helminthosen, haben dies gezeigt), kommt diese Methode aufgrund der niedrigen Sensitivität und der daraus resultierenden geringen positiven wie negativen Voraussagewerte weder als Basistest noch als Test zur Differenzierung zwischen *Toxocara*-Infestation und Toxokarose in Frage.

## Zusammenfassung

Die Diagnose der *Toxocara*-Infestation und der Toxokarose basiert heute nahezu ausschließlich auf dem Nachweis spezifischer Antikörper der IgG-Klasse mittels ELISA und Immunoblot (IB) unter Verwendung von exkretorisch-sekretorischem *T. canis*-Antigen (TES). Die Aussagekraft dieser Tests hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz ist jedoch begrenzt.

Da die Bildung spezifischer Antikörper der Klasse E allgemein als eine typische Reaktion des Immunsystems auf Infestationen/Infektionen mit parasitischen Würmern gilt, haben wir die Bindungsmuster von spezifischem IgE gegenüber TES-Antigen in zwei Personengruppen

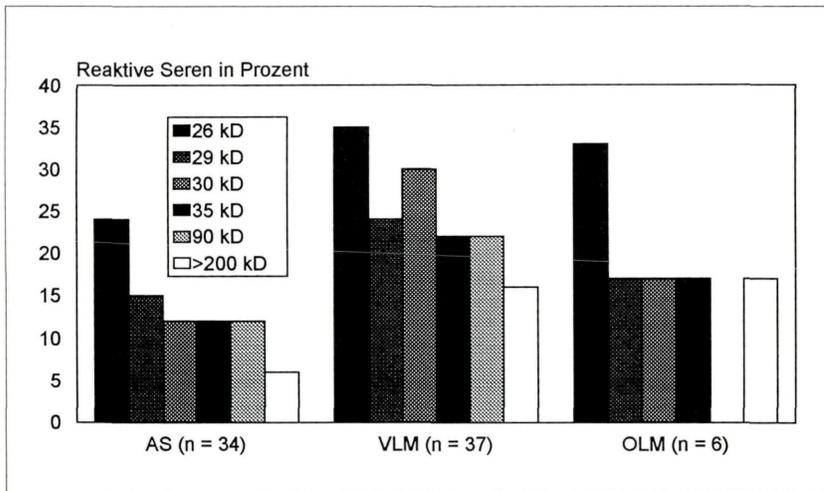


Abbildung 1:

IgE-Reaktivität und Bandenmuster der beiden Patientenkollektive und der Vergleichsgruppe.

AS = asymptotische Probanden

VLM = viszerales Larva migrans-Syndrom

OLM = okuläres Larva migrans-Syndrom

doch sehr gering und stellt daher keine Möglichkeit einer Verbesserung der klinischen Relevanz der Toxokarose-Serologie dar.

### Schlüsselwörter

*Toxocara canis*, IgG, IgE, Immunoblot.

### Summary

#### *The diagnostic significance of specific IgE in Toxocara infestations*

The diagnosis of *Toxocara* infestations and toxocarosis is based on the detection of specific IgG antibodies using excretory/secretory (TES) antigen by ELISA and immunoblot. The clinical relevance of these tests, however, is limited.

Due to the fact that the expression of specific IgE antibodies is considered as a typical reaction of the immune system against helminthic infections we have examined the IgE binding pattern of sera from patients suffering from toxocarosis on one hand and from clinically inapparent *Toxocara* IgG-positive persons on the other hand.

In total 43 sera of patients with Larva migrans visceralis or ocular Larva migrans associated symptoms and 34 sera of clinically inapparent (persons) veterinarians were examined on the presence of specific IgE by immunoblot using TES antigen.

In 35% of sera of toxocarosis patients and in 24% of sera from persons of the control group specific IgE could be detected, the binding pattern of both groups was, however, very similar and comprised bands in three clusters at 26–35 kD, at 90 kD and at about 400 kD. The polypeptide band at 26 kD was highly reactive whereas the band at 400 kD was detected only rarely.

Thus, due to the similar IgE profile in both groups and due to the rather low sensitivity of the test used the IgE-immunoblot cannot be considered as a useful tool for the discrimination between *Toxocara* infestation and toxocarosis.

**Keywords** *Toxocara canis*, IgG, IgE, Immunoblot.

(43 Patienten mit Larva migrans visceralis- oder okulärem Larva migrans-Syndrom) und 34 klinisch unauffälligen Personen (Tierärzte) mit nachweisbaren *Toxocara*-spezifischen IgG-Antikörpern mittels Immunoblot vergleichend untersucht.

In der Toxokarose-Patientengruppe wurde in 35%, in der Probandengruppe in 24% der untersuchten Seren spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen, das Bandenmuster war in beiden untersuchten Gruppen sehr ähnlich und umfaßte 3 Cluster im Bereich 26–35 kD, um 90 kD und um 400 kD. Während die Polypeptidbande mit einem Molekulargewicht von 26 kD hohe Reaktivität zeigte, wurde die 400 kD-Bande nur von den IgEs weniger Patienten bzw. Probanden erkannt.

Die nosologische Aussagekraft des Nachweises von spezifischem IgE gegen TES-Antigen ist jedoch sehr gering und stellt daher keine Möglichkeit einer Verbesserung der klinischen Relevanz der Toxokarose-Serologie dar.

## Literatur

1. AUER, H., ASPÖCK, H. (1994):  
Serodiagnosis in the light of clinical relevance.  
Tagung d. Schweizer Gesellsch. f. Tropenmed. u. Parasitol. 20.-22. Oct. Leysin, Schweiz (Abstr.) 40.
2. AUER, H., ASPÖCK, H. (1995):  
Toxokarose in Österreich - Epidemiologie, Diagnostik und Therapie.  
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 17, 61-70.
3. AUER, H., ASPÖCK, H. (1996):  
Toxocara infestations and toxocarosis in Austria: Results of immunodiagnostic and seroepidemiological studies.  
VII Europ. Multicolloquium of Parasitology (EMOP VII).  
Parma, 2.-6. Sept. 1996. (Abstr.)
4. BOWMAN, D. D., MIKA, G. M., GRIEVE, R. B. (1987):  
Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 36, 75-82.
5. BRADFORD, M. M. (1976):  
A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.  
Analyt. Biochem. 72, 248-254.
6. BRUNELLO, F., GENCHI, C., FALAGIANI, P. (1983):  
Detection of larva-specific IgE in human toxocarosis.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 279-280.
7. 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.  
J. Parasitol. 61, 781-782.
8. DE SAVIGNY, D. H., VOLLER, A., WOODRUFF, A. W. (1979):  
Toxocarosis: serological diagnosis by enzyme immunoassay.  
J. Clin. Pathol. 32, 284-288.
9. DEUTZ, A., FUCHS, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1996):  
Serologische Untersuchung von Tierärzten in der Steiermark auf Zoonosen.  
2. Mitteilung: Parasitäre Zoonosen.  
Wien. Tierärztl. Monatsschrift, (im Druck).
10. GENCHI, C., TINELLI, M., BRUNELLO, F., FALAGIANI, P. (1986):  
Serodiagnosis of ocular toxocarosis: a comparison of specific IgE and IgG.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 993-994.
11. GILLESPIE, S. (1993):  
The clinical spectrum of Toxocarosis.  
In: Lewis, J. W., Maizels, R. M. (Hrsg.): *Toxocara and Toxocarosis*.  
Institute of Biology, London, 55-62.
12. GIRDWOOD, R. W., SMITH, H. V., BRUCE, R. G., QUINN, R. (1978):  
Human *Toxocara* infection in west of Scotland.  
Lancet 1, 1318.
13. LAEMMLI, J. H. (1970):  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.  
Nature 227, 680-685.
14. MAGNAVAL, J. F., FABRE, R., MAURIERES, P., CHARLET, DEL PRETE, L. B. (1991):  
Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocarosis.  
Parasitol. Res. 77, 697-702.
15. OLIVER, S. T., COULSAND, G., SMITH, H. V., GIRDWOOD, R. W. A. (1986):  
Antibody isotype reactivity, isotype specific serodiagnosis and IgE antibody specificity in humans infected with *Toxocara canis*.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 942.
16. RUSSEGGER, L., SCHMUTZHARD, E. (1989):  
Spinal *Toxocara* Abscess.  
Lancet II, 398.
17. SMITH, H. V. (1991):  
Immune evasion and immunopathology in *Toxocara canis* infection.  
In: *Parasitic Nematodes - Antigens, Membranes and Genes*.  
Institute of Biology 116-139.

18. VAN KNAPEN, F., VAN LEUSDEN, J., POLDERMAN, A. M., FRANCHIMONT, J. H. (1983):  
Visceral larva migrans: examinations by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of the second-stage larvae of *Toxocara canis*.  
*Z. Parasitenkd.* 69, 113-118.
19. WALDER, M., ASPÖCK, H. (1988):  
Untersuchungen über die Häufigkeit und Bedeutung von *Toxocara*-Infektionen des Menschen in Österreich.  
*Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 10, 159.

**Korrespondenzadresse:** Mag. Andreas Obwaller  
Abteilung für Medizinische Parasitologie,  
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien  
Kinderspitalgasse 15  
A-1095 Wien · Austria

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1996

Band/Volume: [18](#)

Autor(en)/Author(s): Obwaller A., Auer H., Jensen-Jarolim E., Leitner A., Kraft D., Aspöck Horst

Artikel/Article: [Die diagnostische Bedeutung des Nachweises spezifischer IgE-Antikörper bei \\*Toxocara\\*-Infestationen 201-206](#)