

## 개회충 성충항원을 이용한 실험적 토끼 개회충증 혈청 항체가의 측정

계명대학교 의과대학 기생충학교실 및 의과학연구소

주종윤 · 김문규 · 정명숙

### Determination of Antibody Levels in Experimental Rabbit Toxocariasis Induced by Crude Worm Antigen

Chong Yoon Joo, M.D., Mun Kyoo Kim, M.D. and Myung Sook Chung, Ph.D

Department of Parasitology,  
Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science,  
Taegu, Korea

#### = Abstract =

Toxocariasis is produced by the migration of the *Toxocara canis* larvae into the extra-intestinal tissues of unnatural hosts or natural hosts under suitable conditions. Generally, serodiagnosis and treatment may be difficult in this situation. The present study was performed to observe the specifically reacting antigenic bands in crude extract of *Toxocara canis* adult worm and its reaction in the serum IgG antibody obtained from experimentally infected rabbits.

After homogenization, the homogenate was extracted at 4°C for 2 days and centrifuged at 20,000 × g for 1 hour. The supernatant was used as the antigen. Infected sera were obtained from the rabbits infected with *Toxocara canis* embryonated eggs. The control sera were obtained from non-infected rabbits.

The ELISA showed that serum levels of IgG antibody against crude antigen began to increase from 10 to 14 days after the infection.

SDS-PAGE profiles showed complex protein bands ranging 6.5 to 200 kDa.

Of them 110, 62.5, 48, 17.5, and 13.5 kDa components were prominent bands.

According to the immunoblot data, the serum antibody recognized major protein bands with molecular weight of 110, 101, 72, 62.5, 48, 42, 32.5, and 13.5 kDa respectively. The 110, 72, 62.5, and 48 kDa bands reacted even in non-infected control sera. Cross reactions by immunoblot were also observed with the sera from infected and immunized with *Trichinella* and *Anisakis*.

The proteins of 110 and 42 kDa showed as common antigens.

In conclusion, *Toxocara canis* adult worm antigen represents an antigen that can be used in the diagnosis of toxocariasis. And the 101, 32.5, and 13.5 kDa band were specific antigenic proteins.

**Key Words:** Toxocariasis, ELISA, Immunoblot, *Toxocara canis*

## 서 론

개회충증은 개회충의 유충을 병원체로 하며, 개회충의 감염란이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 증상으로 진단 및 치료가 곤란한 질환이다 (Seo, 1978). 전세계적으로 약 2백만 마리의 애완견 중에서 많은 개들이 개회충 (*Toxocara canis*)에 감염되어 있다고 한다 (Glickman & Schantz, 1981). 인체에 나타나는 개회충증은 개회충 유충의 이행에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 이행은 *visceral larva migrans* (VLM)와 *ocular toxocariasis*의 원인이 된다고 한다. VLM (Beaver, 1969)은 발열, 호산구증다증 (Beaver et al, 1952), 간비대 및 호흡장애 (Gillespie, 1987; Glickman & Schantz, 1981; Taylor et al, 1988)의 증상을 나타내며, *ocular toxocariasis*는 눈에 염증을 일으켜 망막에 손상을 주거나, 시각장애를 일으킨다고 한다 (Gillespie, 1987; Glickman & Schantz, 1981; Pollard et al, 1979).

진단은 면역학적 진단법에 의존하고 있으나 개회충 및 십이지장충의 유충 체내이행증, 고래회충증, 선모충증 등과의 교차반응이 있어서 어떤 질환인지 결정하기 매우 곤란한 상태이다. 호산구증다증이 심하게 나타나는 예에 있어서 이 질환의 양태는 기생충성 감염증일 가능성도 많음에도, 어떤 기생충의 감

염에 따른 호산구증다증인지를 구별하기 힘든 경우가 대부분이다.

인체 감염의 혈청학적 진단법으로 시험판 내 배양 (de Savigny, 1975)으로 얻은 유충의 분비배설물을 항원으로 사용하여 ELISA 법을 주로 실시하고 있다. 최근에는 항체와 순환항원을 검출하는 방법이 개발되었으며 (Robertson et al, 1988), 항원의 생리화학적 성질에 대한 연구도 진행되고 있다고 한다 (Badley et al, 1987; Maizels et al, 1984 & 1987; Meghju & Maizels, 1986; Robertson et al, 1988). 가장 보편적으로 쓰이는 면역진단법인 ELISA는 민감도나 특이도에 있어서 어떠한 검사법보다도 우수하다고 하지만, 실제 사용하기에는 아직도 무리가 있다.

더구나 통상 사용되고 있는 IgG를 이용한 방법으로는 감염 초기에는 항체 형성이 되지 않는 경우가 대부분이어서 IgM을 진단적으로 이용하여야 할 필요성도 없지 않다. 개회충 감염에 있어서 IgG의 변화 양상을 동물을 실험을 통하여 다시 검토하고, 특히 항원대가 가장 많거나, 또는 강하게 착색되는 분획을 검색하여, 앞으로 보다 나은 항원 제조에 이용할 수 있는 분획을 선택해 보고자 이 실험을 시행하였다. 이번 연구에서는 동물 실험을 통하여 개회충 감염 후, 시간 경과에 따라 혈청 항체가 IgG의 변화 양상을 개회충 성충항원을 이용하여 ELISA법으로 관찰하고, 개회충 성충항원이 개회충 혈청 항체가 측정에 유용할 것인가를 검토함과 아울러, 개회충 감

염 혈청과 특이하게 반응하는 항원대를 규명하고, 교차반응을 일으키는 것으로 알려진 선충류 감작 혈청과의 반응으로 공통항원대를 구별해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 개회충 성충의 수집 및 실험적 감염

실험적으로 감염시키기 위한 자충포장란은 개회충 충체에서 수정란을 분리하여 생리식 염수로 세척한 후 0.2% formalin / saline에서 자충포장란이 될 때까지 배양하였다. 자충포장란 100개 (A 군), 500개 (B 군), 1000개 (C 군)씩을 각각 5마리의 토끼에 경구 감염시켰다.

### 혈청의 수집

감염된 토끼의 혈청은 감염일로부터 3, 5, 7, 10, 15, 21, 28일 및 그 이후는 2 주일 간격으로 채혈하여 -40°C에 보관하면서 사용하였다. 교차반응을 보기 위하여서는 폐지회충 및 고래회충 유충 조항원을 감작시킨 토끼의 혈청을 감작 6주후에 채혈하여 사용하였으며, 감염전 혈청과 감염되지 않은 토끼의 혈청을 대조로 사용하였다.

### 항 원

개회충 성충, 폐지회충 및 고래회충 유충을 재료로 하여 항원을 제조하였다. 충체들을 PBS (pH 7.2)로 잘 닦은 다음 1 gm을 PBS 10 ml당 SBTI 0.002 mg이 함유된 PBS 20 ml에 녹여 teflon coating 된 glass homogenizer에 넣어 마쇄하였으며, 마쇄된 액을 20,000 × g에서 60분간 원심분리하고 상청액을 항원으로 사용하였다. 단백질 함량은 각각 5.4 mg / ml, 5.2 mg / ml 및 10.3 mg / ml 이었다.

### 개회충 성충항원의 분석

ELISA법은 Voller *et al.* (1979)과 McLaren *et al.* (1978)의 방법에 준하여 시행하였으며, 혈청회석배율은 1:100, 항원의 단백질 함량은 2.0 g / ml, conjugate는 peroxidase conjugated IgG fraction, goat anti-rabbit IgG를 1:1000 으로 회석하여 사용하였다. SDS-PAGE는 Novex System (Xcell Mini-cell, USA)을 사용하여 4~20% gradient gel을 130 V 일정한 전압으로 bromophenol blue tracking dye가 맨 밑에 올 때까지 전기영동하고, Merril (1981)의 silver 염색을 하였다. Immunoblot은 Novex system (Blot module, USA)을 이용하여 20 V로 일정한 전류 150 mA로 2시간 동안 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 전이한 다음 PVDF를 incubation tray에 넣고 PBS-3 % Tween 20액으로 1:50 회석한 토끼 실험 혈청을 각각 넣어 rotary shaker에서 하룻밤 반응시켰다. 항원대와 부착한 항체는 ELISA 법으로 확인하며, 이 과정중 conjugate는 peroxidase conjugated IgG fraction goat anti-rabbit IgG를 1:500으로 회석하여 사용하고, conjugate 반응 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 침전성 발색 기질인 3-3'-diamino-benzidine (Sigma)으로 발색시켰다.

### 교차반응 검사

교차반응을 알아보기 위하여 각 항원으로 감작된 실험 토끼의 혈청을 갖고 교차 반응의 여부를 immunoblot로 검사하였다. 검사방법은 통상의 방법에 준하여 실시하였다.

### 성 적

#### ELISA 성적

Table 1과 Figure 1에 개회충 감염 토끼 혈청내 특이 IgG 항체가를 표시하였다. 100 개를 감염 시킨 A 군에서는 흡광도가 0.193에서 증가하기 시작하여, 10일 이후부터 양성

Table 1. Changes of absorbance value of *Toxocara* specific-IgG antibody levels in infected rabbit sera using curde antigen.

Days*	Groups**	Non-infected	A	B	C
0		0.180	0.193	0.176	0.200
2 d			0.202	0.198	0.207
5 d			0.247	0.239	0.254
7 d		0.213	0.274	0.275	0.251
10 d			0.321	0.301	0.284
2 w		0.239	0.359	0.356	0.351
3 w			0.458	0.451	0.414
4 w		0.188	0.460	0.464	0.439
5 w			0.474	0.483	0.485
6 w		0.231	0.482	0.494	0.526
7 w			0.505	0.497	0.499
8 w		0.211	0.508	0.533	0.531
9 w			0.543	0.552	0.514
10 w		0.243	0.543	0.556	0.532
12 w			0.544	0.483	0.524
14 w		0.228	0.549	0.543	0.566
16 w			0.587	0.601	0.654
18 w		0.232	0.559	0.622	0.680
20 w			0.555	0.595	0.648
24 w		0.213	0.482	0.557	0.651
28 w		0.218	0.482	0.553	0.625
33 w		0.217	0.481	0.533	0.613

\* The days after infection

\*\* A : infected with 100 embryonated eggs

B : infected with 500 embryonated eggs

C : infected with 1000 embryonated eggs

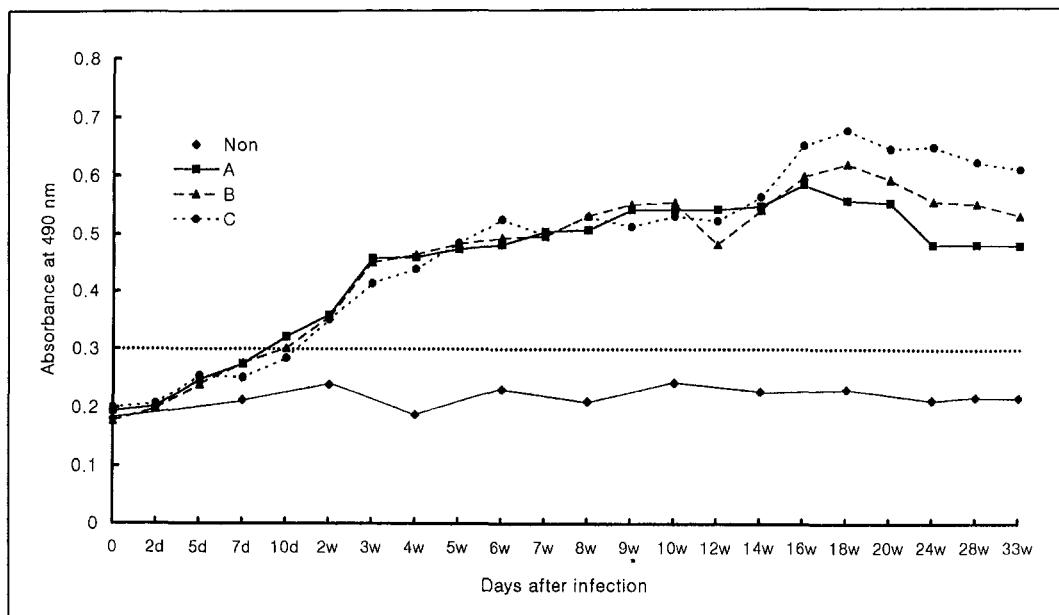


Figure 1. Changes of absorbance of *Toxocara* specific-IgG antibody levels using crude antigen.

범위에 들기 시작하여 계속 증가하였으며, 감염 24주부터 감소하기 시작하였다. 500개를 감염 시킨 B 군에서는 감염전의 흡광도가 0.176에서 10일후 양성 범위인 0.301로 증가하기 시작하여, 감염 18주 후에는 최고치를 나타내었다. 1,000개를 감염시킨 C 군에서도 비슷한 양상을 나타내어, 감염 후 14일부터 양성 반응을 보였으며, 감염 후 18주에서 최고치에 이르렀다. 실험 동물군간에는 큰 차이가 없었으나, 감염 후 14주부터는 C군에서 흡광도가 약간 높게 나타내었다.

#### SDS-PAGE / Immunoblot

4~20% linear gel에서 SDS-PAGE 한 결과 6.5~200 kDa에 이르는 다양한 단백 분획을 나타내었으며, 110, 62.5, 42, 48, 17.5, 13.5 kDa의 단백분획이 진하게 염색되었다 (Figure 2).

Immunoblot 한 결과 개회충을 감염시킨

실험토끼의 혈청과 특이 IgG와 강하게 반응하는 항원대는 110, 101, 72, 62.5, 48, 42, 32.5, 13.5 kDa으로 나타내었으며, 대조군에서도 110, 72, 62.5, 48 kDa이 반응성을 나타내었다 (Figure 3). 그러나 101, 32.5 및 13.5 kDa 항원대는 대조군과 반응을 나타내지 않았다.

교차반응을 실시한 결과 고래회충 유충감염 혈청과 강하게 반응하는 항원대로서 110, 72, 48, 42 kDa 들이었고, 선모충 감염 혈청과는 110과 42 kDa 항원대가 강한 반응을 보였다.

한편 고래회충 유충과 선모충 감자 혈청과의 반응성을 본 결과, 110, 72, 48 및 42 kDa 항원대가 반응하였다. 따라서 110과 42 kDa 항원이 다른 선충류 감염혈청 및 면역혈청과 반응성을 나타내었으므로 공통항원임을 알았다 (Figure 4).

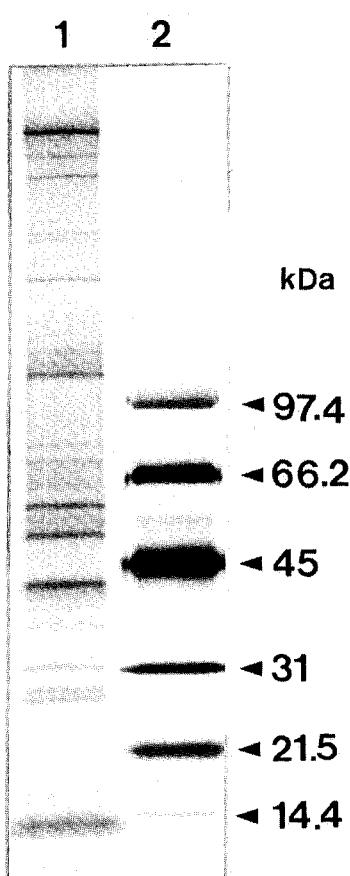


Figure 2. SDS-PAGE findings of crude antigen of *Toxocara canis*. Silver stained protein bands in 4~20% gradient gel.

Lane 1 crude antigen of *Toxocara canis*; lane 2 size marker

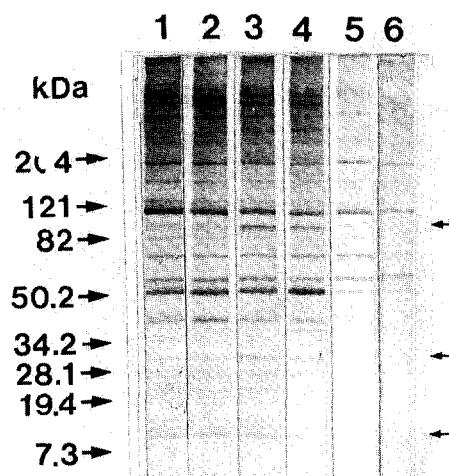


Figure 3. Immunoblot findings of IgG reacting bands to crude antigen using rabbit anti-*Toxocara* serum (infected, non-infected).  
lane 1-4 : infected sera,  
lane 5-6 : non-infected sera

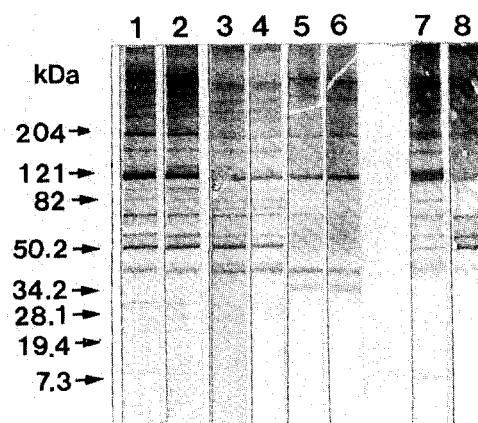


Figure 4. Immunoblot findings of IgG reacting bands to crude antigen using rabbit sera (infected and immunized with *Trichinella*, *Anisakis*, *Toxocara* crude antigen).  
lane 1-2 : infected sera with *Toxocara canis*  
lane 3-4 : infected sera with *Anisakis* larvae  
lane 5-6 : infected sera with *Trichinella*  
lane 7 : immunized with *Anisakis* antigen  
lane 8 : immunized with *Trichinella* antigen

## 고 찰

이 연구에서는 동물 실험을 통하여 개회충 중 진단에 있어서 성충 항원을 이용하여 항체를 측정할 수 있는 시기를 알아보려고 하였다. 혈청 IgG 항체가는 감염 10일에서 14일 후부터 양성 범위에 들기 시작하였다. Cuellar *et al.* (1990)은 토끼에 개회충 감염한 2000개를 일주일 간격으로 중복감염한 후 유충의 분비 배설 항원으로 항체를 측정한 결과 2주부터 증가하기 시작하여 3주부터는 높은 항체를 나타내었다고 하였으며, Smith *et al.* (1982) 도 분비 배설 항원으로 항체를 측정하였던 바, 감염 후 3주에 높은 항체를 나타내어 6주까지 지속되었다고 하였다. Dwight *et al.* (1987)은 BALB/c mice에 감염한 500개를 경구 감염시키고 IgG 및 IgM 항체를 분비 배설 항원으로 측정한 바, IgM은 감염 후 1주일부터 검출할 수 있었으며, IgG는 감염 후 2주일 부터 증가하기 시작하여 16주에는 최고치를 나타내었다고 하였으며, 이번 실험과 거의 같은 결과라고 할 수 있었다.

따라서 개회충 중 진단에 있어서 성충 조 항원을 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 감염 시킨 충란의 양, 즉 감염 강도에 따라 항체가 가 높게 나타난다고 하였다. 이번 실험에서는 감염 강도에 따른 흡광도 변화가 크게 나타나지 않았으나 감염 후 14주부터는 많이 감염 시킨 C군에서의 흡광도가 높게 나타내었다.

분비 배설 항원을 이용하여 인체 개회충 중 진단을 한 많은 조사 보고들 (van Knapen *et al.*, 1983; Jacquier *et al.*, 1991; Magnaval *et al.*, 1992; Abo-Shwhada *et al.*, 1992; Gillespie *et al.*, 1993; Havasiova *et al.*, 1993)이 있었으나 개회충 성충 항원을 이용한 자료는 찾아 볼 수 없었다.

향후 인체 개회충 중 진단에 있어서 성충 항체 항원이 유용한 지는 더 연구해 보아야

할 것 같다. 이숙환 외 (1987)는 간모세선충을 감염시킨 생쥐에서 IgG 항체가를 간접 형광 항체법으로 측정한 결과 3주부터 항체가가 128로 높게 나타나기 시작하여 5주 후에 최고치에 도달하였고 15주 후에는 감염 전의 수준으로 되었다고 하였다.

Crandall & Crandall (1972), Kagan & Norman (1979)은 선모충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 시기는 감염 10일 전후라고 하였으나, 탁병연 외 (1995)는 ELISA 법을 이용하여 IgG가 유의성 있게 증가하는 것은 감염 후 6일 부터였다고 하였다.

전복실 외 (1991)는 고래회충 유충 조항원으로 감염된 토끼의 혈청 항체를 측정하였던 바, 감염 2주부터 강한 양성 반응을 나타내었고, 5주에는 최대값을 나타내고 점차 감소하기 시작하였다고 하였다. 최규홍 외 (1994)는 토끼에 대한 고래회충 유충의 실험적 감염 후, IgM이 유의성 있게 증가하는 것은 5일에서 7일 사이에 처음 감지되며 약 20일간 지속된다고 하였으며, IgG는 IgM보다 2일 정도 늦게 양성으로 판별된다고 하였다. Yang *et al.* (1991)은 역시 고래회충 유충의 실험적 감염 후 IgM의 변화를 ELISA로 관찰한 바, 감염 6일 째부터 양성으로 판별되어 감염 19일 까지 지속된다고 하였다. Tsuji (1989)는 ELISA를 이용하여 고래회충 특이 IgG를 양성으로 판단할 수 있는 최초의 시기가 감염 10일에서 20일 사이라고 하였다. 주경환 외 (1989)는 폐흡충의 발육 단계별 항원으로 폐 흡충증을 진단한 결과, 감염 3주부터 반응이 나타났다고 하였다. 이선경 외 (1991)는 간흡충의 발육 단계별 항원으로 ELISA 법을 실시하여 간흡충 감염 토끼의 혈청 항체를 측정한 결과, 감염 3주부터 급격히 증가하는 경향을 나타내었다고 하였다.

이번 연구에서는 개회충 성충 항원으로 개회충 중 진단에 있어서 감염 후 10일부터 ELISA 법으로 혈청 항체를 검출할 수 있

었다.

Chan *et al.* (1990)은 선모충 조항원을 이용하여 교차반응을 조사하였던 바, 35와 34 kDa의 항원대가 강하게 반응하고 29와 14 kDa 항원대에서는 각각 편중 및 *Metastrengylus apri*와 교차반응을 있다고 하였으며, 탁병연 외 (1995)도 다른 유사 선충류 감염에 따른 교차반응을 실시하여 선모충과 특이하게 반응하는 16, 55 및 60 kDa 들의 항원 대를 확인하였다고 한다. 최규홍 외 (1994)는 고래회충 유충 조항원을 gel 여과하여 분획을 구하고 각 분획별로 고래회충 특이 IgG와 IgM가 반응하는 항원대를 관찰하여, 15, 46, 8, 58, 61.5 및 72 kDa 분획들이 고래회충 특이 IgG 항체와 반응하는 항원대로 규명하였으며, 46.8 kDa 항원은 고래회충 특이 IgM 항체와 반응하는 항원대로, 39 kDa 항원대는 다른 선충류와 교차반응을 하는 공통항원대로 규명하였다. Robertson *et al.* (1989)은 개회충 유충의 분비배설물에서 단백질 분해효소를 추출하여 활성도를 관찰하였으며, 임한종 외 (1997)는 단백분해효소를 추출하여 항원성을 검토하였는데, 110 kDa의 분획이 특이 항원이라고 하였다.

이번 연구에서는 immunoblot 한 결과 개회충을 감염시킨 실험토끼의 혈청과 특이 IgG와 강하게 반응하는 항원대는 110, 101, 72, 62.5, 48, 42, 32.5 및 13.5 kDa으로 나타났으며, 대조군에서도 110, 72, 62.5 및 48 kDa이 반응성을 나타내었다. 그러나 101, 32.5 및 13.5 kDa 항원대는 대조군과 반응을 나타내지 않았다. 교차반응을 실시한 결과 110과 42 kDa 항원이 다른 선충류 감염혈청 및 면역혈청과 반응성을 나타내었으므로 101, 32.5 및 13.5 kDa 항원이 개회충증 진단에 유용한 특이항원임을 알았다.

따라서 향후 개회충 성충항원을 이용하여 인체 개회충증의 진단에 유용한지를 알아보아야 할 것이며, 특이항원대로 나타난 단백분

획들이 효소로써의 활성이 있는지 또는 충체 내에서의 분포 양상에 대하여 더 연구를 해야 할 것 같다.

## 요 약

개회충증은 개회충의 감염란이 인체 및 다른 포유동물에서 성충으로 발육하지 못하여 나타나는 증상으로 진단 및 치료가 곤란한 질환이다. 이 연구는 개회충 감염에 있어서 IgG 항체 변화 양상을 개회충 성충항원을 이용하여 경시적으로 관찰하고 개회충 감염 혈청과 특이하게 반응하는 항원대를 찾아보고자 하였다.

개회충 성충을 tissue homogenizer로 마쇄한 다음 4°C에서 2일간 추출한 후 20,000 × g에서 1시간 원심분리하여 상청액을 성충항원으로 사용하였다. 실험혈청은 개회충 감염란 (자충포장란)을 100개, 500개, 1000개씩을 각각 5마리의 토끼에 경구감염 시킨 후, 시기별로 채혈하여 사용하였으며, 감염시키지 않은 토끼의 혈청을 대조로 사용하였다.

IgG 변화 양상은 ELISA법으로 실시하였으며, 항원대 규명은 SDS-PAGE와 immunoblot를 이용하였다.

IgG 항체가는 감염후 10일에서 14일부터 양성 범위에 들기 시작하였으며, 실험동물군간에는 큰 차이가 없었다. 4~20% linear gel에서 SDS-PAGE 한 결과, 6.5~200 kDa에 이르는 다양한 단백분획을 나타내었으나, 110, 62.5, 48, 17.5 및 13.5 kDa의 단백분획이 전하게 염색되었다.

Immunoblot 한 결과 110, 101, 72, 62.5, 48, 42, 32.5 및 13.5 kDa의 단백분획들이 강하게 반응하는 항원대로 나타내었으나, 대조군에서도 110, 72, 62.5 및 48 kDa의 분획들이 반응성을 나타내었다. 교차반응을 실시한 결과, 110 및 42 kDa 항원이 다른 선충류 감염혈청 및 면역혈청과 반응성을 나타내었으

므로 공통 항원임을 알았다.

이상의 결과로 개회충증 진단에 있어서 개회충 성충 항원을 이용하여 감염 10일 후면 ELISA 법으로 혈청 항체가를 검출할 수 있고, immunoblot에서는 101, 32.5 및 13.5 kDa 항원이 개회충증 진단에 유용한 특이 항원임을 알았다.

### 참 고 문 헌

- 이선경, 주경환, 정명숙, 임한종: Immunoblot 법을 이용한 간흡충 항원의 발육 단계별 항원성 분석에 관한 연구. *한국농촌의학회지* 1991;16(1):61-69.
- 이숙환, 엄기선, 임한종: *Capillaria hepatica* 감염 마우스에 있어서 간접 형광항체 반응을 이용한 IgG, IgM 및 IgA의 변동에 관한 연구. *고려대학교의과대학논문집* 1987; 24:97-105.
- 임한종, 주경환, 최서아, 이혜정, 주종윤, 정명숙: 조직기생 선충류 유충에서 분리한 단백분해 효소의 특성 및 항원성 검토. *한국농촌의학회지* 1997;22:61-74.
- 전복실, 정명숙, 주경환, 임한종: *Anisakis* 감염 가토의 시기별 항체검출에 대한 각종 항원의 적용성. *한국농촌의학회지* 1991;16:70-78.
- 주경환, 홍성철, 정명숙, 임한종: Immunoblot technique을 이용한 폐흡충의 발육단계별 항원 특이성 분석. *기생충학잡지* 1989;27:1-7.
- 최규홍, 정명숙, 주경환, 임한종: Gel 여과한 아니사키스 유충 항원의 Immunoblot 분석. *고려대학교의과대학논문집* 1994;31:365-376.
- 탁병연, 정명숙, 주경환, 김수진: Immunoblot 와 면역황금 표지법을 이용한 선모충 특이 항원 분석. *고려대학교의과대학논문집* 1995 ;32:55-70.
- Abo-Shehada MN, Sharif Lel-Sukhon SN, Abuharfeil N, Atmeh RF: Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in

humans innorthern Jordan. *J Helminthol* 1992;66:75-78.

Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey, JH: Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens. Physicochemical characterization and antibody recognition. *J Parasitol* 1987;73:593-600.

Beaver PC: The nature of visceral larva migrans. *J Parasitol* 1969;55:529-539.

Beaver PC, Synder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferly JW: Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics* 1952;9:7-10.

Chan SW, Ko RC: Serodiagnosis of human trichinosis using a gel filtration antigen and indirect IgG-ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:721-722.

Crandall RB, Crandall CA: *Trichinella spiralis*: Immunologic response to infection in mice. *Exp Parasitol* 1972;31:378-386.

Cuellar C, Fenoy S, Aguila C, Guillen JL: Evaluation of chemotherapy in experimental toxocariasis by determination of specific immune complexes. *J Helminthol* 1990;64:279-289.

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

Dwight DB, Marcia M, Robert BG: Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:75-82.

Glickman LT, Schantz PM: Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocari-

- sis. *Epidemiol Rev* 1981;3:230-250.
- Gillespie SH: Human toxocariasis. A review. *J Appl Bacteriol* 1987;63:473-479.
- Gillespie SH, Bidwell D, Voller A, Robertson BD, Maizels RM: Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Pathol* 1993;46:551-554.
- Havasičová K, Dubinský P, Štefancíková A: A seroepidemiological study of human *Toxocara* infection in the Slovak Republic. *J Helminthol* 1993;67:291-296.
- Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J: Immunodiagnosis of Toxocariasis in Humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 1991;29:1831-1835.
- Kagan IC, Norman C: *The serology of trichinosis in man and animals* (SE Gould, ed) Illinois Charles C Thomas Springfield, 1979, pp 222.
- Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, de Larrard B: Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and post-treatment follow-up human toxocariasis. *J Clin Microbiol* 1992;30:2269-2274.
- Maizels RM, de Savigny DH, Ogilvie BM: Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol* 1984; 6:23-37.
- Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD, Smith HV: Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted epitopes of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987; 139:207-214.
- McKerrow JH: Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989;68:111-115.
- McLaren M, Draper CC, Roberts JM, Minter-Goedbloed E., Lightart GS, Teesdale, C.H., Amin, M.A., Omer, A.H.S., Barlett, A., Voller, A: Studies on the enzyme-linked immunosorbent assay test for *Schistosoma mansoni* infections. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72:243.
- Meghji M, Maizels RM: Biochemical properties of larval excretory-secretory (ES) glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* 1986;18:155-170.
- Merril CR, Goldman D, Sedan SA, Ebert MH: Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gel shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981;211:1437.
- Pollard ZF, Jarret WH, Hagler WS, Alain DS, Schantz PM: ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis. *Ophthalmol* 1979;86:743-752.
- Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH, Maizels RM: *Toxocara canis*: Proteolytic Enzymes Secreted by the infective Larvae in Vitro. *Exp Parasitol* 1989;69:30-36.
- Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z, Maizels RM: Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin Exp Immunol* 1988; 74:236-241.
- Seo BS: *Clinical Parasitology*. Seoul, Il Cho Kak 1978, pp 172-173.
- Smith HV, Quinn R, Bruce RG, Girwood RWA: Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxocara leonina*. *Trans R*

- Soc Trop Med Hyg* 1982;76:89-94.
- Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, Mülvhill E, Holland C: The expanded spectrum of toxocarial disease. *Lancet* 1988; 1(8587):692-695.
- Tsuji M: *Serological and immunological studies*. In Ishikura H (ed). Gastric anisakiasis in Japan, Tokyo, Springer-Verlag, 1989.
- van Knapen F, van Leusden J, Polderman AM, Franchimont JH: 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* 1983;69:113-118.
- Voller A, Bidwell DE, Barlett A: *The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications*. Dynatech Europe (ed) 1979.
- Yang HJ, Cho YJ, Paik YH: Changes of IgM and IgG antibody levels in experimental rabbit anisakiasis as observed by ELISA and SDS-PAGE/immunoblot. *Korean J Parasitol* 1991;29:389-396.