Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 32 (1975)

Heft: 1

Artikel: Eine einfache Methode zur Gewinnung von "Toxocara canis"-Antigen für die indirekte Immunfluoreszenz-Technik

Autor: Annen, J.M. / Eckert, J. / Hess, U.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-312072

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Parasitologie der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. J. Eckert)

Eine einfache Methode zur Gewinnung von *Toxocara canis*-Antigen für die indirekte Immunfluoreszenz-Technik*

J. M. ANNEN, J. ECKERT und U. HESS

I. Einleitung

Als Toxocariasis des Menschen bezeichnet man die Infektion mit Larven der Spulwurmgattung *Toxocara*. Ätiologisch kommt nach der heute vorherrschenden Auffassung der weltweit verbreiteten und häufigen, beim Hund parasitierenden Art *Toxocara canis* die größte Bedeutung zu.

Toxocara-Fälle beim Menschen sind aus allen Kontinenten bekannt (Lit. bei FAUST et al., 1970), und ständig kommen neue Berichte hinzu. WISEMAN und WOODRUFF (1971) untersuchten mit Hilfe des *Toxocara*-Hauttests insgesamt 1119 über 10 Jahre alte Personen und fanden in London 2,1 % positive Reagenten, in verschiedenen Städten Afrikas 0–30,8 %. Demnach scheinen *Toxocara*-Infektionen beim Menschen in verschiedenen Gebieten häufiger zu sein, als bisher bekannt war.

Die Feststellung der Infektion am lebenden Patienten gelingt nur äußerst selten durch den direkten Parasitennachweis, z. B. bei einer Leberbiopsie. Deshalb kommt den immundiagnostischen Untersuchungsmethoden eine besondere Bedeutung zu.

Von den verschiedenen, in diesem Zusammenhang geprüften serologischen Methoden haben unseres Wissens vor allem folgende Eingang in die Laborpraxis gefunden: Der indirekte Immunfluoreszenz-Test (IFT) (MITCHELL, 1964, HOGARTH-SCOTT, 1966, BISSERU & WOODRUFF, 1968, BAUFINE-DUCROCQ et al., 1971, TETTAMANTI et al., 1972, u. a.), der indirekte Hämagglutinationstest (KAGAN et al., 1959, JUNG & PACHECO, 1960, KRUPP, 1974, u. a.), die Agar-Gel-Präzipitation nach Ouchterlony (LAMINA, 1970a) und der Mikropräzipitationstest an der lebenden Larve (LAMINA, 1970b).

Ein Hauptproblem bei der serologischen Diagnostik der Toxocariasis ist die Bereitstellung eines geeigneten, mengenmäßig ausreichenden Antigenpräparates. Da im inadäquaten Wirt, wie ihn der Mensch darstellt, der antigene Stimulus nur von den infektiösen 2. Larven ausgeht, werden diese als Antigen bevorzugt.

Hinsichtlich ihrer Gewinnung und Verwendung wurden verschiedene Wege beschrieben: BISSERU & WOODRUFF (1968) sowie LAMINA (1970b) infizierten Mäuse mit embryonierten *Toxocara*-Eiern, isolierten die Larven aus den Organen und verwendeten ganze Einzellarven für den IFT bzw. für den Mikropräzipitationstest an der lebenden Larve. Diese Methode kommt zweifellos den natürlichen Verhältnissen am nächsten, sie ist jedoch ziemlich aufwendig und nach unseren

---

* Mit Unterstützung durch den Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt-Nr. 4.71.72).

Erfahrungen hinsichtlich der quantitativen Larvenausbeute oft unbefriedigend. MITCHELL (1964) und HOGARTH-SCOTT (1966) gewannen mit Hilfe der «Hatching»-Methode nach FAIRBAIRN (1961) in der Modifikation von HASS und TODD (1962) die *Toxocara*-Larven direkt aus den Eiern. Aus der Arbeit von MITCHELL (1964) geht hervor, daß auf diese Weise große Larvenmengen gewonnen werden können. Die Problematik dieser Methode liegt nach unserer Ansicht in der relativ großen Variabilität des Anteils schlüpfender Larven. BISSERU & WOODRUFF (1968) und BAUFINE-DUCROCQ et al. (1971) versuchten schließlich, geschnittene, larvenhaltige *Toxocara*-Eier für den IFT zu verwenden, doch erwies sich die Autofluoreszenz der Eischalen als störend.

Da uns keine der beschriebenen Methoden für die Laborpraxis voll befriedigte, versuchten wir, das Verfahren der Larvengewinnung zu vereinfachen.

II. Untersuchungen und Ergebnisse

1. Gewinnung der Toxocara-Larven

1.1. Präparation der *Toxocara*-Eier

Geschlechtsreife *Toxocara*-Weibchen wurden aus dem Kot von Junghunden nach einer Piperazinbehandlung oder aus dem Dünndarm sezierter Tiere gesammelt, mehrmals in Tyrode-Lösung gewaschen und zur Eigewinnung verwendet. Dazu wurden die distalen Uterusschläuche mit einem Spatel ausgepreßt. Nach Entfernung der Proteinhülle durch 3 Minuten langes Schütteln in einer Natriumhypochlorit-Lösung mit 0,5 % freiem Chlor wurden die Eier viermal in Tyrode-Lösung gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei +4° C aufbewahrt. Danach wurden je 200 000 normal beschalte, befruchtete Eier in 30 ml 0,1 N H_2SO_4 aufgeschwemmt, in Petri-Schalen (10 cm Durchmesser) überführt und bei +25° C 30 Tage lang inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit enthielten 70–80 % der Eier lebende 2. Larven. Diese infektiösen Eier wurden sofort oder nach kurzer Lagerung (bis 20 Tage) bei +4° C zur Larvengewinnung oder zur Infektion von Kaninchen und Mäusen verwendet.

Auf dieselbe Weise wurden aus weiblichen *Ascaris suum* Eier gewonnen und mindestens 40 Tage bei +25° C inkubiert.

1.2. Larvenisolierung

Zunächst wurden die embryonierten *Toxocara*-Eier 12 Stunden lang bei Raumtemperatur in einer Mischung von gleichen Teilen NaOH (2 %ig) und NaClO (2 %ig = Gehalt an freiem Chlor) (OSHIMA, 1961) inkubiert, wodurch sich die äußeren Eihüllen bis auf die innere Lipidmembran entfernen ließen. Die in der Lipidmembran eingeschlossenen Larven (Abb. 1) wurden nach wiederholtem Waschen in 2–3 ml Tyrode-Lösung (pH 7,2, 37° C) aufgenommen und während 6–7 Sekunden einer vorsichtigen Ultraschall-Behandlung in einem Ultraschall-Reinigungsgerät Bransonic 2 (Branson Instruments Company, Stanford, Conn.,

Abb. 1. Toxocara-Ei mit 2. Larve nach Entfernung der Protein- und Chitinschale.

USA) mit einer Schalleistung von 25 W (50 kHz) unterzogen. Diese Behandlung zerstörte die Lipidhüllen unter weitgehender Schonung der Larven.

Die meisten frei gewordenen Larven zeigten eine lebhafte Beweglichkeit und waren fähig, innerhalb von 5 Stunden bei 37° C durch ein Nylonsieb[1] mit 20 μm Maschenweite in einem modifizierten Baermann-Apparat zu wandern (Abb. 2). Die Larvenausbeute entsprach etwa 50 % der ursprünglich inkubierten Eier. Ein adultes *Toxocara*-Weibchen lieferte durchschnitlich ca. 50 000 Larven. Die erhaltene Larvensuspension war weitgehend frei von Verunreinigungen (Abb. 3); sie wurde zur Antigenbereitung für den IFT verwendet (vgl. Abschnitt 2.1.).

2. Überprüfung der Antigenität der Toxocara-Larven

Die Prüfung der Antigenität der gewonnenen *Toxocara*-Larven erfolgte im IFT unter gleichzeitiger Feststellung der Kreuzreaktionen zu *Ascaris suum*.

---

[1] NY-20-HD, Züricher Beuteltuchfabrik, Rüschlikon, Schweiz.

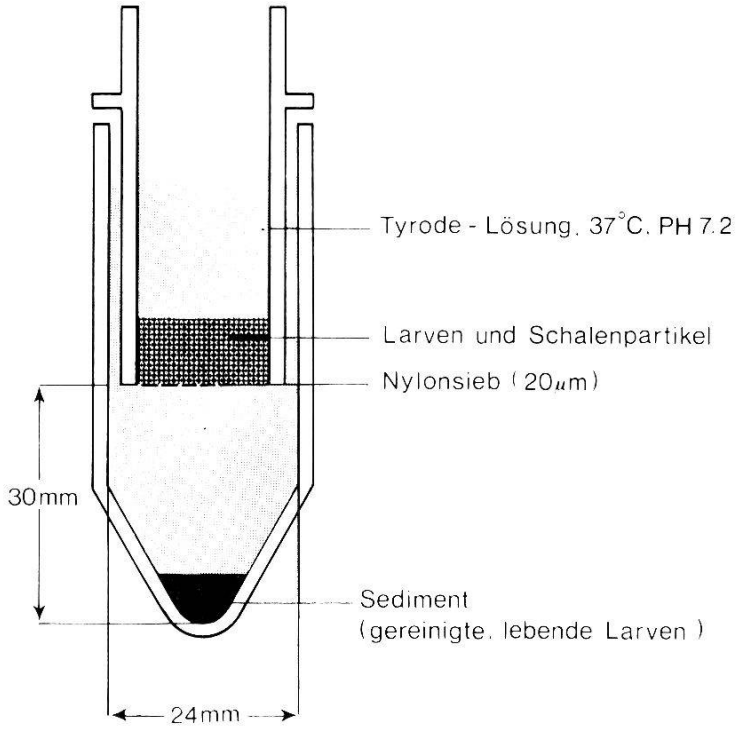

Abb. 2. Modifizierter Baermann-Apparat zur Reinigung der Larven.

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Antigenpräparation

Eine dichte Suspension von *Toxocara*-Larven wurde nach der von AMBROISE-THOMAS (1969) beschriebenen Methode in ein aus Ratten-Bauchmuskulatur gebildetes, gefrorenes Röhrchen eingefüllt, bei –20° C tiefgefroren und zu Gefrierschnitten (10 µm Dicke) verarbeitet. Für die Präparation von «Muskelwürsten» von 3 cm Länge und einem Innendurchmesser von 0,3 cm wurden 0,5–0,8 ml einer angereicherten Suspension mit einem Gehalt von rund 1 Million Larven benötigt. Eine «Wurst» ergab etwa 1000–2000 brauchbare Schnitte. Die Objektträger mit den Antigen-Schnitten wurden bei –20° C gelagert.

In gleicher Weise wurden Gefrierschnitte von embryonierten *Toxocara*-Eiern hergestellt.

2.1.2. Immunseren

Zur Gewinnung von Antiseren wurden Kaninchen und Mäuse mehrmals mit Eiern von *T. canis* oder *A. suum* peroral infiziert und nach bestimmten Zeiten zur Serumgewinnung herangezogen (Tab. 1). Die Seren wurden bis zur Untersuchung bei –20° C gelagert.

Negative Kontrollseren stammten von nicht infizierten, gesunden Kaninchen oder Mäusen aus den gleichen Tierkollektiven.

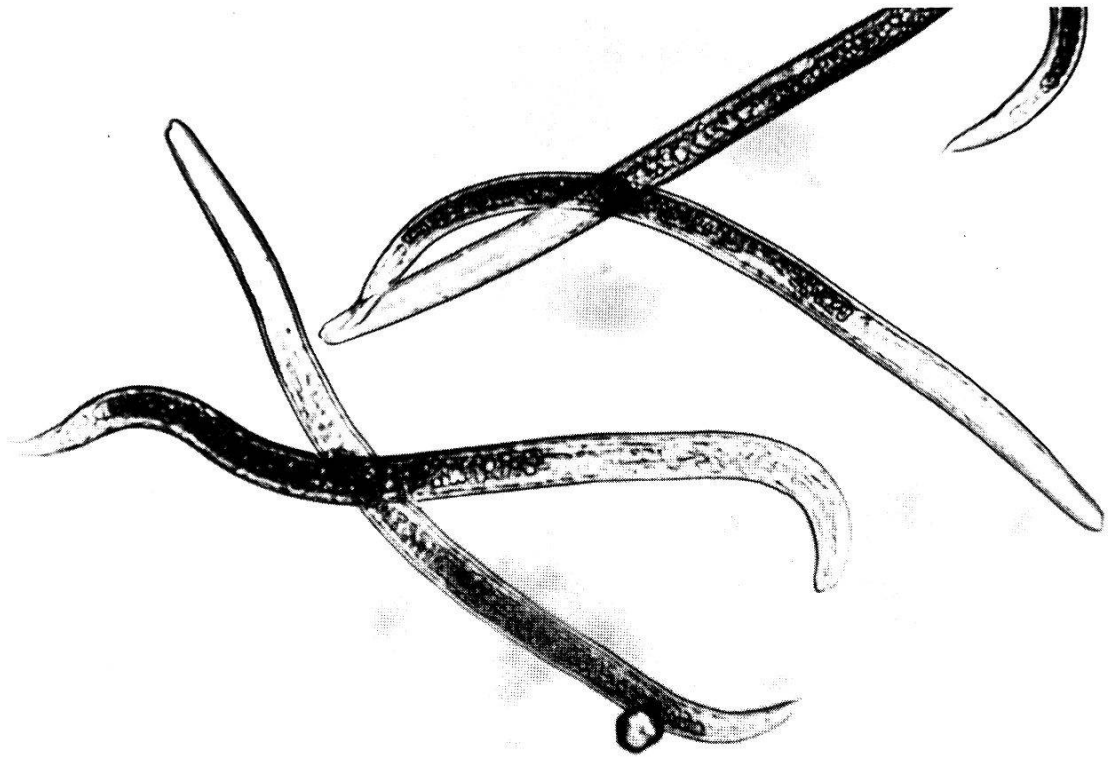

Abb. 3. 2. Larven von *T. canis* nach dem Auswandern aus dem modifizierten Baermann-Apparat (Maschenweite 20 μm).

2.1.3. Indirekte Immunfluoreszenz-Technik

Die Untersuchung der Versuchstierseren erfolgte weitgehend nach der Technik von AMBROISE-THOMAS (1969). Die Gefrierschnitte der *Toxocara*-Larven wurden getrocknet, 10 Minuten in Aceton fixiert und mit den nicht hitzeinaktivierten Seren (Verdünnungen 1/10 bis 1/1280 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert, anschließend in PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,2) gewaschen, kurz in Aqua dest. gespült und getrocknet.

Als Konjugat fand entweder FITC-markiertes Anti-Kaninchenglobulinserum vom Schaf oder FITC-markiertes Anti-Mausglobulinserum vom Kaninchen (Institut Pasteur, Paris) Anwendung, für die Gegenfärbung wurde Evans-Blue (1/10 000 in PBS) eingesetzt. Die optimale Konjugatkonzentration betrug für Anti-Mausglobulinserum 1/40 und für Anti-Kaninchenglobulinserum 1/20. Die Inkubation von Konjugat/Evans-Blue erfolgte bei 37° C während 30 Minuten.

Die Fluoreszenz der Antigen-Schnitte wurde mit Hilfe einer konventionellen Blaulichtfluoreszenzeinrichtung (Fa. Wild, Heerbrugg/Schweiz) mit Quecksilberdampflampe und Hellfeldkondensor beurteilt.

Tabelle 1. Perorale Infektion von Versuchstieren mit Eiern von *Toxocara* oder *Ascaris* zur Gewinnung von Immunseren

Parasitenart	Tierart (n)	Tag	Infektionsdosis	Blutentnahme [1]
Toxocara canis	Kaninchen [2] (4)	0	2000	
		30	2000	
		60	5000	×
		74	–	×
	Mäuse [3] (20)	0	1500–2000	
		30	1500–2000	
		60	–	×
Ascaris suum	Kaninchen [2] (2)	0	2500	
		30	6000	
		60	–	×
	Mäuse [3] (20)	0	2500	
		30	5000	
		60	–	×

[1] Bei Kaninchen: Aus Ohrvene, bei Mäusen durch Herzpunktion.
[2] Rasse: Neuseeländer; Gewicht: ∾ 3 kg.
[3] Stamm: ICR; Gewicht: 20–25 g.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. *Toxocara*-Larven als Antigen (Tab. 2 u. 3)

Experimentell mit *Toxocara*-Eiern infizierte Kaninchen und Mäuse zeigten im Gegensatz zu nicht infizierten Kontrolltieren eine positive Seroreaktion im IFT mit *Toxocara*-Larven als Antigen.

Es wurden Titer bis 1/320 bei gepoolten Mäuseseren und verschiedenen Kaninchenseren abgelesen. In Korrelation zu den pathologisch-anatomischen Veränderungen in Lebern und Lungen unterschieden sich jedoch die Titer bei den einzelnen Kaninchen. Deutliche Unterschiede der Titer nach der 2. und 3. Infektion ergaben sich nicht.

Die bei der positiven Fluoreszenzreaktion beobachtete intensive gelbgrüne Fluoreszenz der Larvenquerschnitte beschränkte sich nicht nur auf die Larvenkutikula. Häufig leuchteten auch nicht identifizierbare Strukturen im Inneren. Die nicht fluoreszierenden Anteile der Larven waren dunkelgrün, in den höheren Serumverdünnungen braun-rot.

Die mit negativen Seren in der Verdünnung 1/10 inkubierten Larven zeigten selten eine minimale kutikuläre Fluoreszenz. In der Ver-

Tabelle 2. Seroreaktionen bei experimentell mit *Toxocara canis*-Eiern infizierten Kaninchen im indirekten Immunfluoreszenz-Test mit *Toxocara canis*-Larven-Antigen

Tier Nr.	Anzahl Infektionen [1]	Titer [2] 1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
1	2	+++	+++	++	+	+	(+)	–	–
	3	+++	+++	++	+	+	(+)	–	–
2	2	+++	++	++	+	(+)	–	–	–
	3	+++	++	++	+	(+)	–	–	–
3	2	+++	+++	++	++	+	(+)	–	–
	3	+++	+++	++	+	+	(+)	–	–
4	2	+++	+++	++	++	+	+	(+)	–
	3	+++	+++	+++	++	+	+	(+)	–
5	0	–	–	–	–	–	–	–	–

[1] Vgl. Tabelle 1; [2] (+): zweifelhafte Reaktionen.

dünnung 1/20 konnten jedoch alle negativen Seren als eindeutig negativ beurteilt werden (Tab. 2 und 3). Die Larven stellten sich bei leicht verdünnten negativen Seren (1/10) dunkelgrün, bei stark verdünnten (1/80) rot-braun dar. Die Grünfärbung der Larven dürfte auf einer schwachen unspezifischen Affinität von Serum zum larvalen Gewebe beruhen. Obwohl sich durch Gegenfärbung mit Evans-Blue in der ermittelten Konzentration die unspezifische Färbung weitgehend unterdrücken ließ, wurden bei der Beurteilung der Reaktion nur solche Schnitte als positiv angesehen, die eine deutliche gelbgrüne Fluoreszenz aufwiesen.

2.2.2. *Toxocara*-Eier als Antigen (Tab. 3)

Bei Verwendung embryonierter *Toxocara*-Eier als Antigen reagierten die Seren homolog infizierter Mäuse prinzipiell mit gleichen Titern wie beim Einsatz von *Toxocara*-Larven-Antigen. Die geschnittenen Eier erschwerten jedoch das Ablesen der Reaktion, da die Eischalen im Test sowohl mit positiven als auch mit negativen Kontrollseren kräftig grün erschienen. Das unspezifische Leuchten der Eihüllen bewirkte, daß schwach positive Reaktionen mit nur leichter Fluoreszenz der Larven in den obersten Verdünnungsstufen nicht mehr erkannt werden konnten (Tab. 3).

2.2.3. Kreuzreaktionen mit Ascaris (Tab. 4)

Die Seren der künstlich mit *Ascaris*-Eiern infizierten Kaninchen und Mäuse ergaben mit *Toxocara*-Larven-Antigen eine deutliche Fluoreszenz, allerdings nur im niedrigen Titerbereich von 1/10 bis 1/20.

Tabelle 3. Seroreaktionen bei experimentell mit *Toxocara canis*-Eiern infizierten Mäusen im indirekten Immunfluoreszenz-Test mit *Toxocara canis*-Larven und -Eiern als Antigen

Serum [1]	Antigen	Titer [2] 1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Anti-*T. canis*	Larven	+++	+++	+++	++	++	+
	Eier	+++	+++	++	+	+	(+)
negativ	Larven	(+)	–	–	–	–	–
	Eier	–	–	–	–	–	–

[1] Vgl. Tabelle 1; [2] (+): zweifelhafte Reaktionen.

III. Diskussion

Die serologischen Resultate bestätigen die Tauglichkeit des auf die beschriebene Weise gewonnenen *Toxocara canis*-Larven-Antigens für die serologische Diagnostik und des angewandten Tests hinsichtlich Sensibilität und Spezifität. Die vorgeschlagene Methode der Larvengewinnung besitzt gegenüber dem Auswanderungsverfahren aus den Organen infizierter Mäuse (OSHIMA, 1961, LAMINA, 1970b, BISSERU & WOODRUFF, 1968) und dem Schlüpfen der Larven *in vitro* (MITCHELL, 1964, HOGARTH-SCOTT, 1966) den Vorteil, daß die für die Herstellung von Gefrierschnitten benötigten relativ großen Mengen von Antigen auf einfache Weise gewonnen werden können. Zudem ist das Antigen weder durch Wirtskomponenten noch durch Chemikalien verunreinigt.

Tabelle 4. Seroreaktionen bei experimentell mit *Ascaris suum*-Eiern infizierten Kaninchen und Mäusen im indirekten Immunfluoreszenz-Test mit *Toxocara canis*-Larven als Antigen

Serum [1]		Titer [2] 1/10	1/20	1/40	1/80
Kaninchen-anti-*A. suum*	Nr. 1	+	(+)	–	–
Kaninchen-anti-*A. suum*	Nr. 2	++	+	(+)	–
Kaninchen negativ		(+)	–	–	–
Maus-anti-*A. suum*	(Pool)	(+)	–	–	–
Maus negativ	(Pool)	–	–	–	–

[1] Vgl. Tabelle 1; [2] (+): zweifelhafte Reaktion.

Von einer Antigenpräparation aus geschnittenen *Toxocara*-Eiern (BAUFINE-DUCROCQ et al., 1971) unterscheidet sich das Larven-Antigen durch die Elimination nicht embryonierter Eier und das Fehlen der störenden Fluoreszenz der Schalen vorteilhaft. Im Gegensatz zu BAUFINE-DUCROCQ et al. (1971) beobachteten wir im Nativpräparat allerdings keine eigentliche Autofluoreszenz von Schalenbestandteilen. Dagegen wurde festgestellt, daß das verwendete Konjugat eine starke Affinität zu den Eischalen besaß, deren grüne Fluoreszenz auch durch Gegenfärbung mit Evans-Blue nur teilweise zu beseitigen war.

Wie schon von verschiedenen Autoren gezeigt wurde, konnten durch Verabreichung von zwei subletalen Dosen von *Toxocara*-Eiern auch in unseren Versuchen Mäuse und Kaninchen zur Bildung von Antikörpern angeregt werden. Eine 3. Infektion übte bei Kaninchen auf die Intensität der serologischen Reaktion und die Titerhöhe keinen meßbaren Einfluß aus. Nach FERNANDO (1968) bildet sich bei Kaninchen bereits nach zweimaliger Infektion eine gute protektive Immunität.

Nach zwei Infektionen mit *Ascaris suum*-Eiern ließen sich im IFT mit *T. canis*-Antigen nur geringe Mengen von Antikörpern nachweisen. Damit konnten die Seren der mit *T. canis* infizierten Tiere deutlich von jenen der mit *A. suum* infizierten unterschieden werden. BISSERU & WOODRUFF (1968) beobachteten im IFT eine deutliche Kreuzreaktion zwischen *T. canis*-Larven und Seren von Patienten mit *Ascaris lumbricoides*-Befall, doch war die Fluoreszenz bei höheren Serumverdünnungen geringer als bei Seren von *Toxocara*-Patienten.

Abschließend ist festzustellen, daß das von uns gewonnene *Toxocara*-Larven-Antigen für den IFT brauchbar ist, doch stehen Untersuchungen mit Humanseren noch aus.

Danksagung

Für die Mitarbeit danken wir: Frl. Ch. Krebs und Frl. A. Fröhlich (Labor), Frau S. Pletscher und Frau A. Hug (Graphik/Photo) und Frau F. Baerfuß (Sekretariat).

Literaturverzeichnis

AMBROISE-THOMAS, P. (1969). Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence. – Lyon: Thèse Doctorat ès-sciences naturelles.

BAUFINE-DUCROCQ, H., COUZINEAU, P., BEAUVAIS, B. & LARIVIÈRE, M. (1971). Sur le diagnostic par immunofluorescence de l'infection expérimentale de la souris par *Toxocara canis*. Mise à l'épreuve d'antigènes pour le diagnostic de la maladie humaine. – C. r. Séance Soc. Biol. *165*, 273-276.

BISSERU, B. & WOODRUFF, A. W. (1968). The detection of circulating antibody in human *Toxocara* infections using the indirect fluorescent antibody test. – J. clin. Path. *21,* 449–455.

FAIRBAIRN, D. (1961). The *in vitro* hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. – Can. J. Zool. *39,* 153–162.

FAUST, E. C., RUSSEL, P. F. & JUNG, R. C. (1970). Craig and Faust's Clinical Parasitology, eighth Edit. – Philadelphia: Lea & Febiger.

FERNANDO, S. T. (1968). Immunological response of rabbits to *Toxocara canis* infection. – Parasitology *58,* 91–103.

HASS, D. K. & TODD, A. C. (1962). Extension of a technique for hatching Ascarid eggs *in vitro.* – Amer. J. vet. Res. *23,* 169–170.

HOGARTH-SCOTT, R. S. (1966). Visceral larva migrans – an immunofluorescent examination of rabbit and human sera for antibodies to the ES antigens of the second stage larvae of *Toxocara canis, Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* (Nematoda). – Immunology *10,* 217–223.

JUNG, R. C. & PACHECO, G. (1960). Use of a hemagglutination test in visceral larva migrans. – Amer. J. trop. Med. Hyg. *9,* 185–191.

KAGAN, I. G., NORMAN, L. & ALLAIN, D. S. (1959). Studies on the serology of visceral larva migrans. I. Haemagglutination and flocculation tests with purified *Ascaris* antigens. – J. Immunol. *83,* 297–301.

KRUPP, I. M. (1974). Hemagglutination test for the detection of antibodies specific for *Ascaris* and *Toxocara* antigens in patients with suspected visceral larva migrans. – Amer. J. trop. Med. *23,* 378–384.

LAMINA, J. (1970a). Immunbiologischer Nachweis einer «*Larva migrans visceralis*-Infektion». Tierexperimentelle Ergebnisse. I. Mitteilung: Die Agar-Gel-Präzipitation nach Ouchterlony. – Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. *215,* 259–273.

LAMINA, J. (1970b). Immunbiologischer Nachweis einer «*Larva migrans visceralis*-Infektion». Tierexperimentelle Ergebnisse. II. Mitteilung: Der Mikropräzipitationstest an der lebenden Larve. – Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. *215,* 386–397.

MITCHELL, J. R. (1964). Detection of *Toxocara canis* antibodies with the fluorescent antibody technique. – Proc. Soc. exp. Biol. Med. *117,* 267–270.

OSHIMA, T. (1961). Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. – J. Parasit. *47,* 652–656.

TETTAMANTI, S., BOUNAMEAUX, Y. & SUTER-KOPP, V. (1972). La toxocarose humaine en Suisse. Son diagnostic par immunofluorescence indirecte. – Schw. med. Wschr. *102,* 1117–1124.

WISEMAN, R. A. & WOODRUFF, A. W. (1971). Toxocariasis in Africa and Malta. The frequency of infection in host animals and its incidence and distribution in humans as revealed by skin sensitivity tests. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *65,* 439–449.

Summary

A simple method for the preparation of *Toxocara canis* antigen for the indirect immunofluorescent test is described: Embryonated *Toxocara* eggs are treated for 12 hours at room temperature with a 1 : 1 mixture of 2 % NaOH and sodium hypochlorite (NaClO) solution with a concentration of 2 % free chlorine in order to remove the outer layers of the egg shells. The larvae which are still enclosed in the lipid membrane are freed by mild ultrasonic treatment. Thereafter, the suspension of larvae is washed and purified in a modified Baermann apparatus.

In this way large numbers of larvae in pure suspension were gained and used for the production of frozen sections for the indirect immunofluorescent test. Rabbits and mice experimentally infected with embryonated *Toxocara canis* eggs showed a positive serological reaction (titers between 1/10 to 1/320) in this test with *Toxocara* larvae as antigen, while in uninfected control animals no antibodies could be detected. The larval antigen exhibited only a weak cross reaction with sera of animals infected with *Ascaris suum* eggs.

Résumé

Une méthode simple de préparation de l'antigène de *Toxocara canis* pour le test d'immunofluorescence indirecte est décrite: des œufs embryonnés de *Toxocara* sont traités pendant 12 heures, à la température du laboratoire, par un mélange à parties égales d'une solution à 2 % NaOH + NaClO avec une concentration de chlore libre de 2 %, de façon à soustraire les débris d'œufs. Les larves, encore enfermées dans la membrane lipidique, sont libérées par un traitement ultrasonic. Après cela, la suspension de larves est lavée et purifiée par une technique de Baermann modifiée.

Cette méthode a permis d'obtenir un très grand nombre de larves en suspension pure qui ont été utilisées à la production de sections sous congélation pour le test d'immunofluorescence indirecte. Des lapins et des souris infectés expérimentalement avec des œufs embryonnés de *Toxocara canis* ont montré une réaction sérologique positive (titres entre 1/10 à 1/320) avec la technique d'immunofluorescence indirecte et l'antigène sus-mentionné. Par ailleurs, aucun anticorps n'a pu être détecté chez les animaux de contrôle non-infectés. Cet antigène n'a montré que de faibles réactions croisées avec le sérum d'animaux infectés par des œufs d'*Ascaris suum*.