

Toksokariyazis Serolojik Tanısında *Trichinella* Çapraz Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi

Evaluation of *Trichinella* Cross-Reactions in the Serological Diagnosis of Toxocariasis

Soykan ÖZKOÇ, Songül BAYRAM DELİBAŞ, Çiler AKISÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.
Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

* Bu çalışma, 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi (18-25 Eylül 2005, İzmir)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 04.11.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.02.2012

ÖZET

Toksokariyazis, *Toxocara* cinsi nematod larvalarıyla meydana gelen tüm dünyada yaygın, paraziter bir zoonozdur. Enfeksiyonda oluşan semptom ve bulguların patognomonik olmamasından dolayı insan toksokariyazisi tanısında genellikle serolojik testlerden faydalanılır. Bununla birlikte *Toxocara* larval ekskretuar-sekretuar (TES) antijeninin kullanıldığı serolojik testlerde askariyazis, anisakiyazis, strongiloidozis ve filariyazis gibi helmint hastalıklarıyla oluşan çapraz reaksiyonlar nedeniyle düşük özgüllük gözlenebilmektedir. Bu çalışmada, toksokariyazis serolojik tanısında gözlenebilecek olası *Trichinella* çapraz reaksiyonlarının, ELISA ve "Western blotting" (WB) yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2004 tarihinde İzmir'de meydana gelen *Trichinella britovi* salgınında kesin tanı konmuş 209 trişinelozis hastasının serum örnekleri dahil edilmiştir. Tüm örnekler ticari bir *Toxocara* IgG-ELISA kiti (Cypress Diagnostics, Belçika) ile taranmış; pozitif/şüpheli pozitif sonuç veren örneklerin doğrulanmasında ticari *Toxocara* IgG-WB kiti (Test-Line Diagnostics, Çek Cumhuriyeti) kullanılmıştır. Çalışmamızda, ELISA ile örneklerin %94.3 (197/209)'ü seronegatif olarak bulunurken, dokuzu pozitif ve üçü ara-pozitif olmak üzere toplam 12 (%5.7) örnekte pozitiflik saptanmıştır. Konfirmasyon amacıyla uygulanan WB testine göre; 120 kDa, 70 kDa, 32 kDa ve 26 kDa moleküler ağırlıktaki antijenik bantların birlikte saptandığı sadece bir örnekte pozitif sonuç alınmış ve toksokariyazis enfeksiyonu doğrulanmıştır. WB kitinin değerlendirme kriterlerine göre, sınır değer olarak saptanan dört serumun toksokariyazis olup olmadıkları konusunda tam olarak değerlendirme yapılamamıştır. Bu serum örneklerinin üçünde 120 ve 70 kDa'luk antijen bantları birlikte gözlenirken, bir serumda üç farklı antijenik bant (120, 70 ve 32 kDa) saptanmıştır. ELISA ile pozitif saptanan yedi serum örneği ise WB testi ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif serum örneklerinin dördünde herhangi bir bant oluşumu izlenmezken, üç örnekte tek başına saptandığı zaman anlamı olmayan 120 kDa'luk bant görülmüştür. WB testi ile negatif olarak tespit edilen bu örneklerin ELISA ile

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Soykan Özkoç, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 2222, **E-posta (E-mail):** soykan.ozkoc@deu.edu.tr

yanlış pozitif olarak saptandıklarına karar verilmiştir. Çalışmamızın sonuçları TES antijeni ile *Trichinella* antikorları arasında çapraz reaksiyonların gözlenebildiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle toksokariyazis açısından şüpheli klinik durumlarda, pozitif *Toxocara* IgG-ELISA sonuçlarının WB gibi farklı bir test ile konfirme edilmesi gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Toksokariyazis; *Trichinella* spp.; serolojik tanı; çapraz reaksiyon.

ABSTRACT

Toxocariasis caused by the nematode larvae of the *Toxocara* genus is a worldwide parasitic zoonosis. Diagnosis of human toxocariasis commonly relies on serological tests since the symptoms and signs of *Toxocara* infection are not pathognomonic. However *Toxocara* larval excretory-secretory (TES) antigen used in serological tests may exhibit low specificity due to the cross-reactions between related helminth infections such as ascariasis, anisakiasis, strongyloidosis and filariasis. In this study, we aimed to evaluate the possible effect of *Trichinella* cross-reactions in the serological diagnosis of toxocariasis by using ELISA and Western blot (WB) assay. For this purpose, sera samples of 209 trichinellosis patients who were definitely diagnosed during the *Trichinella britovi* outbreak occurred in Izmir in January 2004, were used. All the samples were screened initially by commercial *Toxocara* IgG-ELISA kit (Cypress Diagnostics, Belgium), then commercial *Toxocara* IgG-WB (Test-Line Diagnostics, Czech Republic) was applied to positive/borderline-positive sera for confirmation. In our study, 94.3% (197/209) of the sera were found seronegative, while nine were positive and three were borderline. Thus a total of 12 (5.7%) sera were considered as seropositive by *Toxocara* IgG-ELISA. According to the results of WB, only one sera with the antigenic bands of 120 kDa, 32 kDa and 26 kDa in molecular weights was evaluated as positive. Four sera samples were found to be borderline. In three of border sera, the antigenic bands of 120 and 70 kDa in molecular weights were observed together and one sera had three (120, 70 and 32 kDa) different antigenic bands. Seven sera that had been found to be positive by ELISA was considered as negative by WB. While no bands was observed in four of these, three samples had an antigenic band of 120 kDa which had no diagnostic value when it was found alone. The results of our study showed that the cross-reactivities between anti-*Trichinella* antibodies and TES antigens may be observed during *Toxocara* IgG ELISA assay. For that reason the positive *Toxocara* IgG-ELISA result should be confirmed by different tests such as WB for the definitive diagnosis of toxocariasis.

Key words: Toxocariasis; *Trichinella* spp.; serological diagnosis; cross reaction.

GİRİŞ

Toksokariyazis, *Toxocara* cinsi nematod larvalarının neden olduğu tüm dünyada yaygın olarak gözlenen zoonotik bir enfeksiyondur. İnsanlarda en önemli hastalık etkeni, köpek askaridi olan *Toxocara canis* iken, kedigillerin paraziti olan *Toxocara cati* ile oluşan insan enfeksiyonları daha nadir görülmektedir^{1,2}. Enfekte yumurtaların ağız yoluyla alınmasıyla oluşan enfeksiyonda dolaşım yoluyla çeşitli dokulara göç eden ve yerleşen larvalar, sistemik (viseral larva migrans), lokal (oküler larva migrans) veya örtülü (covert) toksokariyazis gibi farklı klinik tablolara neden olmaktadır². Seroprevalans çalışmaları kişisel hijyen ve sosyoekonomik eksikliklerle paralel olarak, gelişmekte olan ülke halklarının *Toxocara* spp. ile daha sık karşılaştığını göstermektedir¹⁻⁵. Türkiye’de yapılan çalışmalara bakıldığında ise kırsal bölgelerde yaşayan çocuklarda daha yoğun olmak üzere %1-45 arasında toksokariyazis seropozitifliği bildirilmiştir⁶⁻¹¹.

Toksokariyazis patognomonik semptomların bulunmaması nedeniyle klinik tanısı son derece güç olan bir parazitozdur. Erişkin parazit insanda gelişemediğinden dışkı incelemeleri parazitoz hakkında fikir verememekte, etkenin tanısı için mutlaka histopatolojik kesitlerde larvaların gösterilmesi gerekmektedir^{1,2}. Ancak histopatolojik inceleme, uygulama zorluğunun yanı sıra larvayı her zaman gösterememe gibi dezavantajlara sahiptir. Tüm bu nedenlerle toksokariyazis tanısında en sık izlenen yol serolojik olarak antikor yanıtının gösterilmesi ve bu yanıtın klinik görünüm ile ilişkilendirilmesi şeklindedir^{2,3,12-14}.

Toksokariyazis, serolojik tanıda standardize edilmiş antijenlerin kullanıldığı nadir parazitler arasında değerlendirilmektedir². Serolojik tanı için geliştirilen testlerde genellikle *T.canis* larval ekskretuar-sekretuar (TES) antijeni kullanılmaktadır^{2,12}. TES antijeninin ham (crude) antijene göre daha özgül olduğu kabul edilmekte ancak TES antijeninin total olarak kullanıldığı testlerde özgüllük problemleri yaşanabildiği bildirilmektedir². Bununla ilgili olarak yapılan çalışmalarda; askariyazis, strongiloidozis, filariyazis, anisakiyazis ve fasioliyazis gibi helmint enfeksiyonlarında çapraz reaksiyonların gözlenebildiği rapor edilmiştir¹³⁻¹⁶. Ancak trişinelozis enfeksiyonlarında bu reaksiyonların varlığını gösteren çok fazla çalışma bulunmamaktadır^{17,18}. Bu nedenle çalışmamızda, toksokariyazis tanısında *Trichinella* antikorları ile oluşabilecek olası çapraz serolojik yanıtların, ELISA ve Western blotting (WB) yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

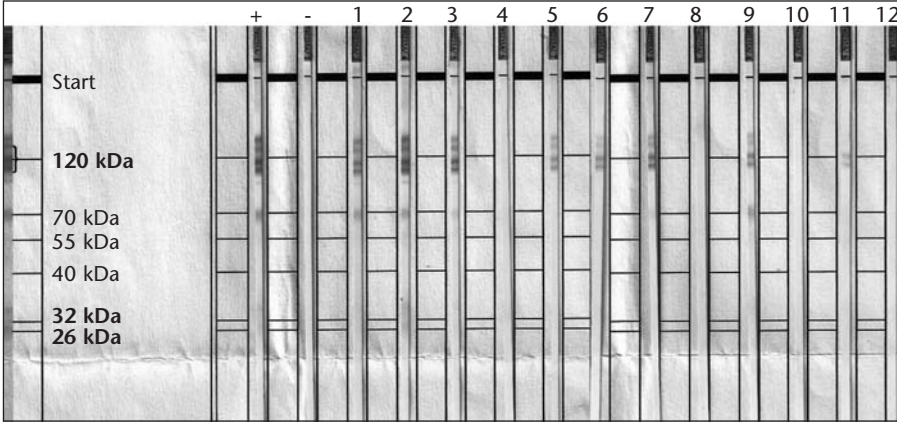
GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, İzmir'de Ocak 2004 tarihinde ortaya çıkan *Trichinella britovi* salgınında tanı algoritmine göre kesin olgu olarak değerlendirilmiş 209 hastanın serum örnekleri dahil edildi. Tüm hastaların bilgilendirilmiş onamları alındıktan sonra kan örnekleri toplandı ve serumları ayrılarak -80°C'de saklandı.

Tüm serum örnekleri, antijen olarak total TES kullanan ticari *Toxocara* IgG-ELISA test kiti (Cypress Diagnostics, Belçika) ile üretici firma prosedürüne göre çalışıldı. *Toxocara* IgG-ELISA kiti ile ara pozitif ve pozitif olarak saptanan serumlar doğrulama yapılmak üzere *Toxocara* IgG-WB kiti (Test-Line Diagnostics, Çek Cumhuriyeti) ile üretici firma prosedürüne göre çalışıldı. Test şeridinde yer alan ve *Toxocara* için karakteristik olduğu belirtilen 120 kDa (üçlü bant), 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 32 kDa ve 26 kDa molekül ağırlığındaki bantlardan, 120 kDa, 32 kDa ve 26 kDa antijenik bantların (yüksek özgüllükte bantlar) her üçünün birlikte görülmesi durumunda hasta örnekleri pozitif olarak değerlendirildi. Diğer karakteristik bantların (70 kDa, 55 kDa ve 40 kDa) tek başına saptandığı hastalar negatif olarak kaydedilirken, yüksek özgüllükteki bantlardan biriyle birlikte saptanmaları halinde hasta sınır değerde kabul edildi (Şekil 1).

BULGULAR

Toxocara IgG-ELISA ile 209 serumun 197 (%94.3)'si seronegatif olarak saptanırken, dokuz serum pozitif ve üç serum ara pozitif olmak üzere toplam 12 (%5.7) serum örneği pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu 12 seruma uygulanan WB testi sonucunda yedi örnek negatif sonuç vermiştir (Şekil 1). Negatif serumlardan dördünde hiçbir reaksiyon gözlenmezken, üç örnekte sadece 120 kDa bandı görülmüştür. WB kitinin değerlendir-



Şekil 1. *Toxocara* IgG-WB testinde kontrol ve hasta örneklerine ait test şeritleri.

me kriterlerine göre dört hasta sınır (border) değerinde bulunmuş ve toksokariyazis açısından tam olarak değerlendirilememiştir. Bu hastaların üçünde (No. 1, 3 ve 7) 120 ve 70 kDa; birinde de (No. 9) 120, 70 ve 32 kDa bantları birlikte saptanmıştır. 120, 70, 32 ve 26 kDa moleküler ağırlıktaki antijenik bantların beraber gözlemlendiği sadece bir hasta (No. 2) pozitif olarak kabul edilmiş ve toksokariyazis tanısı doğrulanmıştır. Çalışılan tüm örneklerin IgG-ELISA ve WB testi sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 1’de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Toksokariyaziste klinik tablo, alınan yumurta ve göç eden larva sayısına, kişinin bu larvalara verdiği immün yanıt ve etkilenen organa göre değişkenlik göstermektedir¹. Az sayıda larvanın alındığı durumlarda immün yanıtın kurtulan larvaların beyin ve göz gibi özgün dokulara ulaşarak lokal belirtiler oluşturduğu; fazla larva alımında ise enfeksiyo-

Tablo 1. *Toxocara* IgG-ELISA ile Pozitif ve Ara Pozitif Olarak Belirlenen Hastaların WB Bant Profilleri

	Örnek No											
	1	2	3	4*	5*	6*	7	8	9	10	11	12
IgG ELISA	+	+	+	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+
IgG WB												
120 kDa	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
70 kDa	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
55 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32 kDa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
26 kDa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yorum	S	P	S	N	N	N	S	N	S	N	N	N

* Ara pozitif örnekler.

P: Pozitif; N: Negatif; S: Sınırdaki (testlerde kullanılan pozitif ve negatif serumlar kit içinde yer almaktadır).

nun sistemik bir hal alarak hepatosplenomegali, eozinofili, hipergamaglobulinemi, deri döküntüleri, solukluk, halsizlik ve pulmoner belirtiler gibi hastalığa özgül olmayan semptomlarla seyrettiği belirtilmektedir^{1,2}. Klinik tanıyı güçleştiren bu belirsizliklere ilaveten, etkenin tanısının da net olarak yapılamaması, toksokariyazis tanısında serolojinin önemi ni daha da artırmaktadır.

Oküler larva migransta alınan larva sayısının az olması nedeniyle antikor yanıtının çok iyi olmadığı, oluşan antikorların da sıklıkla vitroz sıvıyla sınırlı IgE tipi antikorlar olduğu saptanmıştır^{2,19}. Buna karşın viseral larva migransta larvaların salgıladığı TES (*T. canis* larval excretory-secretory) antijenlere karşı konak tarafından güçlü bir antikor yanıtı oluşturulabilmektedir^{1,2}. Günümüzde bu antikorları saptamak amacıyla en sık kullanılan yöntem indirekt TES-IgG-ELISA testidir^{2,12}. Ancak paraziter enfeksiyonların endemik olduğu bölgelerde, antijenik çapraz reaksiyonlar bu testin tanısai değerini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle askariyazis, strongiloidozis, filariyazis, anisakiyazis ve fasioliyazis enfeksiyonuna karşı oluşan antikorlarla, ayrıştırılmamış doğal TES antijenininin 32 kDa'dan büyük molekül ağırlıklı bileşenleri arasında çapraz reaksiyonlar oluşabildiği gösterilmiştir¹³⁻¹⁶.

Diğer bir doku nematodu hastalığı olan trişinellozis, ateş, kas ağrısı, ödem, döküntü ve eozinofili gibi özgül olmayan bulguların benzerliği nedeniyle toksokariyazis ayırıcı tanısında düşünülmesi gereken bir parazitozdur²⁰. Trişinellozisteki esas antikor yanıtının, toksokariyazisteki yanıtı benzer şekilde, larval ekskretuar-sekretuar (ES) antijenlere karşı oluştuğu bilinmektedir^{20,21}. Bununla birlikte *Toxocara* ve *Trichinella*'dan salgılanan bu antijenlerin ortak yapılar içerip içermediğini gösteren çok fazla çalışma bulunmamaktadır. De Ayuela ve arkadaşları²² yaptıkları çalışmada, *Trichinella* ES antijeninde bulunan tyelose epitoplarını, geliştirdikleri monoklonal antikor (mAb US4) ile tespit etmişler, aynı antikoru embriyolu *Toxocara* yumurta ekstratlarında da antijen pozitifliği verdiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise, her iki parazitin kas tutulumlarını takiben otoimmün aktivitenin tetiklenmesi sonucunda aynı antistriational antikorların sentezlendiği gösterilmiştir²³. *Trichinella* ES antijenleri ile toksokariyazisteki oluşan antikorlar arasında çapraz reaksiyonların varlığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir^{24,25}. Bizim daha önce "in-house" *Trichinella* IgG-ELISA testimizi değerlendirdiğimiz çalışmamızda, klinik ve serolojik olarak konfirme edilmiş 10 toksokariyazis hastasından birinin serumunda seropozitiflik saptanmıştır²⁴. Diğer taraftan, anti-*Trichinella* antikorlarıyla *Toxocara* TES antijeni arasındaki çapraz reaksiyonları ortaya koyan çok fazla literatür bulunmamaktadır. Jacquier ve arkadaşları¹⁷, kendi geliştirdikleri *Toxocara* IgG-ELISA kit sonuçlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, doğal TES antijeni kullanarak hazırladıkları kit ile *Trichinella* seropozitif olan 40 örneğin 12 (%30)'sinde *Toxocara* seropozitifliği rapor etmişlerdir. Watthanakulpanich ve arkadaşları¹⁸ ise, TES-ELISA testi ile total IgG ve IgG alt tip antikor yanıtlarındaki olası çapraz reaksiyonları araştırmışlar; *Trichinella* seropozitif dört örneğin tümünde IgG₂; üçünde ise total IgG ve IgG₃, IgG₄ alt tiplerinde çapraz reaksiyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, *Trichinella* seropozitif 209 olguluk büyük bir grup değerlendirilmiş ve dokuz örnek kesin, üç örnek ise ara pozitif olmak üzere toplam 12 (%5.7) hasta serumunda anti-*Toxocara* IgG pozitif ola-

rak saptanmıştır. Çalışmamızda ELISA yöntemiyle önceki çalışmalara göre daha düşük oranda seropozitiflik saptandığı gözlenmiştir^{17,18}. Bu durum, önceki iki çalışmada kullanılan TES antijenlerinin pürifikasyon farklılıklarından ve/veya çalışmalara dahil edilen trişinelozisli hastaların farklı türlerle enfekte olmalarından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Jacquier ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında etkenin *T.spiralis* olduğu görülmektedir. Her ne kadar *T.spiralis* ile *T.britovi* türleri arasında çok fazla antijenik farklılık bulunmasa da, tür farklılığı, saptanan pozitiflik oranları üzerinde etkili olmuş olabilir. Bununla birlikte Jacquier ve arkadaşları¹⁷ ile Wathanakulpanich ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmalarında herhangi bir doğrulama testi kullanılmadığı ve saptanan bu düşük özgüllük oranlarının göreceli olduğu söylenebilir.

TES antijeni içeriğindeki düşük molekül ağırlıklı bileşenlerin toksokariyazis serolojik tanısında daha özgül olduğu ve bu antijenlerin kullanılmasıyla çapraz reaksiyonların büyük ölçüde önüne geçilebileceği belirtilmektedir^{2,12,13}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, TES-26, TES-30, TES-57 gibi rekombinant antijenlerin üretimi ve ELISA testlerinde kullanılması ile özgüllüğü artırmaya yönelik başarılı sonuçlar alınmıştır^{13,14,26}. Yamasaki ve arkadaşları¹⁴ toksokariyazis dışında 20 farklı helmint hastalığını değerlendirmişler ve TES-ELISA ile hastaların %43 (61/142)'ünde çapraz reaksiyon saptarken, TES-30 rekombinant antijeninin kullanımıyla bu oranın %2.1 (3/142)'e düştüğünü bildirmişlerdir. TES antijenlerinin kullanıldığı WB (TES-WB) testi de, *Toxocara* antikorlarını saptamada en özgül yöntem olarak gösterilmekte; bu şekilde, ayrıştırılmış TES antijenik fraksiyonlarına karşı oluşan antikor etkileşimlerinin saptanabildiği ve olası yanlış pozitifliklerin önlenilebileceği vurgulanmaktadır^{2,27}. Günümüzde kabul görmüş en etkin serolojik tanı yaklaşımı; TES-IgG-ELISA ile yapılacak bir taramadan sonra, elde edilen seropozitifliklerin TES-WB ile konfirmasyonu şeklindedir². Bizim çalışmamızda da, serum örneklerinde *Toxocara* IgG-ELISA ile saptanan pozitif sonuçların doğrulaması ticari *Toxocara* IgG-WB kiti ile yapılmış; ELISA pozitif 12 örneğin sadece biri WB ile pozitif bulunarak toksokariyazis seropozitifliği konfirme edilmiştir. Bu örnek hem *Trichinella* hem de *Toxocara* antikorları yönünden seropozitif olarak değerlendirilmiştir. WB ile negatif saptanan örneklerin dördünde herhangi bir bant gözlenmezken, üç örnekte tek başına saptandığı zaman anlamlı olmayan 120 kDa bandı görülmüştür (Tablo I). Bu serumlar için *Toxocara* IgG-ELISA kiti ile elde edilen sonuçlar "yanlış pozitif" olarak kabul edilmiştir. Kesin olarak değerlendirilemeyip sınır değer olarak kabul edilen dört örnek için testin öngördüğü iki ay sonraki tekrar incelemesi, hastalara ulaşamadığından yapılamamıştır.

Çalışmamızın verileri, *Trichinella* ES antijeni ile TES antijeni arasında homojenik epitopların bulunabileceğini ve trişineloziste oluşan antikorların, ayrıştırılmamış total TES antijeni ile reaksiyon oluşturabildiğini göstermiştir. Sonuç olarak, toksokariyazis serolojik tanısında trişinelozis çapraz reaksiyonları açısından dikkatli olunması; kliniğin şüpheli olduğu durumlarda TES-ELISA ile elde edilen seropozitif sonuçların mutlaka WB gibi ileri bir test ile doğrulanması gerektiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev 2003; 16(2): 265-72.
2. Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol 2009; 25(4): 182-8.
3. Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. Ann Trop Med Parasitol 2010; 104(1): 3-23.
4. Baboolal S, Rawlins SC. Seroprevalence of toxocariasis in schoolchildren in Trinidad. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(2): 139-43.
5. Campos-Junior D, Elefant GR, de Melo e Silva EO, et al. Frequency of seropositivity to *Toxocara canis* in children of different socioeconomic strata. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(4): 509-13.
6. Dogan N, Dinleyici EC, Bor O, Toz SO, Ozbel Y. Seroepidemiological survey for *Toxocara canis* infection in the northwestern part of Turkey. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2007; 31(4): 288-91.
7. Kaplan M, Kamanli A, Kalkan A, et al. Toxocariasis seroprevalence in patients with rheumatoid arthritis. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2005; 29(4): 251-4.
8. Akdemir C. Visceral larva migrans among children in Kutahya (Turkey) and an evaluation of playgrounds for *T. canis* eggs. Turk J Pediatr 2010; 52(2): 158-62.
9. Demirci M, Korkmaz M, Sakru N, Kaya S, Kuman A. Diagnostic importance of serological methods and eosinophilia in tissue parasites. J Health Popul Nutr 2002; 20(4): 352-5.
10. Karadam SY, Ertug S, Ertabaklar H, Okyay P. The comparison of IgG antibodies specific to *Toxocara* spp. among eosinophilic and non-eosinophilic groups. New Microbiol 2008; 31(1):113-6.
11. Oğuztürk H, Saygı G. *Toxocara canis* larvaları ile oluşan enfeksiyonun ilköğretim okulu öğrencilerinde araştırılması. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2002; 26(4): 409-14.
12. Smith HV, Noordin R. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis, pp: 89-112. In: Holland CV, Smith HV (eds), *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. 2006. CABI Publishing, Oxfordshire.
13. Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). Clin Microbiol 2009; 47(6): 1712-7.
14. Yamasaki H, Araki K, Lim PK, et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1409-13.
15. Perteguer MJ, Cuéllar C, Guillén JL, et al. Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. Acta Trop 2003; 89(1): 85-9.
16. Rodero M, Chivato T, Muro A, Cuéllar C. Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(3): 293-301.
17. Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. Clin Microbiol 1991; 29(9): 1831-5.
18. Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. Acta Trop 2008; 106(2): 90-5.
19. Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, Magnaval JF. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. Korean J Parasitol 2000; 38(4): 267-73.
20. Pozio E, Gomez Morales MA, Dupouy-Camet J. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2003; 1(3):471-82.
21. Ozkoc S, Delibas SB, Akisu C. Use of the Western Blot assay in the diagnosis of trichinosis. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2005; 29(1): 26-30.

22. Dea-Ayuela MA, Romarís F, Ubeira FM, Rama-Iñiguez S, Martínez-Fernández AR, Bolás F. Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. *Parasite* 2001; 8 (2 Suppl): S120-2.
23. Macura-Biegun A, Pituch-Noworolska A, Rewicka M, Mrozewicz B, Noworolski J. Antistriational antibodies during *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21(2): 101-6.
24. Akisu C, Delibas SB, Ozkoc S, Pozio E. Serodiagnosis of trichinellosis: in-house versus commercial ELISA. *Parasite* 2006; 13(3): 262-3.
25. Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Cherchi S, Pezzotti P, Pozio E. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(11): 1723-9.
26. Iddawela RD, Rajapakse RP, Perera NA, Agatsuma T. 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 J Parasitol* 2007; 45(1): 19-26.
27. Roldan WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocaríasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(3): 411-8.