

## 原虫・蠕虫感染症

赤尾 信明\*

### 要 旨

ペットから感染する寄生虫疾患の多くは経口感染する。小児への感染においても同様に、寄生虫に感染したペットとの接触あるいはその排泄物で汚染された環境が感染源となる。そのためペットの健康管理と個人の衛生管理の徹底が感染の防止に重要である。寄生虫疾患は症状が比較的軽微なものから放置すると死に至るものまで多種多様であるが、早期診断と適切な駆虫剤の投与で完治するものが多い。

### はじめに

『ペットの飼い主にとってペットのいない生活は考えられない。しかし、そのペットからヒトに感染する病気があることもまた事実であり、ヒトとペットが共に健康に暮らすために、ペットからどのような病気が感染し、どうしたらそれを防げるかを知ることがとても大切なことである』(米国CDC国立感染症センター「ペットからの感染症」ホームページより)

ペットを介して感染する寄生虫疾患のうち小児に多くみられるものを表にあげた。これらの多くはペットが排泄する虫卵あるいはオーシスト(卵嚢子)、シスト(嚢子)が感染源となってヒトに経口感染する。しかしなかには昆虫の吸血や刺咬によって感染するものもある。また、線虫類寄生虫では感染しても人体内では成熟することができず、幼虫のまま体内を移行するものが多い。これを幼虫移行症とよんでいる。

ここでは主な寄生虫疾患について最近の感染

実態を含め解説する。

### I. 原虫性疾患

#### 1. アメーバ赤痢

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)によって起きる消化器感染症である。感染は糞便中に排泄された嚢子(cyst)の経口感染によって起こる。糞便中には嚢子以外に栄養型(trophozoite)も排泄されるが、嚢子は有形便にみられ栄養型は粘血便にみられることが多い。

赤痢アメーバには嚢子や栄養型の形態だけでは区別することが困難な非病原性の *E. dispar* というアメーバがある。ある種の酵素(ヘキソキナーゼやスホグルコムターゼ)のアイソザイムパターンの違いやPCRを用いた遺伝子解析によってのみ正確な鑑別が可能である。しかし、臨床的には糞便あるいは膿瘍液から栄養型や嚢子が検出されかつ血清中の抗体が陽性的場合、

\* Nobuaki AKAO 東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

[連絡先] ☎ 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

表 ペットを介して小児に感染する主な寄生虫疾患

原虫類	病名	病原体	感染媒介動物名	小児への感染頻度 からみた重要性*	備 考
原虫類	アメーバ赤痢	<i>Entamoeba histolytica</i>	サル	B	4類感染症。診断した医師は7日以内に届け出が必要。実験的にはイヌ、ネコ、スナネズミに感染
	ジアルジア症	<i>Giardia intestinalis</i>	イヌ、ネコ、ビーバー ネズミ	A	4類感染症
	バベシア症	<i>Babesia microti</i>	イヌ、ネコ、ネズミ	B	マダニの刺咬による感染
	リーシュマニア症	<i>Leishmania sp.</i>	イヌ、ネコ、ネズミ	C	媒介昆虫(サイチヨウバエ)が国内に棲息しないので、すべて輸入症例。
	バランチンジウム症 トキソプラズマ症	<i>Balantidium coli</i> <i>Toxoplasma gondii</i>	ブタ、サル、ラット ネコ	C	不完全調理食肉からの感染もある。
蠕虫類	小形条虫症	<i>Vampirolepis nana</i>	ネズミ	B	ゴミムシダマシ、ネズミノミなどの昆虫が第1中間宿主。自家感染も起こる。
	縮小条虫症	<i>Hymenolepis diminuta</i>	ネズミ	C	ノミ、ゴキブリなどの昆虫が第1中間宿主となる。
	瓜実条虫症	<i>Dipylidium caninum</i>	イヌ、ネコ	A	ネコノミ、イヌノミが中間宿主
	エキノコックス (多包虫)症	<i>Echinococcus multilocularis</i>	イヌ、キツネ、オオカミ	A	4類感染症
	トキソカラ症	<i>Toxocara canis</i>	イヌ、キツネ	A	ネコに寄生するネコ回虫( <i>T. cati</i> )も病原体となりうる。
	皮膚幼虫爬行症 (イヌ鉤虫)	<i>Ancylostoma caninum</i>	イヌ	B	虫卵から孵化した幼虫が経皮感染して爬行疹を起こす。
	広東住血線虫症	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	ネズミ	B	中間宿主(ナメクジ、アフリカマイマイ)内で感染幼虫になる。
	東洋眼虫症	<i>Thelazia callipaeda</i>	イヌ、ネコ、サル、ウサギ	B	中間宿主(メマトイ=シヨウヨウバエ科の小さなハエ)内で感染幼虫になる。

\* A : 国内でもよくみられる寄生虫, B : 小児への感染頻度は低い国内に広く分布している寄生虫, C : 国内には分布していないまたは発生がまれな寄生虫

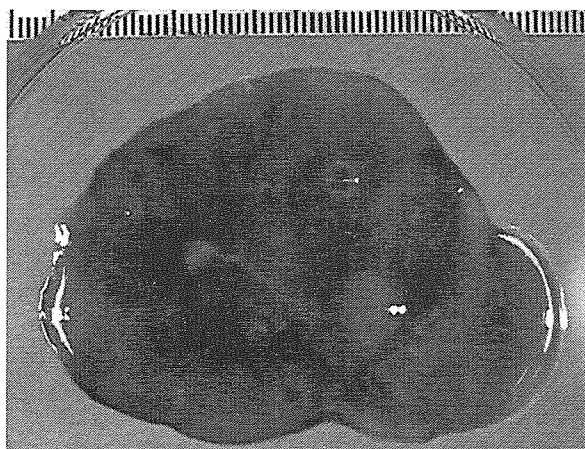


図1 アメーバ赤痢患者の粘血便

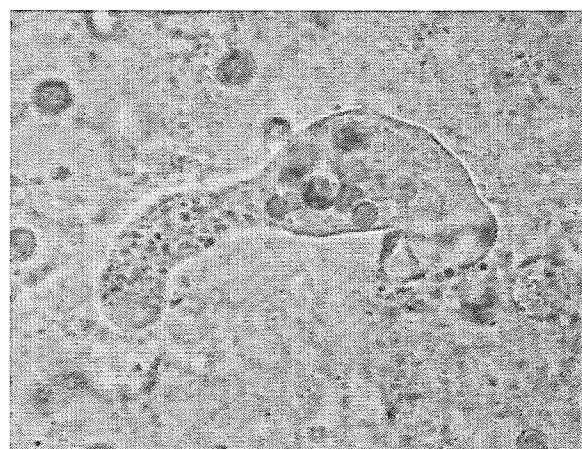


図2 図1の患者糞便中にみられた赤血球を  
貪食した赤痢アメーバ栄養型(無染色)

赤痢アメーバの感染と考えると差し支えない。

#### a) 感染の実態

東南アジア産のカクニクザルで48.1%，エチオピア産ミドリザルで33.3%の感染が報告されている<sup>1)</sup>。しかし、最近の研究ではサルに感染しているのはすべて非病原性の *E. dispar* であることが明らかになってきた<sup>2)</sup>。このように、輸入サルの赤痢アメーバ感染は非常に高率であるが、これらのサルからヒトに感染が起こりうるのかについてはさらに詳細な疫学調査が必要であろう。ミドリガメ、ヘビ、トカゲなどの爬虫類の消化管に寄生して病原性を示すアメーバは *E. invadens* で、これがヒトに感染したという報告はない。

#### b) 症状と診断

栄養型は消化管粘膜を融解しながら組織内に侵入し、大腸に多発性潰瘍（蛸壺状）を形成する（腸アメーバ症）。栄養型が血行性に播種されると肝、肺、皮膚、脳などに膿瘍を形成する（腸管外アメーバ症）。とくに肝膿瘍を併発することが多い。

① 腸アメーバ症：病変の好発部位は盲腸、虫垂、上行結腸、横行結腸、S状結腸、直腸の順にみられる。便の性状はイチゴゼリー状の粘血下痢便を呈する（図1）。このような便を微温生理食塩水に懸濁して顕微鏡で観察すると、細胞質内に赤血球を貪食した栄養型が認められる（図

2)。

② 腸管外アメーバ症：栄養型が血行性に移行増殖して起きる。もっとも多いのが肝膿瘍で、腸アメーバ症を伴っていないことが多い。膿瘍液は濃黄褐色。膿瘍穿刺液中に栄養型を見つけることは少ないので血清抗体検査を実施する。

#### c) 小児への感染経路

ヒトを含む感染動物の糞便中に排泄される赤痢アメーバの嚢子によって汚染された飲料水、食品、手指から経口感染する。栄養型では経口感染しない。通常、感染から1～4週間で発症する。

#### d) 治療と予防

消化管内や膿瘍内の栄養型に対してはメトロニダゾール（小児には30～35 mg/kg/日、分3、10日間）、チニダゾール（小児には50 mg/kg/日、分4、3日間）の経口投与を行う。重症例ではメトロニダゾール35～50 mg/kg/日、分3、7日間あるいはチニダゾール50～60 mg/kg/日、最大日量2 g、5日間連続投与する。嚢子保有者にはフロ酸ジロキサニド（小児は20 mg/kg/日、分3、10日間）を経口投与する。

アメーバ赤痢は熱帯、亜熱帯を中心に5億人以上が感染し、毎年5万人以上が死亡していると推定されている。嚢子は水道水に含有されている通常の塩素消毒や乾燥にも抵抗性を示す

が、煮沸や 200 ppm 濃度のヨードあるいは 5～10%塩酸で死滅する。それゆえ、流行地で生活するときは生水・生野菜の摂取を避け、手指の洗浄を心掛ける。

## 2. ジアルジア症

ランブル鞭毛虫によって起きる急性あるいは慢性の下痢を主徴とする疾患である。

### a) 感染の実態

最近の調査では、青森県と秋田県の一般家庭で飼育されているイヌ 1,035 頭中 151 頭 (14.6%) から囊子あるいは栄養型が検出され、その感染率は 1～6 カ月齢の幼犬で推計学的に有意に高かったと報告されている<sup>3)</sup>。米国ではビーバーの感染率が高く、ビーバーの糞便で汚染された池の水を原因とする集団感染がしばしば報告されており、ジアルジア症は「ビーバー熱 (beaver fever)」ともよばれている。また、インコやカナリアなどの鳥類にも高率に *Giardia* が寄生しているが、これは *G. psittaci* という種類であり、ヒトへの感染性については明らかではない。

### b) 症状と診断

水様性の下痢を起こす。発症までの潜伏期間は 12～20 日で、急性のウイルス性下痢や細菌性下痢、食中毒、急性腸アメーバ症、病原性大腸菌感染症などとの鑑別が必要である。小児ではしばしば吸収不良症候群がみられる。また、141 名のジアルジア症の小児の眼底を検査したところ、28 名 (19.9%) に網膜の異常を認めたという報告がある<sup>4)</sup>。

診断は、糞便内に栄養型あるいは囊子を検出する。脂肪便を生理食塩水 1 滴とともにスライドガラス上で懸濁させて鏡検すると活発に動く栄養型をたやすく見つけることができる。囊子の検査にはホルマリン酢酸エチル沈澱法によって得られた沈渣をヨード染色して鏡検する (図 3)。

### c) 小児への感染経路

赤痢アメーバと同様に囊子に汚染された飲料

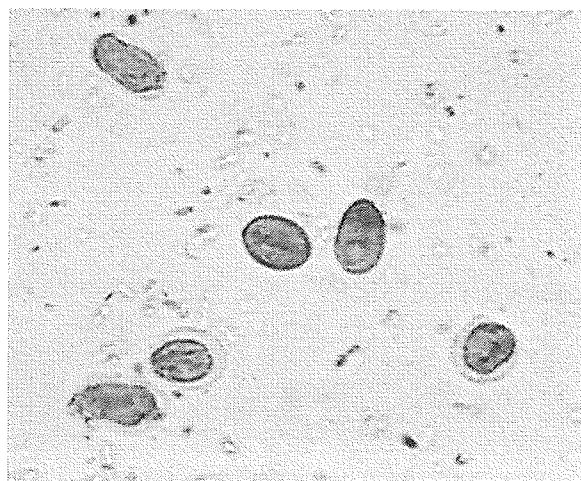


図 3 ランブル鞭毛虫囊子 (ヨード染色)

水、食品、手指を介して経口感染する。

### d) 治療と予防

メトロニダゾール (15 mg/kg/日、分 3、5 日間) が第 1 選択薬。妊婦には禁忌。妊婦にはパロモマイシン (25～35 mg/kg/日、分 3、7 日間) を投与する。

水道水による手洗いの励行と乾いたタオルの使用が感染の広がりを防止するのに役立つ。母乳で育てられた 6 カ月未満の乳児ではジアルジア症の感染が少なかったという報告があり、分泌型 IgA を介した感染防御機序の存在が示唆されている。一方、イヌのジアルジア症にはワクチンが開発され、米国では感染予防に用いられている。

## 3. バベシア症

本来はノネズミの赤血球に寄生するバベシア原虫がヒトに感染して起きる。感染はマダニの刺咬によって伝播されるが、輸血による感染も報告されている。ヒトは本来の宿主ではなく、脾摘を受けたヒトや免疫能の低下したヒトで感染しやすい。

### a) 感染の実態

国立感染症研究所などが行った調査の結果では、関東地方の衛生研究所に保存されていた 1,400 名の血清中 15 名から抗体保有者が見つかり、潜在感染の存在が証明されている。1999

年には神戸市内の病院で輸血を受けたステロイド治療中の男性の赤血球内に本原虫が初めて確認された。

#### b) 症状と診断

マダニの刺咬後1~2週間で悪寒を伴う発熱がみられる。無症状（不顕性感染）から致命的なものまでさまざまであるが、免疫不全患者では重症化しやすい。

血液塗抹標本をギムザ染色して赤血球の原虫を確認する。形態学的にマラリアとの鑑別が必要。マラリア原虫との鑑別点としては、バベシア原虫は赤血球内でマルタ十字形（マルタ騎士団の徽章）を呈する。寄生赤血球数の少ないときには患者血清をハムスターやスナネズミの腹腔に注射すると2~3日で赤血球内に原虫が出現する。血清中の抗体検査も疫学調査には用いられているが、他のバベシア属やマラリア原虫との間で交差反応がみられるので注意が必要である。

#### c) 小児への感染経路

野山でのマダニの刺咬あるいは輸血によって感染する。

#### d) 治療と予防

クリンダマイシン（小児では20~40 mg/kg/日、分3、7日間）とキニーネ（小児25 mg/kg/日、分3、7日間）の併用療法が有効であるが、これが無効な症例に対してはアジスロマイシン（小児12 mg/kg/日、7~10日間経口投与）とキニーネあるいはアトバコン（小児20 mg/kg、12時間ごと、7~10日間経口投与）の併用療法を試みる。

バベシアの流行地で野外活動をするときには昆虫忌避剤を使用する。しかしこれで完全にダニの刺咬を防ぐことはできない。ダニに刺されたらできるだけすばやく取り除くことが大切である。

バベシア原虫は血液を冷蔵（4℃）で21日間保存しても感染力に低下はみられず、通常の輸血用血液による感染が起こりうる事が知られ

ている。

#### 4. バランチジウム症

ヒトに寄生する原虫類のなかではもっとも大きく、糞便内には栄養型と嚢子を認める。栄養型は通常大腸に寄生し、50~100 μm×40~70 μmの卵円形で体表は繊毛で覆われ、新鮮な下痢便中では活発に動いている。嚢子は50~70 μmの球形で、大核と小核それぞれ1個をもつ。

##### a) 感染の実態

国内におけるヒトへの感染はきわめて低いと考えられているが、1993年北海道の養豚農家でブタ流行性下痢症が発生したときの調査では、下痢を呈したブタ19頭のうち5頭から大腸バランチジウムが検出されている<sup>9)</sup>。熱帯、亜熱帯地方ではブタやサルへの感染率は非常に高い。ペットとしてのミニブタの飼育が盛んになってきているので今後注意が必要であろう。

##### b) 症状と診断

嚢子の摂取後4~5日で発症する。下腹部痛、テネスマス、悪心、嘔吐、粘血便がみられる。診断は下痢便の直接塗抹で、繊毛をもつ大きな栄養型や嚢子を確認する。

##### c) 小児への感染経路

感染動物（ブタ、サル、ラット）の糞便内の嚢子に汚染された飲料水の経口摂取によって感染する。

##### d) 治療と予防

テトラサイクリン（8歳以下の小児には40 mg/kg/日、分4、最大日量2 g/日、10日間）あるいはメトロニダゾール（小児は35~50 mg/kg/日、分3、5日間）を投与する。治療1カ月後に連続3日の糞便検査で原虫の消失を確認する。

1%次亜塩素酸あるいは2%グルタールアルデヒドで死滅するが、通常の水道水中の塩素濃度で嚢子は死滅しない。煮沸により感染力を失う。

#### 5. トキソプラズマ症

ネコの小腸上皮内で無性生殖と有性生殖を行

い糞便内にオーシストを排泄する。ネコが唯一の固有宿主である。ヒトをはじめあらゆる温血動物に感染するが、ネコのようにオーシストを排出することはない。ヒトに感染すると最初の2週間程度は組織内で増殖するが、その後脳や筋肉内で嚢子を形成し、なかに多数の緩増虫体 (bradyzoite) を形成して終生寄生し続ける。

#### a) 感染の実態

通常ヒトは不顕性感染が多く、妊娠可能年齢層における抗体保有率は高い地域で20~30%程度といわれている。一方、固有宿主であるネコの感染率は、1998年に千葉で調査された250匹中1匹からオーシストが検出されている<sup>6)</sup>。

#### b) 症状と診断

① 先天性トキソプラズマ症：母親が妊娠初期に感染すると流産を引き起こすが、妊娠中後期に初感染すると新生児に水頭症、脳内石灰化、精神・運動発達障害、網脈絡膜炎が生じる。

② 後天性トキソプラズマ症：小児がこの型の症状を表すのは免疫不全疾患やステロイドなどの免疫抑制療法を受けているときが多い。脳や筋肉内に潜んでいた嚢子内の緩増虫体が急増虫体となって増殖し、急性の肺炎、脳炎、心筋炎を起こす。

診断は血清中の抗体を検査するが、不顕性感染者との区別のためにIgM抗体の検出やペア血清を用いた抗体価の推移を調べる。急性リンパ節炎の患者では生検で得られたリンパ節の乳剤をマウスに摂取して、腹水や脳内に増殖する原虫を確認する。

#### c) 小児への感染

感染ネコの糞便を介する小児への直接感染よりも、妊娠中に初感染した母親からの経胎盤感染が多い。オーシストは低温湿潤な土壌中では1年以上も感染力があり、庭の手入れやガーデニング作業後の手指や家庭菜園の野菜に付着したオーシストの経口摂取によって感染する。

トキソプラズマ原虫はヒトをはじめ数多くの哺乳類や鳥類にも感染する。それゆえ、食用と

なる肉の不完全調理による感染も多い。

#### d) 治療と予防

小児にはピリメサミン(2 mg/kg/日, 3日間, 最大日量 25 mg/日, その後 1 mg/kg/日, 4週間) とスルファダイアジン (100~200 mg/kg/日, 3~4週間) の併用, あるいはアセチルスピライマイシン (50~100 mg/kg/日, 3~4週間) を投与する。

---

## II. 蠕虫性疾患

---

### 1. 小形条虫症

ネズミの小腸に寄生する体長4 cm以下の条虫で、糞便内に排泄された虫卵が経口摂取されると消化管内で孵化して六鉤幼虫が粘膜内に侵入する。粘膜組織内で擬嚢尾虫になり、感染5日目には消化管腔内に戻って頭節の先端にある顎嘴と吸盤で粘膜に咬着して成長する。虫卵をネズミノミやゴミムシグマシなどの昆虫が摂取するとその体内で擬嚢尾虫になる。ヒトがこれらの昆虫を誤飲しても感染が成立する。

#### a) 感染の実態

ネパールの調査では396名の下痢症の患者の2%に小形条虫の寄生がみられている<sup>7)</sup>。国内におけるネズミの調査ではマウス108匹中2匹、ラット60匹中8匹に小形条虫の寄生がみられたという<sup>8)</sup>。

#### b) 症状と診断

少数寄生では無症状だが多数寄生例では腹痛、下痢、眩暈、頭痛が認められる。自家感染を起こした重症例ではしばしば成長障害がみられる。

糞便内に成虫が排泄されることはまれであるが、虫卵は多数排泄されるので、集卵沈澱法(ホルマリン酢酸エチル沈澱法)で検査する。

#### c) 小児への感染経路

中間宿主となるノミの誤飲あるいは虫卵の付着した食品を介して感染する。いったん感染す

ると自家感染により寄生虫体数が増加する。流行地では小児の感染率はきわめて高いが成人では低くなる。

#### d) 治療と予防

プラジカンテル（小児には25 mg/kg 単回投与）は組織内の擬嚢尾虫および消化管内の成虫ともに駆虫効果がある。排泄された虫卵によってヒトからヒトへの感染が起こるので、手指の洗浄や環境の浄化が予防にもっとも大切である。

### 2. 縮小条虫症

小形条虫とは異なりヒトからヒトへ虫卵を介した感染は起こらない。必ず中間宿主を必要とする。ノミやゴキブリあるいは穀類に寄生する甲虫類が虫卵を摂取するとその体内で発育して擬嚢尾虫になる。これを中間宿主ごと誤飲すると感染が成立する。自家感染はないので、多数寄生はまれである。

#### a) 感染の実態

近年国内からの症例報告はないが、ドブネズミやクマネズミの多くが感染している。

#### b) 症状と診断

腹痛と下痢。糞便検査で虫卵を確認する。

#### c) 小児への感染経路

中間宿主であるノミ、ゴキブリ、ゴミムシダマシなどの甲虫類の誤飲によって感染する。

#### d) 治療と予防

小形条虫と同じ。

### 3. 瓜実条虫症

わが国のイヌやネコに広く感染が認められる

条虫で、乳幼児の感染がしばしば報告されている。成人の感染はまれ。イヌノミ、ネコノミが中間宿主となる。虫卵は十数個がひとかたまりになって卵嚢とよばれる透明な袋に入って排泄され（図4）。これが中間宿主体内で擬嚢尾虫にまで発育し、ヒトへの感染源となる。

#### a) 感染の実態

瓜実条虫の受胎節は肛門括約筋の収縮で離断しやすく、乳児ではオムツの交換中に片節の排泄に気づくことが多い。片節は白色で瓜の種状を呈し活発に動く（図5）。瓜実条虫は本邦のイヌやネコの消化管にきわめて普通に寄生している。そのためこの条虫が小児へ寄生する機会も多い。

#### b) 症状と診断

少数寄生例では無症状で、単に片節の排虫による他覚的な異常だけである。しかし、ときに腹痛、下痢を伴うこともある。肛門周囲の搔痒

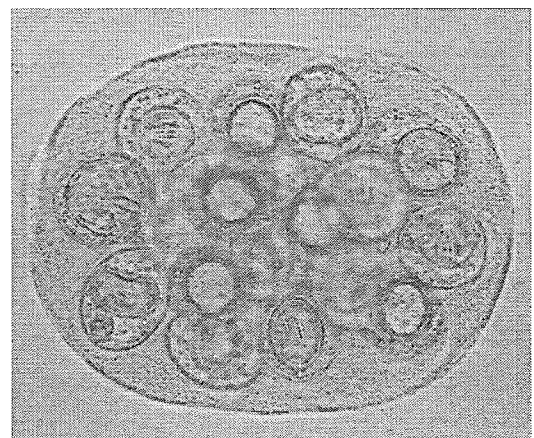


図4 瓜実条虫卵嚢

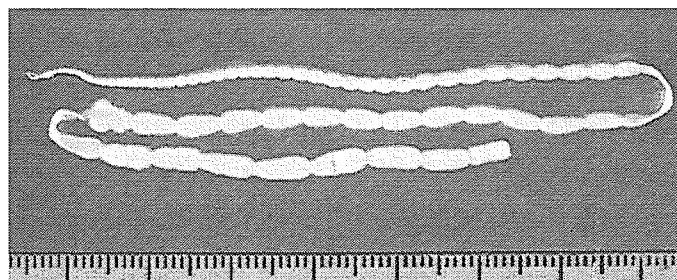


図5 瓜実条虫成虫

感や蕁麻疹，中程度の好酸球増多がみられることもある。

#### c) 小児への感染経路

感染は縮小条虫と同じ。擬囊尾虫をもつ中間宿主の誤飲によって感染が成立する。ノミの誤飲から3~4週間で成虫にまで発育する。

#### d) 治療と予防

成人，小児ともプラジカンテル 10 mg/kg の単回投与により駆虫する。予防にはペットのイヌやネコに寄生するノミの定期的な駆除が重要である。

### 4. エキノコックス (多包虫) 症

多包条虫は北半球に棲むイヌやキツネ，オオカミなどの小腸に寄生するきわめて小形の条虫である。中間宿主はノネズミなどのげっ歯類で，虫卵を摂取すると孵化した六鉤幼虫は血行性に肝に運ばれ，そこで嚢胞 (多包虫) を形成し，外出芽で増殖する。イヌなどの固有宿主は中間宿主を捕食して感染する。

ヒトは固有宿主ではなく中間宿主であり，ヒトの消化管のなかでは成虫にはならず，ネズミと同じように包虫のまま増殖する。

#### a) 感染の実態

北海道を中心に毎年新たな患者が報告されている。2000年までに病理組織学的に多包虫症と確認された患者総数は392名に上っている。北海道庁では抗体検査と超音波検査による住民検診を毎年8万人以上について実施し，2~4名の患者が発見されている。また，1999年には札幌市内在住の2名が患者と認定され，大都市圏においても感染が起きていることが明らかになってきた。

多包虫症は北海道からだけでなく日本各地から70例以上の症例が報告されているがそのほとんどは散发例である。しかし，青森県からはこれまですでに22例の患者の発生が報告されており，感染源となるイヌやキタキツネあるいは中間宿主のノネズミの本州への移動による流行の拡大が現実のものとなってきた。

2000年に小樽市で捕獲された107頭のキツネのうち67頭から，また32頭のタヌキからは3頭に多包条虫の成虫が見つかった。さらにペットとして飼育されていた1,434頭のイヌの検査では5頭が虫卵陽性であった。このうちの1頭は室内で飼育されていたイヌであり，ペットからヒトへの感染の広がり懸念されている<sup>9)10)</sup>。

#### b) 症状と診断

感染後十数年間は無症状のまま経過する。多包虫が肝内で徐々に大きくなると腹部膨満感，腹痛などの症状が現れるが肝機能障害は顕著ではない。病変がさらに拡大すると発熱，黄疸，貧血，腹水貯留などの肝機能不全状態となり，他臓器への転移もみられ予後不良となる。

ヒトでは糞便内に多包条虫の虫卵を排泄することはないので，糞便検査では診断がつかない。問診，超音波検診，腹部X線検査，CT，腹腔鏡検査などの結果と血清抗体をELISA法やウエスタンプロット法で確認して診断する。

自覚症状が現れるのは病期がかなり進展したあとなので，早期診断，早期治療が重要である。

#### c) 小児への感染経路

感染は多包条虫の成虫が寄生しているイヌやキツネなどの糞便中に排泄された虫卵に汚染された飲料水，食品の経口摂取や被毛，粉塵，ゴミの誤飲によって感染する。感染から発症するまで成人では通常10年以上かかるが，7歳女児の感染例が報告されており，子どもでは発症までの経過が短いと考えられるので注意が必要である。

#### d) 治療と予防

病巣の外科的摘除がもっとも確実な治療法となる。しかし，単包虫症とは異なり，多包虫症では正常組織と包虫との境界が明瞭でなく，完全に摘除することは困難である。薬物療法としては，アルベンダゾール (小児で15 mg/kg/日，分3，最大日量800 mg，1~6カ月間) が用いられているが，著効例は少ない。



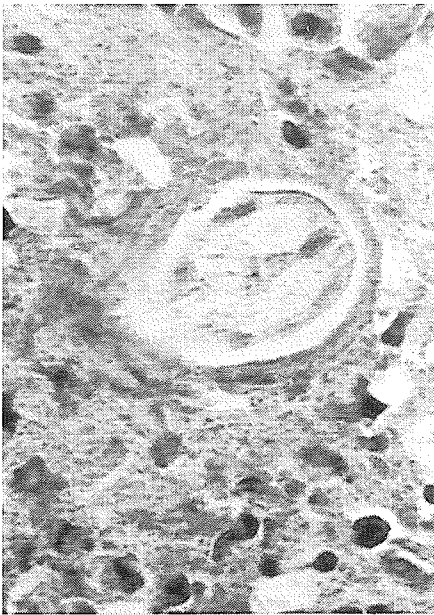


図6 ヒト皮疹の生検標本中にみられたイヌ回虫幼虫断端

感染源となるイヌやキツネに寄生する多包条虫の駆虫，あるいはノネズミの駆除などの動物対策が重要である。また，キツネのエサとなる家庭や農家からの塵芥の適切な処理やペットの定期的な検査が包虫症の予防には大切である。

### 5. トキソカラ症

イヌに寄生するイヌ回虫とネコに寄生するネコ回虫の幼虫によって起きる。成虫が産卵した虫卵は糞便とともに外界に出て発育し，25°Cの湿潤な環境では約1~2週間で虫卵内に感染力をもった幼虫が形成される(幼虫包蔵卵)。これをヒトが何らかの経路で経口摂取して感染する。

#### a) 感染の実態

わが国でヒトからトキソカラ属回虫幼虫が検出された確実な報告は眼型1例と皮膚から幼虫が証明された内臓型の1例であるが，抗体検査の結果と臨床症状からトキソカラ症を疑われた症例はわれわれの研究機関だけでも過去8年の間に60例にのぼっている。

#### b) 症状と診断

ヒトに感染した場合，その寄生部位によって

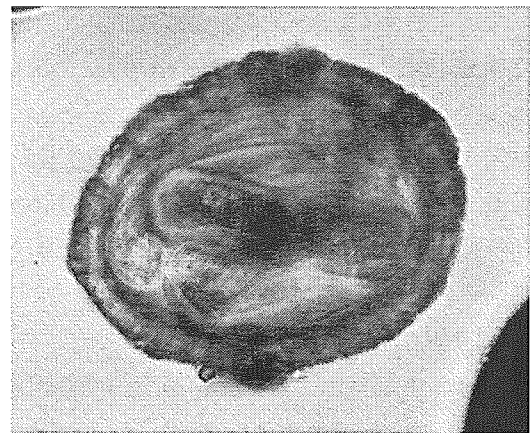


図7 トキソカラ症と診断された患児がよく遊んでいた公園の砂場から回収されたトキソカラ属回虫卵(幼虫包蔵卵)

症状が異なっている。肝や肺，皮膚に寄生する内臓移行型では，発熱，肺炎様症状，肝機能異常，皮疹がみられ末梢血好酸球増多が必発する。網膜に移行する眼型には眼内炎型，後極部肉芽腫型，周辺部腫瘤型があり，視力低下や飛蚊症を自覚するが末梢血好酸球増多はみられないことが多い。中枢神経に寄生して神経症状を起こす神経型ではてんかん様の発作を引き起こす。これ以外に臨床的には無症状であるが，好酸球増多やアレルギー疾患を伴う潜在感染型がある。

人体内に寄生する幼虫は300  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$  ときわめて小さいため肝や皮膚の生検で虫体を証明することは困難である(図6)。そこで，この幼虫が排泄する特異的な抗原を使って血清中の抗体を検出する免疫診断が行われている。眼型では眼内液中の抗体が検出されると診断が確実となる<sup>11)</sup>。

#### c) 小児への感染経路

虫卵で汚染された公園の砂場で遊んだあと，手指に付着した虫卵を誤飲して感染する(図7)。また，イヌ回虫に感染した12頭のイヌの被毛を検査したところ，肛門周囲からは11頭のイヌで，口唇周囲からは10頭のイヌで虫卵が検出

された<sup>12)</sup>。さらにシャンプー後の洗浄液を回収して検査すると60個以上の虫卵が見つかるという。

生肉（ウシ、ニワトリ、シャモ）の生食による感染も報告されている。これらの動物はトキソカラ属回虫の待機宿主となっていると考えられている。

#### d) 治療と予防

アルベンダゾール（400 mg を12時間ごと、3～5日間）あるいはメベンダゾール（100～200 mg を12時間ごと、5日間）投与によって症状が改善することがある。眼型では駆虫剤の投与とともに病変をレーザー照射や凍結凝固することによって視力の低下を防ぐ処置を試みる。

イヌやネコが回虫に感染しないように、定期的な検査と駆虫が重要である。また、砂場が回虫卵で汚染されないような対策を地域住民が協力して実行することも大切である。個人的な感染予防対策としては手洗いの励行とペットとの過度な接触を控えることである。

#### おわりに

本稿では内部寄生虫に焦点を当てて解説したが、ペットに寄生する外部寄生虫による皮膚炎も数多く報告されている。ネコノミによる皮膚炎はときに水疱を形成するほどの重症例もみられるので注意が必要である。なお、最近のイヌに寄生するノミはネコノミが優占種となっている。

ペットから感染する寄生虫疾患の多くはペットの健康管理と個人の衛生管理を徹底することで感染を予防することが可能であるので、ペットオーナーと獣医師、医師相互の情報の共有と連携が何より重要である。

#### 文 献

- 1) 小山 力ほか：実験動物としてのアカゲザルとニホンザルに見出された寄生性アメーバ。寄生虫誌 27(増)：60, 1978
- 2) 脇坂江美ほか：2001, 日本実験動物科学技術大会 2001 (神奈川)
- 3) Itoh N et al：Prevalence of *Giardia lamblia* infection in household dogs. 感染症学雑誌 75：671-677, 2001
- 4) Crosi A et al：Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. Br J Ophthalmol 82：59-62, 1998
- 5) 松木繁幸ほか：豚流行性下痢症の発生について。第41回北海道家畜保健衛生業績集(中標津町), 1993
- 6) 畑 英一ほか：千葉県の不要ネコにおける寄生虫感染状況調査—特に蔗糖浮遊法による検査成績。第59回日本寄生虫学会東日本大会(甲府)抄録, p 47, 1999
- 7) 宇賀昭二ほか：ネパールの下痢症患者における消化管寄生虫の疫学調査。第71回日本寄生虫学会(伊勢原市), p 102, 2002
- 8) 影井 昇ほか：小動物における寄生蠕虫類の感染状況調査(予報)。日本寄生虫学雑誌 29(増)：21-22, 1980
- 9) 金井裕太ほか：小樽市のキツネおよびタヌキにおける多包条虫と旋毛虫の感染状況。第49回日本寄生虫学会北日本支部大会(盛岡)抄録, 2002
- 10) 野中成晃ほか：ペットにおけるエキノコックス感染状況調査(1997～2002年度の集計)。第49回日本寄生虫学会北日本支部大会(盛岡)抄録, 2002
- 11) Yoshida M et al：A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan；Correlation with antibody prevalence and ophthalmologic findings of patients with uveitis. J Helminthol 72：357-361, 1999
- 12) 内田明彦ほか：犬猫の被毛からの寄生虫卵の検出。日本獣医学会誌 51：613-616, 1998

# 硝子体手術時の摘除標本中に幼虫様異物を 認めた眼トキソカラ症の1例

東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野

赤尾信明

西眼科病院

西(中川)佳代・西 起史

**Key Words** : 眼トキソカラ症, 硝子体液, 幼虫様異物

## 緒言

眼トキソカラ症はイヌ回虫やネコ回虫などの幼虫が網膜内に侵入してぶどう膜炎を起こし、放置すると失明することもある動物由来感染症である。近年、イヌ回虫幼虫排泄物抗原を用いた免疫診断法の普及につれて、免疫学的に診断される症例が増加してきている。その結果、本症が従来報告されていたように小児に好発する疾患ではなく、成人にも多く見られることが明らかになってきた。

眼トキソカラ症の確定診断は幼虫を直接検出するのがもっとも確実な方法であるが、幼虫を確認できた例は本邦ではきわめて少ない。われわれは、ぶどう膜炎の再燃で硝子体手術を施行した患者から得た摘除標本に虫体様異物を確認し得た症例を経験したので報告する。

## 症例

患者は39歳、女性。左眼の霧視を自覚し、平成13年8月28日に近医を受診し治療を受けていたが、飛蚊症が新たに出現したので、同年9月8日、他院を受診し、網膜の炎症を指摘された。隔日にステロイド点滴と点眼を受けるも改善しなかったため、同年9月14日、西眼科病院を紹介され受診。

受診時眼底所見：視神経乳頭上は混濁が強く、鼻側に米粒大と球状の2個の白斑を認めた(図1)。視力はLV = 0.1(1.2× -3.0D = C -0.75DA×14°), RV = 0.1(1.5× -2.75D = C -0.75DA×176°)と正常であった。また、血液検査では、CRP(-), WBC8000, Eo0.5%, ツベルクリン反応(-)。眼底所見からトキソカラ症を疑い生食歴を問診するも肝臓などの生食はないとのことであった。

## Ocular Toxocariasis : Recovery of Intraocular Larva-like Foreign Body from a Uveitis Patient

Nobuaki Akao\* Kayo Nishi-Nakagawa\*\* Okihiro Nishi\*\*

\*Section of Environmental Parasitology, Graduate School of Tokyo Medicine and Dental University

\*\*Nishi Eye Hospital

論文請求先：赤尾信明 〒113-8519 文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野



図1 初診時の眼底所見。左眼辺縁部の白色粒状物（左）と神経乳頭を中心とした硝子体混濁（右）

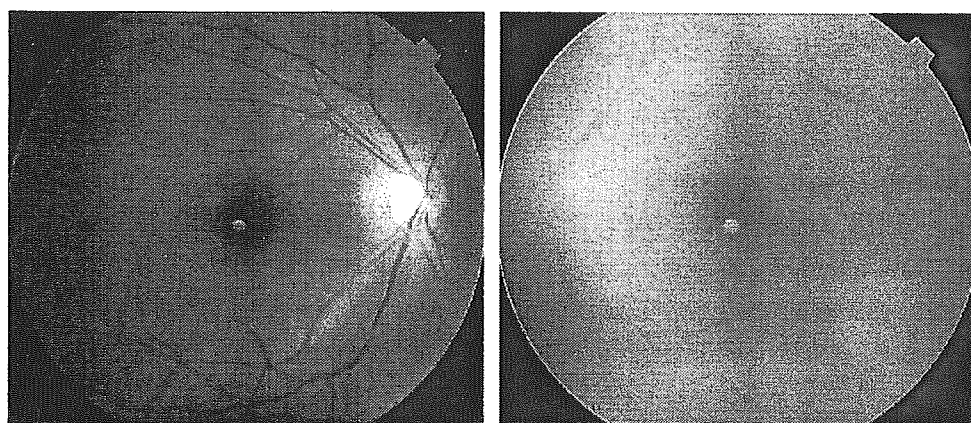


図2 硝子体混濁増悪時の眼底所見。正常な右眼（左）と比較して強い硝子体混濁のため眼底観察が懇談。

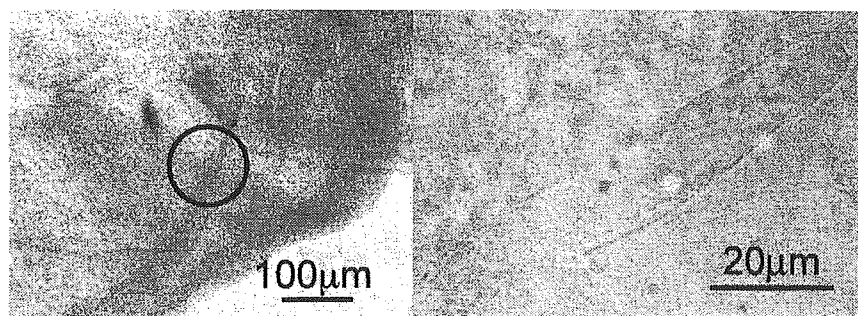


図3 摘除組織中に見られた幼虫様異物。右は左の強拡大。

経過と治療：チアベンダゾール3日間とステロイド点滴（リンデロン4mg）3週間の点滴で硝子体混濁は改善されるも、内服では混濁が強くなる傾向が続いたが、視力は1.2～1.5を維持していた。その後、患者の都合により転院し、近医でのステロイド点滴を行っていた。

平成14年9月6日、2週間前から視力の低下に

気づき再度西眼科病院を受診した。眼底検査では後極部に強い硝子体混濁を認め、鼻側2箇所白濁物と連続する黄白色炎症産物が眼球周辺部に土手状に出現した（図2）。ステロイド点滴にても硝子体混濁は増強し、視力も0.8まで急速に低下し、前眼部ぶどう膜炎、結膜充血、前房内に細胞やフィブリンが出現した。

同年10月16日、左眼視力は廃絶し、硝子体混濁部から網膜上に突出する硝子体出血を合併した。この時点で血清抗体測定のために採血を行った。10月24日、硝子体手術施行。術後、視力は1.0まで快復した。術中に採取した硝子体液と摘出組織は生理食塩水に保存して東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学分野に送付された。

寄生虫学的検査：10月16日に採血された血清中の抗体を、イヌ回虫幼虫排泄物抗原を用いたToxocara CHEK（迅速診断キット）<sup>1)</sup>とplate-ELISAで測定したところ、Toxocara CHEK 1:5(-)、plate-ELISA index = 1と抗体は陰性であったが、10月24日採取された硝子体液中にはToxocara CHEK 1:25(+), plate-ELISA index = 5と抗体が証明された。

また、摘出された組織を顕微鏡下に検査したところ、図3に示すような幼虫様異物を認めた。異物の大きさは長径96 $\mu\text{m}$ ×短径11.7～13.9 $\mu\text{m}$ で、両側は1 $\mu\text{m}$ の角皮で被われ、中央部には食道腔と思われる空隙を認めた。口側の反対側は引きちぎられたように切断されていた。尾端部分は確認し得なかった。

#### 考察

今回、硝子体手術時に採取された組織中に見られた異物は、その形態学的特徴からイヌ回虫第2期

幼虫の体前半1/3程度ではないかと推測された。わが国でこれまで虫体が証明された眼トキソカラ症例は、吉岡(1966)<sup>2)</sup>のほか、伊集院ら(1999)<sup>3)</sup>の報告を見るのみである。これらはいずれも摘出組織の病理組織標本中に幼虫の断端を確認したものである。今回の症例は、組織の圧平標本中に幼虫の体前半部を確認し得た最初の例と思われる。本症例では術前の血清中の抗体検査では陰性であったが、急激な視力の低下と網膜病変の増悪を期に硝子体手術を施行し、その硝子体液には抗体が証明され、その後の組織検査で幼虫が確認された。

硝子体液中から虫体様異物が発見された今回の症例は、眼トキソカラ症の診断における硝子体液内抗体検査の重要性を改めて確認させられるものであった。

#### 文 献

- 1) Dubinsky, P. *et al.* (2000) : Comparison of the sensitive screening kit with two ELISA sets for detection of anti-*Toxocara* antibodies. *Southeast Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31, 394-398.
- 2) 吉岡久晴(1966) : 網膜膠腫と誤診した犬蛔虫幼虫による眼内炎. *臨床眼科*, 20, 605-610.
- 3) 伊集院信夫, 他(1999) : 硝子体手術により虫体が証明された ocular toxocariasis の1例. *臨床眼科*, 53, 1305-1307.



## Development of membrane-based tests for the detection of urinary antigens and antibodies in human toxoplasmosis: preliminary studies in Ghanaian patients

Irene Ayi<sup>a,b,\*</sup>, Nobuaki Akao<sup>a</sup>, Kwabena Mante Bosompem<sup>b</sup>, Stephen K. Akafo<sup>c</sup>, James Clarke<sup>d</sup>, Lydia Nyador<sup>e</sup>, Kwesi-A. Apea-Kubi<sup>f</sup>, Koichiro Fujita<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Section of Environmental Parasitology, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

<sup>b</sup> Parasitology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, P.O. Box LG581, Legon, Accra, Ghana

<sup>c</sup> Ophthalmology Department, Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana

<sup>d</sup> Emmanuel Eye Clinic, East Legon, Accra, Ghana

<sup>e</sup> Ophthalmology Department, Tema General Hospital, Tema, Ghana

<sup>f</sup> Obstetrics and Gynaecology Department, Korle-Bu Teaching Hospital, P.O. Box CT2045, Cantonments, Accra, Ghana

Received 25 March 2004; received in revised form 24 October 2004; accepted 27 October 2004

Available online 8 December 2004

### Abstract

Two membrane-based ELISA systems were used in detecting *Toxoplasma* antigens and anti-*Toxoplasma* antibodies in urine samples collected from 54 ophthalmology (22 suggestive active and 32 suggestive past infection) patients and 26 pregnant women attending obstetrics/gynaecology clinic (OGP), suspected of toxoplasmosis by eye examination, past medical records and questionnaire, respectively, in Ghana from mid-February to April 2002. The antigen detecting ELISA was able to demonstrate antigen in 100% (22/22) ophthalmology (active infection) and 62.5% (20/32) ophthalmology (past infection) patients, and 42% (11/26) of OGP which included 3 that were sero-negative prior to and during this study, giving an overall prevalence of 66.3% (53/80). The urinary antigen positive samples also included 6 that were negative for both the Dye Test (DT) and latex agglutination test (LAT). Antigen was not detected in the urine of 22 normal (sero-negative for antibodies to *Toxoplasma*) individuals. The membrane-based urinary antibody detecting sandwich ELISA also detected anti-*Toxoplasma* antibodies in 100% (22/22) of ophthalmology (active infection) and 81.3% (26/32) of ophthalmology (past infection) patients, a total of 89% (48/54); and 80.8% (21/26) of OGP with an overall prevalence of 86.3% (69/80), including 7 ophthalmology patients' samples that were sero-negative for both DT and LAT. Antibody sero-positivity of the samples was determined by DT as 87% (47/54) in ophthalmology patients and 73.1% (19/26) in pregnant women, LAT as 85.2% (46/54) and 65.4% (17/26), and an overall prevalence as 82.5%

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5803 5192; fax: +81 3 5684 2849.

E-mail address: [Ireneayi@hotmail.com](mailto:Ireneayi@hotmail.com) (I. Ayi).

(66/80) and 78.8% (63/80), respectively. The membrane-based ELISA systems appear promising but need to be investigated further for its efficacy as reliable diagnostic tests.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* *Toxoplasma* infection; Antigen; Human urine; Membrane-based ELISA; Ghana

## 1. Introduction

High prevalence of anti-*Toxoplasma* sero-positivity in a cross-section of the Ghanaian populace as well as evidence of congenital disease caused by *Toxoplasma gondii* infections have been reported in Ghana (Anteson et al., 1978a,b, 1980). Among the existing diagnostic tests for toxoplasmosis, the most readily available one to clinicians in Ghana is the commercial latex agglutination test (LAT), which detects mainly IgG antibodies indicative of past or old infections. According to Luft and Remington (1988), the frequent occurrence of *Toxoplasma* infection in immunocompromised patients and the difficulty in establishing the diagnosis without brain biopsy has necessitated the development of new, non-invasive methods for diagnosis of the disease. Furthermore, *Toxoplasma* antigens have been demonstrated in serum samples from acutely infected animals and humans (Raizman and Neva, 1975; Van Knapen and Panggabean, 1977; Araujo et al., 1980; Araujo and Remington, 1980; Trunen, 1983; Lindenschmidt, 1985; Asai et al., 1987) and also in urine from mice acutely infected with *T. gondii* as well as from human patients with acute toxoplasmic encephalitis (Huskinson et al., 1989). However, the methods used were rather elaborate and expensive which may not be suitable for routine examination. The risk of congenital infection, for example, in this era of rapid spread of HIV/AIDS, necessitate periodical routine examination of all females of child-bearing potential, which may not be cost-effective in the Ghanaian environment. Earlier, Bosompem et al. (1996, 1997) had reported the employment of a membrane-based ELISA to detect antigens in the urine of urinary schistosomiasis patients and its convenience and cost-effectiveness in mass screening of suspected patients in the field. In this study we explored the usefulness of two membrane-based ELISA systems in diagnosing recent infection in suspected toxoplasmosis patients.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

A total of 80 Ghanaians who consented were involved in this study. Fifty-four of them were patients attending four ophthalmology clinics across the country and they included 30 females and 24 males aged 10–70 years. The patients mostly reported with aching eyes and blurred vision and presented with symptoms, such as traumatic and posterior uveitis and signs suggestive of active *Toxoplasma* retinochoroiditis and well demarcated scars upon examination (Holliman, 1990), which was defined as the presence of intraocular inflammation in association with a retinochoroidal scar and an active adjoining retinitis (Guerina et al., 1994). Twenty-two out of the 54 patients (41%) had eye lesions suggestive of active infections and others had scars suggestive of old infection.

The other 26 patients were pregnant women in their second or third trimester attending obstetrics/gynaecology clinic (OGP) and aged 22–44 years. All of them had experienced spontaneous abortions and/or stillbirth (by questionnaire), 18 of them had been sero-positive and 8 sero-negative, by a commercial LAT (according to their past medical records) 6 months to 4 years before this study.

As control 22 people, 14 males and 8 females aged 15–60 years who were considered healthy by questionnaire and screening were included in the study. All of them had tested sero-negative (by LAT) for toxoplasmosis 3 months to 2 years, before this study.

### 2.2. Collection and analysis of blood, urine and stool

Approximately, 3–5 ml of blood was collected from each of the individuals involved in the study. Thick and thin blood smears were prepared on microscope glass slides, processed and examined microscopically

for haemoparasites. Sera were also obtained from the blood and tested for anti-*Toxoplasma* sero-positivity by the Dye Test (DT) and LAT.

A total of about 25–80 ml of urine was collected from the same individuals who had given blood and were also provided with containers to produce stool samples. Each urine sample was centrifuged at  $400 \times g$  and the deposits were examined microscopically for *Schistosoma haematobium* ova and the supernatant tested for *Toxoplasma* antigens and anti-*Toxoplasma* antibodies using a simple designed membrane-based ELISA. Stool specimens were examined for *Schistosoma mansoni* ova using the Kato method (Katz et al., 1972) and the formalin–ether sedimentation technique for the detection of other intestinal parasites' ova, cysts and oocysts of other related coccidian species like *Cryptosporidium parvum*.

### 2.3. Serological tests

DT (Sabin and Feldman, 1948; Beverly and Beattie, 1952; Handman and Remington, 1980) was performed with modification. Briefly, peritoneal exudates were obtained from mice inoculated with the RH strain of *T. gondii* 3 days previously. *Toxoplasma* suspensions rich mainly in extra cellular parasites were used in the test within 20 min after harvesting. Briefly, 20  $\mu$ l of test sera diluted four-fold in normal saline in appropriately labelled eppendorf tubes were added with 40  $\mu$ l of activator serum (normal human serum) and then 20  $\mu$ l of suspension of tachyzoites in PBS (pH 7.4) in each tube and incubated in a water bath at 37 °C for 1 h after brief shaking. Then, 60  $\mu$ l of 1% methylene blue dye in borate buffer (pH 11.0) were added to the tubes and allowed to stand at room temperature for 10 min. The tubes were kept at 4 °C until results were read.

The commercially available LAT (Toxotest<sup>®</sup>-MT Eiken, Tokyo, Japan) was performed according to the manufacturer's instructions.

### 2.4. Infection of mice

Infection of mice was carried out as by Handman and Remington (1980) with modification. Briefly, tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* obtained from mouse peritoneal exudates (described below) were fixed in 0.1% formol–saline at 4 °C for 30 min and washed with excess PBS (pH 7.2). Eight to twelve

weeks old ddY mice were bled a day before infection and sub-cutaneously injected with  $2 \times 10^3$  fixed tachyzoites, and bled at days 5, 10, 15 and 20 after infection when antibody titer in DT was between 1:16 and 1:10,000. Pooled sera were stored in aliquots at –20 °C until used.

### 2.5. Preparation of *Toxoplasma crude antigen*

*Toxoplasma* antigen was prepared according to the method of Araujo and Remington (1980) with modification. Crude tachyzoite antigen was prepared using *T. gondii* tachyzoites from the peritoneal exudates of mice infected 3 days earlier with the RH strain. Pooled exudates were centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min in a refrigerated centrifuge at 4 °C. The sediment containing cells and parasites was re-suspended in cold PBS (pH 7.2), washed three times with PBS and filtered (Remington et al., 1970). Parasites were pelleted and frozen at –30 °C overnight. The frozen pellet containing approximately  $2 \times 10^7$  tachyzoites was re-suspended with distilled water and the suspension subjected to repeated freezing (–80 °C for 30 min) and thawing before sonicating on ice using a Branson Sonifier 250 (Branson Sonic Power Company, CT, USA) set at 60 cycles for 45 s. The resulting suspension was centrifuged at  $1000 \times g$  for 20 min and then at  $3600 \times g$  for 30 min. After demonstrating the presence of *Toxoplasma* antigens by Ouchterlony (1976), protein concentration was estimated at 0.8 mg/ml using Bio-Rad Protein Assay Reagent according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Aliquots of the preparation were stored at –30 °C until used.

### 2.6. Urinary antigen detecting ELISA procedure

The urinary antigen detecting ELISA (UAgE) was performed according to Bosompem et al. (1997) with modification as follows. Methanol wetted polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Atto Company Ltd., Tokyo, Japan) strips were incubated in test urine for 36 h at 4 °C, rinsed with Tris-buffered saline (TBS) (50 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7.2) and then blocked for 45 min in blocking solution consisting of 5% skimmed milk/TBS. The strips were transferred into *T. gondii* infected mouse serum (1:100) for 1 h, washed three times each by 5-min incubation in TBS and then incubated in goat anti-mouse polyclonal



IgG + A + M conjugated to horse-raddish peroxidase (HRPO, 1:5000, Catalog no. 1999, Sigma–Aldrich, Japan) for 1 h. The strips were washed three times each by 10-min incubation in TBS and then incubated in substrate solution [98.65% (w/v) (3,3-diaminobenzidine), 0.25% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 15.4% (w/v) NiCl<sub>2</sub> in TBS] for 1 min. A bluish black reaction represented positive results while negative results remained colourless. The assay was run at room temperature and reagents were diluted in 0.1% blocking solution, unless otherwise stated.

#### 2.7. Detection of type of immunoglobulins bound by *Toxoplasma antigens*

The UAgE described above was repeated with multiple membrane strips incubated in each urine sample. At the conjugate incubation level, strips from each sample were distributed into appropriately diluted goat anti-mouse monoclonal IgG-, IgA- and IgM-HRPO (Catalog no. 1999, Sigma–Aldrich, Japan), respectively.

#### 2.8. Urinary antibody detecting sandwich ELISA procedure

The urinary antibody detecting ELISA (UAbE) was performed as described above with the following

$$\text{sensitivity (\%)} = \frac{\text{number of individuals positive by the test that were also positive by DT}}{\text{total number of individuals testing positive by DT}} \times 100$$

$$\text{specificity (\%)} = \frac{\text{number of individuals negative by the test that were also negative by DT}}{\text{total number of individuals testing negative by DT}} \times 100$$

modifications. Briefly, methanol wetted PVDF membrane strips were incubated in test urine for 36 h at 4 °C. Strips were removed and rinsed with TBS and blocked. They were then rinsed in TBS and transferred into *T. gondii* tachyzoite lysate diluted appropriately in PBS (5 µg/ml) for 1 h at room temperature. They were washed three times each by 5-min incubation in TBS and then incubated in *T. gondii* infected mouse serum and the procedure from here was the same as for the antigen detecting system.

#### 2.9. Determination of optimal working dilutions of murine serum and goat anti-mouse horse-raddish peroxidase conjugate used in the membrane-based ELISA

Pooled murine *T. gondii* infected serum was tested in membrane-based ELISA as follows. Briefly, *Toxoplasma* tachyzoite lysate-captured PVDF membrane strips were rinsed in TBS, pH 7.2 for 2 min and different strips incubated with test serum and then goat anti-mouse polyclonal (IgG + IgA + IgM) horse-raddish peroxidase conjugate in a checkerboard, from 1:50 to 1:1000 and 1:1200 to 1:20,000 at two-fold dilutions in blocking solution, respectively. The respective dilutions that gave the most intense colour reactions by visual assessment were used in the membrane-based ELISA. The procedure was repeated using goat anti-mouse monoclonal (IgG); (IgA); and (IgM) horse-raddish peroxidase conjugate separately to ascertain the inclusion of all the necessary immunoglobulins and in sufficient amounts using visual assessment of the intensity of colour reactivity.

#### 2.10. Sensitivity and specificity of the tests

The percentage sensitivity and specificity of LAT and membrane-based tests were calculated, using DT as the gold standard, as follows (see Bosompem et al., 1996):

### 3. Results

#### 3.1. Results of stool, blood smears and urine deposit examination

Two out of the 26 (7.8%) pregnant women and 36 out of the 54 (66.7%) ophthalmology (22 active and 14 past infection) patients, submitted stool samples, the overall being 38/80 (47.5%). None of the 38 stool samples were found to contain any *S. mansoni* eggs, however, ova of

hookworms were identified in 3 (7.9%) ophthalmology (2 active and 1 past infection) patients' samples. *Plasmodium falciparum* was the only haemoparasite detected in blood smears from 5/80 (6.3%) individuals including four ophthalmology (3 active and 1 past infection) patients and one pregnant woman. *S. haematobium* ova were demonstrated in urine sample deposits of 6/80 (7.5%) ophthalmology (3 active and 3 past infection) patients who included 2 that were also *P. falciparum* positive. No cysts or oocysts were detected in any of the 62 faecal samples collected.

None of the parasites mentioned above were found in any of the 22 stool specimens from the normal controls except 2 of them that had ascariasis.

### 3.2. Detection of anti-*Toxoplasma* antibody by DT, LAT and UAbE

Results of the membrane-based tests are presented in Fig. 1. The use of NiCl<sub>2</sub> in the membrane-based ELISA resulted in a bluish black positive reaction, which was easier to differentiate from a negative result, than a brown positive result without its addition. Thus, membrane strips that appeared coloured after incubation in test urine samples with haematuria demonstrated clearly as positives (strips d and e) or negatives (strips j and k). Control strips (strips l and m) remained colourless. In both systems, positive results showed varying intensity of colouration of membrane strips, which were graded from strong to weak positive.

Prevalence of anti-*Toxoplasma* antibodies in sera and urine as determined by the three different tests, is presented in Table 1. The overall prevalence values were not statistically different ( $P > 0.05$ ). Three sam-

Table 1

Prevalence of anti-*Toxoplasma* antibody as determined by the three different tests

Test	Source of sample	Positive	Negative	Ind <sup>a</sup>	Prevalence (%)
DT <sup>b</sup>	OP <sup>c</sup>	47	7	0	87.0
	OGP <sup>d</sup>	19	7	0	73.1
LAT <sup>e</sup>	OP	46	7	1	85.2
	OGP	17	7	2	65.4
UAbE <sup>f</sup>	OP	48	6	0	89.0
	OGP	21	5	0	80.8

<sup>a</sup> Indeterminate: positivity or negativity could not be determined.

<sup>b</sup> Sabin–Feldman Dye Test.

<sup>c</sup> Samples from ophthalmology patients ( $n = 54$ ).

<sup>d</sup> Samples from pregnant women attending obstetrics/gynaecology clinic ( $n = 26$ ).

<sup>e</sup> Latex agglutination test.

<sup>f</sup> Urinary antibody detecting ELISA.

ples, which were DT-positive could not be determined clearly as positive or negative by LAT, 2 of them were from obstetrics and 1 from ophthalmology (past infection) patients, respectively.

Urinary antibody detection by UAbE as compared with DT and LAT from obstetrics/gynaecology (OGP) as well as ophthalmology (active and past infection) patients' samples is presented in Table 2. As shown in Table 2, 17/22 (77.3%) suggestive active cases and 30/32 (93.8%) of the past-toxoplasmosis cases were confirmed. Also, 19/26 (73.1%) of the pregnant women showed positive serology. Seven out of eight OGP that were previously sero-negative remained so during this study.

Using DT as gold standard, the global sensitivity and specificity of LAT and UAbE on the total num-

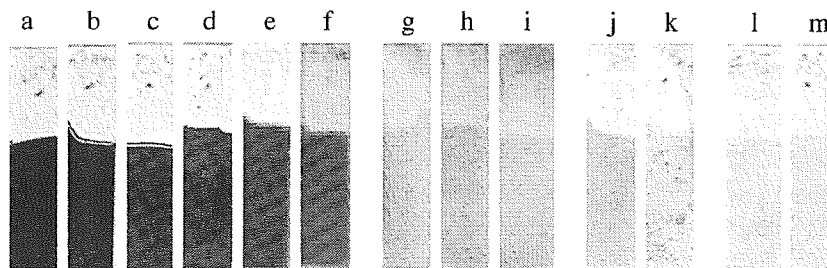


Fig. 1. Results of membrane-based ELISA showing colourization of PVDF membrane strips. Strips (a–f) indicate strong positive results; strips (g–i) indicate very weak positive results; strips (j and k) were incubated with urine from negative samples; strips (l and m) were not incubated with urine.

Table 2  
Results of UAbE as compared with DT and LAT

Test	Result	UAbE <sup>a</sup>						Total (n = 80)
		OP-active infection <sup>b</sup> (n = 22)		OP-past infection <sup>c</sup> (n = 32)		OGP <sup>d</sup> (n = 26)		
		Pos <sup>e</sup>	Neg <sup>f</sup>	Pos	Neg	Pos	Neg	
DT <sup>g</sup>	Pos	17	0	24	6	16	3	66
	Neg	5	0	2	0	5	2	14
LAT <sup>h</sup>	Pos	17	0	23	6	15	2	63
	Neg	5	0	2	0	5	2	14
	Ind <sup>i</sup>	0	0	1	0	1	1	3

<sup>a</sup> Urinary antibody detecting ELISA.

<sup>b</sup> Samples from ophthalmology patients with active toxoplasmosis.

<sup>c</sup> Samples from ophthalmology patients with past toxoplasmosis.

<sup>d</sup> Samples from pregnant women attending obstetrics/gynaecology clinic.

<sup>e</sup> Number positive by the tests from that group of patients.

<sup>f</sup> Number negative by the tests from that group of patients.

<sup>g</sup> Sabin–Feldman Dye Test.

<sup>h</sup> Latex agglutination test.

<sup>i</sup> Indeterminate: positivity or negativity could not be determined.

ber of samples examined in this study (including the 80 toxoplasmosis suspected group of patients and the 22 normal individuals) were determined. The sensitivity and specificity for LAT were 96.0% (63/66) and 92.0% (33/36), and for UAbE, 86.4% (57/66) and 67.0% (24/36), respectively.

All the 22 control samples were negative for DT, LAT and UAbE.

### 3.3. Detection of *Toxoplasma* urinary antigens by UAgE

The UAgE detected antigens in 78.0% (42/54) and 42.3% (11/26) of the ophthalmology and obstetrics/gynaecology urine samples, respectively, and an overall prevalence of 66.3% (53/80) as shown in Table 3. The 42 UAgE-positive samples included 100% (22/22) of patients that presented with eye disorders suggestive of active *Toxoplasma* infection and 62.5% (20/32) of the suggestive past infection cases.

Results of UAgE as compared with DT are shown in Table 4. All of the 11 UAgE-positive obstetrics/gynaecology patients were also DT-positive and antigens from 7 of them recognized murine-IgGs only, mostly in trace amounts whilst 1 bound both murine-IgA and IgG. In addition, six (five ophthalmology active infection and one OGP) samples, which were negative by both DT and LAT were positive by

UAgE and bound by both murine-IgA and IgG (four samples), and IgG only (two samples). All six were positive for urinary antibodies. Samples from five out of seven ophthalmology (active infection) patients all of which were negative by both DT and LAT were positive by UAgE, and the immunoglobulins bound by the antigens were murine-IgA and/or IgG. Two of them were positive for both murine-IgA and IgG and, three for IgG only. On the other hand, all seven samples tested positive for urinary antibodies.

Table 3  
Detecting *Toxoplasma gondii* urinary antigens in samples from ophthalmology and obstetrics patients using the membrane-based ELISA (UAgE)

Source of sample	UAgE <sup>a</sup>		Prevalence (%)
	Positive	Negative	
OP-active infection <sup>b</sup> (n = 22)	22	0	100.0
OP-past infection <sup>c</sup> (n = 32)	20	12	62.5
OGP <sup>d</sup> (n = 26)	11	15	42.3
Total (n = 80)	53	27	66.3

<sup>a</sup> Urinary antigen detecting ELISA.

<sup>b</sup> Samples from ophthalmology patients with active toxoplasmosis.

<sup>c</sup> Samples from ophthalmology patients with past toxoplasmosis.

<sup>d</sup> Samples from pregnant women attending obstetrics/gynaecology clinic.

Table 4  
Results of UAgE as compared with DT

Test	Result	UAgE <sup>a</sup>						Total (n = 80)
		OP-active infection <sup>b</sup> (n = 22)		OP-past infection <sup>c</sup> (n = 32)		OGP <sup>d</sup> (n = 26)		
		Pos <sup>e</sup>	Neg <sup>f</sup>	Pos	Neg	Pos	Neg	
DT <sup>g</sup>	Pos	17	0	17	10	11	11	66
	Neg	5	0	3	2	0	4	14
Total		22	0	20	12	11	15	80

<sup>a</sup> Urinary antigen detecting ELISA.

<sup>b</sup> Samples from ophthalmology patients with active toxoplasmosis.

<sup>c</sup> Samples from ophthalmology patients with past toxoplasmosis.

<sup>d</sup> Samples from pregnant women attending obstetrics/gynaecology clinic.

<sup>e</sup> Number positive by the tests from that group of patients.

<sup>f</sup> Number negative by the tests from that group of patients.

<sup>g</sup> Sabin–Feldman Dye Test.

Serum and urine samples from one patient tested positive for all the tests and the antigens recognized murine-IgM in trace amounts in addition to IgA (++) and IgG (+) (data not shown). The individual involved was a 30-year-old male ophthalmology (active infection) patient who presented with traumatic uveitis. All the 22 urine samples from control individuals were negative by UAgE.

#### 3.4. Probable influence of detected parasites on UAbE and UAgE

All the three ophthalmology (active infection) patients with *S. haematobium* infection, one of whom was also harbouring *P. falciparum*, were positive for UAbE and UAgE but one was negative for DT. Two of the other three *S. haematobium* infected ophthalmology (past infection) patients were negative for both UAbE and UAgE and the remaining one who had *P. falciparum* infection in addition was UAbE positive only, although all three were sero-positive. Two of the ophthalmology (active infection) hookworm infested patients' samples were both positive by UAbE and UAgE but one was sero-positive and the other sero-negative. The remaining one (past infection) was sero-negative but positive by UAbE and UAgE.

#### 4. Discussion

Detection of toxoplasmosis in the early stages of infection could pave the way for early treatment and

consequently effective control of the disease. In addition, a relatively simple, cheap and easy-to-perform test could encourage routine mass screening of people, especially, women of potential childbearing age which will help control congenital transmission as well as to determine the sero-conversion rate among such women in Ghana. The present study is the first to employ membrane-based ELISA to detect *Toxoplasma* antigens and anti-*Toxoplasma* antibodies from the urine samples of such a large number of patients since Huskinson et al. (1989) reported the detection of *Toxoplasma* antigens in urine samples from patients with acute toxoplasmic encephalitis and acquired immunodeficiency syndrome in preliminary studies.

In this study, the two membrane-based ELISA systems were successfully used for the detection of *Toxoplasma* antigens and anti-*Toxoplasma* antibodies in the urine of infected individuals. Although sensitivity of UAbE (86.4%) compared with DT (gold standard) on one hand and with LAT (96.0%) on the other, was not statistically different ( $P > 0.05$ ), its specificity (67.0%) was quite low and might not be considered as a reliable diagnostic method for *Toxoplasma* infection, nevertheless, its performance could be enhanced in further studies. It was useful for comparative purposes in this study. For example, in the present study, detection of anti-*Toxoplasma* antibodies by UAbE in the urine samples of seven patients who were anti-*Toxoplasma* antibody sero-negative by both DT and LAT could be due to IgM and/or IgA antibodies which is suggestive of ongoing infections as has been reported by Bessieres et al. (1992) that, IgA antibodies associated with IgM