

Antigenisitas, Sensitivitas, dan Spesifisitas Protein *Toxocara canis* pada Pemeriksaan Antibodi Serum Mencit dengan *Indirect-ELISA*

(*ANTIGENICITY, SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF TOXOCARA CANIS PROTEIN IN MICE ANTIBODY EXAMINATION BY USING INDIRECT-ELISA*)

Sri Subekti Bendryman¹, Kusnoto¹, Tutik Juniastuti²

¹Departemen Parasitologi, ²Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,
Kampus-C Unair, Jln Mulyorejo, Surabaya 60115.
Telpon (031) 5911451; E-mail: ssbendryman@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui antigenisitas, sensitivitas, spesifisitas protein *Toxocara canis* pada pemeriksaan serologi dengan Ig-ELISA sebagai dasar pembuatan *kit diagnostic* untuk diagnosis melalui pemeriksaan antibodi. Jenis penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *post-test only control groups design*. Hewan coba yang digunakan adalah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing. Variabel bebasnya adalah jenis imunogen (homogenat) cacing; variabel terikatnya adalah nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas merupakan interpretasi dari nilai *optical density* (OD) serum mencit; dan variabel kendali adalah strain mencit, pakan dan waktu pengambilan serum. Hasil uji antigenisitas menunjukkan bahwa, nilai OD serum mencit yang diimunisasi homogenat *T. canis* dan *T. cati* secara sangat bermakna menunjukkan hasil lebih tinggi ($p < 0,01$) dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* dan serum kontrol. Pada uji diagnosis toxocariasis menunjukkan bahwa, nilai OD positif hasil ELISA dari serum mencit yang diimunisasi homogenat *Toxocara* spp. didapatkan nilai sensitivitas 100%. Nilai OD negatif hasil ELISA dari serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing *Ancylostoma* spp. dan *Dipylidium caninum* didapatkan nilai spesifisitas sebesar 87,5%. Berdasarkan hasil tersebut dapat ditarik simpulan bahwa protein *T. canis* memiliki antigenisitas yang sama terhadap serum anti-*T. canis* dan anti-*T. cati*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*; Pada uji diagnosis toxocariasis didapatkan nilai sensitivitas 100% dan spesifisitas sebesar 87,5%, sehingga masih terjadi positif palsu sebesar 12,5%.

Kata-kata kunci: antigenisitas, sensitivitas, spesifisitas, *Toxocara canis*, *indirect-ELISA*

ABSTRACT

The aim of this research were to determine antigenicity, sensitivity, and specificity of *Toxocara canis* protein used as antigen in indirect-ELISA for the detection antibody against the worm in the infected host in order to proper diagnose kit. The design used was true experimental, with Post-test Only Control Groups Design. Mouse was immunized with various worm homogenates used to antigenicity, sensitivity and specificity tests of *T. canis* protein with indirect-ELISA technique. The independence variable were various immunogens (homogenates); the dependence variables were antigenicity, sensitivity and specificity values interpreted by optical density (OD) value of mouse sera; and controlled variable were mouse strain, feed and retrieval time of sera. The result showed that OD values of mouse sera immunized with *T. canis* and *T. cati* homogenate were significantly difference ($p < 0.01$) as compared to those immunized with *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* and control sera. Using the diagnosis based on the finding of *Toxocara*, the sensitivity of OD value by ELISA result from mouse sera immunized with *Toxocara* spp. homogenate were 100%. Using negative OD value by ELISA from mouse sera immunized with *Ancylostoma* spp. and *D. caninum* homogenate, the specificity of the test was 87.5%. In conclusion, protein of *T. canis* has the same antigenicity against anti-*T. canis* and anti-*T. cati* sera, but they had the lower antigenicity against anti-*Ancylostoma* spp. and anti-*D. caninum* sera. As the sensitivity value of 100% and specificity value of 87.5%, in detecting antibody against toxocariasis, the possibility of obtaining false positive was 12.5%.

Keywords : antigenicity, sensitivity, specificity, *Toxocara canis*, indirect-ELISA

PENDAHULUAN

Hingga saat ini *marker* untuk pemeriksaan serologi *toxocariasis* dengan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) masih menggunakan imunoglobulin (Ig)G yang mampu menangkap Ig dari kelas lain, sehingga dapat menimbulkan reaksi silang dengan cacing lain dan dapat memunculkan hasil positif palsu. Diagnosis secara imunologi diperlukan karena diagnosis secara konvensional berdasarkan pemeriksaan telur cacing dalam feses tidak dapat dilakukan pada inang *aberrant*, mengingat telur dan cacing dewasa *Toxocara* spp. tidak dapat ditemukan pada inang *aberrant* termasuk manusia, begitu juga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala klinisnya sangat bervariasi.

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxocara* spp. bersifat zoonosis, khususnya pada anak-anak. Namun demikian, pernah dilaporkan terjadi juga pada orang dewasa. *Toxocariasis* perlu mendapat perhatian karena populasi anjing dan kucing di Indonesia cukup tinggi dan kedekatan hewan kesayangan ini dengan manusia. Prevalensi *toxocariasis* pada kucing di Surabaya cukup tinggi, yaitu sebesar 74% (Kusnoto, 2009). Keadaan ini dapat meningkatkan risiko terjadinya *toxocariasis* pada manusia (Beer *et al.*, 1999). *Toxocariasis* pada manusia merupakan akibat infeksi telur infektif (mengandung L2) *T. canis* dari anjing dan *T. cati* dari kucing, atau mungkin spesies *Toxocara* lain. Penyakit tersebut pada manusia dikenal dengan sebutan *human toxocariasis*, yang merupakan salah satu penyakit cacing zoonosis yang sangat umum (Humbert *et al.*, 2000). *Toxocariasis* pada manusia adalah penyakit paling penting diantara infeksi oleh nematoda, karena menyebabkan berbagai penyakit pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa. *Toxocariasis* pada manusia terdapat dua bentuk yaitu *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*, kedua bentuk ini masing-masing diakibatkan adanya *visceral* dan *ocular larvae migrans* (Uga *et al.*, 1990; Hubner *et al.*, 2001).

Diagnosis *toxocariasis* secara imunologi melalui pemeriksaan serum hewan tersangka memerlukan uji dan bahan uji dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Teknik ELISA dapat diandalkan karena memiliki sensitivitas yang tinggi, namun teknik ini juga memerlukan bahan uji yang spesifik agar diperoleh hasil pemeriksaan yang akurat

(Kusnoto, 2008). Bahan uji yang diperlukan pada teknik *indirect-ELISA* untuk pemeriksaan antibodi dalam serum hewan tersangka adalah konjugat berupa antibodi monoklonal berlabel enzim sebagai biomarker, antigen *T. canis* dan serum hewan tersangka yang mengandung antibodi poliklonal (Harlow dan Lane, 1988). Agar diperoleh hasil pemeriksaan yang akurat maka diperlukan pemilihan biomarker dan penggunaan antigen yang spesifik, mengingat terdapat beberapa imunoglobulin sebagai respons pada infeksi *toxocariasis* dan banyaknya protein pada *Toxocara* spp.

Pemeriksaan serologi untuk tujuan diagnosis terhadap *toxocariasis* pada hewan dan manusia diperlukan untuk meneguhkan diagnosis penyakit tersebut, karena diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan. Sementara itu diagnosis secara konvensional dengan memeriksa telur dalam feses penderita tak mutlak dapat dilakukan, karena pada infeksi L2 (bentuk dorman di dalam jaringan) tidak dapat berkembang menjadi cacing dewasa sehingga telur cacing tidak diproduksi. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemeriksaan serologi, salah satunya adalah dengan mendeteksi antibodi yang dapat dilakukan dengan teknik ELISA. Ikatan antara protein antigenik dengan molekul antibodi dapat dijadikan dasar untuk menciptakan perangkat *kit diagnostic* pada *toxocariasis*. Bertitik tolak dari permasalahan di atas maka perlu dikaji lebih mendalam mengenai biomarker *toxocariasis* dan protein antigenik *T. canis* yang bersifat spesifik, khususnya yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas terhadap protein L2 dan L2 dorman, dalam upaya mendapatkan perangkat diagnostik dini, cepat, dan akurat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan biomarker, sebagai dasar pengembangan *kit diagnostic* spesifik terhadap *toxocariasis*. Hasil yang diperoleh berupa subkelas IgG yang sangat spesifik sebagai dasar (*marker*) pada pemilihan antibodi sekunder untuk keperluan diagnosis melalui pemeriksaan antibodi dengan uji ELISA.

METODE PENELITIAN

Koleksi Cacing Dewasa *Toxocara* spp, *Dipylidium caninum* dan *Ancylostoma* spp.

Cacing *T. canis* diperoleh dengan cara melakukan pengobatan terhadap anjing penderita *toxocariasis*. Anjing tersebut

diberikan anthelmintika *piperazine adipate* dosis 50 mg/kg bobot badan, kemudian diamati beberapa hari untuk mendapatkan cacing dewasa (*Toxocara* spp., *D. caninum*, dan *Ancylostoma* spp.) yang keluar bersama feses anjing.

Cacing *T. cati* diperoleh dari kucing penderita *toxocariasis*. Kucing liar yang berhasil ditangkap dari beberapa pasar di Surabaya dimasukkan kandang dan dilakukan pemeriksaan feses terhadap keberadaan telur cacing (*Toxocara* spp., *D. Caninum*, dan *Ancylostoma* spp.). Kucing yang tidak menderita helminthiasis dilepas, sedangkan yang menderita diberikan anthelmintika *piperazine adipate* dosis, kemudian diamati beberapa hari untuk mendapatkan cacing dewasa (*Toxocara* spp., *D.caninum*, dan *Ancylostoma* spp.) yang keluar bersama feses kucing.

Setelah diinkubasi, cacing dipotong pada bagian anterior dan posteriornya dan masing-masing bagian dimasukkan ke dalam *microtube* berlabel dan disimpan di dalam *freezer* atau langsung diproses. Bagian anterior dan posterior dibuat preparat permanen untuk keperluan identifikasi spesies berdasarkan morfologi secara mikroskopik, sedangkan tubuh bagian tengah (somatik) disiapkan untuk pembuatan homogenat. Preparat permanen *Toxocara* spp. yang sudah jadi dilakukan identifikasi berdasarkan Soulsby (1989).

Pembuatan Homogenat Cacing Dewasa

Cacing dewasa *Toxocara* spp., *D. caninum*, dan *Ancylostoma* spp. hasil koleksi dibersihkan dengan *phosphate buffer saline* (PBS) kemudian masing-masing diambil 10 ekor dimasukkan ke dalam cawan porselin dan digerus. Ke dalam cawan porselin ditambahkan PBS 10 mL, setelah diratakan, larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kemudian disonikasi pada frekuensi 35 kHz dengan pola 3 x 60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Suspensi tersebut kemudian dihancurkan lagi dengan bantuan 10% detergen garam natrium N-lauroilsarkosin serta dipusing dengan kecepatan 5.000 rpm (3000 g) selama 15 menit. Supernatan diambil dan dipusing kembali dengan kecepatan 35.000 rpm (10.000 g) selama 25 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan, selanjutnya pelet disimpan untuk bahan imunisasi (imunogen) pada mencit. (Kusnoto, 2009).

Imunisasi dengan Berbagai Homogenat Cacing pada Mencit

Sebanyak 40 ekor mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan secara acak, perlakuan (P1-P4) diimunisasi dengan protein homogenat sebagai berikut: P1, cacing dewasa *T. canis*; P2, cacing dewasa *T. cati*; P3, cacing dewasa *Ancylostoma* sp.; P4, cacing dewasa *D. caninum*; dan P5, diberi adjuvan vaksin sebagai kontrol. Penyuntikan pertama dilakukan dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak, kemudian setiap dua minggu dilakukan *booster* dengan protein yang sama dan penambahan *incomplete Freund's adjuvant*. *Booster* dilakukan sebanyak tiga kali dengan dosis protein sebesar 200 mg/ekor untuk semua penyuntikan. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah mencit. Darah mencit diambil dari vena infra orbital dengan hematokrit dan ditampung dalam tabung reaksi. Serum dipisahkan dan ditera antibodinya terhadap antigen spesifik *T. canis* dengan *indirect-ELISA*.

Prosedur Indirect-ELISA

Antigen sebanyak 5 mg/mL diencerkan dengan buffer karbonat (50 mmol/L karbo-nat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100 mL/sumuran dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* {1 % *bovine serum albumin* (BSA), 0,02 % NaN_3 dalam PBS} dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Selanjutnya dicuci dengan *buffer* pencuci (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02% NaN_3) sebanyak tiga kali. Antibodi yang diuji dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 mL dan diinkubasi pada 37°C selama satu jam, setelah itu dicuci tiga kali dengan *buffer* pencuci, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*rabbit anti-mouse IgG* yang berlabel enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *buffer blocking* dengan pengenceran 1:1000 sebanyak 100 mL/sumuran dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan *buffer* pencuci untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/L 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin; 0,5 M MgCl_2 ; 0,02% NaN_3 ; pH 9,8) sebanyak 100 mL/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan *ELISA-reader* pada panjang gelombang 405 nm (Harlow dan Lane, 1988).

Uji sensitivitas dan spesifisitas protein

Sensitivitas protein sebagai antigen terhadap antibodi pada Ig-ELISA dinyatakan tinggi apabila dapat mendeteksi antibodi semua hewan yang menderita *toxocariasis*. Spesifisitas dinyatakan tinggi apabila protein tersebut dapat mendeteksi semua hewan yang menderita *toxocariasis*, tetapi tidak didapatkan *positif palsu* dengan penyakit cacing lain. Sensitivitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara nilai *optical density* (OD) positif dengan jumlah antara OD positif dan OD negatif dari hasil pemeriksaan serum *toxocariasis* positif yang dinyatakan dalam persen. Spesifisitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD negatif dengan jumlah antara OD positif dan OD negatif dari hasil pemeriksaan serum darah *toxocariasis* negatif yang dinyatakan dalam persen (de Savigny, 1980; Kusnoto, 2008).

Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai OD yang diinterpretasikan secara kualitatif (OD positif dan negatif) disajikan secara deskriptif dengan tabulasi silang, sedangkan nilai sensitivitas dan spesifisitas dinyatakan dalam bentuk persen (de Savigny, 1980; Kusnoto, 2008). Analisis sidik ragam dan tabulasi silang dilakukan dengan menggunakan *statistical product and service solution* (SPSS) for Windows real. 17 (Santoso, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Antigenisitas Protein *T. canis*

Rataan nilai OD pada mencit yang diimunisasi dengan homogenat *T. canis* adalah 0,550, *T. cati* adalah 0,558, *Ancylostoma* spp. sebesar 0,254, *D. caninum* sebesar 0,247, sedangkan pada kontrol adalah sebesar 0,207. Setelah dilakukan uji sidik ragam dapat diketahui bahwa, terdapat perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$) antar nilai OD serum mencit tersebut. Berdasarkan uji HSD 1% diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD serum mencit yang diimunisasi homogenat *T. canis* dan *T. cati* hasilnya sangat nyata lebih tinggi ($p < 0,01$) dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *D. caninum*, dan serum kontrol (Tabel 1).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antigenisitas protein *T. canis* terhadap serum mencit anti-*T. canis* dan *T. cati* lebih tinggi dibandingkan terhadap serum anti-*Ancylostoma* spp. dan anti-*D. caninum*. Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya perbedaan antigenik antara protein *Toxocara* spp. dengan *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*, dalam memicu respons imun mencit. Walaupun secara material dalam tubuh cacing terkandung berbagai protein, masing-masing protein itu dapat memicu respons imun mencit dengan membentuk antibodi yang juga beragam, baik kelas maupun subkelasnya. Namun, belum tentu dapat berikatan secara spesifik dengan protein murni *Toxocara* spp., sehingga dalam pembacaan dengan ELISA-reader menunjukkan nilai OD yang lebih rendah (Kusnoto, 2009).

Limfosit-T dan limfosit-B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Adanya respons imun yang diinduksi oleh banyak epitop, memerlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi berbagai limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan berbagai limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespons antigen. Hal ini mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang berbeda. Oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal (Rantam, 2003). Karena antigen yang digunakan pada ELISA adalah protein *T. canis* maka antibodi terhadap *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum* yang terikat secara spesifik lebih sedikit, dengan demikian dalam pembacaan

Tabel 1. Rataan nilai *optical density* (OD) hasil pengujian antigenisitas protein *Toxocara canis* terhadap serum mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing

Serum Mencit	Rataan Nilai OD ₄₀₅ ± SD
Anti- <i>T. canis</i>	0,550 ^b ± 0,322
Anti- <i>T. cati</i>	0,558 ^b ± 0,322
Anti- <i>Ancylostoma</i> spp.	0,254 ^a ± 0,145
Anti- <i>D. caninum</i>	0,247 ^a ± 0,145
Kontrol serum negatif	0,208 ^a ± 0,208

^{a,b} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$)

Tabel 2. Tabulasi silang hasil penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas protein *Toxocara* spp. pada diagnosis *toxocariasis* serum mencit

Serum mencit*	Hasil ELISA		Total
	OD positif	OD negatif	
<i>Toxocariasis</i> positif	16 (100%)	0 (0%)	16
<i>Toxocariasis</i> negati	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16
Total	18	14	32

Keterangan : **Toxocara* positif = mencit yang diimunisasi homogenat *Toxocara* spp.,
Toxocara negatif = mencit yang diimunisasi homogenat cacing lain
(*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*); OD= optical density

dengan ELISA-reader menunjukkan nilai OD yang lebih rendah (Kusnoto, 2009).

Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein *T. canis*

Untuk menyatakan hasil positif maka nilai OD pada sampel harus melebihi dua kali *cut off value* (COV) kontrol negatif atau lebih besar dari nilai rata-rata OD kontrol negatif. Pada penelitian ini nilai OD kontrol negatif sebesar 0,208, sehingga OD dinyatakan positif jika lebih besar dari 2 x 0,208 (> 0,415) dan dinyatakan negatif jika nilai OD yang diperoleh pada sampel (perlakuan) lebih kecil dari 2 x 0,208 (< 0,415).

Penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas protein *Toxocara* spp. pada diagnosis *toxocariasis* dalam serum darah mencit pada berbagai perlakuan disajikan pada tabulasi silang yang tercantum dalam Tabel 2.

Berdasarkan tabulasi silang pada Tabel 2, dapat diketahui bahwa nilai OD positif hasil ELISA sebesar 16 dari 16 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat *Toxocara* spp. sehingga didapatkan nilai sensitivitas 100%. Nilai OD negatif hasil ELISA sebesar 14 dari 16 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum* sehingga didapatkan nilai spesifisitas sebesar 87,5%. Hal ini menandakan masih terjadi *positif palsu* sebesar 12,5%. Kusnoto (2008), menggambarkan betapa tinggi kejadian reaksi silang yang terjadi pada infeksi parasit khususnya cacing, bahkan sekalipun kontrol yang digunakan adalah cacing lain klas. Spesifisitas tidak menjadi masalah besar bagi negara maju karena infeksi parasit tidak bersifat umum dan infeksi cacing dari tanah terkontaminasi dengan prevalensi rendah, namun demikian hal ini merupakan masalah

yang berarti pada serodiagnosis di negara tropik (Noordin *et al.*, 2005). Seroprevalensi infeksi *Toxocara* spp. yang tinggi didapatkan di negara berkembang dengan iklim lembab yang cocok untuk perkembangan telur cacing di dalam tanah (Magnaval *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2008).

SIMPULAN

Protein *T. canis* memiliki antigenisitas yang sama terhadap serum anti-*T. canis* dan anti-*T. cati*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap serum anti-*Ancylostoma* spp. dan anti-*D. caninum*. Pada uji diagnosis *toxocariasis* didapatkan nilai sensitivitas 100% dan spesifisitas sebesar 87,5%, sehingga masih terjadi positif palsu sebesar 12,5%.

SARAN

Saran yang diajukan pada hasil penelitian ini, adalah melanjutkan pemeriksaan antibodi dalam serum hewan coba maupun hewan terinfeksi secara alami baik dengan Ig-ELISA maupun ELISA-*isotyping*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas kesempatan yang diberikan untuk mendapatkan dana DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Nomor: 8714/UN3/KR/2013, Tanggal 25 Juni 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Beer SA, Novosil'tsev GI, Mel'nikova LI. 1999. The role of water factor in the dissemination of *Toxocara* eggs and the spread of toxocariasis in a megalopolis. *Parazitologia* 33(2): 129-135
- de Savigny D. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J Immunoassay* 1(1): 105-128
- Harlow E, Lane D. 1988. Production of monoklonal antibodies. In: *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Lab. Pp. 25-50
- Hubner J, Uhlikova M, Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol Microbiol Immunol* 50(2): 67-70
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, Barale T. 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatol* 201(3): 230-234
- Kaplan M, Kalkan A, Kuk S, Demirdag K, Ozden M, Kilic SS. 2008. *Toxocara* seroprevalence in Schizophrenic patients in Turkey. *Yonsei Med J* 49(2): 224-229
- Kusnoto. 2008. Antigenisitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein 27-28 kDa dari Material *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola* spp pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Teknik *Indirect-ELISA*. *Majalah Kedokteran Hewan* 24(1): 1-8
- Kusnoto. 2009. Characterization of Specific Protein of *Toxocara canis* for the Development of Diagnostic by Antibodies Examination of Toxocariasis. *Vet Med J* 25(2): 90-95
- Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol* 39: 1-11
- Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM, Fong MY. 2005. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Tropica* 93: 57-62
- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz J* 95(3): 281-285
- Rantam FA. 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya. Airlangga University Press. Hal. 3-9.
- Santoso S. 2001. Mengolah Data Statistik Secara Profesional. SPSS Versi 13. Jakarta. Penerbit PT. Media Komputindo kelompok Gramedia.
- Soulsby EJJ. 1989. Toxocariasis. *Brit Vet J* 139: 471-475
- Uga S, Matsumura T, Fujisawa K, Okubo K, Kataoka N, Kondo K. 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its possible role in ophthalmic disease. *Jpn J Parasitol* 39(5): 500-502.