

Diagnosis Toksoplasmosis Kongenital Berdasarkan Gen *Surface Antigen-1 Toxoplasma gondii* Isolat Lokal Menggunakan *Polymerase Chain Reaction*

(DIAGNOSIS OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS BASED ON SURFACE ANTIGEN -1 GENE OF LOCAL ISOLATE TOXOPLASMA GONDII USING POLYMERASE CHAIN REACTION)

Dwi Priyowidodo¹, Sri Hartati²,
Asmarani Kusumawati³, Joko Prastowo¹

¹Bagian Parasitologi, ²Bagian Penyakit Dalam,
³Bagian Reproduksi dan Kebidanan,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jl. Fauna No. 2 Karangmalang, Yogyakarta 55281,
Telpon 0274-560862, Email: priyo@ugm.ac.id.

ABSTRAK

Toksoplasmosis kongenital memiliki peranan penting dalam penularan toksoplasmosis pada hewan dan manusia, sehingga diperlukan metode diagnosis yang cepat dan akurat. Penelitian ini bertujuan untuk menerapkan teknik PCR untuk mendiagnosis toksoplasmosis kongenital pada mencit dengan target gen *surface antigen-1* (SAG-1) isolat lokal (IS-1) dari sampel darah, cairan amnion, fetus, dan plasenta. Sebanyak 15 ekor mencit bunting galur Balb/C umur delapan minggu digunakan sebagai hewan percobaan. Mencit diinfeksi dengan 10³ takizoit *Toxoplasma gondii* strain RH setiap ekor secara *intra peritoneal* pada umur kebuntingan sembilan hari. Setelah nyawa mencit-mencit dikorbankan, sampel cairan amnion, darah, fetus, dan plasenta dari masing-masing tiga ekor mencit diambil mulai hari ke- 1, 2, 3, 4, dan 5 sesudah infeksi untuk isolasi DNA. Isolasi DNA dari semua sampel dikerjakan dengan PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, U.S). DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik gen SAG-1 *T. gondii* isolat lokal. Hasil PCR positif terlihat pada sampel cairan amnion mulai 2-5 hari sesudah infeksi dan pada sampel fetus serta plasenta mulai 3-5 hari sesudah infeksi; sedangkan pada semua sampel darah negatif. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa metode PCR dengan target gen SAG-1 isolat lokal mampu mendiagnosis toksoplasmosis kongenital secara dini dari sampel cairan amnion, fetus, dan plasenta. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk penerapan metode PCR dengan target gen SAG-1 isolat lokal, dengan berbagai sampel toksoplasmosis kongenital pada manusia.

Kata-kata kunci: toksoplasmosis kongenital, *polymerase chain reaction* (PCR), gen SAG-1 *T. gondii*

ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis has an important role in the transmission of toxoplasmosis in animals and humans. Thus, a rapid and an accurate diagnostic method is needed. The aim of this study was to conduct the diagnosis technique of congenital toxoplasmosis in mice based on surface antigen-1 (SAG-1) gene of local isolates (IS-1) *T. gondii* using Polymerase Chain Reaction (PCR). A total of 15 pregnant mice Balb/C strain with the aged of eight weeks were used as experimental animal. Mice were intraperitoneally infected with 10³ tachizoit of *T. gondii* RH strain at day 9th of gestation. Amniotic fluids, blood, fetus, and placenta then were collected at day 1, 2, 3, 4 and 5 post infection. DNA was extracted from the above samples using PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, US), and then amplified by using specific primer based on SAG-1 gene of the local isolate *T. gondii*. This study shows that positive PCR result were seen in all samples of amniotic fluids at day 2 up to day 5 post infection. Fetus and placenta samples also show positive PCR result at 3 up to day 5 post infection. Negative PCR result shows in blood samples, however. To conclude, PCR technique using SAG-1 gene of local isolates *T. gondii* as a target gene, could be used to detect congenital toxoplasmosis from infected mouse samples such as, amnion fluids, fetus, and placenta. Further research was needed to apply the PCR method with SAG-1 gene of local isolate *T. gondii* on the human samples of congenital toxoplasmosis.

Keywords: congenital toxoplasmosis, *polymerase chain reaction* (PCR), SAG-1 gene of *T. gondii*

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis adalah penyakit yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*, merupakan parasit patogen oportunistik (Dutta *et al.*, 2000). Protozoa *T.gondii* dapat menginfeksi hampir semua hewan berdarah panas termasuk manusia (Sibley *et al.*, 2009). Infeksi *T. gondii* pada manusia dapat terjadi secara kongenital dan didapat, infeksi biasanya bersifat asimtomatik, tetapi pada kondisi tertentu parasit dapat menyebabkan penyakit yang serius (Dubey, 1998). Toksoplasmosis pada manusia dengan sistem kekebalan tubuh baik tidak menyebabkan masalah yang serius bahkan tidak menunjukkan gejala klinis, tetapi dapat berakibat fatal jika infeksi bersifat kongenital, dan pasien mengalami immunosupresi (Chintana *et al.*, 1998), serta pada penderita dengan sistem kekebalan terganggu seperti penderita ensefalitis, *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), menjalani transplantasi organ, pengobatan dengan kemoterapi, dan lesi okuler (Yamamoto *et al.*, 2000; Sibley *et al.*, 2009).

Infeksi *T. gondii* pada fetus dapat mengakibatkan kematian fetus dan abortus spontan baik pada manusia maupun hewan. Penularan *T. gondii* secara vertikal (dari induk ke anak) sangat penting dalam penyebaran toksoplasmosis, karena tingkat penularan secara kongenital pada manusia dapat mencapai 19,8% (Hide *et al.*, 2009). Berdasarkan pentingnya penularan secara kongenital, diperlukan metode diagnosis toksoplasmosis kongenital secara dini, cepat, sensitif, dan spesifik.

Menurut (Su *et al.*, 2009), pengembangan metode diagnosis yang sederhana, sensitif, spesifik dan cepat untuk deteksi dan identifikasi *T. gondii* merupakan kebutuhan penting. Diagnosis berdasarkan gejala klinis kadang kala agak sulit dilakukan, karena sebagian besar penderita tidak menunjukkan gejala (Montoya dan Liesenfeld, 2004). Uji serologi tidak dapat menunjukkan fase aktif dari infeksi *T. gondii*, selain itu dengan tes serologi tidak selalu didapatkan diagnosis yang cepat dan tepat, karena tidak ditemukan immunoglobulin-M (IgM) pada neonatus, atau karena IgM dapat ditemukan selama beberapa bulan sampai lebih dari setahun, sedangkan pada penderita immunodefisiensi tidak menunjukkan adanya IgM dan tidak dapat ditemukan titer IgG yang meningkat (Gandahusada, 1995). Metode

Polymerase Chain Reaction (PCR) dinyatakan memiliki kepekaan dan akurasi yang tinggi untuk diagnosis toksoplasmosis dari berbagai sampel klinis dibanding dengan metode konvensional seperti inokulasi pada mencit, uji serologi maupun kultur jaringan (Gross *et al.*, 1992; Hohlfield *et al.*, 1994; Owen *et al.*, 1998).

Teknik PCR dengan target gen B1 *T. gondii* sudah banyak digunakan untuk diagnosis toksoplasmosis kongenital dengan spesifitas dan sensitifitas yang tinggi dari berbagai sampel biologi seperti cairan amnion dan plasenta (Owen *et al.*, 1998), sampel fetus (Assmar *et al.*, 2000), sampel cairan amnion (Assmar *et al.*, 2004; Grover *et al.*, 1990). Teknik PCR dengan target gen *surface antigen-1* (SAG-1) *T. gondii* pernah dilaporkan oleh Savva *et al.*, (1990), mampu mendeteksi *T. gondii* pada sampel cairan peritoneum dan jaringan otak dari mencit yang diinfeksi dengan takizoit *T. gondii*, sehingga target gen SAG-1 *T. gondii* isolat lokal diharapkan mampu mendeteksi *T. gondii* dari berbagai sampel biologi pada penelitian ini.

Penelitian diagnosis toksoplasmosis kongenital menggunakan teknik PCR dengan target gen SAG-1 isolat lokal (IS-1) belum pernah dilaporkan sebelumnya, oleh sebab itu penelitian ini bertujuan menerapkan teknik PCR untuk diagnosis toksoplasmosis kongenital pada mencit dengan target gen SAG-1 isolat lokal dari sampel darah, cairan amnion, fetus, dan plasenta, dengan harapan dapat diterapkan dalam diagnosis toksoplasmosis kongenital secara dini pada manusia.

METODE PENELITIAN

Sebanyak 15 ekor mencit Balb/C umur delapan minggu berjenis kelamin betina (bunting) digunakan sebagai hewan percobaan. Mencit diinfeksi dengan 10^3 takizoit *T. gondii* strain RH setiap ekor secara *intra peritoneal* pada umur kebuntingan sembilan hari. Hari 1, 2, 3, 4, dan 5 sesudah infeksi, masing-masing tiga ekor mencit dikorbankan nyawanya untuk pengambilan sampel. Sampel darah, cairan amnion, plasenta, dan fetus diambil untuk dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA sampel dikerjakan menggunakan PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, U.S) dengan prosedur mengikuti petunjuk pabrik pembuat. Sampel jaringan (plasenta dan fetus) mengikuti prosedur untuk *mammalian tissue and mouse/*

rat tail lysate, sedangkan sampel darah dan cairan amnion mengikuti prosedur untuk blood lysate. Hasil isolasi DNA sampel selanjutnya digunakan sebagai DNA template dalam PCR.

Primer Forward adalah 5'-ACCCAACA GGCAAATCTG-3' (posisi 57-74) dan Backward adalah 5'-TCGTCTCCCTTGATGCAA-3' (posisi 226-249) merupakan primer yang dirancang berdasarkan gen SAG-1 *T. gondii* isolat lokal sesuai data GeneBank Acc. No. AY651825 (Hartati et al., 2006; Krasteva et al., 2009). Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan menggunakan FastStart PCR Master (Rhoce) 12,5 µL ; primer Forward dan Backward dengan konsentrasi 10 pmol masing-masing sebanyak 2 µL; sampel DNA 2 µL dan ditambahkan aquadest steril (dd H₂O) dengan volume akhir masing-masing reaksi 25 µL. Teknik PCR dilakukan pada mesin PCR (Thermal Cycler) dengan program sebagai berikut : tahap persiapan satu siklus pada suhu 95°C selama empat menit, diikuti 30 siklus untuk denaturasi 94°C selama dua menit, annealing 57°C selama satu menit, elongasi 72°C selama 30 detik, dan terminasi 72°C selama 10 menit.

Hasil PCR dideteksi dengan menggunakan elektroforesis agarose 1,5%; 1 x tris borate EDTA (TBE) dan hasil PCR dari DNA takizoit *T. gondii* digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif digunakan aquadest. Visualisasi hasil amplifikasi diwarnai dengan GelRed (Biotium) yang kemudian dilihat dengan transilluminator ultraviolet dan selanjutnya dipotret.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian dengan metode PCR untuk mendiagnosis toksoplasmosis kongenital melalui infeksi buatan secara intra peritoneal pada mencit selengkapnya disajikan dalam Tabel 1. Pada Tabel 1 diperlihatkan bahwa pada hari ke-1 sesudah infeksi, tidak ada sampel (darah, cairan amnion, fetus, dan plasenta) yang menunjukkan hasil positif dengan metode PCR. Hari ke-2 sesudah infeksi, hasil positif dapat dilihat pada semua sampel cairan amnion dan plasenta; sedangkan mulai hari ke-3 sampai dengan ke-5 sesudah infeksi, menunjukkan bahwa semua sampel dari semua mencit

Tabel 1. Hasil pemeriksaan sampel darah, cairan amnion, fetus dan plasenta dengan metode PCR dari mencit perlakuan 1-5 hari sesudah infeksi dengan takizoit *T. gondii*.

Hari sesudah infeksi dengan takizoit <i>T. gondii</i>		Deteksi DNA <i>T. gondii</i> dengan PCR			
		Darah	CA	Fetus	Plasenta
Satu hari	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Dua hari	1	-	+	-	+
	2	-	+	-	+
	3	-	+	-	+
Tiga hari	1	-	+	+	+
	2	-	+	+	+
	3	-	+	+	+
Empat hari	1	-	+	+	+
	2	-	+	+	+
	3	-	+	+	+
Lima hari	1	-	+	+	+
	2	-	+	+	+
	3	-	+	+	+

Keterangan: CA = cairan amnion
PCR= polymerase chain reaction

- = hasil pemeriksaan negatif
+= hasil pemeriksaan positif

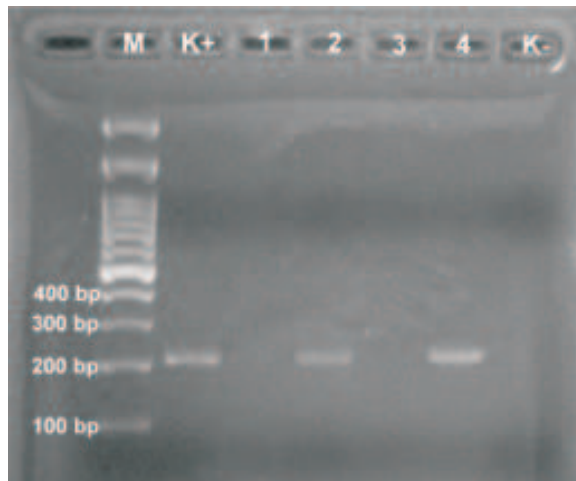
perlakuan menunjukkan hasil positif pada sampel cairan amnion, fetus dan plasenta, sedangkan sampel darah negatif.

Hasil negatif pada semua sampel hari ke-1 sesudah infeksi dapat terjadi karena parasit belum mengalami perkembangan atau dalam isolasi DNA tidak dapat diperoleh jumlah DNA yang cukup untuk proses amplifikasi. Menurut Sterker *et al.*, (2010), hal tersebut dapat terjadi karena untuk preparasi sampel dengan cara isolasi DNA sebagai bahan untuk proses amplifikasi sangat menentukan dalam melaksanakan teknik PCR. Hasil PCR hari ke-2 dan ke-3 sampai ke-5 sesudah infeksi dari berbagai sampel dengan menggunakan primer gen SAG-1 *T. gondii* yang kemudian dielektroforesis disajikan pada Gambar 1 dan 2. Pada Gambar 1 diperlihatkan bahwa DNA *T. gondii* dapat dideteksi dengan terlihat pita pada + 210 bp dari sampel cairan amnion dan plasenta, hal tersebut sesuai dengan laporan Savva *et al.*, (1990) yang menyatakan bahwa PCR berdasarkan gen SAG-1 *T. gondii* mampu mendeteksi parasit tersebut dari berbagai jaringan dan cairan tubuh.

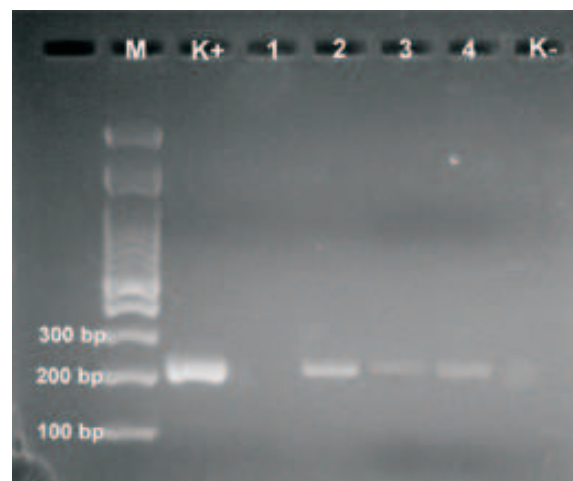
Pemilihan primer berdasarkan gen SAG-1 untuk diagnosis toksoplasmosis kongenital dengan metode PCR didasarkan pada beberapa

alasan, antara lain: merupakan salah satu gen yang mudah diisolasi dari takizoit *T. gondii* (Kazemi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009); Antigen SAG-1 terdistribusi secara homogen di permukaan takizoit yang menyusun sekitar 3-5% dari protein total takizoit dan merupakan protein mayor (Wang *et al.*, 2009). Antigen SAG-1 juga merupakan kandidat yang baik untuk pengembangan piranti diagnosis, karena: SAG-1 merupakan protein permukaan yang paling dominan dan mempunyai peranan penting dalam perlekatan parasit pada sel inang dalam proses infeksi; sekuen gen penyandi SAG-1 sudah diketahui sehingga dapat dibuat primer untuk amplifikasi *in vitro* (Harning *et al.*, 1996; Burg *et al.*, 1988).

Hasil PCR negatif hari ke-2 sesudah infeksi pada sampel fetus kemungkinan dapat terjadi karena distribusi parasit di dalam jaringan tidak merata, sehingga tidak semua jaringan mengandung parasit (Owen *et al.*, 1998). Lebih lanjut Owen *et al.*, (1998), menyatakan bahwa dengan PCR, sampel plasenta lebih sensitif dibandingkan jaringan fetus (otak, hati, dan paru). Hasil PCR positif pada sampel cairan amnion, fetus dan plasenta mulai hari ke-3 sampai ke-5 sesudah infeksi mengindikasikan adanya potensi penularan parasit pada anak,



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA sampel mencit perlakuan dua hari sesudah infeksi menggunakan primer spesifik gen surface antigen-1 *Toxoplasma gondii* pada agarose 1,5%. (M: Marker 100 bp; K+: DNA takizoit sebagai kontrol positif; 1: sampel darah; 2: sampel cairan amnion; 3: sampel fetus; 4: sampel plasenta).



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA sampel mencit perlakuan 3-5 hari sesudah infeksi menggunakan primer spesifik gen surface antigen-1 *Toxoplasma gondii* pada agarose 1,5%. (M: Marker 100 bp; K+: DNA takizoit sebagai kontrol positif; 1: sampel darah; 2: sampel cairan amnion; 3: sampel fetus; 4: sampel plasenta)

meskipun tidak semua infeksi pada induk bunting menghasilkan infeksi kongenital pada anak karena menurut Hide *et al.*, (2009), penularan kongenital pada mencit berkisar 75%, pada kambing dan domba berkisar 65%, sedangkan pada manusia berkisar 19,5%.

Pemilihan sampel dari cairan amnion didasarkan pada banyak pendapat yang menyatakan bahwa sampel cairan amnion sangat cocok sebagai sampel dalam diagnosis toksoplasmosis kongenital karena mudah mendapatkannya dan aman dalam proses pengambilan sampel (Grover *et al.*, 1990; Hohlfeld, *et al.*, 1994; Guy, *et al.*, 1996; Assmar *et al.*, 2000); sedangkan pemilihan sampel jaringan plasenta dan fetus didasarkan pada pendapat Owen *et al.*, (1998) dan Assmar *et al.*, (2000), yang menyatakan metode PCR dapat mendeteksi DNA *T. gondii* dari sampel plasenta, jaringan otak, paru, dan hati fetus yang diabortuskan.

Hasil PCR negatif pada sampel darah dalam penelitian ini sesuai dengan laporan Savva *et al.*, (1990), yang melakukan penelitian pada sampel darah mencit, tiga hari sesudah diinfeksi dengan takizoit berbagai strain *T. gondii* menunjukkan bahwa semua sampel darah negatif dengan PCR. Hasil PCR negatif pada sampel darah pada semua mencit perlakuan kemungkinan karena jumlah DNA parasit pada sampel terlalu sedikit, sehingga tidak dapat diamplifikasi, karena menurut Guy dan Joynton (1995), PCR mampu mendeteksi DNA parasit dari sampel darah pada toksoplasmosis akut, hal ini juga dikuatkan oleh Roberts dan Janovy (2000), yang menyatakan bahwa *T. gondii* dapat diisolasi dari semua cairan tubuh dan darah pada infeksi akut. Hasil PCR negatif pada sampel darah kemungkinan juga dapat disebabkan oleh adanya *inhibitor* pada reaksi PCR yang dapat menurunkan sensitifitas PCR seperti adanya immunoglobulin (Al-Soud *et al.*, 2000), polipeptida dan laktoferin yang merupakan komponen sel darah merah dan sel darah putih (Al-Soud dan Radstrom, 2001).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode PCR dengan target gen SAG-1 isolat lokal mampu mendiagnosis toksoplasmosis kongenital secara dini (dua hari

sesudah infeksi) dari sampel cairan amnion, dan plasenta, serta tiga hari sesudah infeksi dari sampel fetus. Sampel cairan amnion merupakan sampel terbaik dalam mendiagnosis toksoplasmosis kongenital.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut untuk penerapan metode PCR dengan target gen SAG-1 isolat lokal, dengan berbagai sampel toksoplasmosis kongenital pada manusia di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas biaya penelitian melalui Beasiswa Program Pasca Sarjana (BPPS) tahun 2010, sehingga penelitian ini dapat berjalan.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR., *J Clin Microbiol* 30 (1): 345-350.
- Al-Soud WA, Radstrom P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory component in blood cells. *J Clin Microbiol* 39 (2): 485-493.
- Assmar M, Terhovanesian A, Fajrak H, Naddaf SR. 2000. Detection of *Toxoplasma gondii* in dead fetuses by polymerase chain reaction (PCR). *Iranian J Med Sci* 25 (1&2): 59-61.
- Assmar M, Yassaei F, Terhovanesian A, Esmaili AR, Hassan N, Farzanehnezhad Z, Naddaf SR. 2004. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: validity of per using amnionic fluid against indirect fluorescent antibody assay in mothers. *Iranian J Publ Health* 33 (1): 1-4.
- Burg JL, Perelman D, Kasper D, Ware PL, Boothroyd JC. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 14 : 3584-3591.

- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27 : 1787-1792.
- Chintana T, Sukthana Y, Bunyakai B, Lekkla A. 1998. Toxoplasma gondii antibody in pregnant women with and without HIV infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 29 (2): 383-386.
- Dubey JP. 1998. Toxoplasmosis, Sarcocystosis, Isosporosis and Cyclosporiasis. In Palmer SR, Soulsby L, Simpson DIH. (Ed) *Zoonoses Biology Practice and Public Health Control*. New York: Oxford University Press. Pp 579-592.
- Dutta C, Grimwood J, Kasper LH. 2000. Attachment of *Toxoplasma gondii* to a specific membrane fraction of CHO cell. *Infect Immun* 7198-7201.
- Gandahusada S. 1995. Penanggulangan toksoplasmosis dalam meningkatkan kualitas sumber daya manusia. *Majalah Kedokteran Indonesia* 6: 365-370.
- Grover MC, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 2297-2301.
- Gross U, Roggenkamp A, Janitschke K, Heesemann J. 1992. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11 (1) : 33-39.
- Guy EC, Joynson, DHM. 1995. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active toxoplasma infection of parasite in blood. *J Infect Dis* 172 (7) : 319-322.
- Guy EC, Pelloux H, Lappalainen M, Aspöck H, Hassl A, Melby KK, Holberg-Pettersen M, Petersen E, Simone J, Ambroise-Thomas P. 1996. Interlaboratory comparison of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* dna added to samples of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 836-839.
- Harning D, Spenter J, Metsis A, Vuust J, Petersen E. 1996. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin (IgM) and IgG antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 355-357.
- Hartati S, Kusumawati A, Wuryastuti H, Widada JS. 2006. Primary structure of mature SAG1 gene of an Indonesian *Toxoplasma gondii* and comparison with other strains. *Journal of Veterinary Science* 7 (3): 263-270.
- Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, Thomasson D, Wright EA, Williams RH, Murphy RG, Smith JE. 2009. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 136: 1877-1885.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331 : 695-699.
- Kazemi B, Bandehpour M, Maghen L, Solgi GH. 2007. Gene cloning of 30 kDa *Toxoplasma gondii* tachyzoites surface antigen (SAG1). *Iranian J Parasitolgy* 2 (2): 1-8.
- Krasteva D, Toubiana M, Hartati S, Kusumawati A, Dubremetz JF, Widada JS. 2009. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology* 162: 327-331.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363(9425): 1965-1976.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. 1998. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Veterinary Record* 142: 445-448.
- Roberts LS, Janovy Jr J. 2000. *Foundations of parasitology*. Sixth edition. Philadelphia. WB Saunders Co. Pp 129-132.
- Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* 32: 25-31.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *J Philosophical Transaction* 364: 2749-2761.

- Sterker Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart M, Brun S, Dalle F, Delhaes L, Filisetti D, Pelloux H, Year H, Bastien P. 2010. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (9) : 3216-3222.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. 2009. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137: 1-11.
- Wang H, He S, Yao Y, Cong H, Zhao H, Li T, Xing-Quan Z. 2009. *Toxoplasma gondii*: Protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. *Journal Experimental Parasitology* 122: 226–232.
- Yamamoto JH, Vallochi AL, Silvera C, Filho JK, Nusenbalatt, Neto RB, Gazzinelli EC, Belfort R, Rizzo RV. 2000. Discrimination between patient with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* 181: 2018-2022.