

Vaksinasi Protein Ekskretori-Sekretori *Toxoplasma gondii* Hasil Biakan *in vivo* Membangkitkan Respons Imun Non Protektif

(THE VACCINATION OF *Toxoplasma gondii* EXCRETORY-EXCRETORY PROTEINS
FROM IN VIVO CULTURE ENHANCED IMMUNE RESPONSE UNABLE PROTECTIVE)

Mufasirin, Endang Suprihati

Departemen Parasitologi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya,
Telp. 031-5992785 (Psw. 203), Email: mufaromi@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun dan protektivitas mencit yang divaksin dengan protein ekskretori-sekretori *Toxoplasma gondii* hasil pembiakan *in vivo*. Lima puluh ekor mencit jantan *strain* Balb/c dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan 10 ekor. Mencit kemudian divaksin dengan protein 20,7 kDa, 35,3 kDa, 100,9 kDa, ekskretori-sekretori antigen total (ESA total) dan kontrol *Booster* dilakukan dua minggu setelah vaksin pertama. Sebelum dilakukan ujiantang, lima ekor mencit dikorbankan untuk pemeriksaan imunoglobulin-G (IgG). Pemeriksaan IgG dalam serum menggunakan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Ujiantang menggunakan 1×10^3 takizoit *T. gondii* yang diinfeksi secara *intraperitoneal*. Mencit dipelihara dalam waktu dua minggu. Jumlah mencit yang mati dan waktu kematian dihitung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksinasi protein ESA 20,7 kDa; 35,3 kDa; 100,9 kDa dan ESA total *T. gondii* hasil pembiakan *in vivo* mampu membangkitkan respons imun mencit yang ditandai dengan terbentuknya IgG tetapi tidak mampu memproteksi infeksi terhadap *T. gondii strain* RH.

Kata kunci : *Toxoplasma gondii strain* RH, ekskretori-sekretori antigen, 20,7 kDa; 35,3 kDa; 100,9 kDa, respons imun, vaksinasi.

ABSTRACT

The aims of this research was to explore the immune response and protectiveness of mice which were vaccinated with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory proteins produced from *in vivo* culture. A total of 50 Balb/c strain mice were allotted into five groups. Mice in group 1 to 3 were vaccinated with 20.7 kDa, 35.3 kDa, and 100.9 kDa of the protein, respectively. Whereas mice in group 4 were given total excretory-secretory antigen (total ESA), and mice in group 5 were used as control (PBS). Booster vaccinated was conducted at two weeks following the first vaccination. Prior the challenge test, five mice were sacrificed for immunoglobulin-G (IgG) analysis. The analysis of IgG using *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Challenge test used 1×10^3 *T. gondii* tachyzoites which were given to the animals intraperitoneally. The results showed that vaccination using *T. gondii* excretory-secretory proteins as well as *T. gondii* total ESAs could enhanced immune response as detected by the markedly presence of *T. gondii* IgG. However, this was unable to protect against *T. gondii* RH strain infection.

Keywords : *Toxoplasma gondii* RH strain, excretory-secretory antigens, 20.7 kDa, 35.3 kDa, 100.9 kDa, immune response, vaccination.

PENDAHULUAN

Penggunaan vaksin protein ekskretori-sekretori *Toxoplasma gondii* hasil pembiakan *in vivo* untuk pengendalian toksoplasmosis sampai sekarang belum pernah dilaporkan. Toksoplasmosis adalah penyakit yang dapat

menyerang hewan berdarah panas termasuk manusia. Pada manusia, manifestasi yang ditakuti akibat infeksi *T. gondii* adalah kecacatan pada anak yang dilahirkan. Salah satu usaha untuk mengendalikan toksoplasmosis antara lain dengan cara pemberian vaksin sehingga inang mampu bertahan

terhadap infeksi. Beberapa teknik untuk mendapatkan vaksin sudah dilakukan tetapi belum mendapatkan hasil maksimal.

Beberapa peneliti telah mencoba menggunakan vaksin DNA untuk mencegah infeksi *T. gondii* pada mencit dan menggunakan beberapa antigen seperti *surface antigen 1* (SAG1) (Angus *et al.*, 2000), protein ekskretori-sekretori dari *granule1* (GRA1) (Scorza *et al.*, 2003), GRA4 (Desolme, *et al.*, 2000), GRA7 (Vercammen *et al.*, 2000), protein *rhoptry1* (ROP1) (Chen *et al.*, 2001) dan ROP2 (Vercammen *et al.*, 2000; Leyva *et al.*, 2001). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa proteksi yang berbeda terhadap toksoplasmosis pada mencit. Di antara kandidat vaksin yang ada, protein 90 kDa dari *micronema3* (MIC3) yang merupakan bagian protein *excretory-secretory antigens* (ESAs) menunjukkan potensi yang tinggi karena mempunyai sifat melekat kuat pada sel inang baik pada stadium takizoit, bradizoit dan sporozoit dari *T. gondii* (Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Cerede *et al.*, 2002).

Kendala penggunaan vaksin sub unit adalah sumber protein yang digunakan. Protein tersebut didapatkan dengan cara mengolah stadium takizoit *T. gondii* yang memerlukan bahan dan biaya yang besar, di samping jumlah protein yang dihasilkan sedikit. Di lain pihak, stadium takizoit *T. gondii* dapat dibiakkan secara *in vivo* dalam rongga *intraperitoneal* mencit dalam waktu yang relatif pendek. *T. gondii* dalam rongga *intraperitoneal* berkembang, diekskresikan, dan disekresikan beberapa protein yang dibutuhkan untuk perkembangan parasit yang dikenal dengan ekskretori-sekretori antigen (ESA). Protein tersebut dihasilkan oleh *rhoptri*, *mikronema* dan granula padat dan sebagian mampu membangkitkan sistem kebal inang sebagai respons terhadap infeksi.

Protein ESA *T. gondii* yang didapatkan dari perkembangbiakan secara *in vivo* mempunyai konformasi protein dan fungsi yang lebih baik dibandingkan dengan protein ESA hasil isolasi *T. gondii* dengan cara pemecahan stadium takizoit secara *in vitro*. Beberapa protein ESA *T. gondii* dapat merangsang timbulnya kekebalan pada inang yang terinfeksi, sehingga protein tersebut dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit. Laporan tentang profil protein ESA hasil kultivasi *in vivo* dan penggunaan sebagai bahan untuk merangsang kekebalan belum banyak dilaporkan.

Penelitian ini menggunakan tiga protein ESA yang bersifat antigenik yaitu protein dengan bobot molekul (BM) 20,7 kDa, 35,3 kDa, 100,9 kDa, dan protein ESA total *T. gondii* sebagai vaksin. Mencit yang telah divaksin ditantang terhadap infeksi *T. gondii*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui respons imun dan protektivitas mencit yang divaksin dengan protein ekskretori-sekretori *T. gondii* hasil pembiakan *in vivo*. Protein tersebut diharapkan mampu membangkitkan sistem kekebalan dan dapat memproteksi infeksi *T. gondii*, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan vaksin toksoplasmosis.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian menggunakan *true experimental (posttest only control groups design)*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Protozoologi Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan *strain* Balb/c, umur 12 minggu dengan bobot badan 20-30 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga. Isolat *T. gondii* yang digunakan uji tantang adalah *strain* RH, stadium takizoit yang didapatkan dari Departemen Parasitologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Protein ESA yang digunakan sebagai vaksin adalah protein BM 20,7 kDa, 35,3 kDa, 100,9 kDa, dan ESA total (*total ESA*) yang diisolasi dari stadium takizoit *T. gondii strain* RH, hasil penelitian Hibah Bersaing tahun 2010 (Mufasirin dan Suprihati, 2010). Bahan tambahan yang digunakan untuk imunisasi adalah *complete adjuvant* (Sigma, USA) dan *incomplete adjuvant* (Sigma, USA). Bahan untuk *enzyme linked immunosorbent assay*/ELISA adalah konjugat berlabel *alkaline phosphatase* (Santa Cruz, USA) dan 4 para nitrophenil phosphate (Sigma, USA).

Imunisasi dengan Protein ESA Antigenik

Sebanyak 50 ekor mencit jantan *strain* Balb/c diadaptasikan selama satu minggu sebelum perlakuan. Mencit kemudian diacak dan ditempatkan ke dalam lima kelompok dengan masing-masing kelompok perlakuan sebanyak 10 ekor. Kelompok I diimunisasi dengan protein 20,7 kDa, kelompok II dengan protein 35,3 kDa, kelompok III dengan protein

100,9 kDa, kelompok IV dengan protein ESA total, dan kelompok kontrol dimunisasi dengan PBS. Imunisasi protein menggunakan dosis 1 mg, secara *subcutan* dan dua minggu setelah imunisasi pertama, dilakukan *booster* dengan dosis dan cara yang sama. Injeksi pertama menggunakan *complete adjuvant* sedangkan pada *booster* menggunakan *incomplete adjuvant*. Dua minggu setelah *booster*, lima ekor mencit setiap perlakuan dikorbkan, serum diambil dan dilakukan pengukuran kadar IgG dengan ELISA sebelum dilakukan uji tantang.

Pengukuran IgG dengan *Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Penentuan respons humoral (IgG) dilakukan dengan metode *indirect ELISA*. Serum mencit yang telah dimunisasi digunakan untuk pengukuran titer antibodi. Setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100 µl larutan antigen dengan konsentrasi 10 mg/µl dalam bufer karbonat sesuai dengan protein yang diimunisasikan dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Plat mikro dicuci tiga kali dengan bufer pencuci, masing-masing sumuran dengan 200 µl, kemudian dilakukan *blocking* dengan menambahkan tiap sumuran sebanyak 200 µl *blocking solution*. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama satu sampai dua jam, dilakukan tiga kali pencucian. Pencucian dilakukan dengan cara dan bahan yang sama seperti cara sebelumnya. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100 µl serum mencit yang telah diencerkan (1:4), dan diinkubasi pada 37°C selama satu jam, serta diikuti dengan tiga kali pencucian. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100 µl konjugat berlabel alkaline phosphatase (Santa Cruz, USA) dan diinkubasi selama satu jam, diikuti 3-4 kali pencucian. Sebanyak 100 µl substrat 4 para nitrophenil phosphate (Sigma, USA) dimasukkan ke dalam tiap sumuran, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl larutan NaOH 1 N. Titer antibodi (dalam *Optical Density*) dibaca pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 (Mufasirin, 1999).

Uji Tantang

Uji tantang menggunakan takizoit *T. gondii strain* RH yang dikultivasi pada *intraperitoneal* mencit. Mencit yang telah diimunisasi, dua minggu setelah *booster* ditantang dengan cara diinfeksi 1x10³ takizoit dalam 0,1 ml NaCl

fisiologis secara *intraperitoneal*. Mencit kemudian dipelihara selama dua minggu pascatantang, daya hidup mencit dihitung dan mencit yang mati diuji keberadaan takizoit dalam *intraperitoneal* sebagai bukti kematian mencit akibat infeksi *T. gondii*.

Analisis Data

Hasil pengukuran IgG dan uji tantang dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran IgG terhadap *T. gondii* pada serum dengan teknik *indirect ELISA*, dua minggu setelah dilakukan *booster* sebelum dilakukan uji tantang disajikan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 rata-rata OD pengukuran IgG setelah imunisasi terhadap protein ESA *T. gondii* lebih tinggi dua kali lipat dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan IgG pada mencit yang divaksin dengan protein ESA tunggal yang antigenik atau protein ESA total terjadi karena protein tersebut dikenal sistem imun inang yang mampu merespons protein antigenik (ESA). Rahmah dan Anuar (1992) melaporkan bahwa antigen ESA *T. gondii* mampu membangkitkan respons imun dibandingkan dengan antigen terlarut dan antigen kista. Diana *et al.*, (2005) juga melaporkan bahwa faktor yang terlarut pada *T. gondii* (ESA) mampu membangkitkan respons imun dengan cara rekrutmen dan migrasi sel dendritik. Efek yang diakibatkan akibat aktivasi sel dendritik adalah respons imun seluler yang timbul yang diperantarai sel Th1 dan respons imun humoral yang diperantarai sel Th2.

Tabel 1. Rataan *optical density* IgG serum mencit yang divaksin dengan protein ESA.

| Perlakuan | Rataan OD IgG + SD |
|-----------------------|----------------------------|
| Protein ESA 20,7 kDa | 0,401 ^a + 0,106 |
| Protein ESA 35,3 kDa | 0,389 ^a + 0,063 |
| Protein ESA 100,9 kDa | 0,380 ^a + 0,122 |
| Protein ESA total | 0,528 ^a + 0,270 |
| Kontrol | 0,177 ^b + 0,117 |

^{a,b} Superskrip berbeda dalam kolom sama menunjukkan perbedaan yang bermakna (p<0,05).
 ESA: ekskretori-sekretori antigen
 OD : *optical density*

Respons imun humoral tercermin dengan terbentuknya beberapa kelas imunoglobulin termasuk IgG.

Peningkatan IgG terhadap *T. gondii* tidak diikuti dengan protektivitas mencit terhadap ujiantang. Hasil ujiantang menunjukkan semua mencit mati pada hari ke delapan setelah infeksi seperti disajikan pada Tabel 2. Berbeda dengan hasil penelitian Daryani *et al.*, (2003) yang menggunakan ESA *T. gondii* sebagai bahan imunisasi, didapatkan lama hidup mencit yang diimunisasi ESA lebih panjang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada penelitian tersebut, mencit kontrol mati pada hari ke-10.

Beberapa faktor yang menyebabkan tidak ada perbedaan jumlah kematian dan lama hidup antara perlakuan yang menggunakan protein ESA *T. gondii* dengan kontrol kemungkinan IgG yang terbentuk setelah booster tidak mampu mengatasi infeksi walaupun sudah meningkat lebih dari dua kali dibandingkan kontrol. Terbentuknya IgG sangat tergantung dengan waktu. Imunoglobulin-M (IgM) akan timbul lebih dahulu dibandingkan dengan IgG. Peningkatan IgG secara pelan akan diikuti dengan penurunan IgM. IgG yang timbul akan dipertahankan dalam jangka lama dan akan menurun. Kemungkinan lain untuk meningkatkan IgG perlu dilakukan booster ulang lebih dari sekali, hal tersebut tergantung sistem kekebalan individu dan dosis yang diberikan serta rute pemberian dan dosis yang digunakan imunisasi. Jin-Yan *et al.*, (2008) meneliti penggunaan ESA *T. gondii* yang diberikan beberapa dosis melalui *intranasal*. Hasil penelitian menunjukkan dosis 20 µg dan 30 µg mampu membangkitkan respons imun mukosal dan sistemik.

Kemungkinan lain gagalnya protektivitas karena faktor *strain T. gondii* yang digunakan sebagai bahan infeksi pada ujiantang. Pada penelitian ini digunakan *T. gondii strain RH*.

Secara genetik *T. gondii* dikelompokkan ke dalam tiga strain yaitu: tipe I, II, dan III dan *strain RH* merupakan *strain* tipe 1 yang sangat patogen. Conrad *et al.*, (2005) dan Miller *et al.*, (2004) melaporkan bahwa *strain* tipe II adalah *strain* yang umum menyebabkan toksoplasmosis pada manusia. *Strain* tipe I dan II juga ditemukan pada pasien dengan penyakit bawaan, sedangkan *strain* tipe III dari hewan. *Strain* tipe II sebagian besar ditemukan pada pasien dengan *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS). Sibley dan Boothroyd (1992) melaporkan *strain* tipe I sangat virulen pada tikus, sedangkan *strain* tipe II dan III adalah *strain* kurang virulen. *Strain* virulen adalah *strain* yang mempunyai *lethal dose 100* (LD₁₀₀) pada mencit *strain* Swiss kurang dari 10 takizoit sedangkan *strain* tidak virulen lebih dari 1000 takizoit. Howe *et al.*, (1997) dan Darde (2004) menggolongkan *strain T. gondii* ke dalam tiga genotip dengan analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) pada lokus *surface antigen 2* (SAG2) yaitu tipe I, II, dan III dan *strain RH* adalah *strain* virulen dan termasuk tipe I.

Hasil pemeriksaan cairan *intraperitoneal* pada mencit yang mati, dua minggu pascatantang didapatkan takizoit *T. gondii* sehingga disimpulkan mencit mati akibat infeksi *T. gondii* bukan oleh sebab lain. Kematian mencit pada hari kedelapan sesuai dengan dosis infeksi dan *strain T. gondii* yang digunakan. *Strain T. gondii* yang digunakan adalah *strain* tipe 1 yang mampu membunuh mencit dalam waktu delapan hari dengan dosis di bawah 1000 takizoit.

Penggunaan protein ESA *T. gondii*, baik yang protein GRA, ROP, dan MIC sebagai vaksin diharapkan dapat memberikan proteksi terhadap infeksi *T. gondii*. Golkar *et al.*, (2005) melaporkan penggunaan protein GRA2 pada

Tabel 2. Jumlah kematian dan lama hidup mencit setelah imunisasi dengan protein ESA *T. gondii* dalam rentang pengamatan 10 hari setelah infeksi

| Perlakuan | Jumlah (ekor) dan Persentase Kematian | Lama Hidup (Hari) |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Protein ESA 20,7 kDa | 5 ekor (100%) | 8 hari |
| Protein ESA 35,3 kDa | 5 ekor (100%) | 8 hari |
| Protein ESA 100,9 kDa | 5 ekor (100%) | 8 hari |
| Protein ESA total | 5 ekor (100%) | 8 hari |
| Kontrol | 5 ekor (100%) | 8 hari |

ESA: ekskretori-sekretori antigen

mencit dan protein tersebut bersifat imunogenik. Bivas-Benita *et al.*, (2003) melaporkan bahwa protein GRA1 mampu menginduksi respons imun yang mampu mengatasi infeksi *T. gondii* pada hewan coba karena mampu membangkitkan imun seluler dan humoral. Vercammen *et al.*, (2000) melaporkan protein GRA1 yang disekresikan takizoit dan bradizoit mampu membangkitkan respons imun humoral pada mencit dan manusia. Menurut Scorza *et al.*, (2003), vaksin DNA GRA-1 dapat membangkitkan sel T CD8+ yang sangat berperan mengendalikan infeksi akut terhadap *T. gondii*. Daryani *et al.*, (2003) melaporkan penggunaan ESA pada mencit mampu memproteksi terhadap infeksi *T. gondii*. Vercammen *et al.*, (2000) melaporkan bahwa protein GRA1, GRA7, dan ROP2 mampu membangkitkan respons imun seluler dan humoral pada mencit. Vaksinasi dengan protein tersebut mampu mengurangi mortalitas pada fase akut dan juga mampu menghambat pertumbuhan parasit fase kronis. Beberapa peneliti sudah mencoba melihat potensi protein ekskretori-sekretori dari *dense-granule* (GRA1) (Scorza *et al.*, 2003), GRA4 (Desolme, *et al.*, 2000), protein ROP2 (Leyva *et al.*, 2001), dan ROP1 (Chen *et al.*, 2001). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa proteksi yang berbeda terhadap toksoplasmosis pada mencit. Di antara kandidat vaksin yang ada, protein mikronema MIC3 (90 kDa) yang merupakan bagian protein ESA menunjukkan potensi yang tinggi karena mempunyai sifat melekat kuat pada sel inang baik pada stadium takizoit, bradizoit, dan sporozoit dari *T. gondii* (Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Cerede *et al.*, 2002).

Penyebab utama penggunaan protein ESA *T. gondii* yang tidak efektif pada penelitian ini adalah kemungkinan waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan IgG dalam jumlah yang protektif tidak cukup sehingga mencit perlakuan tidak mampu menahan infeksi *T. gondii* strain RH. Langkah selanjutnya diperlukan penelitian menggunakan protein yang sama tetapi diperlukan *booster* berulang dan waktu yang lama sehingga terbentuk imunoglobulin yang cukup sehingga mampu memproteksi infeksi *T. gondii*.

SIMPULAN

Vaksin protein ESA 20,7 kDa; 35,3 kDa; 100,9 kDa, dan *whole* ESA *T. gondii* hasil pembiakan *in vivo* mampu membangkitkan

respons imun mencit yang ditandai dengan terbentuknya IgG terhadap *T. gondii* tetapi tidak mampu memproteksi infeksi *T. gondii* strain RH.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut pemberian protein ESA *T. gondii* yang bersifat antigenik dalam rentang waktu yang cukup lama sehingga terbentuk IgG yang cukup sehingga mampu memproteksi infeksi *T. gondii* strain RH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mendiknas c.q. Ditjen Dikti c.q. Direktur Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat c.q. Rektor Universitas Airlangga melalui dana DIPA PTN atas pendanaan penelitian ini sesuai Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian Kepada Masyarakat Mono Tahun dan Pengabdian Kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2011 Nomor: 844/H3/KR/2011, Tanggal 10 April 2011. Terima kasih kepada drh Dwi Priyowidodo MP Ketua Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada atas pemberian isolat *T. gondii* strain RH yang digunakan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP, Kovacs JA. 2000. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis* 181:317-324.
- Bivas-Benita M, Laloup M, Versteyhe S, Dewit J, De Braekeleer J, Jongert E, Borchard G. 2003. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary *in vivo* studies. *Int J Pharm* 266:17-27.
- Cerede O, Dubremetz JF, Bout D, Lebrun M. 2002. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J* 21:1-11.

- Chen G, Guo H, Lu F, Zheng H. 2001. Construction of a recombinant plasmid harbouring the rhoptry protein 1 gen of *Toxoplasma gondii* and preliminary observation on DNA immunity. *Chin Med J* 114:837-840.
- Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazed J, Dabritz H, Jessup DA, Gulland F, Grigg ME. 2005. Transmission of *Toxoplasma* : clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35:1155–1168.
- Darde M. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann 1st Super Sanita* 40:57-63.
- Daryani A, Hosseini A.Z, Dalimi A. 2003. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol* 18;113:123-34.
- Desolme B, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 18: 2512-2521.
- Diana J, Vincent C, Peyron F, Picot S, Schmitt D, Persat F. 2005. *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clin Exp Immunol* 141: 475–484.
- Garcia-Reguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, mann T, Beckers CJ, Samyn B, Van Beeumen J, Bout D, Dubremetz JF. 2000. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* 2:353-364.
- Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Sadai MR, Assmar M. 2005. Construction, expression and preliminary immunological evaluation of a DNA plasmid encoding the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Iran Biomed J* 9:1-8.
- Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strain isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35:1411-1414.
- Jin-yan S, Zhi-yu G, Hong-li L, Xiao-li, Hai-long W, Guo-rong Y. 2008. Intranasal immunization with different-dosage *Toxoplasma gondii* ESA induces mucosal and systemic immune responses in mice. *J Path Biol* 03.
- Leyva R, Herion P, Saavedra R. 2001. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 87:70-79.
- Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, Jessup DA, Boothroyd JC, Brownstein D, Conrad PA. 2004. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol* 34:275–284.
- Mufasirin. 1999. Kloning dan ekspresi cDNA gen yang menyandi protein membran *Toxoplasma gondii* isolat Bogor. Tesis. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Mufasirin, Suprihati E. 2010. Potensi protein ekskresi-sekresi antigen (ESA) *Toxoplasma gondii* yang imunogenik hasil pembiakan *In Vivo* pada mencit sebagai kandidat vaksin toksoplasmosis. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun I. Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Rahmah N, Anuar K. 1992. Comparison of three forms of antigens in the demonstration of cell-mediated immune response in murine toxoplasmosis. *Biochem Biophys Res Commun* 189:640-4.
- Scorza T, Dsouza S, Laloup M, Dewit J, De Braekeleer J, Verschuere H, Vercammen M, Huygen K, Jongert E. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8+ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 71:309-316.
- Sibley LD, Boothroyd JC. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82-85.
- Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman S, Verschuere H. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun* 68: 38-45.