



Penentuan LD₅₀ Penyakit Infeksi *Toxoplasma gondii* pada Mencit *balb/c*

Winarto *

ABSTRACT

LD₅₀ determination in toxoplasma gondii infection in balb/c mice

Background: LD₅₀ is a marker of virulence which reflects degree of microorganism pathogenicity. LD₅₀ of every pathogens to be used should be determined in order to choose an appropriate infective dose of agent under the study. *Toxoplasma gondii* RH strain has been maintained in the laboratory by serial passage in mice for several years, in which the biologic and laboratory conditions might have an effect on its virulence. The objective of this study was to determine LD₅₀ of *Toxoplasma gondii* RH strain used for research in Biotechnology Laboratory Gajah Mada University.

Methods: The design of the study was true experiment consisting three groups of 10 female *balb/c* mice aged 8–10 weeks that were infected with 10¹, 10³ and 10⁶ of *Toxoplasma gondii* RH strain/mice respectively, and being followed up to day 18. Homogeneity of mice before infection were analyzed by Levene statistic, while the effects of infection were analyzed by Anova. The number of dead mice in each group were recorded and LD₅₀ was calculated base on proportional distance.

Results: There was no weight difference between groups of mice before infection. The weight increased up to day 6 in group I and II, while group III after day 3 there was weight decrease. LD₅₀ of *Toxoplasma gondii* was 1.39x10³ which belonged to genotype II of pathogenicity classification.

Conclusions: LD₅₀ of *Toxoplasma gondii* was 1.39x10³ which is lower than the original RH strain, and belonged to group II of genotype, which is often reported as the major cause of human and animal infections.

Keywords: LD₅₀, *Toxoplasma gondii*, *balb/c* mice, infection.

ABSTRAK

Latar Belakang: *Toxoplasma gondii* di laboratorium dipelihara dengan cara pasase dari satu mencit ke mencit berikutnya, yang mungkin berpengaruh terhadap virulensinya. LD₅₀ adalah ukuran virulensi suatu mikroorganisme penyebab infeksi, yang harus diketahui apabila akan melakukan penelitian tentang fenomena infeksi pada binatang coba. Tujuan penelitian ini untuk menentukan besar LD₅₀ *Toxoplasma gondii* strain RH yang disimpan dan digunakan untuk penelitian di Laboratorium Bioteknologi UGM yang belum pernah ditentukan nilai LD₅₀nya.

Metode: Disain penelitian adalah eksperimental murni. Tiga kelompok mencit *balb/c* usia 6–8 minggu masing-masing kelompok terdiri dari 10 mencit, diinfeksi *Toxoplasma gondii* strain RH secara berturut-turut tiap kelompok diinfeksi dengan 10¹, 10³ dan 10⁶ toksoplasma/mencit, yang diamati sampai hari ke-18. Sebelum perlakuan ketiga kelompok dilakukan tes homogenitas berat badan mencit dengan statistik Levene. Efek infeksi toksoplasma dianalisis dengan Anova, sedangkan LD₅₀ dihitung berdasarkan jarak proporsi.

Hasil: Sebelum diinfeksi *Toxoplasma gondii*, tidak terdapat perbedaan berat badan mencit pada 3 kelompok. Setelah diinfeksi toksoplasma sampai hari ke-6, berat badan mencit pada kelompok I dan II naik, sedangkan kelompok III pada hari ke-1 sampai hari ke-3 beratnya naik, kemudian setelah hari ke-3 beratnya turun. LD₅₀ *Toxoplasma gondii* strain RH di PAU Bioteknologi UGM didapatkan sebesar 1,39x10³ yang sesuai dengan genotipe II.

Simpulan: LD₅₀ *Toxoplasma gondii* sebesar 1,39x10³ lebih rendah dari strain RH yang sebenarnya dan termasuk genotipe II yaitu yang paling sering dilaporkan sebagai penyebab infeksi pada manusia dan binatang.

* Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr. Sutomo 18 Semarang

PENDAHULUAN

Kemampuan mikroorganisme (kuman, jamur, virus atau parasit) untuk menyebabkan infeksi disebut dengan istilah patogen, sedangkan derajat patogenitasnya disebut dengan istilah virulen. Pengukuran virulensi kuman dapat dilakukan dengan MLD (*minimum lethal dose*) yaitu dosis kuman minimal yang dapat mematikan binatang coba pada waktu yang ditentukan atau LD₅₀ (*lethal dose 50*) yaitu dosis kuman yang dapat mematikan binatang coba sebanyak 50% pada waktu yang ditentukan. Beberapa istilah yang berkaitan dengan pengukuran 50% *end-point* tergantung dari efek yang diamati. Kalau efek yang diamati kejadian infeksi, maka dipakai istilah ID₅₀ (*infective dose 50*), bila bukan kematian atau infeksi tetapi efek lain yang diamati, maka dipakai istilah ED₅₀ (*effective dose 50*). Pada vaksinasi disebut PD₅₀ (*protecting dose 50*) dan pada titrasi virus pada kultur embrio ayam disebut TCD₅₀ (*cytophthic effect dose 50*).¹ Pada umumnya para ahli sepakat bahwa LD₅₀ hanya digunakan untuk menentukan derajat virulensi penyebab infeksi dibidang kedokteran. Pada LD₅₀ yang semakin kecil, maka penyebab infeksi semakin virulen. *Lethal Dose 50* bersifat lebih praktis dikerjakan dan lebih dipercaya hasilnya daripada MLD.¹ Tidak ditemukan pustaka baru yang membicarakan tentang metode penentuan LD₅₀ pada binatang coba karena metode ini merupakan metode yang sudah baku.

Toxoplasma gondii adalah parasit obligat intraseluler yang dapat menginfeksi semua sel berinti sehingga inangnnya sangat luas, mulai dari berbagai hewan sampai manusia. Terdapat 3 morfologi toksoplasma yaitu takhizoit yang membelah dengan cepat dan menyebabkan kerusakan sel, bradizoit yang membelah secara lambat dan berada di dalam kista jaringan serta ookista yang terbentuk setelah melewati infeksi pada kucing dan dikeluarkan bersama feces. Infeksi pada manusia prevalensinya sebesar 20–60%, dapat menyebabkan infeksi hebat pada manusia yang sistem kekebalannya rendah atau imunokompromais sehingga sering ditemukan sebagai penyebab infeksi oportunistik pada penderita HIV-AIDS.² Infeksi pada wanita hamil dapat menyebabkan keguguran, lahir cacat atau infeksi kongenital misalnya retinokhorooiditis toksoplasma.^{2,3}

Adanya *Animal Welfare Acts* tahun 1966 dan aktifis penyayang binatang yang memprotes penggunaan binatang coba, maka ada etika tentang penggunaan binatang coba di laboratorium, diantaranya penggunaan binatang coba yang jumlahnya dibatasi.^{2,4} Sebelum melakukan penelitian untuk mempelajari tentang respon imunologi infeksi pada binatang coba, sebaiknya diketahui terlebih dulu berapa LD₅₀-nya pada binatang coba sehingga dapat dipilih dosis infeksi yang tepat.⁴ Tidak ditemukan informasi tentang ekstrapolasi LD₅₀ toksoplasma dari

binatang yang dapat diterapkan untuk dosis infeksi pada manusia, tetapi dengan diketahuinya LD₅₀, maka dapat diketahui pula virulensinya apakah termasuk genotipe yang virulen atau yang non virulen.

Derajat klinis infeksi toksoplasma pada mencit dapat berbeda, tergantung dari genotipe toksoplasma dan genotipe dari mencit yang digunakan.³ Toksoplasma berdasarkan genotipenya dikenal ada 3 genotipe, yaitu genotipe I, II dan genotipe III. Toksoplasma genotipe I bersifat yang sangat virulen yang dapat menyebabkan kematian mencit walaupun hanya 1 toksoplasma, sedangkan genotipe II dan III termasuk toksoplasma yang non virulen, mempunyai LD₅₀ pada mencit sebesar $\geq 10^3$ toksoplasma.^{3,5,6} Toksoplasma dipelihara di laboratorium dengan cara pasase dari satu mencit ke mencit berikutnya, yang memungkinkan berpengaruh terhadap virulensinya. Tujuan penelitian ini adalah untuk penentuan LD₅₀ *Toxoplasma gondii strain RH* pada mencit balb/c yang disimpan dan digunakan untuk penelitian di laboratorium Pusat Studi Bioteknologi UGM Yogyakarta, yang belum pernah dilakukan penentuan LD₅₀ sebelumnya. Manfaatnya adalah untuk menentukan besar dosis infeksi pada penelitian respon imun mencit terhadap infeksi toksoplasma, apakah akan digunakan dosis infeksi lethal atau dosis infeksi sublethal.

METODE

Metode yang digunakan untuk penentuan LD₅₀ adalah metode Reed dan Muench.^{1,4} Mencit *balb/c* betina berumur 8–10 minggu setelah aklimatisasi dilakukan randomisasi dikelompokkan menjadi 3 masing-masing terdiri dari 10 mencit, diinfeksi dengan *Toxoplasma gondii strain RH*.² Kandang mencit diletakkan di kamar yang mendapatkan penghawaan dan pencahayaan yang baik serta diberi makan dan minum yang cukup. Dosis infeksi yang dipakai ialah untuk kelompok I, II, dan III masing-masing dosis infeksi 10^1 , 10^3 , dan 10^6 *toxoplasma gondii* untuk tiap mencit.

Mencit diamati setiap hari sampai hari ke-18, jumlah kumulatif mencit yang mati pada setiap kelompok dicatat. Homogenitas ketiga kelompok mencit sebelum diinfeksi dianalisis dengan *Lavence statistic* dan penurunan berat badan setelah infeksi dilakukan uji ANOVA.⁷ Besar LD₅₀ dihitung berdasarkan *proportional distance*.^{1,4}

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mencit balb/c sebelum diinfeksi dalam keadaan sehat dan geraknnya aktif. Untuk mengetahui homogenitas dari ketiga kelompok mencit sebelum perlakuan, maka dilakukan perbandingan berat badan, hasilnya terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Berat badan mencit *balb/c* sebelum diinfeksi toksoplasma

Kelompok	Rerata BB/gram	SB	<i>p</i>
I	18,35	3,8379	0,218
II	18,26	3,2534	0,256
III	20,87	0,9817	0,192

Pada Tabel 1 terlihat bahwa rerata mencit kelompok I dan II beratnya adalah sekitar 18 gram, sedangkan kelompok III beratnya 20,87 gram tetapi dengan beda yang tidak bermakna ($p > 0,05$).

Hasil *test of homogeneity of variances* mendapatkan nilai *Levence statistic* sebesar 1,149 dengan nilai $p = 0,332$. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga kelompok mencit

sebelum perlakuan homogen dapat diberi perlakuan yang efeknya dapat diperbandingkan.⁷

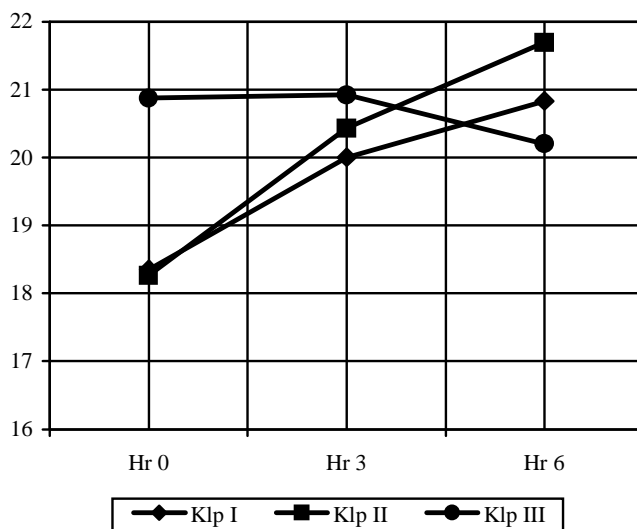
Mencit diinfeksi toksoplasma dengan dosis berbeda, diamati gejala klinis yang terjadi dan jumlah mencit yang mati sampai hari ke-18. Mencit setelah diinfeksi toksoplasma menunjukkan gejala klinis infeksi yaitu bulu tidak mulus tetapi berdiri tegak, badan bergetar, gerak kurang aktif serta nafsu makan dan minum berkurang yang terlihat dengan banyaknya makanan/minuman yang tersisa.

Efek infeksi terhadap berat badan mencit dinilai pada hari 0, hari ke-3 dan hari ke-6, karena mulai hari ke-7 pada kelompok III mencit sudah ada yang mati sehingga kelompoknya tidak utuh lagi. Perubahan berat badan mencit setelah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Berat badan mencit *balb/c* setelah diinfeksi toksoplasma sampai hari ke-6

Kelompok	Infeksi hari ke :					
	0		3		6	
	Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB
Kelompok I	18,35	3,8379	20	3,7906	20,83	3,9564
Kelompok II	18,26	3,2524	20,43	3,5737	21,69	3,3308
Kelompok III	20,87	3,1045	20,92	3,2148	20,2	2,9833
F hitung *	1,884		0,170		0,471	
<i>p</i>	0,171		0,5		0,630	

* ANOVA



Gambar 1. Grafik berat badan mencit setelah diinfeksi toksoplasma diikuti pada hari ke-0, hari ke-3 dan hari ke-6.

Pada Tabel 2 terlihat hasil analisis ANOVA dari berat badan mencit setelah diinfeksi *Toxoplasma gondii*, hasil F hitung untuk hari 0 adalah 1,884 dengan probabilitas 0,171 yang berarti bahwa tidak ada perbedaan berat antara ketiga kelompok mencit pada hari 0. Pada hari ke-3, hasil F hitung adalah 0,170 dengan probabilitas 0,85 yang berarti bahwa tidak ada perbedaan berat antara ketiga kelompok pada hari ke-3. Sedang pada hari ke-6, F hitung adalah 0,471 dengan probabilitas 0,630 yang berarti bahwa tidak ada perbedaan berat antara ketiga kelompok pada hari ke-6.⁷ Jadi rerata berat mencit pada hari 3 dan 6 naik tetapi tidak berbeda bermakna, grafiknya dapat dilihat pada Gambar 1. Pada kelompok I dan II, berat badan mencit *balb/c* naik sampai hari ke-3 dan ke-6, sedangkan pada kelompok III berat badan mencit *balb/c* relatif tetap dari hari 0 sampai hari ke-3, kemudian turun sampai hari ke-6.

Secara klinis gejala infeksi pada mencit terlihat lebih berat pada kelompok III, diikuti oleh kelompok II sedangkan pada kelompok I menunjukkan gejala infeksi ringan. *Toxoplasma gondii strain RH* adalah toksoplasma yang sangat virulent, secara genotipe termasuk tipe I, mempunyai efek *lethal* pada mencit *balb/c* walaupun hanya 1 toksoplasma.³ Dosis infeksi *Toxoplasma gondii strain RH* yang digunakan pada penelitian ini mulai dari 10¹ toksoplasma/mencit sampai 10⁶ toksoplasma/mencit. Efek infeksi toksoplasma pada mencit tersebut tidak terlihat perbedaannya bila yang dibandingkan adalah rerata berat badan, tetapi efek tersebut nampak dari gejala klinis, dan jumlah mencit yang mati, seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah mencit mati pada setiap kelompok yang terdiri dari 10 mencit setelah diinfeksi *Toxoplasma gondii* diamati sampai hari ke-18.

Kelompok	Dosis Toksoplasma/mencit	Jumlah mencit mati pada hari ke:							
		1	7	8	10	12	14	16	18
I	1 x 10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	2
II	1 x 10 ³	0	0	0	0	0	0	2	1
III	1 x 10 ⁶	0	2	3	2	2	1		

Metode Reed dan Muench didasarkan pada asumsi bahwa mencit yang mati pada dosis infeksi tertentu, maka juga akan mati apabila diberikan dosis yang lebih tinggi. Sebaliknya mencit yang tetap hidup pada dosis infeksi tertentu juga akan tetap hidup apabila diberi dosis infeksi yang lebih kecil. Metode ini dipilih karena perhitungannya menggunakan titrasi *end-point* 50%.¹ Metode lain adalah metode Karber (1931) yang menggunakan rumus berbeda, diantaranya faktor yang diperhitungkan adalah dosis infeksi tertinggi yang digunakan dan jumlah total binatang yang mati. Sedangkan metode

Litchfield dan Wilcoxon (1949) menggunakan grafik untuk menentukan median dari dosis efektif (ED₅₀) dan kurva dari persentase dosis.¹

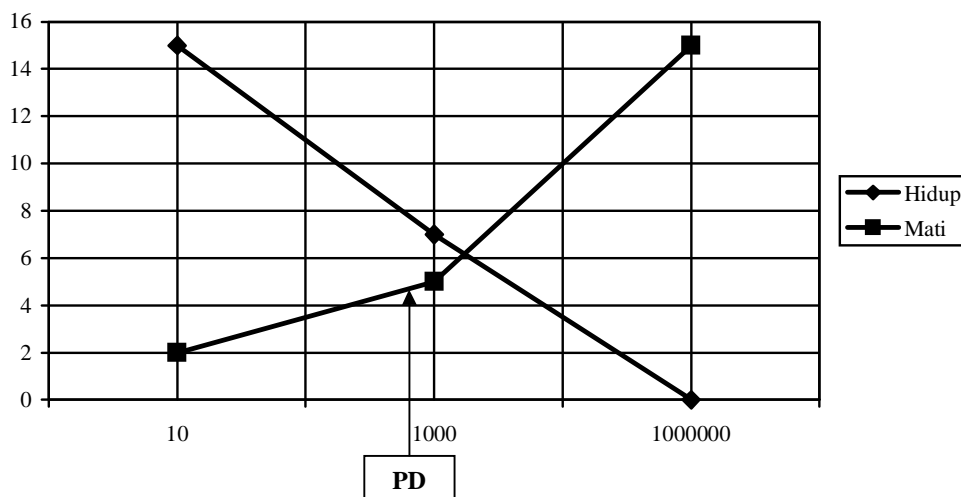
Pada Tabel 3 terlihat pada pengamatan sampai hari ke-18 bahwa pada kelompok I terdapat 2 mencit yang mati, kelompok II terdapat 3 mencit yang mati dan kelompok III semua mencit sudah mati pada hari ke-14. Untuk penentuan LD₅₀, maka dibuat tabel persentase kematian total mencit selama pengamatan, seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase kematian mencit total pada akhir pengamatan

A Dosis infeksi	B Hidup	C Mati	D Jumlah Total		E Persentase mati (%)
			Hidup	Mati	
1 x 10 ¹	8	2	15	2	11,76
1 x 10 ³	7	3	7	5	41,66
1 x 10 ⁶	0	10	0	15	100

Pada tabel 4, kolom A adalah dosis infeksi, kolom B terdiri dari jumlah mencit yang tetap hidup selama penelitian dan kolom C adalah jumlah yang mati selama penelitian pada setiap dosis infeksi. Kolom D merupakan jumlah kumulatif dari mencit yang hidup, yang akan tetap hidup kalau mencit kelompok ini diberikan infeksi dengan dosis yang lebih rendah. Dengan demikian, kolom D merupakan penjumlahan dari kolom B dimulai dari baris paling bawah ke arah atas. Kolom E berisi persentase jumlah mencit yang mati pada setiap dosis infeksi selama penelitian. Kalau mencit pada dosis tertentu mati, maka apabila diberikan infeksi dengan dosis yang lebih tinggi, maka mencit tersebut tentunya juga akan mati, sehingga jumlah di kolom E merupakan penjumlahan kolom C dimulai dari atas ke arah bawah.^{1,4} Pada Tabel 4 nampak bahwa tingkat kematian pada dosis 10³ toksoplasma/mencit, adalah 41,66%, suatu persentase yang masih lebih kecil dari 50% yang berarti berada di bawah LD₅₀. Mestinya LD₅₀ toksoplasma berada di atas dosis 10³ toksoplasma/mencit tetapi di bawah 10⁶ toksoplasma/mencit karena pada dosis 10⁶ angka kematian 100%. Terletak dimanakah LD₅₀? Jumlah mencit yang hidup dan yang mati tersebut di atas kemudian dibuat gambar grafik seperti pada Gambar 2.

Pada Gambar 2 terlihat ada perpotongan antara garis jumlah mencit yang hidup dan garis jumlah mencit yang mati. Pada tempat perpotongan antara garis jumlah mencit hidup dan garis jumlah mencit mati itulah yang dimaksudkan dengan LD₅₀ toksoplasma pada mencit *balb/c*.^{1,4} Kemudian dihitung berapa jarak dari dosis infeksi terendah yang mendekati kematian mencit 50% (10³ toksoplasma/mencit) ke jarak perpotongan 2 garis, yang disebut sebagai *proportional distance*.^{1,4}



Gambar 2. Grafik jumlah mencit hidup dan mencit mati setelah diinfeksi toksoplasma diikuti sampai hari ke-18 dan penentuan *proportional distance*

Jarak *proportional distance* (PD) dihitung dengan rumus sebagai berikut: ¹

$$PD = \frac{50\% - (\% \text{ kematian dosis kuman rendah})}{(\% \text{ kematian dosis kuman tinggi}) - (\% \text{ kematian dosis kuman rendah})}$$

$$PD = \frac{50\% - 41,66\%}{100\% - 41,66\%} = \frac{8,34}{58,34} = 0,143$$

Selanjutnya dapat ditentukan LD₅₀ dengan cara sebagai berikut :

$$\begin{aligned} LD_{50} &= \text{Anti log} [\{\log \text{ dosis kuman rendah}\} + \\ &\quad \{\text{PD} \times (\log \text{ faktor pengenceran})\}] \\ &= \text{Anti log} [\{\log 10^2\} + \{0,143 \times \log 10\}] \\ &= \text{Anti log} [\{\log 10^2\} + \{0,143\}] \\ &= \text{Anti log} [2 + 0,143] = \text{Anti log } 2,143 = \\ &= 1,39 \times 10^3 \end{aligned}$$

LD₅₀ *Toxoplasma gondii* strain RH pada mencit *balb/c* pada penelitian ini didapatkan sebesar 1,39x10³. *Toxoplasma gondii* adalah parasit dengan keragaman genetik (*genetic diversity*) rendah, yaitu perbedaan antara genotipe satu dengan lainnya sebesar 1% atau kurang. Toksoplasma dengan patogenitas tinggi berhubungan dengan infeksi pada mata manusia dan toksoplasmosis yang berat.^{8,9} Howe dan Sibley yang dikutip oleh Fuentes, melakukan analisis gen *Toxoplasma gondii* yang berhubungan dengan SAG2 (*surface antigen 2 locus*) dengan RFLP (*restriction fragmen length polymorphism*) mendapatkan 3 genotipe yaitu genotipe I, II

dan III.¹⁰ Genotipe I adalah *strain RH* yang virulen dengan LD₅₀ sebesar 1 toksoplasma, genotipe II strain Beverly dan Me49 dan genotipe III adalah strain C56 yang non virulen dengan LD₅₀ sebesar >10³ toksoplasma.^{11,12}

Virulensi tipe I dimungkinkan karena toksoplasma mempunyai pertumbuhan dan kemampuan migrasi yang cepat sehingga dapat menyebar diberbagai jaringan dengan akibat rangkaian pelepasan sitokin proinflamasi dan kerusakan sel/jaringan.¹² Infeksi dengan genotipe II menyebabkan diproduksi sitokin IL-12 oleh makrofag yang menyebabkan polarisasi Th1 sehingga infeksi lebih mampu dikontrol oleh tubuh.¹³ Pada umumnya toksoplasma tipe I berhubungan dengan toksoplasmosis kongenital yang hebat dan toksoplasmosis okuler⁹, tipe II paling banyak didapatkan di binatang dan toksoplasmosis pada manusia.^{3,5} Di Amerika Serikat genotipe I didapatkan pada orang imunokompeten dan toksoplasmosis okuler, sedangkan di Eropa genotipe I berhubungan dengan infeksi toksoplasmosis kongenital yang berat.¹¹ Pada umumnya infeksi pada manusia disebabkan oleh genotipe II, dimana genotipe ini paling banyak didapatkan di alam.¹³

Hasil penelitian ini didapatkan LD₅₀ *Toxoplasma gondii* strain RH sebesar $1,39 \times 10^3$ yaitu dosis LD₅₀ yang lebih rendah dari dosis LD₅₀ strain RH yang sebenarnya; dimana dosis ini termasuk genotipe II yang non virulen. Kalau memang benar bahwa *Toxoplasma gondii* yang diteliti adalah strain RH, maka virulensinya saat ini sudah menurun.^{3,5,6} Pada penanaman mikroorganisme secara pasase serial, maka dapat terjadi perubahan fenotipik, diantaranya adalah penurunan virulensi.¹⁴ Proses perubahan ini merupakan suatu proses yang kompleks yang belum sepenuhnya diketahui. Perubahan dapat terjadi karena adanya efek selektif yang menyebabkan perubahan asam amino pada asam nukleatnya sehingga terjadi perubahan populasi yang heterogen dan berakibat dengan penurunan virulensi.¹⁴ Untuk membuktikan apakah toksoplasma tersebut memang termasuk genotipe II atau genotipe yang lain, masih memerlukan pemeriksaan secara biologi molekuler. Walaupun demikian *Toxoplasma gondii* strain RH di Laboratorium Bioteknologi UGM mempunyai potensi dapat menginfeksi manusia sehingga pada saat menanganinya harus hati-hati agar tidak terjadi infeksi, yang merupakan salah satu *laboratory acquired infections*.¹

SIMPULAN

Toxoplasma gondii yang disimpan dan digunakan di Laboratorium Bioteknologi UGM yang dipelihara dengan cara pasase dari satu mencit ke mencit berikutnya mempunyai LD₅₀ pada mencit balb/c lebih rendah dari strain RH yang sebenarnya, yaitu sebesar $1,39 \times 10^3$ yang sesuai dengan LD₅₀ genotipe II yaitu genotipe yang paling sering dilaporkan sebagai penyebab infeksi pada manusia dan binatang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cruickshank R, Duguid JP, Swain RHA. Medical microbiology. 11th ed. ELBS and E & S Livingstone Ltd; 1965.
2. Festing FWM. Isogenic info. c2005. Available from: <http://www.isogenic.info/html/author.html>.
3. Mordue DG, Monroy F, Regina ML, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. The Journal of Immunology. 2001;167: 4574-4584.
4. Dharmana E. LD₅₀ *S. typhimurium* pada mencit CBA dan C57BL/10. Majalah Kedokteran Diponegoro. 1993; 28(4):383-389.
5. Barragan A, Sibley DL. Transepithelial migration of *toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. The Journal of Experimental Medicine. 2002;195(12): 1625-1633.
6. Araujo FG, Slifer T. Different strain of *toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/CA mice. Infection and Immunity. 2003;71(7):4171-4174.
7. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1990;p.130-132.
8. Darde ML. *Toxoplasma gondii* "new" genotypes and virulence. Parasite. 2008;15(3):366-71.
9. Vallochi AL, Muccioli C, Martin MC, Silveira C, Belfort R, Rizzo LV. The genotype of *toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in human in Brazil. Available from: http://www.copyright.com/articles/sd/7b1/00029394/article_00029394_4239.html.
10. Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J. Genotypic characterization of *toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J Clin Microbiol. 2001; 39(4):1566-1570.
11. Saeji JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. TRENDS in Parasitology. 2005;21(10):476-481.
12. Saeji JPJ, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of *toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. Infection and Immunity. 2005;73(2):695-702.
13. Roben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley D. Production of IL-12 by macrophages infected with *toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. The Journal of Immunology. 2004;172:3686-3694.
14. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: students at The University of Hawaii. Am J Trop Med Hyg. 2003;69 (Suppl 6):5-11.