

Perbandingan Uji Serologi Toksoplasmosis dengan Uji Cepat Immunostik, ELISA dan Aglutinasi Lateks

DIDIK T. SUBEKTI dan E. KUSUMANINGTYAS

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. RE Martadinata 30, Bogor 16114, Indonesia

(Ditreima dewan redaksi 5 Agustus 2011)

ABSTRACT

SUBEKTI, D.T. and E. KUSUMANINGTYAS. 2011. Comparison of serological test for toxoplasmosis using Immunostick Assay, ELISA and Latex Agglutination Test. *JITV* 16(3): 224-233.

Many serological methods were developed in order to improve detection and identification of an infectious diseases. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), is a well-known as the most serological technique and widely used for infectious disease diagnoses, especially toxoplasmosis in human and animal. Unfortunately, the technique requires specific tools and expertise that are not always available in the field. In addition, ELISA needs longer process than other techniques for both small and large number of samples. Another serological assay, namely Latex Agglutination Test (LAT) was known as popular and mostly applied in field for toxoplasmosis diagnosis in Indonesia, both for human and animal serum. However, the accuracy of this technique was slightly lower compared to ELISA, especially for weakly seropositive. Recently, an immunostick assay technique was developed as alternative serological method which has high accuracy as ELISA. The immunostick assay was rapid and simple like latex agglutination test. The immunostick assay was evaluated to detect *Toxoplasma gondii* infection in goat serum samples and compared to ELISA and LAT. The immunostick assay had a true agreement 95.88% - 100% against ELISA and their strength of agreement was very good agreement with ELISA ($\kappa = 0.796$; $AC_1 = 0.948$). However, LAT had true agreement only 75.74%, either with ELISA or immunostick assay. The strength of agreement of LAT was moderately agreement with ELISA or immunostick assay ($\kappa = 0.447$; $AC_1 = 0.582$). Therefore, the immunostick assay could become the first choice for rapid serological assay on toxoplasmosis diagnosis, both in the laboratory and in the field.

Key Words: Latex Agglutination, ELISA, Immunostick Assay, FELISA, Toxoplasmosis

ABSTRAK

SUBEKTI, D.T. dan E. KUSUMANINGTYAS. 2011. Perbandingan uji serologi toksoplasmosis dengan Uji Cepat Immunostik, ELISA dan Aglutinasi Lateks. *JITV* 16(3): 224-233.

Beberapa metode diagnosis serologis telah dikembangkan dalam rangka memperbaiki kemampuan diagnosis penyakit infeksius. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), telah diketahui sebagai teknik diagnosa serologis yang digunakan secara luas untuk diagnosis penyakit infeksius, khususnya toksoplasmosis pada manusia maupun hewan. Namun demikian, kelemahan teknik tersebut adalah membutuhkan beberapa peralatan dan bahan khusus serta keahlian yang tidak selalu tersedia di lapang. ELISA juga membutuhkan waktu lama dalam pengujiannya, baik untuk jumlah sampel yang sedikit maupun banyak. Metode serologi yang lain seperti uji aglutinasi latek (UAL) telah diketahui sebagai metode yang populer dan banyak digunakan di lapang untuk diagnosa toksoplasmosis di Indonesia, baik pada manusia maupun hewan. Namun demikian, akurasinya lebih rendah dibandingkan dengan ELISA, terutama untuk deteksi sampel dengan seropositif lemah. Oleh sebab itu, perlu dikembangkan uji cepat imunostik yang diharapkan memiliki akurasi setara dengan ELISA tetapi memiliki kemudahan aplikasi di lapang seperti UAL. Pengujian dilakukan secara bertingkat untuk menguji kemampuan awal uji imunostik dalam mendeteksi serum yang seropositif dan seronegatif sesungguhnya. Selanjutnya pengujian dilanjutkan dengan membandingkan hasil pengujian antar ketiga uji serologis tersebut. Hasil uji menunjukkan bahwa kesesuaian (*true agreement*) antara uji imunostik dengan ELISA berkisar 95,88 - 100%. Derajat kesesuaian antara uji imunostik dengan ELISA sangat baik (*very good agreement*) dengan nilai $\kappa = 0,796$ dan $AC_1 = 0,948$. Sebaliknya, kesesuaian (*true agreement*) antara UAL dengan ELISA maupun uji imunostik hanya sebesar 75,74%. Adapun derajat kesesuaian antara UAL dengan ELISA maupun uji imunostik dikategorikan menengah (*moderately agreement*) dengan nilai $\kappa = 0,447$ dan $AC_1 = 0,582$.

Kata Kunci: Uji Aglutinasi Latek, ELISA, Uji Immunostik, FELISA, Toksoplasmosis

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang banyak ditemukan pada manusia dan hewan. Pada

wanita di Indonesia didapatkan seropositif IgG toksoplasmosis sebesar 28,95% di Nusatenggara Barat sampai 88,23% di Lampung (MA'ROEF dan SOEMANTRI, 2003). Adapun seropositif toksoplasmosis

pada hewan bervariasi, yaitu 24,49% pada ayam kampung (DUBEY *et al.*, 2008) sedangkan pada domba dan kambing berkisar 23,5 sampai 71,97% (SUBEKTI *et al.*, 2005). Secara klinis, toksoplasmosis tidak memiliki gejala yang khas sehingga penetapan diagnosis berdasarkan gejala klinis tidak dapat dijadikan tolak ukur (JIN *et al.*, 2005). Oleh sebab itu, peneguhan diagnosis untuk toksoplasmosis umumnya dilakukan secara serologis, baik pada hewan maupun manusia (FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

Beberapa uji serologis untuk penetapan diagnosa toksoplasmosis, diantaranya adalah uji warna Sabin-Feldman, *indirect immunofluorescent antibody test* (IFAT), *latex agglutination test* (LAT), *indirect hemagglutination* (IHA), dan *the enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang memiliki spesifisitas dan sensitivitas tinggi (SABIN dan FELDMAN, 1948; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; UDONSOM *et al.*, 2010). Beberapa teknik diagnosa serologis tersebut sangat bermanfaat, namun beberapa diantaranya memiliki kelemahan baik dari sensitivitas maupun akurasi, kesederhanaan dan kemudahan aplikasi terutama di lapang. Beberapa contohnya adalah uji warna Sabin-Feldman yang merupakan standar emas pengujian serologis toksoplasmosis (REITER-OWONA *et al.*, 1999), namun teknik ini mengharuskan menggunakan parasit hidup yang virulen (UDONSOM *et al.*, 2010). Teknik uji warna hanya sesuai untuk pengujian di laboratorium referen yang telah memiliki fasilitas baik dan lengkap. Adapun uji aglutinasi latek (UAL) memiliki kemudahan aplikasi baik di laboratorium maupun di lapang namun seringkali menghasilkan hasil positif palsu (*false positive*) sehingga harus diikuti dengan uji tambahan (HOLLIMAN *et al.*, 1989). Uji aglutinasi latek maupun uji warna Sabin-Feldman, keduanya hanya dapat mendeteksi total antibodi tanpa mampu membedakan apakah dari klas IgM atau IgG.

Uji serologis yang banyak diaplikasikan di dunia maupun di Indonesia untuk diagnosa serologis pada manusia dan hewan adalah ELISA dan aglutinasi latek. ELISA merupakan uji serologi yang sensitif dan spesifik, membutuhkan sangat sedikit antigen, dapat menguji banyak sampel dengan mudah di laboratorium (CRUICKSHANK dan MACKENZIE, 1981). Namun demikian, ELISA membutuhkan keterampilan yang memadai, larutan dan peralatan khusus seperti ELISA *reader*, larutan dapar, membutuhkan waktu uji cukup lama (sekitar 4-5 jam) dan enzim yang digunakan memerlukan penanganan rantai dingin serta memiliki banyak tahapan yang berpotensi mengakibatkan kegagalan uji. Pada kondisi yang demikian, maka uji serologis yang multi aplikasi (dapat dilakukan di lapang dan laboratorium dengan mudah), tidak terlalu membutuhkan keterampilan dan peralatan serta

memiliki akurasi yang setara dengan ELISA sangat diperlukan (JIN *et al.*, 2005).

Akhir-akhir ini beberapa penelitian pengembangan teknik diagnosis serologi untuk toksoplasmosis yang berbasis pada modifikasi ELISA dan *Western Blotting* telah dikembangkan untuk mempermudah aplikasinya di lapang. Teknik uji tersebut adalah Uji Cepat Imunokromatografi (*Rapid Immunochromatographic Test*) untuk diagnosis toksoplasmosis menggunakan membran nitroselulosa yang dikembangkan oleh HUANG *et al.* (2004) dan JIN *et al.* (2005). Namun teknik tersebut hanya digunakan untuk mendeteksi satu jenis penyakit saja, misalnya hanya toksoplasmosis. Adapun ROSSI *et al.* (1991) telah mengembangkan teknik diagnosis yaitu Uji Imunostik (*Immunostick Assay*) untuk skistosomiasis yang berbasis pada modifikasi ELISA. Teknik Uji Cepat Imunostik (UCI) merupakan uji serologi cepat yang dapat digunakan di lapang dan masih memungkinkan untuk dikembangkan menjadi uji serologi cepat *multi diseases-multi species*. Berpijak dari latar belakang tersebut dikembangkanlah Uji Cepat Imunostik untuk toksoplasmosis dan penyakit lain dalam satu imunostik (*multi diseases*). Pada studi ini akan membandingkan kemampuan diagnosis serologis toksoplasmosis antara Uji Cepat Imunostik (UCI) atau FELISA (*field ELISA*) dengan ELISA dan Uji Aglutinasi Latek (UAL).

MATERI DAN METODE

Sampel serum

Serum yang digunakan terbagi atas dua kelompok. Kelompok pertama adalah serum seropositif dan seronegatif. Sampel tersebut diuji dengan ELISA dan UAL. Apabila hasil uji dengan ELISA dan UAL dinyatakan positif toksoplasmosis, maka sampel tersebut dinyatakan sampel seropositif. Namun, jika hasil uji dengan ELISA dan UAL negatif toksoplasmosis, maka sampel dinyatakan seronegatif. Adapun jika salah satu uji menyatakan positif dan yang lain menyatakan negatif toksoplasmosis maka serum tersebut dikelompokkan sebagai serum yang tidak diketahui statusnya (*unknown sera*). Sampel demikian adalah sampel yang dikategorikan dalam kelompok kedua. Kelompok kedua adalah serum yang statusnya tidak diketahui (*unknown sera*) atau tidak dapat dipastikan statusnya karena adanya perbedaan hasil pengujian antara ELISA dengan UAL. Jumlah sampel pada kelompok pertama adalah 46 sampel serum kambing sedangkan pada kelompok kedua sebanyak 51 sampel serum kambing. Serum kambing yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari RPH Tanah Abang, Jakarta.

Alur penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam dua tahapan. Tahapan pertama adalah evaluasi Uji Cepat Immunostik (*Immunostick assay* atau diberi nama FELISA, *field ELISA*) untuk mendeteksi sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis. Apabila hasil evaluasi menunjukkan bahwa Uji Cepat Immunostik dapat membedakan sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis dengan baik maka dilakukan uji perbandingan dengan uji serologis lain. Tahap kedua adalah perbandingan antar tiga uji serologis yaitu Uji Immunostik (FELISA), ELISA dan UAL. Pengujian tahap kedua menggunakan 97 sampel yang terdiri dari sampel serum kelompok pertama maupun kelompok kedua.

Penyiapan Antigen dan Immunostik

Takizoit dari *Toxoplasma gondii* galur RH diperbanyak dengan cara dipasasekan secara intraperitoneal ke mencit. Takizoit kemudian dipanen dari cairan peritoneum dan disentrifus dengan kecepatan 2851 g selama 15 menit pada suhu 4°C (Allegra X-15R, Beckman-Coulter, USA). Supernatan kemudian dibuang dan peletnya diresuspensi dalam 1 mL larutan dapar fosfat fisiologis (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) (Sigma Chem., USA) dengan pH 7,2 (konsentrasi akhir adalah 10⁹ takizoit/mL).

Selanjutnya *soluble tachyzoite antigen* (ST-Ag) dari takizoit *T. gondii* diisolasi mengikuti prosedur dari FATOHI *et al.*, (2004) dengan sedikit modifikasi. Secara singkat, 10⁹ takizoit/mL dalam 1 mL PBS dihancurkan dengan sonikator (Branson Sonifier 250, USA). Suspensi takizoit yang telah disonikasi kemudian disentrifus dengan kecepatan 2851 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dan konsentrasi protein dalam supernatan diukur dengan metode Bradford menggunakan *Bio-Rad DC Protein Assay* (Bio-Rad, France). Larutan ST-Ag kemudian dialiokot dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan.

Pada penyiapan immunostik, ST-Ag dilarutkan dalam dapar pelapis karbonat-bikarbonat (*carbonate-bicarbonate buffer*, Sigma Chem., USA) dengan konsentrasi akhir 10 µg/mL. Selanjutnya 5 µL suspensi antigen dilapiskan pada permukaan immunostik (Nunc, Denmark) dan diinkubasi selama 4°C selama semalam. Permukaan immunostik yang telah dilapisi berbagai antigen kemudian dicuci dengan air kran mengalir. Permukaan stik tersebut kemudian direndam dalam larutan dapar blok (*blocking buffer*) yaitu PBS yang mengandung 0,05% Tween 20 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Setelah itu immunostik kembali dicuci dengan air kran mengalir, dikeringkan dan disimpan dalam lemari pendingin (*refrigerator*) sampai akan dipergunakan untuk pengujian. Pada

penyiapan immunostik tersebut antigen ST-Ag dilapiskan pada permukaan immunostik bersama dengan antigen lain yaitu virus BHV1, *Salmonella enteritidis*, protein sekretori-ekskretori *Fasciola gigantica* dan protein solubel *Trypanosoma evansi*. Namun pada artikel ini, data yang dibaca dan dianalisis hanya hasil uji serologi dengan antigen ST-Ag yang dipergunakan untuk diagnosis toksoplasmosis.

Deteksi Toksoplasmosis dengan Uji Cepat Immunostik

Sampel serum diencerkan (1 : 100) dalam PBS pH 7,2 yang mengandung 0,05% Tween 20 dan divortek atau dikocok agar homogen. Selanjutnya, 800 µL sampel serum yang telah diencerkan tersebut dituangkan ke dalam tabung untuk immunostik. Immunostik yang telah siap pakai direndam ke dalam tabung dan di inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu immunostik dikeluarkan dari dalam tabung dan dicuci dengan air kran mengalir. Immunostik selanjutnya dimasukkan dan direndam di dalam tabung yang telah berisi konjugat (1 : 6000) anti goat IgG - HRP (Sigma Chem., USA) serta diinkubasi di suhu ruang selama 10 menit. Setelah perendaman, immunostik kembali dicuci dengan air kran mengalir. Terakhir, immunostik dimasukkan dan direndam di dalam tabung yang telah berisi substrat ODN (*o-Dianisidine*; Sigma Chem., USA) selama tiga menit. Immunostik kemudian dicuci dengan air kran mengalir dan dilihat secara visual. Apabila terdapat perubahan warna oranye bulat di permukaan immunostik pada lokasi pelapisan antigen ST-Ag, maka sampel tersebut dinyatakan seropositif toksoplasmosis. Apabila tidak terbentuk bulatan warna oranye maka dinyatakan seronegatif toksoplasmosis.

Deteksi toksoplasmosis dengan aglutinasi latek dan ELISA

Uji aglutinasi latek menggunakan *Pastorex Toxo Kit* (Bio-Rad, France). Prosedur pengujian dilakukan dengan mengikuti prosedur yang telah ditetapkan produsennya. Secara umum, serum ditetaskan pada permukaan kartu dan dicampur dengan larutan dapar pengencer serta suspensi latek yang telah dilapisi antigen *T. gondii*. Volume serum, larutan dapar pengencer dan suspensi latek berlapis antigen adalah sebanding, yaitu masing-masing sekitar 20 µL. Selanjutnya serum dan suspensi latek dihomogenisasi menggunakan stik plastik dan kemudian di goyang di atas rotator selama 7-10 menit. Reaksi positif apabila terjadi aglutinasi latek seperti butiran pasir, sehingga sampel dapat dinyatakan seropositif toksoplasmosis. Adapun jika tidak terjadi aglutinasi maka sampel dinyatakan seronegatif toksoplasmosis.

Pengujian dengan ELISA mengikuti prosedur yang telah ditetapkan sebelumnya (SUBEKTI *et al.*, 2005).

Tahap awal didahului dengan melapiskan antigen ST-Ag (10 µg/mL dalam 0,005 M *sodium carbonate buffer* pH 9,8) sebanyak 100 µL/sumuran ke dalam lempeng mikro 96 sumuran (*96 well-flat bottomed Maxisorb microplate*; Nunc, Denmark) dan diinkubasi dalam lemari pendingin selama semalam. Setelah inkubasi, lempeng mikro dicuci dengan 0,01M PBS pH 7,2 (200 µL/sumuran) sebanyak 5 kali. Selanjutnya lempeng mikro di blok dengan PBS (0,01M)-BSA 0,5 % dan di inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, lempeng mikro kembali dicuci sebanyak 5 kali dengan PBS (0,01M)-Tween 20 (0,05%) dan diakhiri dengan pencucian menggunakan PBS untuk menghindari terbentuknya gelembung. Setelah pencucian, ditambahkan serum sampel yang diencerkan (1:100) dalam PBS-Tween 20 (0,05%) dan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, dilakukan pencucian kembali sebanyak 5 kali sebagaimana sebelumnya. Berikutnya ditambahkan (100 µL/sumuran) konjugat *anti goat IgG-HRP* (Sigma Chem., USA) yang sebelumnya diencerkan dalam PBS (0,01M)-Tween 20 (0,05%) dengan perbandingan 1 : 6000. Setelah penambahan konjugat, dilakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Pencucian kembali dilakukan sebanyak 7 kali dengan prosedur yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya, ditambahkan substrat TMB/3,3',5,5' - *tetramethylbenzidine* (Sigma Chem., USA) sebanyak 100 µL/sumuran. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2N H₂SO₄ dengan volume yang sama dan digoyang agar homogen. Perubahan warna yang terjadi dibaca dengan Multiskan-EX ELISA Reader (Labsystem, Finland) pada panjang gelombang 450 nm. Sampel dinyatakan seropositif toksoplasmosis apabila nilai kerapatan optik (OD, *optical density*) yang terbaca lebih besar dari nilai OD kontrol negatif + 2 x (SD) kontrol negatif (OD > [rerata OD kontrol negatif] + [2 x SD kontrol negatif]).

Analisis statistik

Data yang telah diperoleh kemudian ditabulasi seperti dalam Tabel 1 dan dianalisis nilai kesesuaiannya dengan *inter reliability agreement* menggunakan *Cohen's Kappa estimator* (κ) dan *Gwet's AC₁ statistic* serta dianalisis kekuatan pengukuran (*power of measurement*). Selanjutnya berdasarkan nilai κ dan AC₁ ditetapkan derajat kesesuaian (*The strength of agreement*) yang diinterpretasi sesuai dengan kriteria yang ditetapkan oleh ALTMAN (1991).

Tabel 1. Format Tabel untuk perbandingan antar dua uji

		Uji serologi 1		
		Seropositif	Seronegatif	
Uji serologi 2	Seropositif	a	b	g
	Seronegatif	c	d	h
		e	f	i

Uji serologi 1 = uji serologi standar yang digunakan sebagai pembanding

Uji serologi 2 = uji serologi yang dianalisis dan akan dibandingkan dengan uji standar

"e = a + c"; "f = b + d"; "g = a + b"; "h = c + d"; "i = e + f = g + h"

Nilai κ dihitung dengan persamaan berikut (VIERA dan GARRETT, 2005; CUNNINGHAM, 2009):

$$\kappa = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Keterangan :

$$p_o = (a) + (d) / (i)$$

$$p_e = [(e) * (g) + (f) * (h)] / (i)^2$$

Adapun nilai AC₁ dihitung dengan persamaan berikut (GWET, 2002 ; GWET, 2008):

$$AC_1 = (p - e\gamma / 1 - e\gamma)$$

Keterangan :

$$p = (a) + (d) / (i)$$

$$e\gamma = 2 p_1(1 - p_1)$$

$$p_1 = [(e) + (g) / 2] / (i)$$

Sebaliknya kekuatan pengukuran (*power of measurement*) dari dua alat uji serologis tersebut juga ditetapkan menggunakan rumus yang dideskripsikan oleh HRIPCSAK dan ROTHSCILD (2005):

$$F_1 = 2 \times \frac{[a/(a+b)] \times [a/(a+c)]}{[a/(a+b)] + [a/(a+c)]}$$

Keterangan :

$$a/(a + b) = \text{presisi atau PPV (positive predictive value)}$$

$$a/(a + c) = \text{sensitivitas atau recall}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi uji cepat imunostik

Sebelum dilakukan perbandingan, maka uji cepat imunostik (UCI) harus dievaluasi menggunakan sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa Kit UCI bekerja

Tabel 2. Data hasil evaluasi Kit Uji Cepat Imunostik (FELISA) pada sampel serum kambing yang telah diketahui statusnya (seropositif atau seronegatif toksoplasmosis)

		ELISA dan UAL*		
		Seropositif	Seronegatif	
FELISA	Reaksi positif	37(1)	0	37
	Reaksi negatif	0	9(2)	9
		37	9	46

* Sampel dinyatakan seropositif yang sesungguhnya (*true seropositive*) dan seronegatif yang sesungguhnya (*true seronegative*) apabila terdapat kesamaan hasil pengujian dengan dua uji, yaitu UAL dan ELISA.

- (1) Menunjukkan bahwa 37 sampel seropositif yang telah ditetapkan dengan dua uji yaitu ELISA dan UAL, dapat dideteksi sebagai sampel seropositif toksoplasmosis oleh Kit Uji Cepat Imunostik (FELISA).
- (2) Menunjukkan bahwa 9 sampel seronegatif yang telah ditetapkan dengan dua uji yaitu ELISA dan UAL, dapat dideteksi sebagai sampel seronegatif toksoplasmosis oleh Kit Uji Cepat Imunostik (FELISA).

dengan baik dan mampu membedakan antara seropositif dan seronegatif dengan baik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa Kit UCI (yang diberi kode FELISA) mampu mengenali seluruh (100%) sampel seropositif dan seronegatif toksoplasmosis dengan baik (Tabel 2). Dengan demikian Kit UCI layak untuk diuji lebih lanjut pada uji perbandingan antar uji serologi.

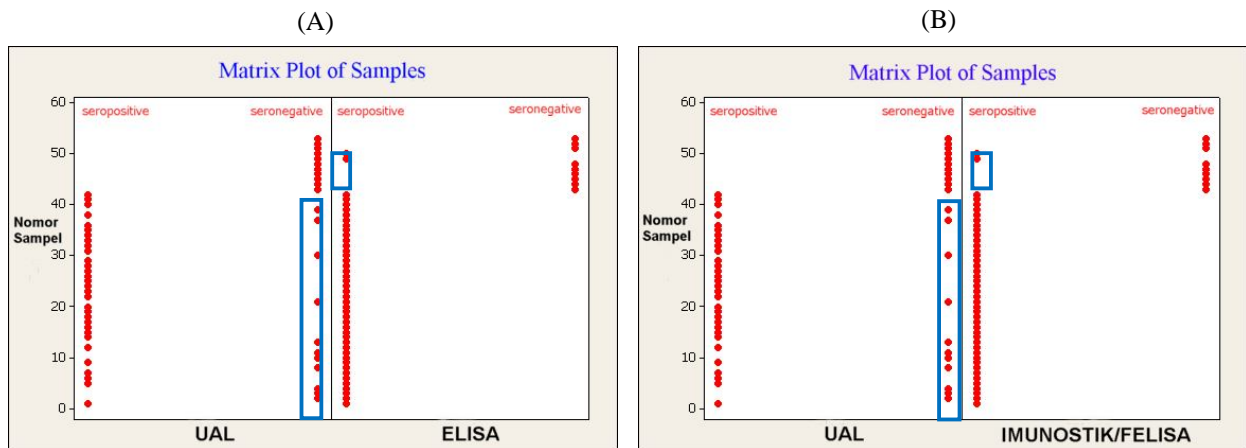
Perbandingan Uji Aglutinasi Latek dengan ELISA dan Uji Imunostik (FELISA)

Pada pengujian menggunakan 53 sampel yang diuji dengan uji aglutinasi latek (UAL) dan dibandingkan dengan uji imunostik (UCI/FELISA) dan ELISA diperoleh hasil bahwa ELISA dan imunostik (FELISA)

memiliki kesamaan. Apabila dibandingkan dengan antara UAL dengan ELISA (Gambar 1) maka akan diperoleh 13 sampel yang menunjukkan hasil uji yang berbeda (24,53%) dan 40 sampel yang menunjukkan hasil uji yang sama (75,47%). Dengan demikian maka kesesuaian uji antara UAL dengan ELISA secara matematis (*true agreement/concordance*) sebesar 75,47%.

Namun, jika dianalisis menggunakan *inter rater reliability test* diperoleh nilai *Cohen's Kappa* (κ) dan *Gwet's AC₁ statistic* sebesar 0,447 dan 0,582. Berdasarkan kriteria yang ditetapkan ALTMAN (1991) maka nilai κ sebesar 0,447 dan nilai *AC₁* sebesar 0,582 bermakna memiliki kesesuaian yang intermediat (*moderately agreement*). Dengan demikian maka kesesuaian antara UAL dengan ELISA maupun UAL dengan imunostik (FELISA) cenderung memiliki derajat kesesuaian yang intermediat (menengah atau sedang).

Apabila diperhatikan secara seksama maka terdapat sedikit perbedaan interpretasi antara hasil kalkulasi kesesuaian secara matematis (*concordance/true agreement*) dan nilai *F₁* dengan berdasarkan κ dan *AC₁*. Nilai *F₁* sesungguhnya serupa dengan κ dan *AC₁* tetapi juga dapat dipergunakan untuk mengetahui akurasi uji pada perbandingan kesesuaian antara dua uji apabila tidak diperoleh kasus seronegatif yang sesungguhnya. Apabila nilai *F₁* dihitung berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 3 maka diperoleh nilai cukup baik yaitu 0,828. Hal ini bermakna bahwa UAL memiliki akurasi uji yang cukup baik terutama untuk mendiagnosa sampel seropositif toksoplasmosis. Kesesuaian uji (*true agreement*) dan nilai *F₁* menunjukkan bahwa UAL memiliki akurasi dan kesesuaian uji serologi cukup baik dengan ELISA maupun imunostik/FELISA. Namun, berdasarkan κ dan *AC₁* maka derajat kesesuaian antara UAL dengan ELISA maupun FELISA tergolong menengah (intermediat).



(A). Perbandingan Uji Aglutinasi Latek (UAL) dengan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
 (B). Perbandingan Uji Aglutinasi Latek (UAL) dengan Uji Imunostik (FELISA, *field ELISA*)
 Data di dalam kotak merupakan nomor sampel yang menunjukkan hasil pengujian yang berbeda (*disagreement*)

Gambar 1. Perbandingan sebaran data hasil uji serologi dari sampel serum kambing (*Matrix Plot of Samples*)

Tabel 3. Data perbandingan hasil uji serologis toksoplasmosis dengan UAL, ELISA dan Imunostik (FELISA) pada sampel serum kambing

		ELISA / FELISA *		
		Seropositif	Seronegatif	
UAL	Seropositif	31(a)	0(b)	31(g)
	Seronegatif	13(c)	9(d)	22(h)
		44(e)	9(f)	53(i)

* Menunjukkan perbandingan antara UAL vs ELISA dan UAL vs FELISA (Imunostik).

Indek Prevalensi (*prevalence index*) : $(a-d)/i = 0,4151$

Proporsi kesesuaian positif (*proportion of positive agreement*): $(2a)/(i + a - d) = 0,8267$

Proporsi kesesuaian negatif (*proportion of negative agreement*): $(2d)/(i - a + d) = 0,6923$

Perbedaan interpretasi antara hasil analisis berdasarkan nilai F_1 dengan κ dan AC_1 dinyatakan umum terjadi pada analisis *inter rater reliability test* (VIERA dan GARRETT, 2005; CUNNINGHAM, 2009). Oleh karena itu, harus diketahui penjelasannya agar dapat dicapai hasil analisis yang tepat. Umumnya, kondisi paradoks tersebut dapat terjadi apabila nilai indek prevalensi (*prevalence index*) dan nilai proporsi kesesuaian positif (*proportion of positive agreement*) tinggi (CUNNINGHAM, 2009). Namun pada kenyataannya, nilai indek prevalensi pada kasus ini rendah yaitu 0,4151, sedangkan nilai proporsi kesesuaian positifnya tinggi yaitu 0,8267. Hal ini memperlihatkan bahwa fenomena paradoks tersebut tidak terkait dengan banyaknya prevalensi kasus positif (seropositif). Fenomena tersebut juga tidak terkait dengan jenis antigen yang digunakan karena ketiga teknik uji tersebut menggunakan antigen yang sama yaitu ST-Ag dari takizoit *T. gondii*.

Apabila dikaji secara mendasar dari sudut pandang imunologi, UAL memiliki kepekaan (sensitivitas) deteksi sampel yang lebih rendah dibandingkan dengan ELISA. Hal demikian disebabkan karena pada UAL untuk dapat mendeteksi suatu sampel seropositif dibutuhkan titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan jika menggunakan ELISA. Penyebabnya adalah kemampuan deskriminasi perubahan warna dan batas interaksi antigen-antibodi pada ELISA sangat peka sehingga dapat mendeteksi perubahan warna dan reaksi antigen-antibodi pada kadar yang rendah dibanding dengan uji UAL. Dengan demikian jika UAL menyatakan seropositif maka ELISA akan menyatakan seropositif sedangkan jika UAL menyatakan seronegatif maka ELISA belum tentu mendeteksi sebagai seronegatif karena kepekaan deteksinya yang lebih tinggi. Sebaliknya jika ELISA menyatakan seronegatif, maka UAL akan menyatakan seronegatif pula. Secara keseluruhan penjelasan tersebut

sesuai dengan hasil yang terlihat pada Tabel 3 dimana sampel yang dinyatakan negatif oleh ELISA seluruhnya terdeteksi negatif oleh UAL, sebaliknya jika UAL menyatakan seronegatif maka ternyata 29,55% (13/44) terdeteksi positif oleh ELISA. Oleh sebab itu, diperkirakan penyebab rendahnya hasil analisis dengan κ dan AC_1 cenderung terkait dengan banyaknya prevalensi seronegatif yang dideteksi oleh UAL. Hal demikian terkait dengan kelemahan UAL dalam mendeteksi sampel seronegatif sebagaimana telah dijelaskan. Fakta tersebut juga didukung dan diperkuat dengan nilai F_1 yang tinggi karena pada persamaannya tidak memperhitungkan sampel seronegatif yang sesungguhnya (*true negative*). Demikian pula jika diperhatikan nilai proporsi kesesuaian negatif (*proportion of negative agreement*) yang tinggi, yaitu 0,6923, maka semakin kuat dugaan bahwa penyebab rendahnya nilai κ dan AC_1 terkait dengan kelemahan UAL untuk mendeteksi seronegatif.

Beberapa perbandingan antar UAL dengan ELISA juga pernah dilaporkan oleh beberapa peneliti. MAZUMDER *et al.* (1988) telah mengembangkan UAL dan ELISA untuk diagnosis toksoplasmosis. Mereka melaporkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas UAL cukup baik dibandingkan dengan ELISA (86% dan 100%). Namun yang perlu diperhatikan adalah bahwa antigen yang digunakan diantara kedua teknik tersebut berbeda, terutama ELISA yang diaplikasikan karena menggunakan takizoit utuh sehingga dapat mengurangi akurasi. SHEKATKAR *et al.* (2010) juga melaporkan bahwa sensitivitas UAL hanya 82,5% dibandingkan dengan ELISA dalam mendiagnosa leptospirosis. Berdasarkan data penelitian tersebut diketahui bahwa kesesuaian uji (*true agreement*), κ , AC_1 dan nilai F_1 adalah 90,66%; 0,76; 0,847 dan 0,825 (SHEKATKAR *et al.*, 2010). Namun yang perlu diperhatikan adalah bahwa kedua kelompok peneliti tersebut lebih dominan menggunakan sampel seronegatif yang telah ditetapkan dengan ELISA. Hal ini tentu akan menyebabkan kesesuaian yang tinggi sebab sampel yang terdeteksi negatif oleh ELISA memiliki peluang yang sangat besar terdeteksi negatif pada UAL. Bahkan khusus pada penelitian SHEKATKAR *et al.* (2010) adalah bahwa 7/110 sampel yang dinyatakan seronegatif IgM terdeteksi seropositif dengan UAL. Hal ini tentu harus dijustifikasi sebelum dilakukan perbandingan karena periode sekresi dan sirkulasi IgM yang pendek dalam darah. Oleh sebab itu, seharusnya ketujuh sampel tersebut direjustifikasi karena kemungkinan seropositif IgG. Sebaliknya jika ELISA juga menyatakan seronegatif IgG tetapi terdeteksi seropositif oleh UAL, maka hal ini merupakan kesalahan diagnosis oleh UAL (*true false positive*). Hal demikian merupakan kelemahan UAL sebagaimana kelemahannya dalam kepekaan menetapkan seropositif oleh ELISA (terutama seropositif lemah) tetapi dinyatakan seronegatif UAL.

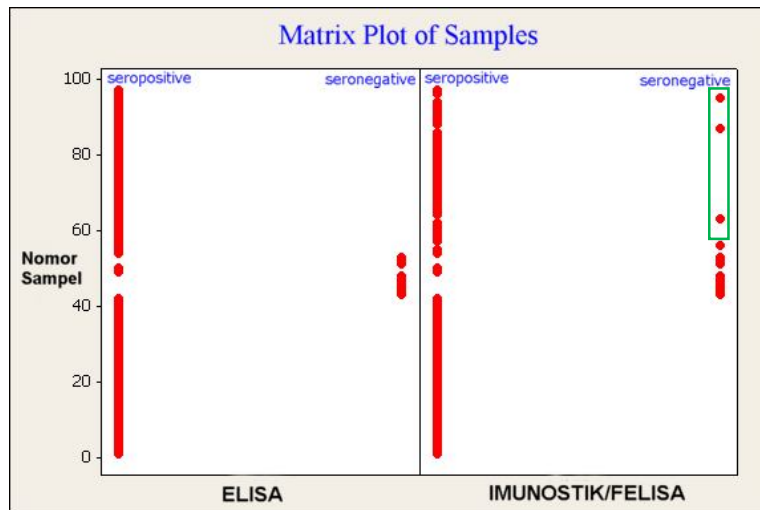
Hasil yang berbeda dilaporkan RYU *et al.* (1996) menyatakan bahwa UAL memiliki kesesuaian yang rendah dengan ELISA ($\kappa = 0,109$) untuk diagnosis toksoplasmosis pada 899 sampel sera dari wanita hamil. Hasil tersebut tentu lebih ekstrim dari penelitian ini dimana pada penelitian ini hanya berkesimpulan adanya kesesuaian yang menengah/intermediate. Hasil yang serupa dengan penelitian ini adalah laporan KISTIAH *et al.* (2011) yang juga menggunakan kit UAL dengan merk yang sama dengan penelitian ini. Kesesuaian antara UAL dengan ELISA untuk deteksi toksoplasmosis pada manusia cukup baik (*good agreement*) berdasarkan nilai κ adalah 0,63 (KISTIAH *et al.*, 2011). Berdasarkan data KISTIAH *et al.* (2011) tersebut dapat dihitung nilai F_1 nya yaitu 0,659. Nilai F_1 tersebut lebih rendah dibandingkan dengan yang diperoleh dalam penelitian ini, namun secara keseluruhan kesimpulannya adalah sama yaitu adanya derajat kesesuaian hasil uji serologis yang menengah/intermediat (*moderately agreement*) antara UAL dengan ELISA untuk deteksi toksoplasmosis.

Perbandingan Kit Uji Cepat Imunostik (FELISA) dengan ELISA

Hasil analisis yang diperoleh menunjukkan bahwa kesesuaian (*true agreement*) antara Imunostik/FELISA dengan ELISA berkisar antara 95,88% sampai 100%(Gambar 2). Perbedaan tersebut terjadinya karena

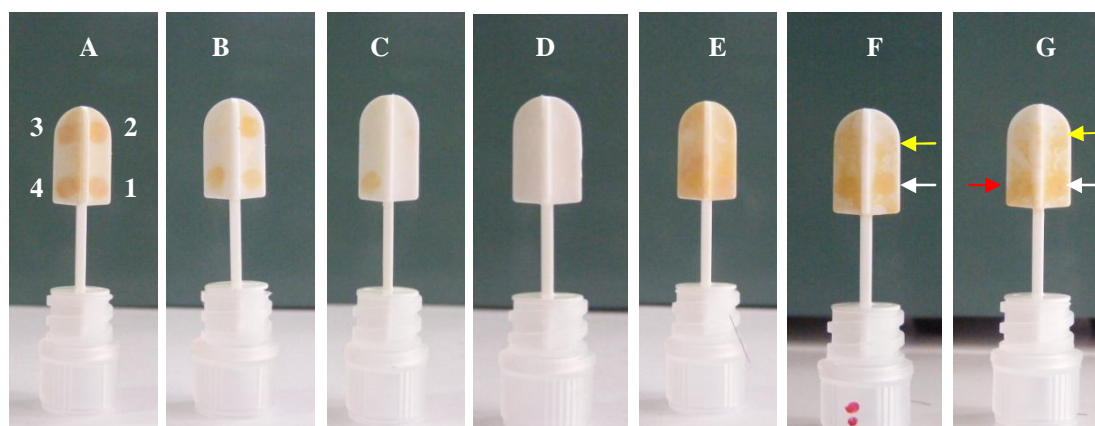
adanya 4,12% (4/97) sampel yang terdeteksi seropositif toksoplasmosis dengan ELISA akan tetapi terdeteksi seronegatif toksoplasmosis oleh Imunostik/FELISA. Namun demikian apabila diperhatikan hasil pengujian dengan Imunostik akan terlihat bahwa keempat sampel tidak menunjukkan adanya bulatan warna oranye (Gambar 3E). Suatu sampel akan dinyatakan seropositif toksoplasmosis apabila terdapat bulatan warna oranye pada posisi nomor 1 sebagaimana terlihat di Gambar 3A). Sebaliknya dinyatakan seronegatif jika tidak terbentuk bulatan warna oranye pada posisi no 1 (Gambar 3C ataupun 3D).

Fenomena yang terlihat pada Gambar 3E kemungkinan disebabkan dua hal. Pertama, fenomena demikian seringkali dijumpai pada sampel seronegatif sesungguhnya (*true negative*) tetapi proses pencucian selama tahap pengujian tidak dilakukan dengan baik sehingga masih terlihat kotoran yang menyebabkan reaksi nonspesifik (*non specific background*). Kedua, kualitas sampel serum yang diperoleh tidak terlalu baik sehingga akan mengakibatkan reaksi non spesifik meskipun pencucian selama tahap pengujian dilakukan dengan baik dan sempurna. Kondisi kedua dipertimbangkan sebagai sampel seronegatif apabila pengujian ulang menghasilkan hasil serupa dengan indikasi tidak ditemukan adanya bulatan oranye diantara warna latar tersebut. Contoh sampel yang memiliki indikasi adanya bulatan oranye walaupun memiliki reaksi latar nonspesifik dapat dilihat pada Gambar 3F dan G.



Data di dalam kotak merupakan nomor sampel yang menunjukkan hasil pengujian yang berbeda (*disagreement*)

Gambar 2. Perbandingan sebaran data hasil uji serologis dari 97 sampel serum kambing (*Matrix Plot of Samples*) menggunakan Imunostik/FELISA dengan ELISA



Posisi nomor:

(1). Deteksi toksoplasmosis; (2) deteksi IBR; (3) Deteksi tripanosomiasis; (4) deteksi fasciolosis

(A). Sampel yang dinyatakan seropositif untuk empat jenis penyakit termasuk toksoplasmosis

(B). Sampel dinyatakan seropositif tiga jenis penyakit kecuali tripanosomiasis

(C). Sampel yang dinyatakan seropositif fasciolosis saja dan reaksi latar non spesifik (*non specific background*)

(F). Sampel dinyatakan seropositif toksoplasmosis (panah putih) dan fasciolosis namun dinyatakan seronegatif IBR (panah kuning) dan tripanosomiasis dengan reaksi latar non spesifik

(G). Sampel serupa dengan sampel pada Gambar 3.F. namun bulatan oranye pada lokasi nomor 4 lebih samar (panah merah)

Gambar 3. Foto Immunostik untuk diagnosis multi penyakit yang dinyatakan seropositif dan seronegatif toksoplasmosis pada serum kambing

Empat sampel yang dideteksi dengan imunostik dapat dipertimbangkan sebagai sampel seronegatif toksoplasmosis meskipun terdeteksi seropositif oleh ELISA. Hal demikian terjadi karena kelemahan teknik ELISA yaitu adanya kemungkinan munculnya deteksi positif palsu (*false positive*). Pada ELISA, positif palsu tidak dapat diketahui sejak awal karena hanya tampak sebagai perubahan warna substrat yang terbaca sebagai nilai kerapatan optik (OD, *optical density*) oleh spektrofotometer. Sebaliknya, pada imunostik/FELISA justru dapat diketahui dan dijustifikasi karena terlihat secara visual serta dapat dibedakan apakah warna tersebut adalah reaksi latar non-spesifik atukah reaksi warna yang positif berupa bulatan berwarna oranye. Melalui justifikasi tersebut dapat ditetapkan bahwa keempat sampel seropositif toksoplasmosis yang diuji dengan ELISA merupakan seropositif palsu dan seharusnya adalah seronegatif toksoplasmosis. Dengan demikian kesesuaian (*true agreement*) antara imunostik dengan ELISA dipertimbangkan mencapai 100%.

Analisis perbandingan antara imunostik/FELISA dengan ELISA berdasarkan kesesuaian hasil uji serologi menggunakan κ , diperoleh nilai 0,7959 dan AC_1 dengan nilai 0,9484. Berdasarkan skala pada ALTMAN (1991), maka derajat kesesuaian hasil uji serologis antara Imunostik dengan ELISA adalah baik (*good agreement*) jika mengacu pada nilai κ dan sangat baik (*very good agreement*) apabila mengacu pada AC_1 . Adapun skor F_1 yang bernilai 0,9768 bermakna bahwa akurasi imunostik/FELISA sangat baik. Hal ini juga sejalan

dengan nilai akurasi, spesifisitas dan sensitivitas uji yang dilakukan terhadap 97 sampel sera, yaitu 95,88; 100 dan 95,46% (Tabel 4). Laporan mengenai perbandingan antara teknik uji serologi menggunakan imunostik/FELISA dibandingkan dengan ELISA saat ini masih sangat terbatas. Namun demikian, Miwa *et al.* (2009) melaporkan bahwa kesesuaian (*concordance/true agreement*) hasil uji serologis antara STICKELISA (uji imunostik) dengan ELISA terhadap pengukuran konsentrasi IL6 dan IL8 pada sera manusia adalah 91 dan 85%. Hasil tersebut tidak terlalu berbeda jauh dengan penelitian ini yang memperoleh kesesuaian hasil uji serologi toksoplasmosis antara Imunostik/FELISA dengan ELISA sebesar 95,88%.

Tabel 4. Data perbandingan hasil uji serologi toksoplasmosis dengan ELISA dengan Imunostik (FELISA) pada sampel serum kambing

		ELISA		
		Seropositif	Seronegatif	
Imunostik/ FELISA	seropositif	84(a)	0(b)	84(g)
	seronegatif	4(c)	9(d)	13(h)
		88(e)	9(f)	97(i)

Indek prevalensi (*prevalence index*): $(a-d) / i = 0,7732$

Proporsi kesesuaian positif (*proportion of positive agreement*): $(2a) / (i + a - d) = 0,9767$

Proporsi kesesuaian negatif (*proportion of negative agreement*): $(2d) / (i - a + d) = 4,5$

Sensitivitas (*sensitivity*): $[(a)/(e)] * 100\% = 95,46\%$

Spesifisitas (*specificity*): $[(d)/(f)] * 100\% = 100\%$

Akurasi (*accuracy*): $\{[(a)+(d)]/(i)\} * 100\% = 95,88\%$

Walaupun secara umum nilai akurasi dan skor kesesuaian hasil uji serologi antara imunostik (FELISA) dan ELISA sangat baik, namun nilai κ yang sedikit lebih rendah menunjukkan adanya hal yang perlu diperhatikan. Rendahnya nilai κ dibandingkan dengan nilai dan skor hasil uji lainnya kemungkinan disebabkan oleh permasalahan pada serum positif dan negatif. Imunostik mampu melakukan justifikasi suatu sampel seronegatif yang akan terdeteksi seropositif palsu pada ELISA karena adanya reaksi latar nonspesifik. Hal tersebut berpotensi mengakibatkan adanya perbedaan, karena ELISA akan mendeteksi seropositif palsu sedangkan imunostik akan merevisi menjadi seronegatif melalui justifikasi secara visual. Fakta demikian juga terlihat dari tingginya nilai indeks prevalensi pada Tabel 4. Proporsi kesesuaian positif dan negatif yang diduga mengindikasikan adanya masalah pada penetapan seropositif dan seronegatif sebagaimana telah dijelaskan. Namun demikian hal ini tidak perlu dikhawatirkan karena dapat ditetapkan solusinya. Apabila sampel terdeteksi seronegatif oleh Imunostik dengan reaksi latar nonspesifik tetapi terdeteksi seropositif oleh ELISA maka sampel tersebut adalah seronegatif, karena adanya kemungkinan yang kuat terdapat reaksi positif palsu pada hasil uji ELISA. Sebaliknya apabila suatu sampel terdeteksi seronegatif tanpa reaksi latar nonspesifik (bersih), tetapi terdeteksi seropositif oleh ELISA, maka sampel cenderung dinyatakan seropositif karena hasil pembacaan spektrofotometer dipertimbangkan lebih peka dibandingkan dengan pengamatan visual oleh mata. Adapun diluar kedua kondisi tersebut maka harus dilakukan pengulangan uji dan evaluasi prosedur uji karena imunostik (FELISA) dan ELISA memiliki teknik dasar pengujian imunologi yang sama.

KESIMPULAN

Uji aglutinasi latek memiliki kesesuaian yang menengah (*intermediate*) dengan ELISA maupun uji Imunostik/FELISA ($\kappa = 0,447$; $AC_1 = 0,582$; *true agreement* 75,74%). Adapun uji cepat imunostik (FELISA) memiliki kesesuaian yang sangat baik dengan ELISA ($\kappa = 0,796$; $AC_1 = 0,948$; *true agreement* 95,88% - 100%). Uji cepat imunostik dipertimbangkan sebagai pilihan utama karena memiliki akurasi yang baik dan dapat menjustifikasi sampel yang menunjukkan positif atau negatif palsu. Adapun UAL dipertimbangkan sebagai uji pendamping konfirmatorik untuk Imunostik/FELISA ataupun ELISA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai oleh Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia melalui Program Riset Insentif untuk Peningkatan Kapasitas Peneliti dan Perekrayasa (PIPKPP) dengan No. 79.10/LB.620/I/2/2010 dan No. 187.2/LB.620/I/3/2011.

DAFTAR PUSTAKA

- ALTMAN, D.G. 1991. Practical Statistics for Medical Research. Chapman and Hall, London. pp. 403-409.
- CRUICKSHANK, J.K. and C. MCKENZIE. 1981. Immunodiagnosis in parasitic disease. *Br. Med. J.* 283: 1349-1350.
- CUNNINGHAM, M. 2009. More than Just the Kappa Coefficient: A Program to Fully Characterize Inter-Rater Reliability between Two Raters. SAS Global Forum 2009, Statistics and Data Analysis. Paper 242-200. pp. 1-7.
- DUBEY, J.P., L.T.T. HUONG, B.W.L. LAWSON, D.T. SUBEKTI, P. TASSI, W. CABAJ, N. SUNDAR, G.V. VELMURUGAN, O.C.H. KWOK and C. SU. 2008. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italy, Poland and Vietnam. *J. Parasitol.* 94: 68-71.
- FATOOHI, A.F., G.J.N. COZON, P. GONZALO, M. MAYENCON, T. GREENLAND, S. PICOT and F. PEYRON. 2004. Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 535-541.
- FIGUEIREDO, J.F., DEISE A.O. SILVA, DAGMAR D. CABRAL and J. R. MINEO. 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the Region of Uberlândia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 96: 687-692.
- GWET, K.L. 2008. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *Br. J. Math. Statist. Psychol.* 61: 29-48.
- GWET, K.L. 2002. Kappa Statistic is not Satisfactory for Assessing the Extent of Agreement Between Raters. *Statistical Methods for Inter-Rater Reliability Assessment*, No. 1, April 2002.
- HOLLIMAN, R.E., J. JOHNSON, K. DUFFY and L. NEW. 1989. Discrepant toxoplasma latex agglutination test results. *J. Clin. Pathol.* 42: 200-203.
- HRIPCSAK, G. and A.S. ROTHSCHILD. 2005. Agreement, the F-Measure, and Reliability in Information Retrieval. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 12: 296-298.

- HUANG, X., X. XUAN, H. HIRATA, N. YOKOYAMA, L. XU, N. SUZUKI and I. IGARASHI. 2004. Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG2 for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Clin. Microbiol.* 42: 351-353.
- JIN, S., Z.Y. CHANG, X. MING, C.L. MIN, H. WEI, L.Y. SHENG and G.X. HONG. 2005. Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies of human *Toxoplasmosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 198-201.
- KISTIAH, K., J. FREAN, A. BARRAGAN, J. WINIECKA-KRUSNELL and A. KARSTAEDT. 2011. An evaluation of Pastorex Toxo Latex Agglutination Test as a screening tool for *Toxoplasma gondii* antibody detection in a South African setting. *Ann. Aust. Coll. Trop. Med.* 12: 25-27.
- MA'ROEF, S. and S. SOEMANTRI. 2003. Toxoplasmosis in Indonesian pregnant woman (Further study following family health surveillance on 1995). *Cermin Dunia Kedok.* 139: 41-45.
- MAZUMDER, P., H.Y.K. CHUANG, M.W. WENTZ and D.L. WIEDBRAUK. 1988. Latex Agglutination Test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2444-2446.
- MIWA, K., N. SHIBAYAMA, T. MORIGUCHI, J. GOTO, M. YANAGISAWA, Y. YAMAZAKI, G. JUNG and K. MATSUDA. 2009. A rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with two modes of detection for measuring cytokine concentration. *J. Clin. Lab. Anal.* 23: 40-44.
- REITER-OWONA, I., E. PETERSEN and D. JOYSON. 1999. The part and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull. WHO* 77: 929-935.
- ROSSI, C.L., V.C.W. TSANG and J.B. PILCHER. 1991. Rapid, low-technology field - and laboratory - Applicable Enzyme Linked Immunosorbent Assays for immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 183-1841.
- RYU, J.S., D.K. MIN, M.H. AHN, H.G. CHOI, S.C. RHO, Y.J. SHIN, B. CHOI and H.D. JOO. 1996. Toxoplasma antibody titers by ELISA and indirect latex agglutination test in pregnant women. *Korean J. Parasitol.* 34: 233-238.
- SABIN, A.B. and H.A. FELDMAN. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660-663.
- SHEKATKAR, S., N.S. ACHARYA, B.N. HARISH and S.C. PARIJA. 2010. Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of leptospirosis. *Indian J. Med. Microbiol.* 28: 238-240.
- SUBEKTI, D.T., W.T. ARTAMA and T. ISKANDAR. 2005. Progress on toxoplasmosis occurrence and diagnostic technologies. Proc. on National Workshop of Zoonotic Diseases. Bogor, 15 September 2005. Centre Research Institute for Animal Science, Agricultural Agency for Research and Development, Indonesian Ministry of Agriculture, Bogor. pp. 253-264.
- UDONSOM, R., R. BUDDHIRONGAWAT and Y. SUKTHANA. 2010. Is sabin-feldman dye test using *T. gondii* tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies? *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 41: 1059-1064.
- VIERA, A.J. and J.M. GARRETT. 2005. Understanding interobserver agreement: The kappa statistic. *Fam. Med.* 37: 360-363.