

UTILIZAÇÃO DA PCR *NESTED* PARA DETECÇÃO DE *Toxoplasma gondii* NO SANGUE DE OVELHAS EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS*

Érica Paes Barreto Xavier de Moraes¹⁺, Antônio Carlos de Freitas², Mateus Matiuzzi da Costa³, José Wilton Pinheiro Jr⁴ e Rinaldo Aparecido Mota⁵

ABSTRACT. de Moraes E.P.B.X., Freitas A.C., Costa M.M., Pinheiro Jr J.W. & Mota R.A. [Nestled PCR utilization for *Toxoplasma gondii* detection in the blood of experimentally infected sheep]. Utilização da PCR nested para detecção de *Toxoplasma gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(4):329-334, 2013. Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mail: ericaxmoraes@globo.com

The aim of this study was to evaluate the sensitivity of the PCR and nested PCR for *T. gondii* detection in the blood of experimentally infected sheep with tachyzoites through the semen. Blood samples of 41 sheep were taken, which were infected with different dosages: G1 - 6.5×10^4 tachyzoites; G2- 4×10^7 tachyzoites and G3- control group. For the anti-*T.gondii* antibodies research the Indirect Immunofluorescence (IIF) technique was used. For the PCR and nested PCR, primers derived from *B1* gene were used. Seroconversion was observed only for the infected group. In the PCR, *T. gondii* DNA was detected in 40% of the infected sheep blood samples, and in the nested PCR, in 93.3% of the samples. In the G3, no antibodies were detected, as well as parasitic DNA in neither of the animals. It is possible to conclude that the nested PCR is more sensitive for the *T. gondii* detection in the blood of animals experimentally infected through the semen, presenting superior results in comparison to those of the PCR and might be successfully used in studies like this one.

KEY WORDS. Diagnose, toxoplasmosis in sheep, molecular technique.

RESUMO. Objetivou-se com esse estudo avaliar a sensibilidade da PCR e PCR *nested* na detecção de *T. gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas com taquizoítos via sêmen. Foram colhidas amostras de sangue de 30 ovelhas infectadas com diferentes doses: G1- $6,5 \times 10^4$ taquizoítos; G2- 4×10^7 taquizoítos e G3- grupo controle. Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada

a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). Para o PCR e PCR *nested* foram utilizados iniciadores derivados do gene *B1*. Observou-se soroconversão apenas dos grupos infectados. Na PCR, detectou-se o DNA do *T. gondii* em 40% e na PCR *nested* em 93,3% amostras de sangue das ovelhas infectadas. No G3 não foi detectado anticorpos e DNA parasitário em nenhum animal. Conclui-se que a PCR

* Recebido em 31 de julho de 2012.

Aceito para publicação em 30 de agosto de 2013.

¹ Médica-veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE), Av. Bom Pastor, s/n, Garanhuns, PE 55296-901, Brasil. ⁺ Autora para correspondência. E-mail: ericaxmoraes@globo.com - bolsista PNP/Capes.

² Biólogo, PhD. Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brasil. E-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br

³ Médico-veterinário, DSc. Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rua José de Sá Manissoba, s/n, Centro, Petrolina, PE 56304-970. E-mail: mmatiuzzi@hotmail.com

⁴ Médico-veterinário, DSc. UAG, UFRPE, Av. Bom Pastor, s/n, Garanhuns, PE 55296-901. E-mail: jrwilton@uag.ufrpe.br

⁵ Médico-veterinário, DSc. Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

nested é mais sensível na detecção de *T. gondii* no sangue de animais experimentalmente infectados via sêmen, mostrando resultado superior ao da PCR e podendo ser utilizada com êxito em estudos dessa natureza.

PALAVRAS-CHAVE. Diagnóstico, toxoplasmose ovina, técnica molecular.

INTRODUÇÃO

Nos ovinos, *Toxoplasma gondii* é descrito como um dos principais responsáveis por problemas reprodutivos em rebanhos no mundo. Os transtornos acontecem quando a fêmea se infecta durante a gestação, podendo ocorrer desde reabsorções embrionárias iniciais e abortos até fetos malformados e crias debilitadas e fracas, variando a intensidade de acordo com a fase gestacional em que a fêmea se encontra (Dubey 1986, Weissmann 2003).

A toxoplasmose ovina é diagnosticada rotineiramente por métodos sorológicos, bem como através dos métodos diretos como o bioensaio em camundongos, exame histopatológico, imunohistoquímica e PCR (Pereira-Bueno et al. 2004). A parasitemia tem sido detectada por meio dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR, com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em cultura de tecido (Meireles 2001).

Além de outros fatores, a sensibilidade e a especificidade da PCR dependem não só da sequência-alvo no DNA do parasito, mas também dos iniciadores escolhidos (Spalding et al. 2006). Avanços recentes no conhecimento do genoma de *T. gondii* tornaram possível a utilização da PCR para detecção do parasito. Estas técnicas se fundamentam na amplificação específica de determinados genes, como *B1* e *P30* que codificam o principal antígeno de superfície do protozoário, RNA ribossomal (rRNA) (Ellis 1998, Kompalic-Cristo et al. 2005, Spalding et al. 2006). Além do fragmento de 529pb (Homanet al. 2000) e um seguimento repetitivo de DNA não-codificante, TGR 1E, 1^a, 2 e 4 (Cristina et al. 1991).

Diversos estudos demonstraram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de diferentes fluidos corporais. Na Medicina Veterinária, especificamente em ovinos, são utilizadas principalmente em amostras de sangue (Esteban-Redondo & Innes 1998, da Silva & Langoni 2001), tecidos de fetos abortados (Duncanson et al. 2001, Terry et al. 2001, Masala et al. 2003,

Pereira-Bueno et al. 2004) e placentas (Duncanson et al. 2001, Terry et al. 2001, Masala et al. 2003), com protocolos diferentes, não havendo uma uniformidade da técnica para o diagnóstico molecular da toxoplasmose ovina. A utilização do método complementar PCR *nested*, como uma segunda amplificação a partir do produto gerado da primeira amplificação tem demonstrado resultados superiores aos alcançados apenas em uma única PCR. O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização da PCR *nested* na detecção de *T. gondii* no sangue de ovelhas experimentalmente infectadas via sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quarenta e uma (41) ovelhas da raça Santa Inês com histórico reprodutivo de fertilidade satisfatória. Todos os animais foram sorologicamente negativos para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii*, *Clamidophyla abortus*, *Neospora caninum* e *Brucella ovis*. Foram constituídos três grupos experimentais (G1, G2 e G3) com 15, 15 e 11 animais, respectivamente. As fêmeas foram infectadas via sêmen através de inseminação laparoscópica utilizando diferentes doses: G1 que foram inseminadas com sêmen contaminado com $6,5 \times 10^4$ taquizoítos; G2 com sêmen com 4×10^7 taquizoítos e G3 com sêmen sem taquizoítos (grupo controle).

Para a confirmação da infecção por *T. gondii* foram realizados exames sorológicos aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando-se anticorpos anti-IgG-ovina conjugado ao isotiocianato fluoresceína. Diluições do soro na razão quatro (1:64 a 1:4096) foram testadas e reações na diluição 1:64 ou maior foram consideradas positivas (Camargo 1974).

Para a detecção do DNA do *T. gondii* foram colhidas amostras de sangue total com EDTA aos 0, 7, 14, 21, 28 dias após a infecção, utilizando-se a técnica de PCR seguida do PCR *nested*.

Todas as amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial "Qiagen DNA EasyBlood and Tissues Kit" (Qiagen®, Hilden - Alemanha), utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8% com marcador de peso molecular 1Kb, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. Após a extração do DNA, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 10µM de cada iniciador, 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Promega) de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico das etapas de reações foram feitas em um termociclador MJ-96G (BiocycleCo. Ltd, Hangzhou - China) e seguido de acordo com o protocolo descrito em Spalding et al. (2006). Todas as amostras negativas e controles foram submetidos a PCR *nested*, utilizando 1µL do produto da primeira amplificação e adicionado à mistura de reação em um volume final de 12,5µL contendo 10µM de cada iniciador, 4,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix de acordo com o protocolo do fornecedor. O ci-

clo das reações consistiu de uma desnaturação do DNA inicial a 95°C (4 minutos) e seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 1 minuto para a extensão e um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os pares de iniciadores utilizados são fragmentos da sequência do gene *Bl*. Para a primeira amplificação, foram utilizados TOXO-C1/TOXO-N1, amplificado em 197pb. E para a segunda amplificação foram utilizados TOXO-C2/TOXO-N2, amplificado em 97pb (Burg et al. 1989, Spalding et al. 2006). O controle positivo foi feito utilizando-se suspensão de lavados intra-peritoneal de camundongos previamente infectados com taquizoítos da cepa RH na concentração 10⁴taquizoítos/mL para posterior extração do DNA parasitário. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Para confirmação da identidade dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciamento de DNA. Os fragmentos de DNA analisados apresentaram valores de similaridade e identidade com as sequências já existentes no GenBank que variaram de 93 a 99% com E = 1e -100.

Medidas para evitar contaminação entre amostras foram seguidas conforme recomendações de Kwok (1990) desde a colheita das amostras até a obtenção dos resultados através da corrida eletroforética do produto da PCR *nested*.

Para a Análise de Sensibilidade e Especificidade foi avaliado os resultados para obter sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo da PCR X PCR *nested*.

RESULTADOS

Na sorologia realizada em amostras de sangue colhidas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção experimental foi possível observar a soroconversão dos animais dos grupos infectados, sendo 100% (15/15) os animais do G2 e 33,3% (5/15) do G1, confirmando a infecção via sêmen. Nenhuma ovelha do G3 apresentou anticorpos contra *T. gondii*.

No resultado da primeira amplificação (PCR), observou-se o DNA do *T. gondii* em 40% (12/30) das amostras de sangue. Na PCR *nested*, 93,3% (28/30) das amostras foram positivas (Figura 1). No G3 não foi detectado DNA parasitário em nenhum animal. Observou-se que o teste mais sensível foi a PCR *nested* (100%), entretanto a PCR convencional demonstrou especificidade de 100% (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Amato Neto et al. (1995) citaram que o diagnóstico clínico da toxoplasmose é difícil de ser realizado pelo fato de as falhas reprodutivas serem consequência de várias doenças infecciosas (Vidotto 1992), ressaltando a necessidade do emprego do diagnóstico laboratorial para elucidar as prováveis etiologias. A toxoplasmose ovina é diagnosticada rotineiramente por métodos sorológicos, principalmente a IFI, MAD e ELISA, bem como através dos métodos diretos como o bioensaio em camundongos, histopatológico, imunohistoquímica e PCR (Pereira-Bueno et al. 2004).

Os testes sorológicos possuem grande utilização pelo tipo de coleta e processamento das amostras, embora possuam desvantagens em relação às técnicas diretas de diagnóstico por detectar apenas imu-

Tabela 1. Resultado comparativo do PCR X PCR *nested* na detecção de *Toxoplasma gondii* no sangue de ovelhas infectadas com taquizoítos via sêmen.

Parâmetros	PCR (%)	PCR <i>nested</i> (%)
Sensibilidade	60	100
Especificidade	100	20
V.P.P	100	71,4
V.P.N	55,4	100

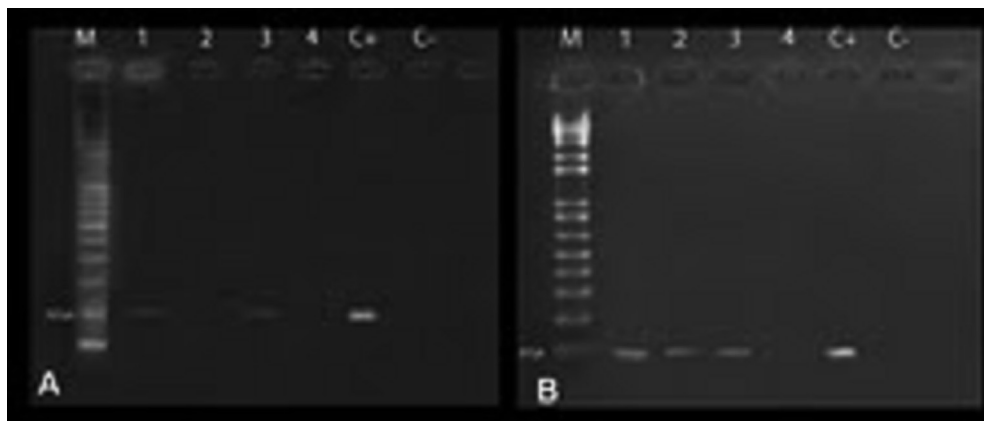


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos de amplificação por PCR *nested* de *T. gondii* em amostras de soro, tecidos fetais e placentários na primeira (A) e segunda (B) amplificações. Onde: Marcador de massa molecular de 100pb DNA Ladder, Promega®, (M), Amostras positivas na primeira (1 e 3) e segunda (1, 2 e 3) amplificações, Amostra negativa (4), Controle positivo (C+) e Controle negativo (C-).

noglobulinas presentes no soro sanguíneo (Da Silva et al. 2002). A IFI é o teste sorológico de maior uso atualmente, embora estudos comparativos ainda discutam a sua escolha em relação ao MAD e ELISA (Da Silva et al. 2002, 2003). Apesar da sua grande utilização essa técnica não confirma a causa do aborto por *T. gondii* como acontece na detecção do agente no tecido fetal ou placentário (Owen et al. 1998, Hurtado et al. 2001, Masala et al. 2003).

De acordo com Meireles (2001) a parasitemia na infecção por *T. gondii* tem sido detectada pela PCR, com a vantagem de demonstrar maior sensibilidade quando comparado ao isolamento do parasito em cultura de tecido. Embora a utilização do sangue circulante para este propósito ainda não seja utilizada no diagnóstico de toxoplasmose ovina, em humanos estudos comprovaram seu papel importante no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita (Wong & Remington 1994, Spalding et al. 2002, Kompalic-Cristo et al. 2005) e em pacientes imunodeprimidos (Filice et al. 1993, Guy & Joynson 1995, Franzen et al. 1997). Um aspecto relevante da escolha do sangue é a capacidade de realizar o diagnóstico da doença na fase aguda através da detecção dos taquizoítos no sangue circulante, o que torna a PCR uma ferramenta para diagnóstico precoce, antes dos sinais clínicos que nem sempre são aparentes (Ho-Yenet al. 1992, Kompalic-Cristo et al. 2005). Em experimentação com animais o estudo através do sangue circulante também foi relatado um importante papel, permitindo a detecção do parasito e apontando uma interpretação mais exata da fase da infecção por *T. gondii* como observado nesse estudo onde as amostras de sangue foram colhidas semanalmente para a detecção da parasitemia.

Quando se analisaram os resultados da PCR em relação a primeira e a segunda amplificação, observou-se que a PCR *nested* mostrou-se mais sensível (100%) indicando que é um ótimo exame para triagem. Hurtado et al. (2001) também demonstraram que a PCR *nested* foi mais sensível e específica e pode ser utilizada para confirmar casos duvidosos. Neste estudo foram utilizados pares de iniciadores derivados do gene *B1* capazes de detectar 10 taquizoítos/mL e apenas 1 taquizoíto/mL para o PCR e PCR *nested*, respectivamente, conforme Spalding et al. (2006). Esta sensibilidade do *nested* explica a alta percentagem (93,3%) das amostras somente detectadas após a segunda amplificação.

Variações nas sequências-alvo utilizadas na PCR para detecção de *T. gondii* são descritas. Entre estas

citam-se o gene *P30* (Robert et al. 1996), porções dos espaçadores internos transcritos do RNA ribossomal (Hurtado et al. 2001). Da mesma forma o gene *B1* de função desconhecida e altamente repetitivo e conservado é o mais utilizado (Kompalic-Cristo et al. 2005). O PCR *nested* aumentou a especificidade e a sensibilidade da reação uma vez que o DNA-molde da segunda amplificação está em concentrações mais elevadas e os *primers* da segunda etapa têm menos chances de anelamento em sequências inespecíficas, dada a redução do tamanho do molde (Rodrigues et al. 2006).

O uso da PCR *nested* em muitos casos é discutível pelo tempo e custo dispendidos. Contudo, Montoya et al. (2009) ao utilizar o PCR *nested* com os mesmos iniciadores aqui utilizados, obtiveram ótimos resultados descrevendo que a quantidade de DNA parasitário extraído na maioria das vezes não é suficiente para ser detectado apenas na primeira PCR. Os resultados aqui obtidos mostram que o *nested* aumentou o número de amostras positivas em 53,3% em relação a PCR convencional. Devido à elevada sensibilidade do PCR *nested*, Kompalic-Cristo et al. (2005) descreveram que as amostras devem ser processadas com precaução para se evitar contaminações de ácidos nucleicos do parasito por outras fontes, embora Spalding et al. (2006) ressaltaram que sua alta especificidade limita estes possíveis falsos-positivos. Outra precaução que deve ser discutida é em relação ao método de extração do DNA genômico. Existem vários protocolos de extração do DNA, mas dependendo da qualidade das amostras iniciais, alguns não conseguem extrair e purificar o DNA com acurácia, deixando resquícios de substâncias inibidoras, como principalmente o grupamento heme presente em amostras de sangue total que inibe a ação da enzima *Taq* DNA-polimerase (Rodrigues et al. 2006). O uso de *kits* comerciais de extração tem resultado numa melhor qualidade do DNA extraído, principalmente por obterem uma etapa de purificação mais eficiente em relação aos protocolos laboratoriais (Kalia et al. 1999, McOrist et al. 2002). Hurtado et al. (2001) ressaltaram que as contaminações ocorrem devido à manipulação dos amplicons formados na primeira PCR para a PCR *nested* e para minimizar isto indicam a realização da técnica do “único tubo” agregado aos cuidados de manipulação em ambiente descontaminado, além da realização de cada etapa em áreas distintas. Neste estudo a técnica foi realizada conforme recomendações de Kwok (1990).

Bastien (2002) ressalta que o diagnóstico por PCR está longe de ser padronizado e ainda não existe um consenso que defina as condições ideais desta técnica, mas este caminho está sendo seguido através de estudos e discussões. Dessa forma conclui-se que a PCR *nested* utilizada nesse estudo é mais sensível na detecção do parasito no sangue em ovelhas experimentalmente infectadas por *T. gondii*, mostrando resultado superior ao da PCR e podendo ser utilizada com êxito em estudos dessa natureza.

Agradecimentos. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo no. 472459/2008-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amato Neto V., Campos R., Barazzi R.G. & Duarte M.I.S. *Toxoplasmose*. 4ª ed. Editora Salvier, São Paulo, 1995. 154p.
- Bastien P. Diagnosis Molecular: diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96:205-15, 2002.
- Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P. & Boothoyd J.C. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan. *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1787-1792, 1989.
- Camargo M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Pat. Clín.* 10:143-169, 1974.
- Cristina N., Liaud M.F., Santoro F., Oury B. & Ambroise-Thomas P. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Exp. Parasitol.*, 73:73-81, 1991.
- da Silva A.V. & Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.*, 97:191-198, 2001.
- da Silva A.V., Cutolo A.A. & Langoni H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. *Arq. Inst. Biol.* 69 7-11, 2002.
- da Silva A.V., Cunha E.L.P., Meireles L.R., Gottschalk S., Mota R.A. & Langoni H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, 33:115-119, 2003.
- Dubey J.P. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, 22:177-202, 1986.
- Duncanson P., Terry R.S., Smith J.E. & Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, 31:1699-1703, 2001.
- Ellis J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neosporacanium* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 28:1053-1060, 1998.
- Esteban-Redondo I. & Innes E.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.*, 28:1459-1466, 1998.
- Filice G.A., Hitt J.A., Mitchell C.D., Blackstad M. & Sorensen S.W. Diagnosis of toxoplasma parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31:2327-31, 1993.
- Franzen C., Altfeld M., Hegener P., Hartmann P., Arendt G., Jablonowski H., Rockstronh J., Diehl V., Salzberger B. & Fatkenheuer G. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2639-41, 1997.
- Guy E.C. & Joynson H.M. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.*, 172:319-22, 1995.
- Homan W.L., Vercammen M., De Braekeleer J. & Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, 30:69-75, 2000.
- Ho-Yen D.O., Joss A.W., Balfour A.H., Smyth E.T., Baird D. & Chatterton J.M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J. Clin. Pathol.*, 45:1572-1572, 1992.
- Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., Barandika J. & García-Pérez A.L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.*, 102:17-27, 2001.
- Kalia A., Rattan A. & Chopra P.A. Method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Analytic. Biochem.*, 275:1-5, 1999.
- Kompalic-Cristo A., Britto C. & Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J. Bras. Pat. Med. Lab.*, 41:229-35, 2005.
- Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carry-over, p.142-145. In: Innis M. A., Gelfan D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (Eds), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego California, 1990.
- Landis J.R. & Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-174, 1977.
- Masala G., Porcu R., Madau L., Tanda A., Ibba B., Satta G. & Tola S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.*, 117:15-21, 2003.
- McOrist A.L., Jackson M. & Bird A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods*, 50:131-139, 2002.
- Meireles L.R. *Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo*. Dissertação (Ciências), Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 141p. (Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde.../tesefinal.pdf>>)
- Montoya A., Miró G., Mateo M., Ramírez C. & Fuentes I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.*, 160:159-162, 2009.
- Owen M.R., Clarkson M.J. & Trees A.J. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Vet. Rec.*, 142:445-448, 1998.

- Pereira-Bueno J., Quintanilla-Gozalo A., Perez-Perez V., Alvarez-Garcia G., Collantes-Fernandez E. & Ortega-Mora L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.*, 121:33-43, 2004.
- Robert F., Gavinet M.F., Tourte-Schaefer C. & Dupouy-Camet J. Intérêts et limites de la polymerasechainreaction dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 11:176-182, 1996.
- Rodrigues J.J.S., Silva R.C. & Siqueira M.M. Toxoplasmose, p.16-40. In: Rossetti M.L., Silva C.M.D., Rodrigues J.J.S. (Eds), *Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- Spalding S.M., Amendoeira M.R.R., Coelho J.M.C. & Angel S.O. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. *J. Bras. Pat. Med. Lab.*, 38:105-110, 2002.
- Spalding S.M., Angel S.O., Amendoeira M.R.R. Toxoplasmose, p.102-111. In: Rossetti M.L., Silva C.M.D., Rodrigues J.J.S. (Eds), *Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- Terry R.S., Smith J.E., Duncanson P. & Hide G. MGE-PCR: a novel approach to the analysis of *Toxoplasma gondii* strain differentiation using mobile genetic elements. *Int.J. Parasitol.*, 31:155-61, 2001.
- Vidotto O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. *Semina: Cienc. Agr.*, 13:69-75, 1992.
- Weissmann J. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Can. Vet. J.*, 4:322-324, 2003.