

## UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DE BOVINOS

*Márcia Cristina de Sena Oliveira<sup>1</sup>*

### 1. Introdução

Nos últimos 100 anos a detecção, identificação e caracterização de agentes de muitas doenças, têm dependido da habilidade de se cultivar ou purificar os organismos em laboratório. O cultivo de microrganismos pode ser visto como um processo de amplificação biológica utilizado para verificação de características morfológicas, bioquímicas ou metabólicas que definem um grupo específico ou uma espécie individualmente. As técnicas microscópicas permanecem como padrão para o diagnóstico de muitos parasitas, apesar de serem trabalhosas e necessitarem de pessoal bem treinado para a identificação e interpretação dos exames, particularmente para parasitas cuja morfologia é similar em diferentes espécies ou estão em baixo número na amostra.

A utilização de características fenotípicas é adequada a uma grande quantidade de microrganismos e parasitas presentes em amostras para análises com fim de diagnóstico. No entanto, um dos maiores problemas para a identificação de patógenos é que muitos necessitam de rápido transporte e meios de cultura especiais. Além disso, algumas cepas de bactérias no início do cultivo podem apresentar alterações fenotípicas quanto ao metabolismo de algumas substâncias que são usadas para testes bioquímicos de diagnóstico, a exemplo do que ocorre com cepas de meningococos que não são capazes de metabolizar a maltose em cultivos iniciais, o fazendo posteriormente.

Os métodos de diagnóstico baseados no genótipo apresentam uma série de vantagens em relação aos que utilizam características fenotípicas. A principal vantagem é que as técnicas moleculares aumentam a sensibilidade e especificidade do processo de detecção e reduzem a subjetividade inerentes à interpretação de dados morfológicos e biológicos. O DNA essencialmente não varia através de estágios diferentes do ciclo de vida da maioria dos microrganismos e parasitas causadores de doenças.

Na prática, seqüências alvo de DNA ou RNA específicos de microrganismos e parasitas são detectados basicamente por dois métodos: hibridização da seqüência homóloga com DNA marcado e amplificação enzimática da seqüência alvo por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para posterior análise do produto amplificado. Essas técnicas têm possibilitado o avanço significativo no conhecimento relativo a sistêmica, epidemiologia, imunologia, interação parasita-hospedeiro e desenvolvimento de vacinas recombinantes dos diversos agentes de doenças.

---

<sup>1</sup> Pesquisadora em Sanidade Animal. Em brapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP. Endereço Eletrônico: marcia@cpps.e.br

## **2. Genom a de parasitas de interesse veterinário**

Com o avanço rápido dos estudos de genética molecular muita ênfase tem sido dada a predisposição genética a doenças. Resultados de pesquisa identificam locus associados a predisposição a várias enfermidades, e de certa maneira, o estudo das doenças parasitárias e infecciosas ficaram em segundo plano. No entanto, essas doenças podem ser vistas com o "desordens genéticas adquiridas horizontalmente", no qual seqüências de ácidos nucleicos originárias de agentes patogênicos são responsáveis por produzir reação inflamatória e doença (Reiman & Persing, 1996).

O seqüenciamento do genoma de muitos microrganismos e parasitas serve de base para o estudo não somente da espécie analisada, com o de muitas espécies relacionadas a elas. O *Caenorhabditis elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma seqüenciado e representou uma imensa fonte de pesquisa para muitos outros helmintos (Anon, 1998). Todo o conhecimento gerado a partir do seqüenciamento do genoma de parasitas serve como base para análises funcionais de novos genes descobertos. Os resultados obtidos no projeto *schistosoma* disponibilizaram informações que foram utilizadas no estudo de parasitas de interesse veterinário, com o *Fasciola hepatica*. Outros projetos- genoma também direcionados para doenças humanas, tiveram ampla aplicação em pesquisas de parasitas de animais, com os projetos *Leishmania*, *Plasmodium* e *Entamoeba* e *Brugia malayi*. Atualmente, cerca de oito projetos genoma de parasitas estão em execução e muitos outros fazem parte de uma lista de prioridades com o *Eimeria* spp. e *Toxoplasma goondi* (Prichard & Tait, 2001).

## **3. Desenvolvimento de "primers" para reações de PCR**

Algumas técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de "primers" ou seqüências iniciadoras para PCR. A seqüência do gene 18S rDNA é comumente utilizado para o desenvolvimento de "primers", devido a sua disponibilidade (<http://ma.uia.ace.be>) para um grande número de protozoários e outros parasitas (Morgan & Thompson, 1998). Os "primers" podem ser facilmente designados a partir dessas seqüências, porém, devido a grande conservação observada nesses genes a ocorrência de reações cruzadas com outros organismos pode ocorrer. Um método alternativo é por meio da construção de bibliotecas de DNA genômico. Esse método é caro e demanda tempo, necessitando de grande quantidade de DNA, que pode ser difícil de se obter dependendo do microrganismo em questão. O uso da técnica de amplificação de DNA polimórfico ao acaso (RAPD) desenvolvida independentemente por Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990) tem sido uma opção mais simples para ser utilizada. Essa técnica de tecta polimorfismos em seqüência de nucleotídeos nos testes de PCR, sem a necessidade de informação prévia sobre a seqüência desse nucleotídeo. Com essa técnica é baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise. Muitos dos produtos gerados pelo RAPD-PCR são derivados de seqüências repetidas do DNA, portanto espécie-específicas e dessa maneira adequados para o delineamento de técnicas de diagnóstico (Williams et al., 1990).

Dessa maneira bandas geradas por RAPD-PCR podem ser eluídas do gel, sua especificidade pode ser testada por hibridização e então clonada e sequenciada e a partir dessas seqüências os primers podem ser designados e sintetizados (Morgan & Thompson, 1998).

#### **4. Preparação das amostras**

O isolamento e purificação de ácidos nucleicos de amostras de agentes de doenças é uma importante etapa para se conseguir alta eficiência de amplificação e especificidade nas reações de PCR. Para as reações de hibridização a mesma observação se aplica, já que pode ser difícil de se obter amostra de DNA genômico em quantidade suficiente e pura, de muitos estágios de alguns parasitas. Os helmintos são particularmente difíceis de se obter boa amostra de DNA, devido a presença de cutícula e substâncias que precipitam junto com os ácidos nucleicos durante o seu isolamento (Gasser et al., 1998).

Existem vários métodos para extração de ácidos nucleicos que podem ser usados para parasitas e microrganismos, no entanto, devido a pequena quantidade de DNA presente nesses agentes, é necessário a otimização do processo. Segundo Gasser et al. (1998) 0,1 pg de rDNA de *Oesophagostomum* spp. é uma quantidade adequada para ser utilizada em amplificação por meio de PCR.

Para extração de DNA, amostras contendo o agente são homogeneizadas em tampão contendo RNase, as células são submetidas a lise e a amostra é digerida com proteinase K. A partir daí o DNA pode ser extraído com fênol, precipitado com etanol e dissolvido em água purificada e esterilizada ou tampão aquoso.

Precauções são necessárias na extração de RNA devido à sua característica de ser facilmente degradável. Dessa maneira o congelamento rápido em nitrogênio líquido é usado para inativar rapidamente as ribonucleases, que geralmente podem se manter estáveis por longos períodos, não requerendo co-fatores para sua ativação. Todo o material utilizado na colheita das amostras deve ser livre dessas enzimas, sendo que a utilização de luvas é obrigatória. Enquanto o material está ainda congelado um agente desnaturante com o fênol ou guanidina é adicionado, e dessa maneira, após a lise das células e digestão das proteínas, o RNA pode ser fracionado e separado de outras macromoléculas. As amostras de DNA ou RNA também podem ser obtidas por meio da utilização de kits para purificação, produzidos por diversos laboratórios. Estes kits podem tornar o processo de extração mais fácil e rápido.

#### **5. Reações de hibridização de ácidos nucleicos**

O aquecimento de uma solução de DNA a temperaturas ao redor de 90-100°C assim como a exposição a pH extremamente alcalino, provoca o rompimento da estrutura de dupla hélice do ácido nucleico. Esse processo chamado de desnaturação foi considerado irreversível por um longo tempo, até que foi demonstrado que as fitas simples complementares podiam ser novamente dispostas em dupla hélice pelo processo

reverso, denominado renaturação ou hibridização. A partir desse conhecimento fitas simples de DNA puderam ser utilizadas com sondas para se determinar a presença de qualquer sequência de DNA ou RNA. Fragmentos de ácidos nucleicos podem ser identificados por transferência de RNA total ou de DNA genômico para membranas de nitrocelulose, nas quais as reações de hibridização são realizadas empregando-se sondas moleculares específicas ao gene de interesse. Tal procedimento experimental pode ser realizado com DNA e RNA, sendo denominados "southern" e "northern blotting", respectivamente (Gabriel, 2001).

A técnica de hibridização de DNA foi utilizada por Buening et al. (1990) para detectar DNA específico de *Babesia bigemina*. Esses autores construíram uma biblioteca de DNA recombinante que continha seqüências repetitivas do genoma de *B. bigemina*. Após a clonagem, a sonda selecionada hibridizou apenas com o DNA genômico de *B. bigemina*, não o fazendo com DNA de *B. bovis* e outros hemoparasitas. Além disso, verificaram que essas seqüências se conservavam em várias cepas geográficas com as provenientes do México, Porto Rico, Costa Rica e Kênia. Nos ensaios sobre sensibilidade verificou-se que parasitemias da ordem de 0,001% podiam ser detectadas com o uso dessa sonda. A técnica de hibridização também foi utilizada por Hodgson et al. (1992) para estimar a susceptibilidade de ninfas e adultos de *Boophilus microplus* à infecção por *B. bigemina*. Nessas técnicas, com o DNA hibridizado é detectado por marcação radioativa, alguns inconvenientes como os relacionados ao manuseio de isótopos radioativos, aos altos custos do equipamento e à exigência de pessoal especializado, constituem graves limitações. Esses problemas incentivaram o desenvolvimento de testes utilizando marcação não radioativa com digoxigenina. Entretanto, esta metodologia quando aplicada ao diagnóstico de hemoparasitas apresentou o inconveniente de reduzir a sensibilidade do teste (Aoytes et al., 1991). Os testes de hibridização de DNA para fins de diagnóstico foram abandonados porque dependem essencialmente da quantidade de DNA do agente presente na amostra e a sensibilidade desses testes são comparáveis à dos exames microscópicos.

## **6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), na qual uma determinada região do genoma de qualquer organismo pode ser multiplicada em milhões de cópias, possibilitou o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e com alta especificidade. Essa técnica é considerada a base do desenvolvimento de uma nova geração de métodos de diagnóstico. A alta sensibilidade, especificidade, facilidade de execução e análise de um grande número de amostras simultaneamente, fazem dessa técnica uma opção atrativa para diagnóstico e utilização em levantamentos epidemiológicos, entre outros estudos com agentes de doenças (Morgan & Thompson, 1998).

As técnicas baseadas na reação de cadeia da polimerase (PCR) têm sido empregadas com sucesso em diversos estudos, como para a detecção de *Cryptosporidium* em água (States et al., 1997) e em casos clínicos de criptosporidiose (Leng et al., 1996); diagnóstico específico de *Plasmodium* spp. (Ayyanathan & Datta, 1996) e estudos epidemiológicos em malária (Roper et al., 1996); diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* (Troll et al., 1997); diagnóstico de *Tritrichomonas foetus* (Ho et al., 1994); diferenciação de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (Lally et al., 1996); detecção de *Trypanosoma* spp. no hospedeiro vertebrado (Katakura et al., 1997) e sua prevalência nos hospedeiros invertebrados (Masiga et al., 1996), entre outros.

Testes baseados em PCR, desenvolvidos para a detecção de *Babesia* spp., têm demonstrado sensibilidade 100 a 1.000 vezes maior que o limiar de detecção em microscopia óptica (Böse et al., 1995). Com isso, oligonucleotídeos são disponíveis para a detecção de diferentes espécies com o *Babesia gibsoni* (Fukumoto et al., 2001), *Babesia microti* (Skotarczak & Cichocka, 2001), *Babesia equi* e *Babesia caballi* (Battsetseg et al., 2001, 2002) e têm sido utilizados para pesquisa dos protozoários tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados.

Figueroa et al. (1992) desenvolveram uma técnica de PCR específica para *B. bigemina*, utilizando um fragmento clonado de rDNA repetitivo para designar dois pares de "primers". O primeiro par, foi utilizado para amplificar um fragmento de DNA com 278 pares de bases (pb) e o segundo, para hibridizar com um sítio interno da sequência inicialmente amplificada. A reação de amplificação da sequência do DNA de *B. bigemina* obtida de cultura "in vitro", seguido da reação de hibridização do ácido nucleico amplificado, mostrou que o fragmento de 278 pares de bases pôde ser detectado quando quantidades tão pequenas quanto 100 fg de DNA genômico foram utilizados. Padrões idênticos de amplificação foram obtidos em testes em que se utilizaram várias cepas de *B. bigemina*, de diferentes procedências. Além disso, com essa sequência não amplificou o DNA de amostras de *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, seis espécies de bactérias e de leucócitos bovinos, mostrou-se bastante específica.

A técnica de PCR desenvolvida por Figueroa et al. (1992) foi utilizada em vários estudos conduzidos em várias partes do mundo: Hermans et al. (1994); Smeenk et al. (2000) no Zimbábue e Almeria et al. (2001) na Espanha.

Recentemente, Oliveira (2002) utilizou os "primers" designados por Figueroa et al. (1993) para desenvolver um teste de "nested PCR" (nPCR) para o diagnóstico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em amostras de sangue de bovinos, em fêmeas adultas e ovos de *Boophilus microplus*. Os "primers" internos de hibridização, foram utilizados para uma nova reação. A sensibilidade estimada para as reações de PCR para *Babesia bigemina* foi de  $6 \times 10^3$  eritrócitos parasitados em  $18 \times 10^6$  eritrócitos, que corresponde a uma parasitemia de 0,00003%. Nas reações de nPCR a sensibilidade estimada foi de 0,0000003%.

## **7. PCR "multiplex"**

A técnica de "multiplex" foi desenvolvida com a finalidade de, com um único teste, altamente específico, promover a diferenciação entre várias espécies ou gêneros simultaneamente (Zarlenga & Higgins, 2001). Essa forma de PCR envolve a amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo por reação, pela mistura de múltiplos pares de "primers". Essa técnica é especialmente útil para análise de amostras que contêm parasitas cuja distinção morfológica é difícil ou se apresentem em número muito baixo. Desse modo, "primers" altamente específicos são usados para amplificar seqüências conhecidas do DNA, produzindo padrões únicos para cada espécie.

Vários trabalhos foram conduzidos utilizando essa técnica para diferenciar parasitas: *Taenia saginata* de *Taenia asiatica* (Zarlenga et al., 1991), *Haemonchus contortus* e *Haemonchus placei* (Zarlenga et al., 1994), espécies do gênero *Trichinella* (Zarlenga et al., 1999), espécies do gênero *Leishmania* (Belli et al., 1998).

Figueiroa et al. (1993) desenvolveram um PCR "multiplex" para detecção de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em sangue bovino. A sensibilidade do teste, avaliada por meio da hibridização do ácido nucleico, foi de 0,00001% de eritrócitos infectados para *B. bovis* e *B. bigemina* e 0,0001% para *Anaplasma marginale*.

## **8. RAPD**

A análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) é usada para comparar diferenças e similaridades no DNA amplificado em reações de PCR, usando "primers" selecionados ao acaso. Os fragmentos sintetizados são separados e visualizados por eletroforese, de modo que a natureza polimórfica dos produtos amplificados de diferentes amostras podem ser comparadas (Pritchard, 1997). A análise de RAPD tem sido utilizada em estudos de caracterização de espécies ou isolados de *Trypanosoma* de rumiantes e suínos (Dirie et al., 1993; Waimumbi & Murphy, 1993), sendo necessária a purificação dos parasitas do de sangue do hospedeiro antes da amplificação.

## **9. RT-PCR**

A técnica de RT-PCR envolve a síntese de um transcrito de DNA complementar (cDNA) a partir de moléculas de RNA, por meio da utilização da enzima Transcriptase Reversa. O DNA sintetizado é então submetido a amplificação por meio da técnica de PCR, utilizando "primers" específicos que se ligam especificamente com as moléculas de mRNA do gene de interesse (Alvares, 2001). A utilização do RNA contido na amostra, tem como principal vantagem o fato de aumentar a sensibilidade do teste, já que esse ácido nucleico está presente em maior quantidade (cerca de 50%) em uma célula típica, quando comparado ao DNA (Zarlenga et al., 2001).

As técnicas de RT-PCR quantitativas e semi-quantitativas são consideradas de grande importância para a análise da expressão gênica em diferentes estágios do desenvolvimento de parasitas. Estudos recentes têm aplicado essa técnica para

caracterizar a expressão de genes específicos de estágios de parasitas cestodos, que são importantes na predição da imunogenicidade de antígenos protetores (Watek et al., 1997).

#### **10. PCR quantitativo**

A análise quantitativa por meio da cinética da técnica de PCR pode ser feita adicionando-se um corante fluorescente (SYBR Green™ ou brometo de etídeo) na reação de PCR. Com isso, conforme a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA dupla fita que se liga ao corante resultando em aumento da fluorescência. Plotando-se o aumento da fluorescência pelo número de ciclos, são produzidos gráficos de amplificação que fornecem um panorama completo da PCR (Alvares, 2001). A técnica de PCR quantitativo utilizando o SYBR Green™ foi usada para quantificar *Borrelia burgdorferi* em modelos com animais de laboratório para a doença de Lyme (Morrison et al., 1999) e melhorar os métodos de diagnóstico para ehrlichiose (Edelman & Dumler, 1996).

Técnicas mais recentes com o uso dos "beacons" e DNA "arrays" de verão ser usadas no futuro com fins de diagnóstico e outros propósitos em parasitologia veterinária.

#### **11. Conclusões**

As técnicas de amplificação de DNA encontram um amplo campo de aplicações em estudos de doenças infecciosas e parasitárias de interesse veterinário. Estudos recentes demonstram sua aplicação para identificação de agentes de doenças e sua caracterização genética, diagnóstico de infecções e infestações, estudos epidemiológicos, de detecção de resistência a drogas, entre outros.

#### **12. Referências bibliográficas:**

ABOYTES, R.; BUENING, G. M.; FIGUEROA, J. V.; VEGA, C. A. El uso de sondas de ADN para el diagnóstico de hemoparásitos. **Rev. Cub. Cienc. Vet.**, v.22, n.3, p.173-8, 1991.

ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIERREZ, J. F. Bovine piroplasm s in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Vet. Parasitol.**, v.99, p.249-59, 2001.

ALVARES, L. E. Aplicação da RT-PCR nos Estudos de Expressão Gênica. In: REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. (Ed.). **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa-SPI, 2001. p.135-150.

ANON *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v.282, p.2012-2018, 1998.

AYYANATHAN, K.; DATTA, S. Identification and characterization of a generic DNA probes capable of detecting plasmodial infections in blood. **Mol. Cell. Probes**, v.10, p.273-8, 1996.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI H.; JOSE, R. B. L.; BYAMBAA, B.; BOLBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult tick. **Int. J. Parasitol.** v.31, p.384-386, 2001.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALI ASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested-polymerase chain reaction. **Vet. Parasitol.** v.107, p.351-357, 2002.

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.102-109, 1998.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DeVOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.** v.57, p.61-74, 1995.

BUENING, G. M.; BARBET, A.; MYLER, P.; MAHAN, S.; MCGUIRE, T.C. Characterization of a repetitive DNA probe for *Babesia bigemina*. **Vet. Parasitol.**, v.36, p.11-20, 1990.

DIRIE, M. F.; MURPHY, N. B.; GARDINER, P. R. DNA Fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. **J. Eukaryotic Microbiol.** v.40, p.132-134, 1993.

EDELMAN, D. C.; DUMLER, J. S. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. **Mol. Diagn.** v.1, p.41-49, 1996.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.10, p.2576-2582, 1992.



- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, v.50, p.69-81, 1993.
- FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SHIGENO, S.; KIMBITA, E.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infections in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**; v.63, n.9, p.977-981, 2001.
- GABRIEL, J. E. Emprego das técnicas de Biologia Molecular nos Estudos de Expressão Gênica. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília:Embrapa-SPI, 2001, p. 124-134.
- GASSER, R. B.; ZHU, X. Q.; MONTI, J. R.; DOU, L.; CAI, X.; FOU, E. PCR-SSCP of de rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. **Mol. Cell. Probes**, v.12, p.27-34, 1998.
- HERMANS, P.; DWINGER, R. H.; BUENING, G. M.; ERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** v.42, n.3, p.623-632, 1994.
- HO, M. S.; CONRAD, P. A.; LEFEBVRE, R. B.; PEREZ, E.; BONDURANT, R. H. Detection of bovine trichomoniasis with specific DNA probe and PCR amplification system. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p.98-104, 1994.
- HODGSON, J. L.; STILLER, D.; DOUGLAS, P. J.; BUENING, G. M.; WAGNER, G. G.; MCGUIRE, C. *Babesia bigemina*: Quantification of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Ex. Parasitol.** v.74, p.117-26, 1992.
- KATAKURA, K.; LUBINGA, C.; CHITAMBO, H.; TADA, Y. Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. **Parasitol. Res.** v.83, p.241-5, 1997.
- LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Development a polymerase chain reaction assay for the diagnostics of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.75, p.169-78, 1996.
- LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. **App. Environ. microbiol.** v.62, p.643-7, 1996.

MASIGA, D. K.; MCNAMARA, J. J.; GIBSON, W. C. A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. **Vet. Parasitol.** v.62, p.27-33, 1996.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, v.117, p.73-85, 1998.

MORRISON, T. B.; MA, Y.; WEIS, J. H.; WEIS, J. J. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi* infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.987-992, 1999.

MULLIS, K.; FALDONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.55, p.335-350, 1987.

OLIVEIRA, M. C. S. **Avaliação da taxa de infecção por *Babesia bigemina* em bovinos mestiços leiteiros e em fêmeas e ovos de *Boophilus microplus* provenientes de área endêmica do Estado de São Paulo.** Botucatu, 2002. 96f. Dissertação (Doutoramento). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PRICHARD, R. Application of a molecular biology in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.** v.71, p.155-175, 1997.

PRICHARD, R.; TAIT, A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.** v.98, p.169-194, 2001.

RELMAN, D. A.; PERSING, D. H. Genotypic Methods for Microbial identification In: PERSING, D. H. (Ed.) **PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases.** Washington: ASM Press, 1996, p.4-31.

ROPER, C.; ELIASSAN, I. M.; HVIID, L.; GHIA, H.; RICHARDSON, W.; BABIKER, H.; SATTI, G. M. H.; THEANDER, T. G.; AARNOT, D. E. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.54, p.325-331, 1996.

SKOTARCZAK, B.; CICHOCKA, A. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodis ricinus*. **Folia Biol.** v.49, n.3-4, p.247-50, 2001.

SMEENK, I.; KELLY, P. J.; WRAY, K.; MUSUKA, G.; TREES, A. J.; JONGEJAN, F. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **J. S. Afr. Vet. Assoc.** v. 71, n.1, p.1-4, 2000.

STATES, S.; STADTERMAN, K.; AMMON, L.; VOGEL, P.; BALDIZAR, J.; WRIGHT, D.; CONLEY, L.; SYKORA, J. Protozoa in river water: sources occurrence, and treatment. **J. Am. Water Works Assoc.** v.89, p.74-83, 1997.

TROLL, H.; MARTI, H.; WEISS, N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. **J. Clin. Microbiol.** v.35, p.1701-5, 1997.

WAIMTUMBI, J. N.; MURPHY, N. B. Inter and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.58, p.181-186, 1993.

WATERKEYN, J.; GAUCI, C.; COWMAN, A.; LIGHTOWLERS, M. W. Sequence analysis of a gene family encoding *Taenia ovis* vaccine antigens expressed during embryogenesis of eggs. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.86, p.75-84, 1997.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

ZARLENGA, D. S.; CHUTE, M. B. MARTIN, A.; KAPEL, C. M. O. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of six encapsulated and three non encapsulated genotypes of *Trichinella*. **Int. J. Parasitol.** v.29, p.141-149, 1999.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.**, v.101, p.215-230, 2001.

ZARLENGA, D. S.; MacMANUS, D. P.; FAN, P. C.; CROSS, J. H. Characterization and detection of a newly described Asian Taeniid using closed ribosomal DNA fragments and sequence amplification by the polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol.** v.72, p.174-183, 2001.

ZARLENGA, D. S.; STRINGFELLOW, F.; NOBARY, M.; LICHTENFELS, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda, Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. **Exp. Parasitol.**, v.78, p.28-36, 1994.