

TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EM ESTUDOS DE DOENÇAS DE INTERESSE VETERINÁRIO

Márcia Cristina de Sena Oliveira

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.

Introdução

Nos últimos cem anos, os estudos relacionados a doenças tiveram como base a análise de características fenotípicas de parasitas, de bactérias e de vírus: características morfológicas, produção de metabólitos e reações bioquímicas específicas. Apesar de muitas dessas técnicas permanecerem como padrão “ouro”, as técnicas moleculares assumiram grande importância e proporcionaram avanço significativo nos estudos das enfermidades dos animais. Essas técnicas possibilitam a análise de quantidades muito pequenas de DNA e de RNA, para fins diversos, tais como seqüenciamento de genes, caracterização genética de cepas, estudos de filogenia e de taxonomia, genética de populações, ecologia, epidemiologia, desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, descoberta de mecanismos de resistência a drogas, mecanismos de escape ao sistema imunológico do hospedeiro, novos alvos para quimioterapia, e produção e desenvolvimento de vacinas. O conhecimento e a disponibilidade das seqüências dos genes de muitos agentes de doenças torna possível a execução de muitos trabalhos de pesquisa. Dentre as técnicas moleculares, aquelas baseadas na amplificação enzimática do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) são as que mais impacto produziram nos estudos de doenças.

Genoma de parasitas

O seqüenciamento dos genes de vários organismos possibilita a utilização dessas informações em muitos trabalhos de pesquisa. Na última década, foram criados diversos programas de seqüenciamento e de mapeamento de genes (determinação da localização dos genes nos cromossomos) dos mais diversos organismos. O seqüenciamento do genoma do *Caenorhabditis elegans*, primeiro organismo multicelular a ter seu genoma seqüenciado, possibilitou o

desenvolvimento de trabalhos com muitos outros helmintos. Para se ter uma idéia da abrangência desses trabalhos de seqüenciamento, os resultados obtidos no “projeto *Schistosoma*” forneceu informações que foram utilizadas no estudo de parasitas de interesse veterinário, como *Fasciola hepatica*. Outros projetos de avaliação de genoma, também direcionados para doenças humanas, tiveram ampla aplicação em pesquisas de parasitas de animais, como os projetos *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Brugia malayi*.

A maioria dos organismos que provoca doença apresenta genoma de tamanho considerável, fato que dificulta e que onera os trabalhos de seqüenciamento. Atualmente, apenas uma fração do genoma (cerca de 5% a 10%) dos parasitas é seqüenciada. A fração escolhida para ser seqüenciada é aquela que contém os genes que codificam a síntese das proteínas produzidas pelo organismo. O DNA complementar (cDNA) é aquele DNA produzido a partir de RNA mensageiro (mRNA), que é utilizado como molde. A enzima transcriptase reversa catalisa a reação de síntese de uma fita de DNA, com base no mRNA, procedimento conhecido como transcrição reversa. Este método é muito útil, pois se sabe que todo DNA gerado corresponde quase totalmente à seqüência do gene, sem conter os íntrons (partes não transcritas do gene). O seqüenciamento é feito com base nas bibliotecas de cDNA, que são coleções de genes inseridas em vetores artificiais. Os fragmentos seqüenciados são denominados “etiquetas de seqüências expressas” (EST) e podem ser usados para verificação de similaridades e para identificação de novos genes nos bancos de dados. Atualmente, milhares dessas seqüências estão disponíveis nos bancos de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html). Devido à grande quantidade de ESTs geradas, foram criados vários programas computacionais que ajudam a gerenciar e a manipular de forma mais adequada esses dados, como é o caso do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e do Phred.

Vários patógenos de interesse humano ou veterinário já foram ou estão sendo seqüenciados. Dentre as bactérias, podemos destacar: *Rickettsia prowazekii*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdoferi*, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Dentre os parasitas, temos: *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp.,

Toxoplasma gondii, *Entamoeba histolytica* e *Strongyloides stercoralis*. O *Caenorhabditis elegans* é o parasita atualmente mais bem estudado e esse fato é atribuído ao total seqüenciamento de seu genoma.

A técnica de PCR

A técnica de amplificação de DNA (Mullis & Faloona, 1987), denominada reação em cadeia da polimerase, possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada, produzindo milhares de cópias de determinado fragmento de DNA. Os elementos envolvidos nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre no interior das células e são os seguintes:

- Amostra de DNA que contém a seqüência que será amplificada.
- Mistura com os nucleotídeos (A,T,C e G).
- Enzima DNA-polimerase (Taq DNA-polimerase).
- *Primers* ou iniciadores (pequenas seqüências de DNA que são complementares à região alvo que se deseja amplificar).

Para que a reação ocorra, a mistura com todos os componentes citados (em concentrações adequadas) é preparada e colocada em pequenos tubos ou placas. Essas amostras são então incubadas em aparelho chamado termociclador, que é programado para direcionar as três etapas da reação, por meio da mudança de temperatura:

- 1) A primeira etapa é a **desnaturação do DNA**, em que ocorre a separação das fitas devido ao aumento da temperatura (94 – 95°C).
- 2) A segunda etapa é o **anelamento dos primers**, que ocorre quando a temperatura é reduzida para 55 – 65°C (a temperatura de anelamento é diferente para cada *primer*). Os iniciadores ligam-se, um em cada fita, nas respectivas seqüências complementares à região-alvo da amplificação.
- 3) A terceira e última etapa é a **extensão**, que ocorre quando a temperatura é aumentada para 72°C. Nessa temperatura, a DNA-polimerase promove a duplicação das fitas de DNA.

Após cada ciclo, todo o processo é repetido desde a desnaturação até a extensão, por várias vezes (40 vezes, em média). A sucessão desses ciclos produz

o acúmulo de quantidade razoável da seqüência alvo de amplificação, que são denominados produtos de amplificação ou *amplicons*.

Visualização dos produtos de PCR

O DNA ou o RNA podem ser facilmente separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose, e corados com brometo de etídio. O brometo de etídio é um corante que se intercala entre as fitas da dupla hélice de DNA ou de segmentos dentro de uma molécula de RNA (que é de fita simples). As bandas de DNA ou de RNA são visualizadas colocando-se os géis no transiluminador. Esse aparelho é equipado com lâmpadas que emitem luz ultravioleta (254 nm); o brometo de etídeo emite fluorescência, tornando visível os ácidos nucléicos em estudo. A olho nu, essa técnica de leitura permite a visualização de 1 a 10 ng de DNA ou de RNA.

Devido à propriedade de se intercalar entre as fitas da dupla hélice, o brometo de etídeo é um agente mutagênico potencialmente perigoso para a saúde das pessoas e para o ambiente. Dessa maneira, cuidados especiais devem ser tomados no seu manuseio e na eliminação dos seus resíduos do laboratório.

Preparo de amostras para PCR

O DNA em forma de dupla fita é muito estável e resistente a condições adversas, no entanto, ele é fisicamente frágil. O isolamento e a purificação de ácidos nucléicos de amostras de agentes de doenças é uma etapa muito importante para se conseguir alta eficiência de amplificação e de especificidade nos testes de PCR. A obtenção de DNA de amostras de helmintos é particularmente difícil, devido à presença de cutícula e de substâncias que precipitam com os ácidos nucléicos durante o seu isolamento. A quantidade de 0,1 pg de rDNA de *Oesophagostomun* spp. é uma quantidade adequada para ser utilizada em amplificação por meio de PCR (Gasser et al., 1998).

Existem vários métodos para extração de ácidos nucléicos que podem ser usados para parasitas, no entanto, devido à pequena quantidade de DNA presente nesses organismos, é importante que o processo seja adequadamente padronizado.

Para extração de DNA, amostras com o agente são homogeneizadas em tampão que contenha ribonucleases, então, as células são submetidas à lise e a amostra é digerida com proteinase K. A partir daí, o DNA pode ser extraído com

fenol, precipitado com etanol e dissolvido em água purificada esterilizada ou tampão aquoso.

A extração de RNA exige maiores cuidados, devido a sua característica de ser facilmente degradável. Dessa maneira, o congelamento em nitrogênio líquido é usado para inativar rapidamente as ribonucleases, que geralmente se mantêm estáveis por longo período, não requerendo co-fatores para sua ativação. Todo o material utilizado na colheita das amostras deve ser livre dessas enzimas, de modo que a utilização de luvas deve ser obrigatória. Enquanto o material está congelado, um agente desnaturante como fenol ou guanidina pode ser adicionado e, dessa maneira, após a lise das células e a digestão das proteínas, o RNA pode ser fracionado e separado de outras macromoléculas.

As amostras de DNA ou de RNA também podem ser obtidas por meio da utilização de *kits* para purificação, que podem tornar o processo de extração mais fácil e mais rápido.

Primers

Algumas técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de *primers* ou seqüências iniciadoras para PCR. A seqüência do gene 18S rDNA é comumente utilizada para o desenvolvimento de *primers*, devido à sua disponibilidade para grande número de protozoários e de outros parasitas (Morgan & Thompson, 1999). Os *primers* podem ser facilmente obtidos com base nessas seqüências, porém, devido à grande conservação observada nesses genes, pode haver ocorrência de reações cruzadas com outros organismos. Um método alternativo é a construção de bibliotecas de DNA genômico. Esse método é caro, demanda tempo e necessita de grande quantidade de DNA, que pode ser difícil de se obter, dependendo do microrganismo em questão. A técnica de amplificação de DNA polimórfico ao acaso (RAPD-PCR), desenvolvida independentemente por Williams et al. (1990) e por Welsh & McClelland (1990), também pode ser utilizada para obtenção de *primers*. Essa técnica detecta polimorfismos em seqüências de nucleotídeos nos testes de PCR, sem a necessidade de qualquer informação prévia. Como essa técnica é baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise. Muitos dos produtos gerados pela RAPD-PCR são derivados de seqüências repetitivas do DNA, portanto são característicos de cada espécie e dessa maneira

adequados para o delineamento de técnicas de diagnóstico. Assim, bandas geradas por RAPD-PCR podem ser eluídas do gel, seqüenciadas e com base nessas seqüências os *primers* podem ser desenhados e sintetizados (Morgan & Thompson, 1999). Importante característica dos *primers* é a temperatura de “*melting*” [TM = (número de G + C) x 4 + (número de A + T) x 2]. Essa é a temperatura na qual metade dos *primers* está ligada à região-alvo de amplificação e que é utilizada para determinar a melhor temperatura para anelamento dos *primers*. Atualmente, existem várias facilidades para análise completa das seqüências utilizadas, como é o caso do programa Generunner e os termocicladores equipados com a função Gradiente.

Identificação e diagnóstico por meio da PCR e da *Nested-PCR* (N-PCR)

No estudo das doenças, as técnicas de diagnóstico apresentam dois parâmetros de grande importância: a sensibilidade e a especificidade. Tais atributos são importantes porque o exame de diagnóstico ideal é aquele que, quando positivo, indica com certeza a presença da doença e que, quando negativo, a ausência. Pode-se dizer, que a sensibilidade de um teste é a sua capacidade de reconhecer os realmente positivos e a especificidade, os realmente negativos (Menezes & Santos, 1999). Esses parâmetros devem ser estabelecidos para cada reação em cadeia que se padroniza, utilizando-se sempre padrões positivos e padrões negativos. Os ensaios de N-PCR são preparados com uma segunda reação em cadeia com base nos produtos de amplificação da primeira reação. Os *primers* utilizados na N-PCR delimitam a seqüência de bases presente no primeiro *amplicon* e por isso o fragmento gerado é sempre menor do que o produto da primeira reação. A N-PCR é capaz de aumentar a sensibilidade da PCR em cerca de 100 vezes, fato altamente desejável, por exemplo, na detecção de indivíduos portadores sadios. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e a possibilidade de análise de grande número de amostras simultaneamente fazem dessas técnicas uma opção atrativa para diagnóstico e utilização em estudos de epidemiologia molecular (Morgan & Thompson, 1999). Desse modo, essas técnicas foram empregadas com sucesso em diversos estudos, tais como detecção em fezes (Leng et al., 1996), diagnóstico específico de *Plasmodium* spp. (Ayyanathan & Datta, 1996), estudos epidemiológicos sobre a malária (Roper et al., 1996), diagnóstico de *Tritrichomonas foetus* (Ho et al., 1994), diferenciação de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

(Lally et al., 1996), detecção de *Trypanosoma* spp. em hospedeiro vertebrado (Katakura et al., 1997) e prevalência de *Trypanosoma* spp. em hospedeiros invertebrados (Masiga et al., 1996).

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

Figuroa et al. (1992) desenvolveram método de diagnóstico da babesiose bovina (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) que foi utilizado em muitos estudos conduzidos em várias partes do mundo: Hermans et al. (1994), na Costa Rica; Smeenk et al. (2000), no Zimbábue; e Almeria et al. (2001), na Espanha. No Brasil, Oliveira et al. (2005) utilizaram esses *primers* para desenvolver um teste de N-PCR para o diagnóstico de *Babesia bovis* e de *Babesia bigemina* em amostras de sangue de bovinos, e em fêmeas adultas e em ovos de *Boophilus microplus*. A sensibilidade estimada da PCR para *Babesia bigemina* foi de 6×10^3 eritrócitos parasitados em 18×10^6 eritrócitos, o que corresponde à parasitemia de 0,00003%. Nos testes de N-PCR, a sensibilidade estimada foi de 0,000003%.

PCR multiplex

Essa forma de PCR envolve a amplificação simultânea de mais de uma seqüência-alvo por reação, mediante a mistura de múltiplos pares de *primers*. Essa técnica é especialmente útil para análise de amostras que contenham parasitas cuja distinção morfológica seja difícil ou que 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. Esses testes são muito úteis em estudos de triagem. Vários trabalhos foram conduzidos com essa técnica, para diferenciar parasitas: *Taenia saginata* de *Taenia asiatica* (Zarlenga et al., 1991), espécies do gênero *Trichinella* (Zarlenga et al., 1999), espécies do gênero *Leishmania* (Belli et al., 1998). Figuroa et al. (1993) desenvolveram uma PCR *multiplex* para detecção simultânea de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em sangue bovino. A sensibilidade do teste, avaliada por meio da hibridização do

ácido nucléico, foi de 0,00001% de eritrócitos infectados com *B. bovis* e *B. bigemina* e de 0,0001% com *Anaplasma marginale*. Na prática, a PCR *multiplex* tem o inconveniente de apresentar menor sensibilidade, quando comparada à execução das reações separadamente.

PCR–RAPD

A análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso é um método de *fingerprinting*, usado para comparar diferenças e similaridades no DNA amplificado em testes de PCR com *primers* selecionados ao acaso ou únicos. Os fragmentos sintetizados são separados e visualizados por eletroforese, de modo que a natureza polimórfica dos produtos amplificados de diferentes amostras pode ser comparada (Prichard, 1997). A maior vantagem dessa técnica é ser facilmente executável, no entanto, ela apresenta o inconveniente de ser influenciada por muitos fatores, tais como qualidade do DNA, especificidade dos *primers*, concentração do DNA-alvo da amplificação o que pode resultar em baixa reprodutibilidade da reação (Gasser, 2006).

A análise de RAPD tem sido utilizada em estudos de caracterização de espécies ou de isolados de *Trypanosoma* de ruminantes e de suínos (Dirie et al., 1993; Waimtumbi & Murphy, 1993). Os produtos da PCR–RAPD podem ser também utilizados como marcadores moleculares de populações geográficas de parasitas.

RT-PCR

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

PCR quantitativo

As técnicas de PCR quantitativo foram desenvolvidas nos anos de 1990 e têm ampla aplicação nos estudos de doenças, principalmente aquelas relacionadas à quantificação da expressão gênica. A análise quantitativa por meio da cinética da PCR é feita pela adição de um corante fluorescente intercalante na reação em cadeia (Gasser, 2006). A amplificação produz quantidades crescentes de DNA de dupla fita, o qual se liga ao corante, resultando em aumento da fluorescência em cada ciclo da PCR. Curvas-padrão são construídas com os dados obtidos da reação, de modo a se obter a quantidade relativa de DNA-alvo na amostra em análise. Essa reação pode ser utilizada para diferenciar produtos de PCR de seqüências variadas, por meio da análise das curvas de dissociação de produtos em estudo, tendo sempre como controle a amplificação de um segmento de um gene conhecido. A principal desvantagem dessa técnica é que os corantes utilizados se ligam a todo o DNA presente na amostra e, desse modo, deve-se obter a fluorescência a temperaturas específicas que desnaturem os produtos inespecíficos, deixando os produtos específicos intactos.

As técnicas padrão para contagem de parasitas são freqüentemente demoradas e difíceis e possuem baixa acurácia, principalmente quando se trata de protozoários. Por isso, as técnicas de PCR quantitativo vêm sendo aplicadas a estudos de parasitologia sobre *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* e *Neospora* (Bell & Ranford-Cartwright, 2002).

Referências bibliográficas

- ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIERREZ, J. F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 249-259, 2001.
- AYYANATHAN, K.; DATTA, S. Identification and characterization of a generic DNA probe capable of detecting plasmodial infections in blood. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 273-278, 1996.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, 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 ticks. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 384-386, 2001.

- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, 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. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351-357, 2002.
- BELL, A. S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. Real-time quantitative PCR in parasitology. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 338-342, 2002.
- BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 102-109, 1998.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; de VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.
- DIRIE, M. F.; MURPHY, N. B.; GARDINER, P. R. DNA fingerprinting of *Trypanosoma vivax* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 132-134, 1993.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, 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. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, 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* infection in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 9, p. 977-981, 2001.
- GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 69-89, 2006.
- GASSER, R. B.; ZHU, X. Q.; MONTI, J. R.; DOU, L.; CAI, X.; POZIO, E. PCR-SSCP of rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 1998.
- HERMANS, P., DWINGER, R.H., BUENING, G. M., HERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Review of Biology Tropical**, v. 42, n. 3, p. 623-632, 1994.
- HO, M. S.; CONRAD, P. A.; CONRAD, P. J.; LEFEBVRE, R. B.; PEREZ, E.; BONDURANT, R. H. Detection of bovine trichomoniasis with a specific DNA probe

and PCR amplification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 98-104, 1994.

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. **Parasitology Research**, v. 83, n. 3, p. 241-245, 1997.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Development a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 169-178, 1996.

LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 643-647, 1996.

MASIGA, D. K.; MCNAMARA, J. J.; GIBSON, W. C. A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi*. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1-2, p. 27-33, 1996.

MENEZES, A. M. B.; SANTOS, I. S. Curso de epidemiologia básica para pneumologistas. **Journal of Pneumology**, v. 25, n. 6, p. 321-326, 1999.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, v. 117, n. 7, p. 73-85, 1999.

MULLIS, K.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 255, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO Jr, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 61-67, 2005.

PRICHARD, R. Application of a molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 155-175, 1997.

ROPER, C.; ELHASSAN, I. M.; HVIID, L.; GIHA, 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 325-331, 1996.

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. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 71, n. 1, p. 21-24, 2000.

WAIMTUMBI, J. N.; MURPHY, N. B. Inter and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 181-185, 1993.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, 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. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZARLENGA, D. S.; CHUTE, M. B.; MARTIN, A.; KAPEL, C. M. O. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1859-1867, 1999.

ZARLENGA, D.S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZARLENGA, D. S.; McMANUS, D. P.; FAN, P. C.; CROSS, J. H. Characterization and detection of a newly described Asian taeniid using cloned ribosomal DNA fragments and sequence amplification by the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 2, p.174-183, 1991.