



Avaliação das reações de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT) na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em exsudatos cárneos bovinos

Evaluation of indirect Hemagglutination (HI) and Modified Agglutination (MAT) reactions in the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies in bovine meat exudates

RIALA6/1766

Maria Aparecida Moraes MARCIANO^{1*}, Heitor Franco de ANDRADE JUNIOR², Luciana Regina MEIRELES²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. E-mail: maria.marciano@ial.sp.gov.br

²Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo

Recebido: 19.07.2018 - Aceito para publicação: 31.01.2019

RESUMO

Toxoplasmose é uma zoonose parasitária com ampla distribuição mundial provocada pelo *Toxoplasma gondii*, considerado um dos protozoários mais bem sucedidos do planeta, pois infecta cerca de um terço da população mundial. Dentre as formas de transmissão, o consumo de carne mal cozida, contendo cistos, tem sido considerado um fator de risco para aquisição desta zoonose. Uma abordagem alternativa para o controle da toxoplasmose pela ingestão de carne bovina seria a sorologia dos bovinos, já que animais soropositivos albergam cistos teciduais. Contudo, a obtenção de soro para esta avaliação, nem sempre é factível, dada a dificuldade de coleta de sangue durante a linha de abate e sua ausência em cortes comerciais. O exsudato cárneo é uma alternativa para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cortes comerciais de carne, que foi a proposta deste estudo para avaliar o desempenho dos testes de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT) quando comparados ao ELISA usando exsudato cárneo. Este estudo mostrou que a acurácia dos testes de aglutinação não foi viável devido aos baixos índices de sensibilidade e especificidade quando comparados ao ELISA. Estes dados demonstram a importância da escolha de testes eficientes como ELISA para aplicação no controle da qualidade e inocuidade de cortes comerciais de carne bovina.

Palavras-chave. toxoplasmose, exsudato cárneo, segurança alimentar, testes de aglutinação.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic zoonosis with a wide worldwide distribution caused by *Toxoplasma gondii*, which is considered one of the most successful protozoa on the planet, since it can infect a third of the world population. Among the forms of transmission, consumption of undercooked meat has been considered as a risk factor for the acquisition of this zoonosis. An alternative approach to toxoplasmosis control by beef ingestion could be the serological diagnosis in cattle, since seropositives animals harbor tissue cysts. However, the use of serum for this evaluation is not always feasible due to the difficulty of blood collection during slaughter and its absence in commercial beef cuts. Meat exudate is an alternative for the detection of anti-*T. gondii* antibodies in commercial beef cuts, which was the propose of this study to evaluate the performance of Indirect Hemagglutination (HI) and Agglutination Modified (MAT) tests compared to ELISA using meat exudates. This study showed that the agglutination tests accuracy was not viable due to low sensitivity and specificity indexes when compared to ELISA. These data demonstrate the importance of choosing accurate tests such as ELISA for application in quality control and safety of commercial beef cuts.

Keywords. toxoplasmosis, meat exudate, food security, agglutination tests.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o parasito responsável pela toxoplasmose, importante zoonose que causa infecção aguda e também infecção crônica¹. O controle de *T. gondii* no ambiente é alcançado com esforços concentrados dos setores médico, veterinário e ambiental tornando-se, assim, um exemplo paradigmático do conceito de saúde única². Devido à alta contaminação ambiental, estima-se que possam ocorrer exposições múltiplas ao longo da vida dos hospedeiros, definitivos ou intermediários, dentre eles o homem, aumentando o risco de infecção³. A importância da toxoplasmose está associada ao fato de ser cosmopolita, altamente difundida, e pela possibilidade de causar infecções graves, com lesões irreversíveis e morte⁴. Estima-se que um terço da população mundial humana já foi infectada por *T. gondii*⁵, sendo descritas prevalências de 15% a 85%, variando de acordo com o nível sócio econômico, áreas geográficas, fatores climáticos, hábitos culturais, alimentares e idade⁶.

Um dos principais fatores da alta prevalência dessa zoonose é a ingestão de alimentos contaminados, seja com oocistos ou cistos teciduais, que está relacionado com o nível de educação sanitária da população, o qual representa uma prática imprescindível no controle e prevenção da doença. A relevância da toxoplasmose para a saúde pública está associada ao grande número de infecções em gestantes e indivíduos imunocomprometidos como portadores do vírus HIV⁷. *T. gondii* apresenta várias vias de transmissão em potencial, podendo o hospedeiro entrar em contato com o agente via transplacentária, ou após o nascimento por mecanismos de transmissão horizontal³. Dentre eles, destaca-se a ingestão de cistos contidos em carnes, produtos cárneos ou consumo de vísceras de animais infectados^{6,8}. Os cistos teciduais, presentes nos cortes comerciais de carne, apresentam tamanho variável, entre 10 a 100 µm, sendo que os cistos jovens são frequentemente pequenos, contendo somente dois bradizoítos em seu interior, enquanto os maduros podem conter milhares deles. O tamanho dos cistos também pode variar de acordo com a sua localização, sendo os encontrados no cérebro, geralmente, menores do que os localizados no músculo esquelético⁹.

Em condições experimentais, animais destinados ao consumo humano como bovinos, suínos, ovinos e caprinos, apresentam resposta imunológica e formação de cistos teciduais, mostrando-se susceptíveis à infecção por *T. gondii*. Em relação à infecção natural, a maioria dos animais de produção soropositivos para toxoplasmose já demonstraram albergar o parasita, na forma cística, em cortes comerciais de carne⁵.

Em relação aos bovinos, a ingestão de pastagens contaminadas por oocistos é a principal via de transmissão¹⁰, por isso o sistema de criação extensivo, muito comum no Brasil, favorece a infecção por *T. gondii* nessa espécie¹¹.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos parasitológicos e moleculares para detecção de cistos de *T. gondii* na carne de diferentes espécies animais, visando o aprimoramento de medidas de controle e prevenção da toxoplasmose⁴, porém a aplicação destes métodos nem sempre é viável para o controle em larga escala, por apresentar avaliações analíticas longas e equipamentos e insumos específicos. Uma abordagem metodológica factível para o controle da toxoplasmose pelo consumo de carne bovina é detecção de anticorpos específicos no soro⁶. Contudo, a obtenção de soro para esta avaliação, nem sempre é possível, dada a dificuldade de coleta durante a linha de abate do animal em matadouros comerciais e ausência deste material em cortes comerciais já processados para comercialização. Nestes casos, o exsudato cárneo é um material biológico alternativo para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de carne bovina¹².

Com o objetivo de auxiliar no controle da qualidade da carne bovina frente à toxoplasmose, avaliou-se o desempenho dos testes de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT), comparados ao ensaio imunoenzimático (ELISA) em exsudatos de cortes comerciais bovinos. Este trabalho permitiu determinar os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo e concordância dos testes de aglutinação. Os testes de aglutinação (HI e MAT) permitem a pesquisa de imunoglobulinas específicas em laboratórios com menor infraestrutura e poderiam ser aplicado em condições

de campo, principalmente, por não exigirem o uso de equipamentos de alta complexidade, possibilitando a aplicação do exsudato cárneo como material biológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cortes comerciais de carne bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a comparação do desempenho dos testes de aglutinação na detecção de IgG anti-*T. gondii*, foram ensaiadas 89 amostras, sendo 32 reagentes e 57 não reagentes, de exsudatos cárneos de cortes comerciais de carne *in natura* adquiridas no varejo. As amostras foram previamente ensaiadas pelo ELISA, considerado método de referência para detecção de anticorpos IgG, segundo padronização de Mecca et al¹³, adaptado para amostras de bovinos¹².

Como controles positivos e negativos das reações foram utilizados exsudatos cárneos provenientes de animais previamente infectados e não infectados confirmados pelo ELISA¹².

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo preconizado por Mecca et al¹³, onde os exsudatos cárneos foram diluídos em tampão Tris/HCl (10mM, pH 7,5), NH₄Cl (150mM), NaNO₃ (1mM) e NaN₃ (1mM) para lise de eritrócitos e conversão da hemoglobina em um composto estável, que permitiu a mensuração da quantidade de sangue por espectrofotometria em comprimento de onda por filtro de 540 nm. Após diluição de todas as amostras numa mesma concentração de sangue, os exsudatos foram ensaiados simultaneamente nos testes de aglutinação.

Hemaglutinação indireta (HI)

Os testes de Hemaglutinação Indireta (HI) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de exsudato cárneo bovino foram realizados com o kit comercial Imuno-Hai Toxo (Wama[®]) seguindo as especificações do fabricante. Foram adicionados 25 µL do exsudato cárneo em placas de microtitulação descartáveis, com fundo em “V” de 96 cavidades, seguida da adição de 25 µL da suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes de *Toxoplasma gondii*. As placas foram agitadas por vibração mecânica por 3 a 4

minutos e mantidas em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente (20°C) em bancada fixa livre de vibrações. Após esse período, foi realizada a leitura macroscópica das placas, considerando como positivas as reações que resultaram na formação de uma rede ou malha semitransparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando houve a formação de um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo das cavidades. Foram aplicados na placa, controles positivo e negativo, constantes no kit comercial para comparação dos resultados.

Teste de aglutinação modificada (MAT)

Para o teste de aglutinação direta modificada (MAT) foram confeccionadas placas de 96 poços de fundo em “V” (Costar[®]), de acordo com o protocolo descrito por Desmouts e Remington¹⁴ com algumas modificações. Para a produção do antígeno, taquizoítos da cepa RH (tipo I), mantidos no Laboratório de Protozoologia do IMT-USP por inoculação em camundongos Swiss, foram filtrados do lavado peritoneal e diluídos 1:1 (v/v) em solução de formaldeído 6%. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 600 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em solução fisiológica por mais duas vezes para limpeza e retirada dos *debris* celulares. Em seguida, os parasitas foram suspensos em tampão borato pH 8,7 e quantificados em câmara de Neubauer para ajuste da solução em concentração final de 10⁸ taquizoítos/mL. Em seguida, foi padronizada a concentração ideal de taquizoítos a partir de diluições seriadas na base 2 partindo-se de 1/2 até 1/128 de antígeno diluído em tampão borato pH 8,2, contendo Azul de Evans. Foram testados soros bovinos conhecidamente positivos e negativos, nas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000, previamente ensaiados por ELISA. Após a padronização, foram adicionados 25 µL das amostras de exsudatos, diluídas 1:2 em tampão Tris/HCl (10 mM, pH 7,5), NH₄Cl (150 mM), NaN₃ (1 mM) e azida sódica (1 mM), anteriormente ensaiadas pelo ELISA, seguidos de 25 µL de tampão Borato pH 8,2, contendo 0,2% de Azul de Evans e posteriormente 50 µL do antígeno.

As placas foram homogeneizadas manualmente e mantidas em temperatura ambiente por 18 horas (20°C). A partir da leitura macroscópica do teste, foram consideradas positivas todas as reações que resultaram na formação de uma rede ou malha semitransparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando se formou um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo.

Análise estatística

Os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos bem como os intervalos de confiança de 95% para proporções e a concordância entre os testes (índice kappa) foram estimados utilizando o programa EpiInfo 6.01., sendo a reação de ELISA considerada como teste de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Hemaglutinação Indireta (HI)

Os resultados da HI apresentaram baixa concordância com os resultados do ELISA (método de referência), com baixos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos (Tabela 1). No total de 32 amostras positivas, reagentes no ELISA, somente 5 amostras foram positivas pelo HI, apresentando, portanto, 27 amostras falso-negativas. Este fato pode estar relacionado à provável interferência na ligação das imunoglobulinas da classe IgG presentes no exsudato, podendo haver competição nos sítios de ligação do complexo antígeno anticorpo, diferentemente em ensaios com amostras de soro¹⁴.

Teste de aglutinação modificada (MAT)

Semelhante aos resultados da hemaglutinação indireta, os resultados do MAT apresentaram baixa concordância com os resultados do ELISA (método de referência), com baixos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos (Tabela 2). Da mesma forma que a HI, houve uma discrepância dos resultados das amostras no MAT quando comparados ao ELISA, no qual somente 07 do total de 32 amostras positivas, foram reagentes, apresentando, portanto, 25 amostras falso-negativas.

A menor sensibilidade verificada no HI em relação ao MAT, quando comparados ao ELISA, pode estar relacionada ao fato do teste comercial apresentar

quantidade específica de antígeno, padronizada para a detecção de anticorpos em amostras de soro, não sendo possível estabelecer doses padronizadas para teste em exsudatos cárneos¹².

Tabela 1. Determinação dos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos para a reação de HI comparada ao método de referência (ELISA) para amostras de exsudato bovino

HI	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	05	08	13
Negativo	27	49	76
Total	32	57	89

Sensibilidade: 15.6% (I.C.95% = 5.9 – 33.5)
Especificidade: 86.0% (I.C. 95% = 73.7 – 93.3)
Valor Preditivo Positivo: 38.5% (I.C. 95% = 15.1 – 67.7)
Valor Preditivo Negativo: 64.5% (I.C. 95% = 52.6 – 74.9)

Tabela 2. Determinação dos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos para a reação de MAT em relação ao ELISA para amostras de exsudato bovino

MAT	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	07	10	17
Negativo	25	47	72
Total	32	57	89

Sensibilidade: 21,9% (I.C.95% = 9,9 – 40,4)
Especificidade: 82,5% (I.C. 95% = 69,6 – 90,0)
Valor Preditivo Positivo: 41,2% (I.C 95% = 19,4– 66,5)
Valor Preditivo Negativo: 65,3% (I.C 95% = 53,1 – 75,9)

Os resultados obtidos, neste trabalho, denotam que a aplicação dos testes de aglutinação para amostras de exsudato cárneo bovino foi limitada, quando comparada aos resultados do ELISA, permitindo verificar algumas particularidades que parecem estar relacionadas à espécie animal estudada, pois dados da literatura mostram que o teste de aglutinação modificado (MAT) apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade para amostras de exsudato cárneo de coelho¹³. Este

tipo de problema pode ser decorrente da forma de exsanguinação do animal durante o abate, restando mais sangue na carne bovina “carne vermelha” do que na carne de coelho que apresenta coloração rósea. Além disso, a quantidade de mioglobina presente na fibra muscular da carne bovina e liberada durante o processo de ruptura da fibra muscular pelo descongelamento da carne é superior ao da carne de coelho, fator que poderia influenciar na mensuração de sangue presente no exsudato bovino pela espectrofotometria. Resultados falso negativos foram também obtidos por outros autores em ensaios com o Kit comercial PrioCHECK[®] Toxoplasma AB para amostras de exsudato cárneo suíno⁷.

Os testes de HI e MAT para bovinos apresentaram resultados favoráveis para as amostras de soro¹², em infecção experimental, porém para as amostras provenientes de exsudatos de cortes comerciais, os índices obtidos foram inferiores, com baixa concordância em relação ao ELISA. Estes achados podem estar relacionados ao volume e à quantidade de proteínas totais e outros componentes do exsudato cárneo bovino, incluindo a presença de grande quantidade de material adiposo. Esta questão é plausível pelo próprio aspecto do exsudato bovino que apresenta maior número de componentes precipitados após centrifugação, além de maior quantidade de sangue e intensidade de cor vermelha. Assim, a maior quantidade de proteínas não específicas presentes nas amostras de exsudatos bovinos poderiam influenciar a reação de aglutinação dos anticorpos IgG específicos com os epítomos antigênicos do *T. gondii*, já que estas proteínas poderiam competir com os sítios de ligação do antígeno, impedindo a formação do imunocomplexo, o que explicaria os resultados falsos negativos encontrados em nossos testes de aglutinação. Outro aspecto importante, que deve ser levado em consideração, é o elevado grau de vascularização da carne bovina que permite a liberação de uma quantidade maior de sangue e exsudato cárneo, necessitando de mais diluente na solução final a ser ensaiada. Outro ponto que deve ser ressaltado é a resposta imunológica intrínseca de cada espécie em relação à infecção por *T. gondii*. Estudos relatam que os bovinos são mais resistentes à infecção pelo protozoário quando comparados a outras espécies animais, apresentando menor título de anticorpos

e menor número de cistos teciduais que as demais espécies de produção⁶. Alguns autores relatam que o risco de infecção por *T. gondii* pela ingestão da carne bovina pode estar associado a fatores como adulteração dos produtos cárneos bovinos, com o propósito de baratear o produto, por adição de carne de outras espécies mais contaminadas com cistos do parasito¹⁵, como por exemplo, a carne suína. Contudo, cistos teciduais de *T. gondii* foram isolados em vísceras de bovinos naturalmente infectados¹⁶ e foi demonstrado que os mesmos podem permanecer viáveis por períodos superiores há três anos em coração, língua e fígado¹⁰.

Assim, é necessário enfatizar que os testes de aglutinação, utilizando o exsudato cárneo, devem ser rigorosamente padronizados e avaliados para cada espécie animal antes de serem utilizados como testes de triagem, já que podem sofrer ação inespecífica dos constituintes do exsudato como demonstrado neste trabalho para amostras de bovinos. Vale ressaltar a importância de avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos analíticos frente a um método de referência, garantindo resultados confiáveis.

CONCLUSÃO

O presente estudo denota a importância do desenvolvimento de técnicas diagnósticas alternativas para amostras de alimentos, consideradas matrizes complexas. A aplicação do exsudato cárneo como material biológico é um método factível, recentemente empregado, que possibilita a otimização das análises em cortes comerciais de carne. Os resultados dos testes de aglutinação HI e MAT na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em exsudatos cárneos bovinos provenientes de cortes comerciais revelaram baixos índices de sensibilidade e especificidade quando comparados ao ELISA que foi considerado método de referência. Quando comparados os resultados dos testes de aglutinação, o MAT apresentou uma maior sensibilidade, com um número menor de amostras falso negativas em relação ao HI, fato este que pode estar relacionado a padronização da reação, diferentemente do HI que foi aplicado um kit comercial. Apesar dos resultados obtidos neste trabalho demonstrarem a baixa sensibilidade dos métodos de HI e MAT, outros parâmetros destes testes poderão ser avaliados em

estudos futuros visando a utilização dos mesmos para detecção de imunoglobulinas específicas em exsudato cárneo. Vale ressaltar que pela primeira vez foi aplicado o exsudato cárneo em testes comerciais, sendo relevante os achados para nortear pesquisas futuras, principalmente no controle de alimentos frente a patógenos intrínsecos.

REFERÊNCIAS

1. Assolini JP, Concato VM, Gonçalves MD, Carloto ACM, Conchon-Costa I, Pavanelli WR et al. "Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications". *Parasitol Res*. 2017;116(6):1603-1615. <https://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5458-2>
2. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Giessen JV, Dubey JP. Toxoplasmosis: overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;15:e00054. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054>
3. Verma SK, Sweeny AR, Lovallo MJ, Calero-Bernal R, Kwok OC, Jiang T et al. Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA. *Int J Parasitol*. 2017;47(5):297-303. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.12.007>
4. Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(10):634-40. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
5. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 2008;38(12):1359-70. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>
6. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217-58. [https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7)
7. McAllister MM. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. *Vet Parasitol*. 2005;132:241-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.003>
8. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):364-9. <https://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000200033>
9. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):267-99.
10. Dubey JP, Thulliez P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*. 1993;54(2):270-3.
11. Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(7):917-29. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>
12. Marciano MAM. Pesquisa de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em exsudato cárneo para monitoramento da qualidade da carne bovina. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2013. [resumo]. Disponível em: http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/bib/Catalogo_Dis_Tes_IMTSP_v1.pdf
13. Mecca JN, Meireles LR, de Andrade Jr HF. Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts. *Meat Sci*. 2011;88(3):584-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.016>
14. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):562-8. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.11.6.562-568.1980>
15. Stelzer S, Basso W, Benavides J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J et al. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;15:e00037. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>
16. Dubey JP. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J Parasitol*. 1992;78(1):151-3.