

## Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em criações comerciais brasileiras de coelhos

[Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in Brazilian rabbit farms]

M.M. Heker, A.A. Nakamura, M.V. Meireles\*

Universidade Estadual Paulista – Unesp – Araçatuba, SP

### RESUMO

A criptosporidiose é uma importante zoonose que pode ser transmitida por meio de alimentos, água de bebida e por contato com animais e pessoas infectadas. Além disso, trata-se de uma enfermidade clínica ou subclínica frequente em diversas espécies de animais, incluindo coelhos domésticos. O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp., realizar sua classificação molecular e relacionar a presença do parasito às diferentes fases de criação em 21 criações comerciais de coelhos, localizadas nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Quinhentas e catorze amostras de fezes foram colhidas e armazenadas em solução de dicromato de potássio 5%. Os oocistos foram purificados por centrífugo-flutuação em solução de Sheather e visualizados por microscopia, utilizando-se a coloração negativa com verde malaquita. Cinquenta e cinco amostras foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (*nested* PCR) e ao sequenciamento de fragmentos amplificados, referentes aos genes da subunidade 18S do rRNA e da glicoproteína GP60, visando à caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. Oito amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. pela microscopia (1,56%; 8/514) e sete foram positivas pela *nested* PCR (12,73%; 7/55). Pela análise molecular, foi possível identificar *Cryptosporidium cuniculus* (18S rRNA) e *C. cuniculus* subtipo VbA21 (gp60) em coelhos jovens e em matrizes.

Palavras-chave: coelho, coccidiose, classificação molecular, reação em cadeia da polimerase

### ABSTRACT

*Cryptosporidiosis is an important zoonotic disease that can be transmitted via water, food and contact with infected animals and people. Furthermore, clinical and subclinical disease occur in many animal species, including the domestic rabbit. The objective of this study was to determine the occurrence of Cryptosporidium spp., perform its molecular classification and correlate the presence of the parasite to the different animal categories in Brazilian rabbits farms. A total of 514 fecal samples from 21 rabbits farms located in the states of Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo were collected and stored in 5% potassium dichromate. Fecal samples were purified by centrifugal-flotation in Sheather solution and screened for Cryptosporidium spp. oocysts using the negative malachite green staining. Aiming the molecular characterization of Cryptosporidium spp., nested PCR targeting the 18S rRNA gene and gp60 gene followed by sequencing of amplified fragments were accomplished in 55 samples. Eight samples were positive for Cryptosporidium spp. by microscopy (1.56%; 8/514) and seven samples were positive by PCR (12.73%; 7/55). Molecular analysis revealed Cryptosporidium cuniculus for the 18S rRNA gene and C. cuniculus subtype VbA21 for the gp60 gene in kits and does.*

Keywords: rabbit, Brazil, coccidiosis, molecular classification, polymerase chain reaction

---

Recebido em 23 de outubro de 2015

Aceito em 15 de fevereiro de 2016

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: marcelo@fmva.unesp.br

## INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma importante zoonose que pode ser transmitida por meio de alimentos, água de bebida e por contato com animais e pessoas infectadas. Além disso, trata-se de uma enfermidade clínica ou subclínica frequente em diversas espécies de animais, incluindo coelhos domésticos (Xiao e Fayer, 2008).

Na África e na Ásia, a criptosporidiose foi considerada a segunda maior causa de diarreia e morte em crianças com menos de cinco anos de idade (Striepen, 2013), sendo responsável por 20% das causas de diarreia em crianças de países em desenvolvimento (Mosier e Oberst, 2000) e por 748.000 casos anuais de diarreia nos Estados Unidos (Scallan et al., 2011).

Aproximadamente 20 espécies e diversos genótipos de *Cryptosporidium* já foram encontrados em humanos, incluindo *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* e os genótipos cavalo, gambá, macaco e esquilo I (Robinson et al., 2008; Xiao e Fayer, 2008; Fayer, 2010; Xiao, 2010; Liuet al., 2014).

Os coelhos eram considerados como o único hospedeiro de *C. cuniculus* até que um surto de criptosporidiose em humanos por *C. cuniculus* foi descrito no Reino Unido (Chalmers et al., 2009). A crescente aquisição de coelhos como animais de estimação enfatiza a necessidade de monitoramento de infecções por *Cryptosporidium* e sua importância em saúde pública (Shiibashi et al., 2006). Os coelhos também podem ser infectados por *C. parvum* e *C. meleagridis*, que igualmente são espécies consideradas patogênicas para humanos (Duszynski e Couch, 2013).

Nos coelhos, a infecção por *Cryptosporidium* muitas vezes não é detectada devido à baixa prevalência e ao fato de que a infecção muitas vezes é subclínica (Shi et al., 2010; Zhang et al., 2012). No entanto, quando submetidos a condições estressantes, coelhos portadores de *Cryptosporidium* podem desenvolver diarreia, cuja gravidade vai depender da idade, da alimentação e do estado imunológico dos animais (Kaupke et al., 2014). A diarreia,

associada à criptosporidiose, pode resultar em mortalidade e ocorre principalmente no período pós-desmame, quando há estresse relacionado à separação da mãe, ao transporte para gaiolas de engorda e à mudança de alimentação (Shiibashi et al., 2006; Kaupke et al., 2014).

No Brasil, não há trabalhos referentes à caracterização molecular de *Cryptosporidium* em coelhos. Em outros países, há diversos relatos de identificação de *C. cuniculus* e de seus subtipos relacionados ao gene da glicoproteína GP60 (Ryan et al., 2003; Chalmers et al., 2009; Nolan et al., 2010; Shi et al., 2010; Zhang et al., 2012; Kaupke et al., 2014).

Este trabalho visou determinar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais de coelhos em granjas brasileiras, realizar sua caracterização molecular para determinação da espécie e do subtipo do parasito, bem como relacionar a presença do parasito às diferentes fases de criação.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras fecais foram colhidas em 21 criações comerciais de coelhos, que tem como objetivo a comercialização de animais de estimação para pesquisa, abate para consumo ou reprodução. As criações se localizam nos municípios de Bambuí (MG), São João Batista da Glória (MG), Campo Grande (MS), Jabotão dos Guararapes (PE), Curitiba (PR), Teresópolis (RJ), Eldorado do Sul (RS), Porto Alegre (RS), Santa Maria (RS), Araçatuba (SP), Araraquara (SP), Botucatu (SP), Campinas (SP), Guariba (SP), Jaboticabal (SP), Pradópolis (SP), Ribeirão Pires (SP) e Ribeirão Preto (SP).

Foram colhidas 514 amostras, constituídas por aproximadamente 30g de fezes, diretamente no interior das gaiolas, no piso embaixo das gaiolas ou em bandejas coletoras localizadas embaixo das gaiolas. As amostras foram armazenadas em frascos de plástico contendo dicromato de potássio 5%, a 4°C.

As amostras foram classificadas de acordo com a idade, o sexo e o estado reprodutivo dos animais: fêmeas não gestantes, fêmeas gestantes, fêmeas lactantes, filhotes de 31 a 50 dias de idade, filhotes de 51 a 80 dias de idade e machos adultos. As amostras de filhotes foram

constituídas por um *pool* de amostras fecais referentes a vários animais alojados em uma mesma gaiola, enquanto as amostras de coelhos adultos foram individuais.

As amostras fecais foram coadas em peneira de plástico descartável e submetidas à concentração e purificação por centrífugo-flutuação em solução de Sheather acrescida com 0,1% de Tween 20. O sedimento resultante do processo de purificação foi diluído em solução salina fosfatada (PBS) com antibióticos (100U penicilina/mL + 100µg gentamicina/mL + 100µg estreptomicina/mL + 0,25µg anfotericina B/mL) e armazenado a 4°C.

A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi realizada no sedimento resultante do processo de purificação das 514 amostras, utilizando-se a coloração negativa com verde malaquita (Elliot *et al.*, 1999).

Para extração do DNA genômico de *Cryptosporidium* spp., foi utilizado um protocolo adaptado das técnicas descritas por Boom *et al.* (1990) e Wang *et al.* (2011). Os microtubos contendo o sedimento resultante da purificação foram centrifugados a 12.000g, por três minutos, com descarte do sobrenadante. O sedimento foi diluído em 600µL de tampão L1 (24g de isotiocianato de guanidina; 20mL de Tris-HCL 0,1M pH 6,4; 4,4mL de EDTA 0,2M pH 8,0; 0,5mL de Triton X-100 e polivinilpirrolidona 1%). Após adição de 20µL de álcool isoamílico e 200mg de pérolas de vidro de 0,45µm, o microtubo foi submetido à agitação por dois minutos, em velocidade máxima, no *mini-Beadbeater* (Biospec, Estados Unidos), com incubação a 60°C por duas horas e agitação periódica a 1.000rpm por cinco segundos, a cada cinco minutos, e centrifugação a 12.000g por cinco minutos. O sobrenadante foi homogeneizado com 300µL de isopropanol e transferido para uma coluna de sílica (Zymo-Spin™ IIIC, Zymo Research, Estados Unidos) previamente inserida em um tubo coletor de 2mL. O tubo foi centrifugado a 16.100g por um minuto, com descarte da solução. Seiscentos microlitros de tampão L2 (24g de tiocianato de guanidina, 20mL de 0,1M Tris-HCL pH 6,4, 4,4mL de EDTA 0,2M pH 8,0) foram adicionados à coluna de sílica, com centrifugação a 16.100g, por um minuto, e descarte da solução. Seiscentos microlitros de

tampão L3 (etanol 70% em solução de NaCl 10mM, Tris-HCL 10mM e EDTA 0,5mM, pH 7,5) foram adicionados por duas vezes seguidas, com centrifugação a 16.100g, por um minuto, e descarte da solução do microtubo. Após transferência da coluna de sílica para um tubo de 1,5mL, 50µL de solução de eluição (Tris 10mM, EDTA 0,5mM, pH 9), previamente aquecida a 56°C, foi adicionada à coluna de sílica, com centrifugação a 16.100g por um minuto, colheita do DNA eluído e armazenamento a -20°C.

Para identificação da espécie de *Cryptosporidium*, 55 amostras foram selecionadas, de forma a que cada fase de criação fosse representada, incluindo as amostras positivas pela microscopia, para realização da reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR) seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (*nested* PCR/S). Dessa forma, foram selecionadas amostras correspondentes a cinco fêmeas não gestantes, 10 fêmeas gestantes, 12 fêmeas lactantes, 14 filhotes de 31 a 50 dias, oito filhotes de 51 a 80 dias e seis machos adultos.

A *nested* PCR foi realizada para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA), com os oligonucleotídeos iniciadores 5' TTCTAG AGCTAATACATGCG 3' e 5' CCCATTTCTTCGAAACAGGA 3' para a reação primária (1325 pb) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAGTAAGGAACAACCTCCA 3' para a reação secundária (826-840 pb) (Xiao *et al.*, 2000).

Visando à subtipagem de *C. cuniculus*, as amostras positivas pela *nested* PCR/S para o gene 18S rRNA foram submetidas à *nested* PCR/S para amplificação e sequenciamento de fragmento parcial do gene da glicoproteína GP60, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 5' ATAGTCTCCGCTGTATTC 3' e 5' GGAAGGAACGATGTATCT 3' para a reação primária (909 bp) e 5' TCCGCTGTATTCTCAGCC 3' e 5' GCAGAGGAACCAGCATC 3' para a reação secundária (875 pb) (Alves *et al.*, 2003).

Como controle positivo da *nested* PCR, foi utilizado DNA genômico de *Cryptosporidium serpentis* (18S rRNA) e de *C. parvum* (GP60).

Água ultrapura foi empregada como controle negativo. Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Os fragmentos resultantes da *nested* PCR para os dois genes foram purificados utilizando-se o QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen, Alemanha) e submetidos ao sequenciamento bidirecional no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da Unesp, *Campus* de Jaboticabal, utilizando-se o “ABI Prism® Dye Terminator 3.1” (Applied Biosystems, Estados Unidos), em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems, Estados Unidos).

A determinação das seqüências consenso foi realizada por meio do *software* CodonCode Aligner v. 1.5.2. (CodonCode Corporation, Estados Unidos). As seqüências consenso contendo nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20 foram alinhadas com auxílio dos programas Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base seqüências homólogas disponíveis no *GenBank*. As seqüências de nucleotídeos descritas neste trabalho foram publicadas no *Genbank*, sob os códigos KT948753 e KT948754.

A análise estatística descritiva foi efetuada para avaliação dos resultados.

Este trabalho foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais das Faculdades de Odontologia e de Medicina Veterinária da Unesp, *campus* de Araçatuba, Processo FOA-00553-2013.

Tabela 1. Identificação das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. pela *nested* PCR e pelo sequenciamento dos fragmentos amplificados, em relação à fase de criação

Categoria	PCR (gene 18S rRNA) % positivas (positivas/total)	Sequenciamento Gene 18S rRNA	Sequenciamento Gene GP60
Fêmea não gestante	0 (0/5)	-	-
Fêmea gestante	10 (1/10)	<i>C. cuniculus</i>	<i>C. cuniculus</i> VbA21
Fêmea lactante	8,33 (1/12)	<i>C. cuniculus</i>	<i>C. cuniculus</i> VbA21
Filhote 31-50 dias	21,43 (3/14)	<i>C. cuniculus</i>	<i>C. cuniculus</i> VbA21
Filhote 51-80 dias	25 (2/8)	<i>C. cuniculus</i>	<i>C. cuniculus</i> VbA21
Machos	0 (0/6)	-	-

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela microscopia e pela *nested* PCR, foi observada positividade para *Cryptosporidium* spp. de 1,56% (8/514) e 12,73% (7/55), respectivamente. Entre as amostras positivas pela microscopia, sete foram positivas pela *nested* PCR. Positividade para *Cryptosporidium* foi encontrada em cinco granjas, sendo três em amostras de filhotes de coelhos entre 31 e 50 dias, nas cidades de Campo Grande, Curitiba e Ribeirão Preto, duas de filhotes entre 51 e 80 dias, em Jaboticabal, uma de uma fêmea gestante e uma de uma fêmea lactante, em Ribeirão Preto (Tab. 1). A análise molecular revelou *C. cuniculus* para o gene 18S rRNA e *C. cuniculus* subtipo VbA21 para o gene GP60, com 100% de similaridade genética quando comparados às seqüências publicadas no *GenBank* FJ262724 (gene 18S rRNA) e HQ397717 (gene GP60) (Tab. 1).

A criptosporidiose em coelhos geralmente se caracteriza por ausência de sinais clínicos e pelo baixo número de oocistos em fezes (Inman e Takeuchi, 1979; Pavlásek *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 2005; Shiibashi *et al.*, 2006). A enfermidade clínica ocorre com mais frequência em coelhos entre 30 e 40 dias de idade, e a fonte de infecção para os coelhos jovens são as mães que excretam oocistos pouco antes do parto e vários dias depois do parto (Pavlásek *et al.*, 1996). Esses fatores podem explicar a ocorrência de *C. cuniculus* apenas em filhotes e em fêmeas gestantes e lactantes, como observado neste estudo.

Ocorrência semelhante à encontrada neste estudo (1,56%; 8/514) foi observada no único trabalho desenvolvido no Brasil (1,66%; 2/120) que utilizou o exame microscópico para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em coelhos, no Rio Grande do Sul (Silva *et al.*, 2006).

Em outros países, os valores de ocorrência de *Cryptosporidium* em coelhos também são semelhantes ao encontrado neste estudo, porém com identificação de outros subtipos relacionados ao gene GP60 (Chalmers *et al.*, 2009; Nolan *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010).

Zhang *et al.* (2012) relataram, em coelhos de quatro a seis meses de idade, na China, a presença dos subtipos VbA21e VbA32 de *C. cuniculus* e positividade para *Cryptosporidium* spp., pela microscopia, de 2,38% (9/378). Shi *et al.* (2010) relataram prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 3,4% (37/1081) na China, sendo de 10,9% (27/249) para coelhos jovens e de 0,92% (7/761) para coelhos adultos. Neste trabalho, considerando-se os animais por faixa etária, foi encontrada positividade de 22,73% (5/22) e de 5,71% (2/35) em coelhos jovens e em coelhos adultos, respectivamente. Ocorrência mais alta em coelhos jovens (19,7%; 13/66) também foi identificada no Japão (Shiibashi *et al.*, 2006).

O subtipo VbA21 também foi encontrado por Zhang *et al.* (2012) em granjas de coelhos na China. No entanto, não há relatos quanto à infecção pelo subtipo VbA21 em humanos, apesar de outros subtipos de *C. cuniculus* terem sido encontrados em humanos (Chalmers *et al.*, 2009; Bouzid *et al.*, 2010; Robinson e Chalmers, 2010).

Apesar de a ocorrência de infecção por *C. cuniculus* em criações brasileiras de coelhos pesquisadas neste experimento ser baixa e semelhante à observada em outros países, a possibilidade de transmissão de um agente zoonótico para o homem deve ser considerada, particularmente em pessoas que apresentam contado direto ou indireto com coelhos domésticos. Por outro lado, a infecção por *C. cuniculus* deve ser considerada no diagnóstico diferencial de enfermidade clínica relacionada ao sistema gastrointestinal em coelhos domésticos.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o subtipo zoonótico VbA21 de *C. cuniculus* está presente em criações de coelhos no Brasil, em fêmeas gestantes, fêmeas lactantes e em filhotes.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I. *et al.* Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.2744-2747, 2003.
- BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.495-503, 1990.
- BOUZID, M.; TYLER, K.M.; CHRISTEN, R. *et al.* Multilocus analysis of human infective *Cryptosporidium* species and subtypes using ten novel genetic loci. *BMC Microbiol.*, v.10, p.213, 2010.
- CHALMERS, R.M.; ROBINSON, G.; ELWIN, K. *et al.* *Cryptosporidium* rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, v.10, p.829-830, 2009.
- COX, P.; GRIFFITH, M.; ANGLES, M. *et al.* Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, p.5929-5934, 2005.
- DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L. (Eds.). *The biology and identification of the Coccidia (Apicomplexa) of rabbits of the world*. San Diego: Elsevier, 2013. 335p.
- ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. *J. Genet. Appl. Microbiol.*, v.45, p.139-142, 1999.
- FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, v.124, p.90-97, 2010.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.

- INMAN, L.R.; TAKEUCHI, A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet. Pathol.*, v.16, p.89-95, 1979.
- KAUPKE, A.; KWIT, E.; CHALMERS, R.M. *et al.* An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. *Res. Vet. Sci.*, v.97, p.85-87, 2014.
- LIU, H.; SHEN, Y.; YIN, J. *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal out patients in China. *BMC Infect. Dis.*, v.14, p.25, 2014.
- MOSIER, D.A.; OBERST, R.D. Cryptosporidiosis: a global challenge. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.916, p.102-111, 2000.
- NOLAN, M.J.; JEX, A.R.; HAYDON, S.R. *et al.* Molecular detection of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Australia. *Infect. Genet. Evol.*, v.10, p.1179-1187, 2010.
- PAVLÁSEK, I.; LÁVICKA, M.; TUMOVÁ, E.; SKRIVAN, M. Spontaneous *Cryptosporidium* infection in weaned rabbits. *Vet. Med.*, v.41, p.361-366, 1996.
- ROBINSON, G.; CHALMERS, R.M. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health*, v.57, p.e1-e13, 2010.
- ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, p.1800-1802, 2008.
- RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C. *et al.* Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.4302-4307, 2003.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, v.17, p.7-15, 2011.
- SHI, K.; JIAN, F.; LV, C. *et al.* Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, p.3263-3266, 2010.
- SHIIBASHI, T.; IMAI, T.; SATO, Y. *et al.* *Cryptosporidium* infection in juvenile pet rabbits. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p.281-282, 2006.
- SILVA, A.S.; CEOLIN, L.V.; MONTEIRO, S.G. Endoparasitoses de coelhos criados em diferentes sistemas de manejo. *Rev. FZVA*, v.13, p.127-136, 2006.
- STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*, v.503, p.189-191, 2013.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F. *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.*, v.24, p.4876-4882, 1997.
- WANG, T.Y.; WANG, L.; ZHANG, J.H. *et al.* A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet. Mol. Res.*, v.10, p.519-525, 2011.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.*, v.124, p.80-89, 2010.
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J. *et al.* Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.5492-5498, 2000.
- XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.*, v.38, p.1239-1255, 2008.
- ZHANG, W.; SHEN, Y.; WANG, R. *et al.* *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. *PloS One*, v.7, p.e31262, 2012.