

***Cryptosporidium* Sp. EN BECERROS NEONATOS DE UNA FINCA DEL MUNICIPIO ROSARIO DE PERIJÁ, ESTADO ZULIA, VENEZUELA**

***Cryptosporidium* sp. in Newborn Calves in a Farm of the Rosario de Perija County, Zulia State, Venezuela**

Zulayne Valera¹, Walter Quintero¹, Regino Villarroel¹ y Elena Hernández²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: zulayne@cantv.net

²Auxiliar de Investigación

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la presencia de *Cryptosporidium* sp. y su asociación con cuadros de diarrea en becerros neonatos, se desarrolló una investigación en una finca comercial ubicada en el Municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela. Se colectaron muestras fecales de 57 becerros de ambos sexos, alojados en becerrerías individuales, cuyas edades oscilaron entre 2 y 27 días. Las muestras fueron analizadas mediante la preparación de frotis coloreados con la técnica de kinyoun modificada y observadas a una magnificación de 1000X. Todas las muestras positivas para *Cryptosporidium* con kinyoun fueron confirmadas con la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína específicos para oocistos de *Cryptosporidium*. Del total de muestras examinadas, 29 resultaron positivas a *Cryptosporidium* (50,8%), observándose una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la presencia del parásito y la edad por semana de los becerros. En los casos positivos a *Cryptosporidium* solo se presentaron 6 animales con diarrea (20,6%), no encontrándose asociación significativa entre la presencia de *Cryptosporidium* y ésta. Los resultados del presente estudio indican un alto porcentaje de infección con *Cryptosporidium* sp. en los becerros neonatos de la hacienda La Esperanza, sin embargo, su presencia no fue determinante en el desarrollo del cuadro de diarrea.

Palabras clave: Becerros, neonatos, *Cryptosporidium* sp.

ABSTRACT

In order to establish the presence of *Cryptosporidium* sp. and its association with diarrhea cases in newborn calves, a commercial farm in the Rosario de Perijá county, Zulia state, Venezuela was surveyed. Fecal samples were collected directly from the rectum of a total of 57 individually housed calves with ages ranging from 2 to 27 days. For the detection of *Cryptosporidium* oocysts fecal smears were stained with a modified Kinyoun technique and subsequently examined by light microscopy at X1000 magnification. All oocyst-positive samples were further stained with monoclonal antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-Mabs) and examined by epifluorescence microscopy to confirm the presence of *Cryptosporidium*. Among all samples, 29 (50.8%) were *Cryptosporidium* positive, and the percentage of occurrence in newborn calves was significantly associated with the age in weeks of the animals ($P < 0.05$). Only six (20.6%) of the animals examined had diarrhea and no association was found between illness and *Cryptosporidium* occurrence. The results of this research showed that a high percentage of the calves were infected with *Cryptosporidium* sp., however the presence of this protozoan parasite was not responsible for the development of cases of diarrhea.

Key words: Calves, newborn, *Cryptosporidium* sp.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium sp. es un protozooario parásito descrito inicialmente por Tyzzer (1912) en cortes histológicos de intestino de ratón [15]. Desde entonces se ha demostrado la infección en una amplia variedad de especies mamíferas, incluyendo al hombre, por lo que es considerado como un importante agente zoonótico [3, 15, 27].

Este protozooario es reconocido a nivel mundial, como un enteropatógeno causante de cuadros de diarrea tanto en hospedadores inmunocompetentes como en inmunocomprometidos [8, 15]. *Cryptosporidium* presenta un ciclo de vida monoxeno, donde todos los estados de desarrollo (sexual y asexual) ocurren en el mismo hospedador [27]. El período prepatente oscila entre 4 y 8 d en becerros con infecciones naturales [13, 28] siendo la transmisión fecal-oral entre los hospedadores, la que comúnmente se acepta [7, 24]. Los oocistos son infectantes en el momento de ser eliminados con las heces y son capaces de sobrevivir en el ambiente por su alta resistencia a las condiciones adversas [14, 15, 24, 27].

El poder patógeno de la especie *C. parvum* en la salud animal fue reportado en 1971, cuando por primera vez se detectó en el intestino de un bovino con diarrea [18]. Posteriormente numerosas publicaciones señalan a *C. parvum*, como uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal del becerro que puede actuar como único patógeno responsable de severos cuadros de diarrea [5, 13, 14, 19, 21] o en asociación con otros agentes infecciosos tales como: rotavirus, coronavirus, *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* [5, 14, 21, 22]. Entre los signos clínicos de la criptosporidiosis bovina se señalan: diarrea, anorexia, depresión, letargia, fiebre, deshidratación y pérdida de condición corporal [13, 16, 28]. Este cuadro puede durar entre 5 y 12 d, lo que influye negativamente en el desarrollo de los becerros en el primer mes de edad y ocasiona pérdidas económicas dentro de las explotaciones ganaderas, por la alta morbilidad, aplicación de tratamientos y disminución de la ganancia de peso [16, 17, 20].

Algunos trabajos efectuados en bovinos reportan una mayor prevalencia del parásito en animales menores de 30 d [5, 8, 12, 20], en los cuales es frecuente la manifestación de signos clínicos, sin embargo, los animales mayores pueden contener y eliminar oocistos de *C. parvum*, sin presentar sintomatología alguna actuando como portadores sanos, capaces de diseminar la infección dentro del rebaño [10, 14, 20, 23, 24].

Otros resultados en diversos países señalan prevalencias de *Cryptosporidium* sp. en becerros que oscilan entre 10,3 y 81% [2, 3, 7, 14, 16, 21]. Quílez y col. [20] reportan un 53,8% de infección por *Cryptosporidium* sp. en becerros menores a 45 d de nacidos en rebaños bovinos de España. Al considerar la presencia del parásito en becerros sobre el mes de edad, la prevalencia de la infección disminuye de manera significativa como lo reportan diversos autores [2, 20]. Al respecto, Gorman y col. [8] encontraron un 12,8% de prevalencia para *Cryptosporidium* sp. en bovinos de 0 a 6 meses de edad en Chile, sin embargo, al reagrupar los animales infectados por grupos etarios estos autores observaron que la prevalencia del protozooario se incrementa a 70,5% en los becerros iguales o menores a un mes de edad.

En Venezuela los antecedentes sobre el hallazgo de *Cryptosporidium* sp. en becerros son escasos, destacándose un estudio realizado por Surumay y col. [26] en el estado Mo-

nagas. Estos autores señalan una prevalencia del 18% en bovinos entre 2 y 12 semanas de edad y del 4%, en bovinos entre 13 y 20 semanas; tales resultados indicaron la presencia de *Cryptosporidium* en los rebaños bovinos del país.

Motivado a la gran importancia que tiene este protozooario, considerando su distribución mundial, así como sus implicaciones zoonóticas y en virtud de la escasa información que de él existe en el país, se realizó la presente investigación cuyos objetivos fueron los siguientes: 1) Determinar la presencia de *Cryptosporidium* sp. en becerros neonatos de la Hacienda La Esperanza en el estado Zulia, Venezuela. 2) Determinar la asociación entre *Cryptosporidium* y cuadros de diarreas en becerros neonatos y 3) Establecer la relación entre la presencia de *Cryptosporidium* y el sexo de los animales infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad de producción

El estudio fue realizado en la Hacienda La Esperanza, municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela, ubicada en un área ecológica de bosque seco tropical, a una altura de 100 m.s.n.m. [11]. La temperatura media anual es de 29,9°C (21,2°C – 37,9°C) y precipitación anual de 1277 mm, con distribución bimodal [11]. La Hacienda La Esperanza desarrolla un sistema de explotación de ganadería de doble propósito con cría de becerros en forma artificial. El manejo de los becerros incluye un destete precoz entre 48 y 72 h después del nacimiento, para luego pasar a becerrerías individuales (jaulas), elevadas a 30 cm del suelo, las cuales son lavadas con agua sin la utilización de desinfectantes. En estas jaulas, a los becerros se les suministra leche en forma artificial dos veces al día, alimento concentrado preiniciador (17% de proteínas) durante un período aproximado de 1 mes.

Población experimental

La población experimental estuvo representada por un lote de 57 becerros (machos y hembras), con una composición racial de 5/8 Holstein o Pardo Suizo con 3/8 Brahman, bajo el mismo manejo y con edades comprendidas entre 2 y 27 d de nacidos.

Muestreo

Se tomaron muestras fecales de todos los animales que nacieron en la hacienda entre los meses de Enero a Mayo de 1999. Por cada becerro se colectó una muestra fecal mediante estimulación rectal, evitando el contacto de éstas con el suelo, utilizando para ello, guantes quirúrgicos y bolsas de polietileno rotuladas con el número del animal y fecha del muestreo. Las muestras fueron refrigeradas en cavas con hielo y transportadas inmediatamente al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia para su procesamiento. Al momento de la colección de las

muestras se registraron los siguientes datos: edad del becerro, actitud del animal, estado de hidratación, sexo, características de las heces y fecha de recolección.

Procesamiento de la muestra

Las muestras fueron examinadas siguiendo dos procedimientos diagnósticos: la técnica de coloración de Kinyoun modificada [4] y, la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (Crypto-a-Glo, Waterborne, New Orleans, USA) y siguiendo procedimientos previamente descritos [1, 4]. En el primer procedimiento se utilizó microscopio de luz y se examinaron las muestras a una magnificación de 1000X. Para el segundo procedimiento se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop, Oberkochen, Germany) equipado con un filtro excitador 450-490-nm y un filtro supresor de 520 nm).

Análisis estadístico

Los resultados de este estudio se analizaron utilizando el paquete estadístico computarizado S.A.S. (Statistical Analysis System), realizando una prueba de ji-Cuadrado y tablas de frecuencia. La ocurrencia de *Cryptosporidium* fue considerada como variable dependiente y la edad por semana, presencia de diarrea y sexo como variables independientes.

RESULTADOS

Del total de muestras examinadas a través de la técnica de kinyoun modificada, 29 (50,8%) resultaron positivas para

oocistos de *Cryptosporidium* sp. Estos oocistos fueron observados como estructuras esféricas u ovoides de 4 a 6 µm de diámetro, de color rojo intenso con granulaciones oscuras en su interior, características que son utilizadas para la detección e identificación de coccidios en muestras fecales. Mediante la técnica de inmunofluorescencia directa fue confirmada la presencia de oocistos de *Cryptosporidium* sp. tomando en cuenta la presencia de estructuras esféricas fluorescentes de color verde manzana de 4 a 6 µm de diámetro.

En cuanto a la edad y la presencia de *Cryptosporidium*, los resultados indican un porcentaje de infección de 31,5; 57,1; 76,9 y 25% para la 1era, 2da, 3ra y 4ta semana de edad respectivamente, TABLA I. Se observó una asociación significativa ($P < 0,05$) entre la presencia de *Cryptosporidium* y la edad por semana de los becerros.

De los 29 becerros que resultaron positivos para oocistos de *Cryptosporidium* se presentaron cuadros de diarrea en seis de ellos (20,6%), TABLA II, sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la presencia de oocistos y diarrea.

En el grupo de animales examinados se presentaron 2 casos de diarrea en los cuales no se detectó oocistos de *Cryptosporidium*.

De las 29 muestras positivas a *Cryptosporidium*, un 40% correspondió a becerros machos y un 60% a hembras. No se observó una asociación significativa entre el sexo de los animales y la infección.

TABLA I
***Cryptosporidium* sp. EN BECERROS NEONATOS DISTRIBUIDOS POR GRUPOS ETARIOS, DE LA HACIENDA LA ESPERANZA**

Edad en Semanas	Muestras tomadas		Muestras positivas	
	No	%	No	%
1	19	33,33	6	31,58
2	21	36,84	12	57,14
3	13	22,81	10	76,92
4	4	7,02	1	25,00
	57	100,0	29	
Total Muestras Positivas (%)				50,88

TABLA II
***Cryptosporidium* sp. EN BECERROS NEONATOS CON Y SIN DIARREA DE LA HACIENDA LA ESPERANZA**

	Muestras tomadas		Positivos a <i>Cryptosporidium</i>	
	Nº	%	Nº	%
Diarrea	8	14,1	6	20,6
Sin diarrea	49	85,9	23	79,3
Total	57	100,0	29	100,0

DISCUSIÓN

En este estudio se detectó por primera vez la presencia de *Cryptosporidium* en becerros neonatos del estado Zulia. Los oocistos de *Cryptosporidium* se encontraron en 29 de 57 (50,8%) becerros examinados a partir de los 4 días de edad. Este porcentaje de infección es similar a los reportados por Ongerth y Stibbs [16] en becerros de 7 a 21 d de edad en el estado de Washington, USA, (51%) así como por De la Fuente y col. [5], en becerros de 1 a 30 d de edad (52,3%) y Quílez y col. [20] en becerros menores a 45 d de edad (53,8%) en España.

En Venezuela, Surumay y col. [26] reportan una prevalencia para *Cryptosporidium* sp de 30,1% en becerros de 2 a 20 semanas de edad en el estado Monagas, siendo de 18% en animales de 2 a 12 semanas y de 4% entre 13 y 20 semanas; el porcentaje de infección de Surumay y col. es menor al encontrado en el presente estudio debido probablemente, a que solo se evaluaron animales de hasta cuatro semanas de nacidos, considerando que las características epidemiológicas de *Cryptosporidium* indican una mayor susceptibilidad para becerros menores de 30 d de edad [5, 12].

El porcentaje de infección con *Cryptosporidium* reportado en nuestro estudio (50,8%) es alto con relación a los valores detectados por Reinhard y col. [21] (18,8%) en Chile, por Garber y col. [7] (22,4%) y, por Atwill y col. [3] (10,3%) en los Estados Unidos. Varios autores coinciden en que el período de mayor frecuencia de infección por *Cryptosporidium* ocurre en la segunda semana de vida del becerro [3, 5, 29], sin embargo, en nuestra investigación y la de Kaminjolo y col. [9] la mayor frecuencia de infección se observó en la tercera semana.

El porcentaje de becerros infectados por *Cryptosporidium* entre los 4 a 7 d de edad (1ra semana) para este estudio es de 31,5%, lo que indica que los becerros pudieron contraer la infección inmediatamente después del nacimiento; debido a un período prepatente corto, similar a investigaciones previas y consistente con el ciclo de vida del parásito [14, 15], donde se señala un período prepatente de 4 a 8 d en becerros con infecciones naturales [13, 28]. Quílez y col. [20] reportan un 44,4% de infección por *Cryptosporidium* sp. en becerros de 3 a 4 d de nacidos, en tanto que De la Fuente y col. [5] señalan un 43,8% en becerros de 1 a 7 d.

Los oocistos fueron detectados en los becerros a partir del cuarto día de nacido, no observándose en animales de 1 a 3 d. Estos resultados son similares a los encontrados por Xiao y Herd [29], lo que sugiere que la infestación de los becerros ocurre poco después del nacimiento por la presencia de oocistos en el área de maternidad. Algunos autores señalan que las infecciones tempranas se deben a la eliminación de oocistos por parte de bovinos adultos y consideran a las madres, como una potencial fuente de infección [14, 20, 27]. En relación con esto, Scott y col. [23], reportan oocistos de *C. parvum* en vacas aparentemente sanas, pertenecientes a un rebaño con alta incidencia de diarrea criptosporidial en becerros neonatos;

todas las vacas evaluadas, eliminaron entre 750.000 y 720 millones de oocistos por día. Al respecto, los autores concluyeron que esa masiva contaminación del ambiente donde permanecen los becerros recién nacidos, pudiera ser un factor significativo en el desarrollo de la criptosporidiosis. Es importante destacar, que todos los becerros examinados en el presente estudio permanecieron con sus madres entre 48 a 72 h, después del nacimiento.

Otro aspecto importante en la transmisión de la infección por *Cryptosporidium* y que favorece la diseminación del parásito entre los becerros evaluados, es el referido a las prácticas de manejo establecidas en la finca, en la cual, los becerros 2 a 3 d después del nacimiento son trasladados a jaulas o becerrerías individuales, sin desinfectar, ocupadas previamente por otros becerros. Es probable que los becerros adquieran la infección a través de la vía fecal-oral, si en estas instalaciones permanecieron previamente animales infectados. Es necesario destacar que los oocistos de *Cryptosporidium* sp. sobreviven en el ambiente por mucho tiempo, debido a su alta resistencia a condiciones adversas y, a la acción de agentes químicos [14, 15, 20, 24, 27]. Además, la construcción de las jaulas en batería y su continuidad, permite que exista contacto directo entre los becerros por lo que la transmisión del parásito pudiera estar favorecida.

Los reportes sobre la ocurrencia de brotes de diarrea en becerros, asociadas a infecciones por *Cryptosporidium* sp. en fincas de Ohio, señalan la vía de transmisión fecal-oral por contacto de becerro a becerro, alojados en condiciones similares a las del presente estudio, como el factor determinante en los brotes de diarrea [30].

En el presente estudio se observó que la mayoría de los animales infectados por *Cryptosporidium* no presentaron cuadros de diarrea (79,3%), en tal sentido, no se encontró una asociación significativa entre la presencia del parásito y la diarrea. Algunos autores señalan una asociación significativa entre *C. parvum* y las diarreas neonatales [5, 8, 14, 20, 25] sin embargo, otros autores [10, 17] reportan infecciones por *C. parvum* en rebaños de becerros en los cuales no fueron detectados casos de diarrea. Estas investigaciones, no obstante, estuvieron basadas en la detección e identificación de *C. parvum* utilizando técnicas morfométricas. Hoy en día la identificación y asignación de especies de *Cryptosporidium* deben estar basadas en tres técnicas básicas: técnicas morfométricas, técnicas moleculares y especificidad del hospedador [6]. Este estudio reportó la presencia de oocistos de *Cryptosporidium* sp. en becerros neonatos sin hacer referencia a la virulencia, infectividad o genotipos asociados con la ocurrencia de sintomatología debido que estos tipos de análisis no fueron realizados. Las investigaciones sobre virulencia, infectividad y determinación de genotipos son muy importantes en el entendimiento de la epidemiología y transmisión de la enfermedad, así mismo permiten suministrar información sobre la prevalencia de especies en una localidad geográfica [6]. La presente investigación demostró la presencia de *Cryptosporidium* sp. en animales de fincas del Estado Zulia e indicó el potencial que tienen las

prácticas de manejo de esta finca en la diseminación del parásito y el riesgo que ello representa para la salud pública.

CONCLUSIONES

Existe un alto porcentaje de infección por *Cryptosporidium* sp en la población de becerros estudiados, que resultó ser mas alto en los becerros de tres semanas de nacidos, sin embargo, la presencia de este protozooario en los animales no estuvo asociada a los cuadros de diarrea. Las prácticas de manejo establecidas en la finca estudiada pueden favorecer la diseminación del parásito dentro del rebaño.

RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de investigaciones similares, a fin de determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* en la población bovina del país y sus implicaciones en la producción animal. Asimismo, sería importante llevar a cabo estudios moleculares para determinar las especies de *Cryptosporidium* aisladas en el estado Zulia.

Considerando el alto porcentaje de animales infectados por *Cryptosporidium* observado en el presente estudio, se recomienda promover la divulgación y entrenamiento a los Médicos Veterinarios sobre aspectos que permitan detectar este protozooario como patógeno involucrado en los problemas de diarreas en becerros neonatos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Proposed test method for Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in low-turbidity water by a fluorescent antibody procedure. **Annual book of ASTM standards**, vol. 11.01. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Pa., 925-935. 1991.
- [2] ARES, M.E.; FERNANDEZ, B.; VERGARA, C.A.; FREIRE, F.; QUILEZ, I.; CAUSAPE, A.C.; SANCHEZ, C. Oocysts, IgG levels and immunoblot patterns determined for *Cryptosporidium parvum* in bovine examined a farm (northeastern Spain). **Vet. Parasitol.** 81: 185-193. 1999.
- [3] ATWILL, E.R.; JOHNSON, E.; KLINGBORG, D.J.; VESERAT, G.M.; MARKEGARD, G.; JENSEN, W.A. Age, geographic and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. **Am. J. Vet. Res.** 60 (4): 420-425. 1999.
- [4] BOTERO, L.; QUINTERO, W. Manual de laboratorio del Curso "Métodos de Detección de Parásitos Entéricos en Aguas". Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. 13 pp. 1998.
- [5] DE LA FUENTE, R.; LUZON, M.; RUIZ, J.A.; GARCIA, A.; CID, D.; ORDEN, J.A.; GARCIA, S.; SANZ, R.; GOMEZ, M. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30 day old diarrheic dairy calves in central Spain. **Vet. Parasitol.** 80: 179-185. 1999.
- [6] FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** 30: 1305-1322. 2000.
- [7] GARBER, L.P.; SALMAN, M.D.; HURD, H.S.; KEEFE, T.; SCHLATER, J.L. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 205 (1): 86-91. 1994.
- [8] GORMAN, T.; ALCAINO, H.; SANTELICES, J. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería, Región Metropolitana. Chile. **Arch. Med. Vet.** 21 (1): 29-34. 1989.
- [9] KAMINJOLO, J.S.; ADESIYUN, A.A.; LOREGNARD, R.; KIDSON, W. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. **Vet. Parasitol.** 45: 209-213. 1993.
- [10] MANN, E.D.; SEKLA, L.H.; NAYAR, G.P.S.; KOSCHIK, C. Infection with *Cryptosporidium* sp. in Humans and Cattle in Manitoba. **Can. J. Vet. Res.** 50: 174-178. 1986.
- [11] MARTINEZ, N. Evaluación del Sistema de Producción y del Proceso de Planificación de la Hacienda La Esperanza - L.U.Z. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía (Trabajo de Ascenso). Maracaibo, Venezuela. 146 pp. 1993.
- [12] MOHAMMED, H.O.; WADE, S.E.; SCHAAF, S. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. **Vet. Parasitol.** 83: 1-13. 1999.
- [13] MOORE, D.A.; ZEMAN, D.H. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 227 cases (1986-1987). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 198 (11): 1969-1971. 1991
- [14] NACIRI, M.; LEFAY, M.P.; MANCASSOLA, R.; POIRIER, P.; CHERMETTE, R. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhea complex in

- suckling and dairy calves in France. **Vet. Parasitol.** 85: 245-257. 1999.
- [15] O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Int. J. Parasitol.** 25 (2): 139-195. 1995.
- [16] ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Prevalence of *Cryptosporidium* in dairy calves in western Washington. **Am. J. Vet. Res.** 50 (7): 1069-1070. 1989.
- [17] OLSON, M.E.; THORLAKSON, C.L.; DESELLIERS, L.; MORCK, D.W.; McALLISTER, T.A. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. **Vet. Parasitol.** 68: 375-381. 1997.
- [18] PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Vet. Pathol.** 8: 479-484. 1971.
- [19] POHLENZ, J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N.F.; BEMRICK, W.J. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 172 (4): 452-457. 1978.
- [20] QUILEZ, J.; SANCHEZ, C.; DEL CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPE, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). **Vet. Parasitol.** 66: 139-146. 1996.
- [21] REINHARDT, G.; ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; TADICH, N.; MONTESINOS, M.I. Diagnóstico etiológico de diarrea neonatal del ternero mediante la prueba inmunoenzimática (ELISA). **Arch. Med. Vet.** 23 (2): 189-192. 1991.
- [22] SANFORD, S.E.; JOSEPHSON, G.K. Bovine cryptosporidiosis: Clinical and Pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. **Can. Vet. J.** 23: 343 - 347. 1982.
- [23] SCOTT, C.A.; SMITH, H.V.; GIBBS, H.A. Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. **Vet. Rec.** 134: 172. 1994.
- [24] SCOTT, C.A.; SMITH, H.V.; MTAMBO, M.M.A.; GIBBS, H.A. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. **Vet. Parasitol.** 57: 227-288. 1995.
- [25] SOBIEH, M.; TACAL, J.V.; WILCKER, B.W.; LAWRENCE, W.; EL-AHRAF, A. Investigation of cryptosporidial infection in calves in San Bernardino County, California. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 191 (7): 816-818. 1987.
- [26] SURUMAY, Q.; ALFARO, C. *Cryptosporidium spp.* en bovinos jóvenes de Fincas de la Región Oriental de Venezuela. (Resumen). En: **IV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. VII Congreso Nacional SOVVEC.** Mayo 17-21, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. 222 pp. 1999.
- [27] TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **Advances in Parasitol.** 40: 5-35. 1998.
- [28] TZIPORI, S.; SMITH, M.; HALPIN, C.; ANGUS, K.W.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I. Experimental cryptosporidiosis in calves: Clinical manifestations and pathological finding. **Vet. Rec.** 112: 116-120. 1983.
- [29] XIAO, L.; HERD, R.P. Infections patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. **Vet. Parasitol.** 55: 257-262. 1994.
- [30] XIAO, L.; HERD, R.P.; RINGS, D.M. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. **Vet. Parasitol.** 51: 41-48. 1993.