

# Slutrapport till Stiftelsen Lantbruksforskning

**Projekttitel:** Kryptosporidier i dikobesättningar – utgör de en smittkälla för människor?

**Projektnummer:** H1150199

**Rapportens författare:** Camilla Björkman & Charlotte Silverlås

## Bakgrund

Kryptosporidier (*Cryptosporidium* spp) är en grupp encelliga parasiter som infekterar tarmslemhinnan och kan orsaka tarmlidanden och diarré, så kallad kryptosporidios, hos bland annat nötkreatur och människa. Parasiternas livscykel omfattar olika utvecklingsstadier i tarmcellerna hos infekterade individer. Så småningom utsöndras de med avföringen som mikroskopiska så kallade oocystor, som är det smittsamma stadiet av parasiten. En del arter, framför allt *C. parvum*, är zoonotiska och kan således smitta både människor och djur. Det finns andra arter som enbart infekterar nötkreatur och sådana som enbart infekterar människor. Smitta sker genom kontakt med infekterade individer eller förorenad miljö och genom intag av förorenat vatten eller föda [1].

*C. parvum*-infektion är en vanlig diarréorsak hos unga kalvar över hela världen [2]. Diagnosen kryptosporidios baseras på kliniska symptom och att oocystor påvisas i avföringen. Under sjukdomsfasen utskiljer en kalv miljontals oocystor och kan på så sätt sprida infektionen såväl inom besättningen som till omgivningen. Då oocystorna är mycket motståndskraftiga mot alla vanligen använda desinfektionsmedel och är smittdugliga länge kan smittan finnas kvar i miljön under mycket lång tid [3]. Nyligen har man visat att det man tidigare trott vara *C. parvum* hos nötkreatur egentligen är tre olika arter, nämligen *C. parvum*, *C. bovis* och *C. ryanae*. Det är framför allt *C. parvum* som orsakar sjukdom hos kalvarna, medan de övriga arterna ger subkliniska infektioner [4, 5]. *C. parvum* är den enda arten som kan överföras till människa.

Vi har i tidigare studier visat att kryptosporidieinfektion är vanlig i svenska mjölkbesättningar. Vi fann kryptosporidier i 96 % av undersökta besättningar och hos 45-60 % av kalvarna. Både *C. parvum*, *C. bovis* och *C. ryanae* förekommer [6]. Parasiterna finns i alla åldersgrupper (kalvar, ungdjur och kor), men *C. parvum* har bara påvisats hos kalvar upp till nio veckors ålder [7-9]. Även hos dessa unga kalvar var dock *C. bovis* den vanligaste arten, till skillnad från vad man funnit i internationella studier. Vi fann nio olika subtyper av *C. parvum* och de tillhörde alla zoonotiska familjer, vilket innebär att de kan infektera människor.

### Risk för betesburen smitta

Kryptosporidier är också en viktig orsak till vattenburen, och ibland livsmedelsburen, sjukdom hos människor runt om i världen. Frågan om i vilken utsträckning betande nötkreatur utgör en risk för vattenburen smitta till människor är högaktuell. För att besvara den frågan måste en ordentlig riskanalys baserad på infektionsläget hos nötkreaturen som hålls på betesmark genomföras. För att detta ska kunna göras krävs kunskap om infektionsläget i våra nötbosättningar.

Den viktigaste åldersgruppen i detta sammanhang är unga djur upp till sex månaders ålder. Vi vet att zoonotiska kryptosporidier förekommer hos kalvar i dikobesättningarna men inte hur vanliga de är. Det går inte att utifrån den information vi har om mjölkbesättningarna uppskatta smittläget dikobesättningarna av flera orsaker. Kalvar i mjölkbesättningar hålls tätt tillsammans inomhus vilket gör att smitta lätt överförs genom direktkontakt. Kontaminationsgraden i näromgivningen blir också hög eftersom smittan sprids på en liten

yta. Det har bedömts att samtliga kalvar i en kryptosporidieinfekterad mjölkbesättning blir smittade före tre veckors ålder [10]. Dikalvar, å andra sidan, går tillsammans med mamman på större ytor inomhus och på bete, vilket gör att infektionsdosen blir lägre och risken för att en kalv att bli smittad sannolikt minskar. Detta kan ge en mer lågradig infektion och därmed minskad utsöndring av oocystor från infekterade individer. Det finns också indikationer på att artförekomsten hos di- och mjölkkalvar skiljer sig [11] vilket är ytterligare en anledning till att zoonosrisken kan variera.

## **Målsättning**

Målsättningen med studien var att klarlägga hur vanlig kryptosporidier är i svenska dikobesättningar samt vilka arter och subtyper av parasiterna som förekommer.

## **Material och metoder**

### Besättningar, prover och djurägarintervjuer

Rekrytering av besättningar till studien gjordes med hjälp av Växa Halland, Växa Örebro och Upplandsbondens ekonomiska förening. Varje besättning besöktes en gång under perioden april-juni 2012 eller april-maj 2013. Vid besöket togs träckprov från samtliga kalvar upp till 90 dagars ålder och det gjordes en översiktlig bedömning av de provtagna kalvarnas hälsotillstånd. Djurägaren intervjuades också om besättningsstruktur och skötselrutiner under stallperioden. Frågor ställdes bl.a. om besättningens storlek och antal djur i olika ålderskategorier, inköp av djur, rutiner vid kalvning och rengöring av kalvningsutrymmet, kalvdödlighet och sjukdomsförekomst hos de ej avvanda kalvarna. Vi frågade även hur gamla kalvarna brukade vara vid betessläpp, om en rastgård/välkomstfälla användes innan det egentliga betessläppet och om djuren betade på vattennära betesmark.

### Laboratorieundersökningar

På laboratoriet registrerades träckens konsistens och färg. Proverna renades och koncentrerades med en salt/glukos-flotationsmetod, varefter en liten mängd (30 µl) av det renade provet färgades med fluorescerande antikroppar riktade mot kryptosporidier (CryptoCel, Cellabs Australien) och mängden oocystor räknades i fluorescensmikroskop [12]. Metoden är mycket känslig och identifierar djur som positiva vid utsöndringsnivåer på 200 oocystor per gram träck (OPG).

Alla kryptosporidiepositiva prover skickades till SVA för molekylärbiologisk undersökning. För artbestämning användes nested PCR och sekvensering av 18S rRNA-genen [13, 14] medan sekvensering av GP60-genen användes för att identifiera vilken subtyp av *C. parvum* som förekom [15]. GP60-analys utfördes på alla prover, även de som inte innehöll *C. parvum* enligt 18S rRNA-analysen. Detta gav oss möjlighet att påvisa blandinfektion med *C. parvum* även hos individer där någon av de andra kryptosporidiearterna dominerade, då *C. parvum* är den enda av de arter som infekterar på nötkreatur som upptäckts med denna metod. Erhållna DNA-sekvenser för 18S rRNA och GP60 jämfördes med sekvenser deponerade i GenBank för art- och subtypsbestämning.

### Statistisk bearbetning

För statistisk bearbetning användes Stata 11 (Stata Software, StataCorp LP College Station, TX, USA). Beroende på de olika variablernas karaktär användes Mann-Whitney test och  $\chi^2$ -test för att undersöka eventuella samband. En "random effects logistic regression model" konstruerades för utvärdering av riskfaktorer för oocystutsöndring hos kalvarna.

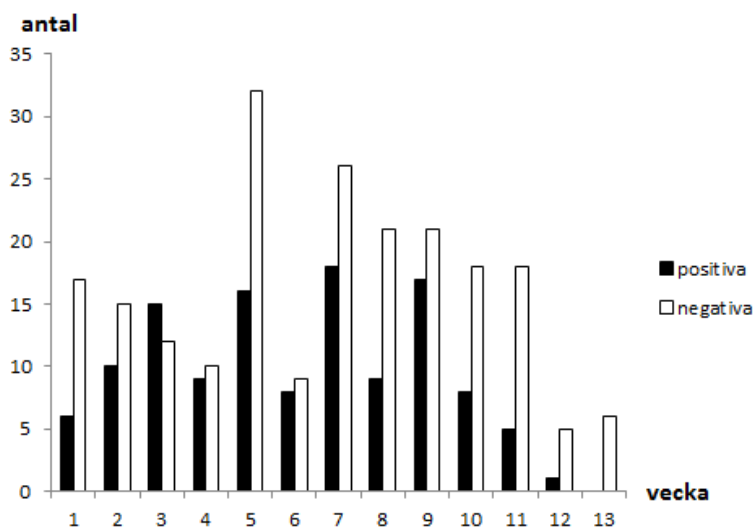
## Resultat

Trettio besättningar ingick i studien, 15 besättningar sydvästra Sverige och 15 besättningar från mellersta och östra delen av landet (Figur 1). Besättningarna hade 10-99 kor (median 39). Totalt provtogs 332 kalvar, 3-18 kalvar/besättning (median 11,5). De provtagna kalvarna var 1-90 dagar gamla. En kalv bedömdes ha nedsatt allmäntillstånd och en var dehydrerad och hade hög andningsfrekvens. I övrigt sågs inga tecken på sjukdom hos någon kalv.



**Figur 1:** Provtagna besättningar (n=30)

I 29 besättningar (97 %) påträffades minst en kryptosporidiepositiv kalv och prevalensen i de positiva besättningarna varierade mellan 6,3 % och 75,0 % (median 42,3). Kryptosporidier påvisades hos 36,8 % (122/332) av kalvarna. De positiva kalvarna var 1-81 dagar gamla (Figur 2). Det var inget statistiskt signifikant samband mellan kalvens ålder och förekomst av kryptosporidier, och inte heller mellan träckens konsistens och förekomst av kryptosporidier. Antalet oocystor i de positiva proverna var 400 OPG -  $2,4 \times 10^7$  OPG. De två yngsta kalvarna som utsöndrade oocystor var 1 och 2 dagar gamla och de utsöndrade 1600 respektive 400 OPG.

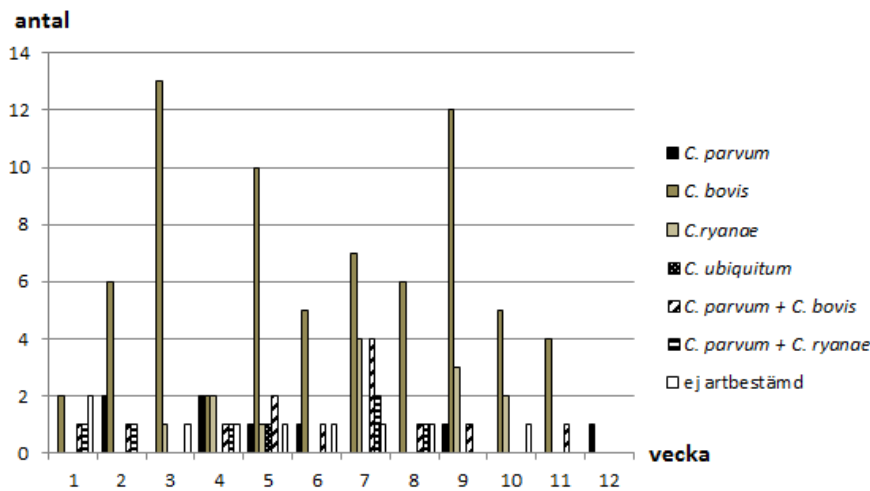


**Figur 2:** Ålder på 332 provtagna kalvar, fördelat på kryptosporidiepositiva och –negativa

### Artfördelning

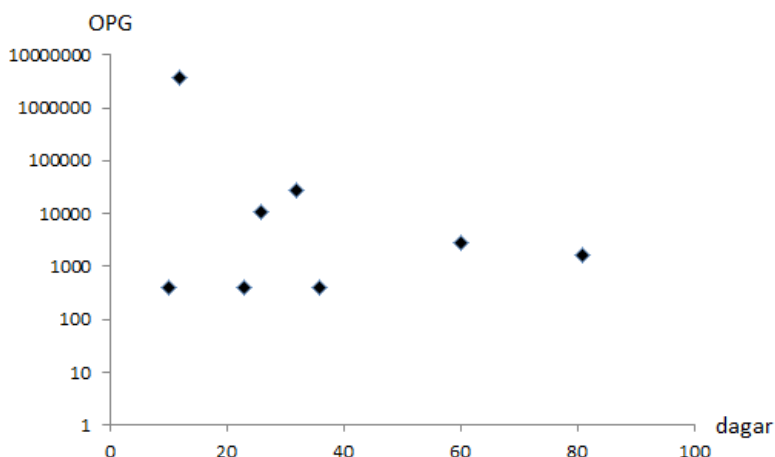
I 114 prover kunde vi artbestämma oocystorna. Sjuttiotvå av de provtagna kalvarna (21,7 %) utsöndrade *C. bovis*, 14 (4,2 %) *C. ryanae*, 8 (2,4 %) *C. parvum* och 1 (0,3 %) *C. ubiquitum*. Dessutom innehöll 13 prover (3,9 %) en blandning av *C. bovis* och *C. parvum* och 6 prover (1,8 %) en blandning av *C. ryanae* och *C. parvum*. Artfördelningen hos kalvar av olika ålder visas i Figur 3. Det var ingen signifikant åldersskillnad mellan kalvar som utsöndrade de olika kryptosporidiearterna (p-värden 0.09-0.89, Mann-Whitney test). Det var inte heller någon skillnad i OPG-värden mellan de olika arterna (p-värden 0.08-0.87, Mann-Whitney test).

*C. bovis* påvisades i 25 besättningar, *C. ryanae* i 13, *C. parvum* i 9 nio besättningar.



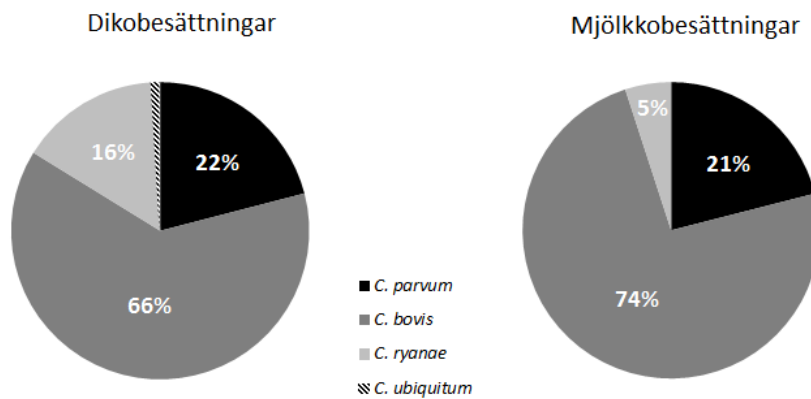
**Figur 3:** Ålder på kryptosporidiepositiva kalvar, fördelade på vilken art som identifierats.

OPG-värdena hos de åtta kalvarna där mono-infektion med *C. parvum* påvisades visas i Figur 4.



**Figur 4:** Antal oocystor per gram träck (OPG) hos de åtta provtagna kalvar som enbart utsöndrade *C. parvum*.

Artfördelningen hos de 1-62 dagar gamla kalvarna i denna studie jämfört med vad vi tidigare funnit när vi artbestämt oocystor från 1-62 dagar gamla kalvar i 50 mjölkbesättningar [9] visas i Figur 5.



**Figur 5.** Sammanställning av artfördelning av kryptosporidier som isolerats från kalvar i 30 dikobesättningar och 50 mjölkbesättningar [9].

#### Subtyper av *Cryptosporidium parvum*

*C. parvum*-subtyp kunde bestämmas på 23 av de totalt 27 prover där parasiten påvisats. Två subtyper identifierades och båda tillhörde zoonotiska subtypfamiljer; IIA och IID. Subtyp IIAA27G1 identifierades i 16 prover från fem besättningar och IIAA16G1R1 i 7 prover från två besättningar. Vi fann enbart en subtyp per besättning. IIAA16G1R1 är en subtyp som ofta hittas i prover från kalvar i besättningar med diarréproblem [16], men IIDAA27G1 har vi inte sett tidigare.

#### Resultat från djurägarintervjuerna

De enda variabler vi fann hade samband med förekomst av kryptosporidier hos kalvarna var rengöringen av kalvningsutrymmet och antal kor i kalvningsutrymmet (Tabell 1). När kalvningsutrymmet rengjordes oftare än en gång per år hade kalvarna mindre risk att vara infekterade (p-värde 0,0035). För variabeln antal kor i kalvningsutrymmet var risken minst för infektion i de besättningar som hade flest kor (30-90) på samma kalvningsplats. Såväl känslighet som specificitet var låg, och ytan under ROC-kurvan var bara 0.59 (max-värde 1.0).

**Tabell 1:** Variabler som visade samband med förekomst av kryptosporidier i den univariata analysen och i den slutliga modellen (random effects logistic regression model).

Variabel	Nivåer	p-värde	OR	p-värde	95% CI
		univariat analys	slutlig modell	slutlig modell	slutlig modell
1. Rengöring av kalvningsboxar	En gång/år	<b>0,020<sup>a</sup></b>	1	<b>0,0035<sup>a</sup></b>	
	Oftare		0,25	0,004	0,10-0,64
2. Antal kor/kalvningsbox	1	<b>0,056<sup>a</sup></b>	1	<b>0,0109<sup>a</sup></b>	
	5-15		2,5	0,029	1,10-5,89
	20-28		1,2	0,579	0,57-2,69
	30-90		0,47	0,202	0,15-1,49
	Ingen info		5,1	0,100	0,73-35,23
3. % döda kalvar innevarande år	0	<b>0,054<sup>a</sup></b>		Ingick inte i den slutliga modellen <sup>b</sup>	
	1-4				
	5-9				
	≥10				

<sup>a</sup> Övergripande p-värde för variabeln

<sup>b</sup> Då en flödesanalys visade att variabel 3 intervererar med både 1 och 2 och då dessutom inte alla nivåer av 3 återfanns i alla nivåer av 1 och 2 så uteslöts variabeln ur den slutliga modellen.

## Diskussion

Resultaten visar att kryptosporidier är vanliga i svenska dikobesättningar. Kryptosporidier påvisades i 29 av de 30 undersökta besättningarna och hos 37 % av de provtagna kalvarna. Jämfört med situationen i svenska mjölkbesättningar så är lika många besättningar infekterade, men andelen infekterade kalvar är lägre i dikobesättningarna. Denna skillnad mellan kalvar i mjölkko- och dikobesättningar liknar vad man funnit i flera andra länder, bl.a. Belgien, Kanada och Zambia [11, 17, 18].

I denna studie var *C. bovis* den dominerande arten, följd av *C. parvum* och *C. ryanae*, vilket överensstämmer med hur det ser ut i de svenska mjölkbesättningarna [9]. Vi har tidigare bara funnit *C. parvum* hos kalvar yngre än nio veckor, men nu hittade vi parasiten hos en 71 dagar kalv och en kalv som var 81 dagar gammal. En förklaring till att vi här hittade parasiten hos några lite äldre kalvar skulle kunna vara att smittrycket i dikobesättningarna är lägre och att kalvarna därför blir smittade senare. Man har visat att åldersrelaterad immunitet mot kryptosporidier förekommer hos möss [19]. Om detta också förekommer hos nötkreatur skulle kalvar som smittas senare ha hunnit utvecklat viss immunitet vilket kan medföra att oocysturskiljningen blir lägre. Hos kalvarna som enbart utsöndrade *C. parvum* var det högsta OPG-värdet  $3,8 \times 10^6$ , och det fann vi hos en 12 dagar gammal kalv. De övriga hade avsevärt lägre utsöndringsnivåer och ingen kalv som var äldre än 5 veckor hade mer än 2800 OPG. De flesta kalvar där vi fann *C. parvum* hade en blandinfektion med antingen *C. bovis* eller *C. ryanae* som den dominerande arten. Förekomst av *C. parvum* kunde först spåras när GP60-analys användes som kompletterande verktyg. De högsta OPG-värdena hos dessa dubbelinfekterade individer,  $2,0 \times 10^7$  och  $2,4 \times 10^7$  OPG, uppmättes hos två kalvar som var yngre än en vecka. Som jämförelse kan nämnas att vi hos *C. parvum*-infekterade unga kalvar utan kliniska symptom i mjölkbesättningar kan se  $1 \times 10^8$  OPG, vilket är på samma nivå som vi också sett hos sjuka kalvar [7].

Vi rapporterar här det första fyndet av *C. ubiquitum* hos nötkreatur i Sverige. Denna kryptosporidieart har ett brett värdspektrum och stor geografisk spridning och påträffas framför allt hos får och människa [20, 21]. Det är oklart hur patogen arten är för olika

djurarter. Naturlig infektion hos nötkreatur har bara beskrivits en gång tidigare; hos en 22 veckors ungdjur på en gård med specialiserad köttjursuppfödning i Bretagne, Frankrike [22]. Det positiva provet i denna studie kom från en 5 veckor gammal tjurkalv. Det fanns prover från ytterligare 11 kalvar i denna besättning, men inget av dem innehöll *C. ubiquitum*.

Den yngsta kalv som vi hittade oocystor hos vara bara en dag gammal. Den utsöndrade *C. bovis* som tidigare rapporterats ha en prepatentperiod, d.v.s. den tid som förflyter mellan en kalv blir infekterad och oocystor tidigast utsöndras med träcken, på minst sju dagar [9]. Det är möjligt att detta inte återspeglar en aktiv infektion utan att det var oocystor som kalven fått i sig och som en enbart passerade mag-tarmkanalen. Det faktum att två 4 dagar gamla kalvar utsöndrade höga nivåer av *C. bovis*,  $9600 - 2.4 \times 10^7$  OPG, visar dock att prepatent tiden är kortare än vad som tidigare beskrivits.

I dikobesättningarna identifierades två subtyper av *C. parvum* och bara en subtyp per besättning, vilket är ett mycket ovanligt mönster. När vi undersökt prover från mjölkobesättningar har vi funnit många subtyper men oftast bara en subtyp per besättning [7, 9, 16], vilket är som det brukar se ut i regioner med slutna besättningar. I regioner med mer djurförflyttningar ses vanligen ett fåtal subtyper men fler subtyper i varje besättning [23, 24].

Vi fann bara två besättningsfaktorer som var förknippade med *Cryptosporidium*-infektion. Emellertid var modellens känslighet, specificitet och prediktionsvärde lågt vilket visar att vi missat att fånga upp viktiga faktorer som har betydelse för smittspridningen.

## Publikationer

En artikel skrivs nu för tänkt publicering i tidskriften Parasitology (open access). Publikationens preliminära titel är ”*Cryptosporidium* infection in calves in Swedish cow calf herds”, författare Camilla Björkman, Lina Lindström, Carolina Oweson, Karin Troell och Charlotte Axén.

Studien har presenterats som poster på konferensen Apicomplexa in Farm Animals som hölls i Lissabon 25-28 oktober 2012. Resultaten kommer att presenteras muntligt på V International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference som hålls i Uppsala 27-30 maj 2014.

## Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Studien visar att kryptosporidieinfektion är vanlig hos kalvar i svenska dikobesättningar och att *C. bovis* är den dominerande arten. Cirka 8 % av kalvarna utsöndrade *C. parvum* vilket i stort överensstämmer med vad man tidigare funnit i svenska mjölkobesättningar. De två subtyper av *C. parvum* som påträffades tillhör båda zoonotiska subtypfamiljer.

Att det var en liten andel kalvar som utsöndrade *C. parvum* i kombination med att utsöndringsnivåerna var låga gör att dikobesättningar på bete sannolikt har en begränsad betydelse som orsak till vattenburen kryptosporidiesmitta till människor. Ytterligare faktorer som stödjer detta är att risken för nyinfektion och sjunker när djuren släpps på bete och får tillgång till större ytor än när de hålls inomhus. Därmed minskar smittrycket och utsöndringen av oocystor till omgivningen. Oocystorna är dessutom känsliga för UV-ljus och uttorkning vilket gör att överlevnaden utomhus, framför allt under torra somrar, är mycket lägre än inne i stallmiljön.

## Resultatförmedling till näringen

Preliminära resultat från studien inkluderades i en presentation om kryptosporidier vid Svensk Mjölks årliga djurhälso- och utfodringskonferens i augusti 2012. (Björkman C & Silverlås, C.

Kryptosporidier – parasiter som angår oss alla. Djurhälso- & utfodringskonferensen Svensk Mjölk 21-22 augusti 2012. Sid 50.)

Resultaten har också presenterats vid seminariet ”Vattenburna smittor – hur kan vi hjälpas åt att bedöma och hantera risker?” den 5 december 2013 på Smittskyddsinstitutet. Arrangör var SVA, SMI, Livsmedelsverket, Chalmers och Havs- och vattenmyndigheten. Seminariet vände sig till relevant personal vid centrala, regionala och lokala myndigheter, dricksvattenproducenter och lantbruksnäringens organisationer. <http://www.sva.se/sv/Mer-om-SVA1/Utbildning/Vattenburna-smittor/> (Själva presentationen ligger inte på hemsidan då alla resultat inte var konfirmerade vid tidpunkten för presentationen).

Projektpresentation finns på hemsidan för SLU Institutionen för kliniska vetenskaper <http://www.slu.se/sv/institutioner/kliniska-vetenskaper/forskning/idisslarmedicin/>

## Referenser

1. Fayer, R. and L. Xiao, eds. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2nd ed. 2008, CRC Press: Boca Raton. 560.
2. Radostits, O.M., et al., *Diseases of the newborn*, in *Veterinary Medicine*. 2007, W.B. Saunders Company Ltd: London. p. 127-160.
3. Olson, M.E., et al., *Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle*. Trends in Parasitology, 2004. **20**(4): p. 185-191.
4. Fayer, R., M. Santin, and J.M. Trout, *Prevalence of Cryptosporidium species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations*. Veterinary Parasitology, 2007. **145**: p. 260-266.
5. Fayer, R., M. Santin, and J.M. Trout, *Cryptosporidium ryanae n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus)*. Veterinary Parasitology, 2008. **156**: p. 191-198.
6. Silverlås, C., *Cryptosporidium infection in dairy cattle. Prevalence, species distribution and associated management factors*, in *Department of Clinical Sciences*. 2010, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala. p. 77.
7. Silverlås, C., et al., *Cryptosporidium infection in herds with and without calf diarrhoeal problems*. Parasitology Research, 2010. **107**(6): p. 1435-1444.
8. Silverlås, C., et al., *Prevalence and associated management factors of Cryptosporidium shedding in 50 Swedish dairy herds*. Preventive Veterinary Medicine, 2009. **90**: p. 242-253.
9. Silverlås, C., et al., *Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region*. Veterinary Parasitology, 2010. **169**: p. 289-295.
10. Atwill, E.R., et al., *Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of Cryptosporidium parvum for calfhood infection*. American Journal of Veterinary Research, 1998. **59**(9): p. 1116-1121.
11. Geurden, T., et al., *Prevalence and genotyping of Cryptosporidium in three cattle husbandry systems in Zambia*. Veterinary Parasitology, 2006. **138**: p. 217-222.
12. Maddox-Hyttel, C., et al., *Cryptosporidium and Giardia in different age groups of Danish cattle and pigs - occurrence and management associated risk factors*. Veterinary Parasitology, 2006. **141**: p. 48-59.
13. Silva, S.O.S., et al., *A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of Cryptosporidium spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents*. Experimental Parasitology, 2013. **135**: p. 551-557.
14. Xiao, L., et al., *Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(4): p. 1578-1583.
15. Chalmers, R.M., et al., *Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis species*. Int J Parasitol, 2005. **35**(4): p. 397-410.
16. Silverlås, C., et al., *Is there a need for improved Cryptosporidium diagnostics in Swedish calves?* International Journal for Parasitology, 2013. **43**: p. 155-161.



17. Geurden, T., et al., *Molecular epidemiology with subtype analysis of Cryptosporidium in calves in Belgium*. Parasitology, 2007. **134**: p. 1981-1987.
18. Dixon, B., et al., *The potential for zoonotic transmission of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada*. Veterinary Parasitology, 2011. **175**: p. 20-26.
19. Harp, J.A., *Cryptosporidium and host resistance: historical perspective and some novel approaches*. Animal Health Research Reviews, 2003. **4**(1): p. 53-62.
20. Li, N., et al., *Subtyping Cryptosporidium ubiquitum, a zoonotic pathogen emerging in humans*. Emerging Infectious Diseases, 2014. **20**(2): p. 217-224.
21. Fayer, R., M. Santín, and D. Macarisin, *Cryptosporidium ubiquitum n. sp. in animals and humans*. Veterinary Parasitology, 2010. **172**(1-2): p. 23-32.
22. Follet, J., et al., *Cryptosporidium infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study*. Veterinary Research, 2011. **42**: p. 116.
23. Brook, E.J., et al., *Molecular epidemiology of Cryptosporidium subtypes in cattle in England*. Vet J, 2009. **179**(3): p. 378-82.
24. Trotz-Williams, L.A., et al., *Genotype and subtype analyses of Cryptosporidium isolates from dairy calves and humans in Ontario*. Parasitology Research, 2006. **99**: p. 346-352.