

TRAITEMENT ET PRÉVENTION DE LA CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ LES JEUNES RUMINANTS (CHEVREAUX): INTÉRÊT DES POLYSACCHARIDES NATURELS

TREATMENT AND PREVENTION OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN YOUNG RUMINANTS (GOAT KIDS) : THE INTEREST OF NATURAL POLYSACCHARIDES

Par Karim Tarik ADJOU⁽¹⁾

(Communication présentée le 31 Octobre 2019,
Manuscrit accepté le 10 Octobre 2019)

RÉSUMÉ

La cryptosporidiose est une parasitose cosmopolite affectant de nombreuses espèces animales. Elle provoque des diarrhées néonatales chez les ruminants occasionnant des pertes économiques dans les élevages. Le principal protozoaire responsable est *Cryptosporidium parvum*. Aucun traitement pleinement efficace n'est disponible pour lutter contre la cryptosporidiose. Dans cet article, nous présentons une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation des polysaccharides naturels tels que le chitosan. Dans notre travail, à l'aide de deux modèles *in vitro* de cellules intestinales (HCT-8 et Caco-2) nous avons montré que le chitosan était efficace pour réduire le nombre d'oocystes de *C. parvum*. Une autre étude a été également menée afin de confirmer ces effets inhibiteurs sur des chevreaux infectés expérimentalement. Les résultats montrent, chez les animaux infectés et traités avec un produit (Optisaf[®]) contenant du chitosan, une baisse de l'excrétion fécale des oocystes de *C. parvum* et de la sévérité de la diarrhée.

Mots-clés : Cryptosporidiose, *C. parvum*, jeunes ruminants, polysaccharides naturels, traitement, prévention.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a cosmopolitan parasitosis affecting many animal species. It causes neonatal diarrhea in ruminants causing economic losses in farms. The main protozoan responsible is Cryptosporidium parvum. No fully effective treatment is available to control cryptosporidiosis. In this article, we present a new therapeutic approach based on the use of natural polysaccharides (chitosan). In our work, using 2 in vitro models of intestinal cells (HCT-8 and Caco-2), we have shown that Chitosan is effective in reducing the number of oocysts of C. parvum. Another study was also conducted to confirm these inhibitory effects on experimentally infected goat kids. The results show, in infected animals treated with a product containing Chitosan, a decrease in faecal excretion of C. parvum oocysts and the severity of diarrhea.

Key words: Cryptosporidiosis, *C. parvum*, young ruminants, naturel polysaccharides, treatment, prevention

INTRODUCTION

Cryptosporidium spp est un des principaux agents des diarrhées néonatales chez les ruminants (De Graaf *et al.* 1999). Le genre *Cryptosporidium* appartient à la famille des *Cryptosporidiidae*, caractérisée par un cycle biologique monoxène, elle est affiliée à l'ordre des *Eucoccidiorida*, sous-classe des *Coccidiasina*, phylum des *Apicomplexa*, nommé ainsi pour évoquer la présence constante,

chez les stades invasifs du cycle de ces parasites, d'un complexe apical (Carey *et al.* 2004). Chez l'Homme, de nombreuses épidémies ont été rapportées à travers le monde par le biais de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par cet agent zoonotique. *C. parvum* occupe d'ailleurs le 5^{ème} rang d'un classement de 24 parasites zoonotiques transmis par les aliments

(1) Professeur de Pathologie des Animaux de Production, ENV d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort.
Courriel : karim.adjou@vet-alfort.fr

réalisé en Octobre 2012 par des experts de la FAO et de l'OMS. La maladie, associée à *C. parvum*, entraîne une diarrhée dans les trois premières semaines de vie du veau. Le réservoir de parasites, à l'origine de l'infection des veaux demeure le milieu. Les animaux adultes sains sont néanmoins suspectés d'être ce réservoir surtout autour de la mise-bas en raison de leur excréation importante à cette période (Castro-Hermida *et al.* 2002). Cependant, Fayer *et al.* (2008) rapportent que *Cryptosporidium parvum* est plus isolé chez le veau non sevré de moins de 8 semaines, *C. bovis* et *C. ryanae* prédominent chez les génisses et *C. andersoni* est majoritaire chez les bovins adultes (Fayer *et al.* 2008). Chez les ovins, on retrouvera, en plus de *C. parvum*, *C. xiaoi*, *C. hominis* et *C. ubiquitum*. Chez les caprins, *C. parvum* est largement dominant (Chartier & Paraud 2010). Les pertes économiques associées à la cryptosporidiose peuvent être directes par la mortalité élevée qui peut survenir dans certains élevages de ruminants mais également indirectes via les frais engagés (alimentation, médicaments, retard de croissance...). Très peu de molécules actives bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché en Europe (Adjou, 2014). Néanmoins, un nombre grandissant de recherches voit le jour, afin de développer, entre autres, des outils diagnostiques rapides et fiables, de trouver un traitement et des modes de désinfection efficaces pour lutter contre la maladie. Le chitosan est un polysaccharide naturel composé de la distribution aléatoire le long des motifs de répétition de la chaîne de polymères de D-glucosamine (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée) de la chitine. De nombreuses propriétés biologiques du chitosan sont référencées : les activités anti-tumorales, antimicrobiennes et antifongiques (Park *et al.* 2008). Le chitosan peut provenir de deux sources: (1) par désacétylation (hydrolyse des groupes N-acétyl) des substrats provenant des industries des déchets de la pêche (coquilles de crustacés tels que les crevettes, calamars et les crabes) ou (2) par la production d'une source fongique (*Aspergillus* *et/ou Saccharomyces*). Le chitosan est un polymère non toxique, et biodégradable, qui peut être administré par voie orale, ce qui en fait un candidat intéressant pour l'étude d'éventuelles actions «anti-parasitaires» (Alvares *et al.* 2012). Notre étude a pour objectif d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité anti-cryptosporidienne des chitosans et la tolérance d'un traitement à base de chitosans chez des chevreux expérimentalement infectés par *C. parvum*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cultures cellulaires

Dans cette étude, deux lignées cellulaires ont été utilisées. Les HCT-8 (ATCC CCL-244, Rockville, MD, U.S.A.) issues d'une tumeur de colon humain, les Caco-2 (ATCC HTB-37, Rockville, MD, U.S.A.) issues d'adénocarcinome du colon humain, cultivées respectivement dans du milieu RPMI ou DMEM avec 10 % SVF dans les deux cas, incubées à 37°C, dans 5% de CO₂ et 80% d'humidité relative. Les cellules ont été cultivées dans des grandes flasques ventilées, et lors de 90% de confluence du tapis cellulaire, les passages ont été réalisés. Les cellules étant

adhérentes, un décollement par la trypsine à 3X dans du RPMI ou DMEM selon la lignée (HCT-8 ou Caco 2 respectivement) a été effectué pour remettre la culture en suspension, ensuite les cellules sont lavées dans du RPMI/DMEM à 2% SVF. Après comptage, une quantité (selon le besoin) de cellules a été déposée dans une autre grande flasque pour le maintien de la lignée, tandis que le reste a été utilisé pour débiter les expériences. Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* proviennent d'une souche de référence *C. parvum* IOWA (Waterborne inc., New Orleans, LA, USA). Ils ont été utilisés pour infecter les cellules. Une technique d'immunofluorescence grâce à des anticorps spécifiques a été utilisée pour l'identification et la quantification des parasites intracellulaires (Mammeri *et al.* 2018). Dans cette étude, le sulfate de paromomycine, considéré comme une molécule de référence pour son action anti-cryptosporidienne, a été utilisé à 500 µg/ml comme contrôle positif. Le chitosan Nag (forme purifiée) et le chitosan Mix (contenant le chitosan Nag et d'autres polysaccharides) ont été évalués. Des études de toxicité ont été préalablement effectuées pour les trois produits. Dans les deux lignées cellulaires (HCT-8 et Caco 2) les doses optimales pour la paromomycine, le chitosan Mix et le chitosan Nag sont respectivement de 500 µg/ml et 1000 µg/ml (pour les chitosans). Les effets du chitosan sur le parasite ont été évalués en situation de traitement (mise en place du produit sur les cellules infectées depuis 48h).

Les chevreux

Les animaux expérimentaux sont 16 chevreux nés dans le même élevage (âgés de 2 jours), ayant consommé le colostrum de leur mère. Ils sont retirés dès le deuxième jour de vie de l'élevage et regroupés dans un site indemne de contamination environnementale de cryptosporidies. Les chevreux sont nourris avec du lait reconstitué à partir de poudre de lait. La distribution du lait est effectuée au biberon toutes les 3 heures environ de J3 à J5-J6, puis à la louve. Les conditions de température environnementale sont maintenues avec des radiants à infra-rouge. Les chevreux n'ont reçu aucun traitement avant le début de l'essai. Ils ne présentaient pas de diarrhée ni de symptômes.

Allotement - distribution du produit (Optisaf®) - Posologie

Les chevreux de chaque groupe sont logés dans le même bâtiment sur copeaux et dans des cases séparées (il s'agit d'une vraie séparation). Les animaux de chaque groupe n'ont pas de contact entre eux et disposent d'équipement d'allaitement (biberons, louves) spécifiques. Les animaux proviennent tous du même élevage mais les lots témoins (8 chevreux) et traités (8 chevreux) ont été regroupés par catégories. Les deux groupes ont été infectés par voie orale, à J3, par une souche de *Cryptosporidium parvum* à la dose de 10⁵ oocystes. Le groupe témoin est maintenu sans intervention médicamenteuse pendant la durée de l'étude. Le groupe traité par Optisaf[®] reçoit ce produit une fois par jour dans le lait à la posologie de 12 g/jour, à J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9, soit pendant 7 jours consécutifs. L'Optisaf[®] est un aliment

complémentaire diététique contenant des levures et du chitosan Mix à la concentration de 20% (Laboratoires Phileo-Lesaffre, Marcq-en-Barœul, France). Il est préconisé en période néonatale pour réduire les risques de diarrhées.

L'inoculum

Les oocystes de *C. parvum* ont été collectés à partir des matières fécales de chevreux âgés d'une semaine, infectés massivement et naturellement.

Les paramètres étudiés

Le suivi des diarrhées a été quantifié de 0 à 4 par la notation de l'état des matières fécales : 0 (selles normales) ; 1 (pâteuses) ; 2 (liquides), 3 (liquides et collées autour de la queue), 4 (très liquides et collées autour de la queue avec présence du sang). L'état général a été défini par l'évaluation des critères suivants : bonne santé (l'animal mange et se déplace normalement), état moyen (l'animal mange, se déplace mais n'a pas la peau souple car il est déshydraté); mauvais état (l'animal a des difficultés à se déplacer, ne mange pas et ne tète pas...). Un comptage parasitaire (mesure de l'excrétion fécale des oocystes par immunofluorescence) a été effectué sur chaque animal 2 jours après l'infection puis tous les 2 jours jusqu'au 16ème jour. Enfin, les chevreux ont été pesés à J3, J7, J11 et J17.

RÉSULTATS

Les cultures cellulaires

Les effets du chitosan sur le développement du parasite en « pré-incubation » (avant l'infection des cellules) ont été évalués. Les résultats ont montré que l'action inhibitrice des chitosans était significative dans les deux modèles cellulaires utilisés ($p < 0,05$, test de Kruskal-Wallis). Cet effet est dépendant de la dose utilisée (résultats non montrés). De plus, le chitosan Nag et Mix utilisés en situation thérapeutique (c'est-à-dire après infection des cellules) inhibent significativement le développement de *C. parvum* (Figures 1A et 1B).

L'essai *in vivo*

Score des diarrhées

L'état de santé des chevreux du groupe « contrôle » a été d'un niveau moyen jusqu'à J5. Des diarrhées sont apparues à J4 (soit à 7 jours d'âge) sur 4 animaux sur 8. Les diarrhées étaient liquides, collées autour de la queue. Cet état diarrhéique s'est maintenu en partie sur les chevreux du lot témoin. L'état de santé des chevreux s'est dégradé dès J6. Au début de l'expérience, seuls 4 animaux avaient de la diarrhée ensuite tous les animaux l'avaient (Figure 2). Les animaux ont présenté les signes cliniques de la maladie, ils étaient prostrés, les poils raides, ne se déplaçant plus. L'état de santé de l'ensemble des chevreux traités est resté assez bon par rapport aux témoins sur la période de l'étude. Ils ont consommé le lait et le produit sans problème. Une phase

de diarrhée a été observée chez trois chevreux entre J5 et J9 après l'infection.

Excrétion fécale d'oocystes

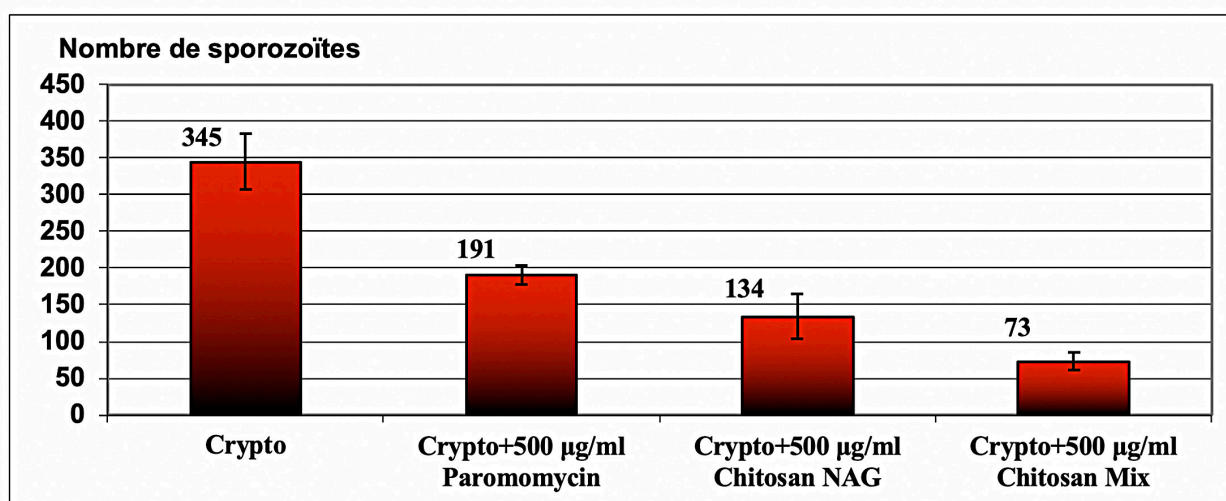
Quatre jours après l'infection artificielle, les chevreux ont présenté une excrétion d'oocystes de cryptosporidies dans les matières fécales. Le niveau de l'excrétion parasitaire est très élevé avec plusieurs millions d'oocystes par gramme de fèces (Figure 3). Les chevreux du groupe témoin (Contrôle) ont eu une forte augmentation de l'excrétion à J6 et J8, avec respectivement plus de 66 millions et 106 millions d'oocystes par gramme de fèces. Le niveau d'excrétion parasitaire diminue de J10 à J14, suite probablement à l'acquisition d'immunité par les animaux (Figure 3). L'excrétion des oocystes est moins importante, de J6 à J10, chez le groupe traité. Une réduction significative de l'excrétion parasitaire a été enregistrée par rapport au lot témoin : de 69,60% à J6 et de 85,72% à J8 ($p < 0,05$).

Suivi du poids des animaux

Un gain de croissance de 30% a été noté chez les animaux traités, soit une différence significative d'un kilo de poids vif ($p < 0,05$).

DISCUSSION

La cryptosporidiose est une maladie parasitaire zoonotique émergente, de distribution mondiale, qui a été largement négligée et très peu étudiée par rapport aux autres maladies (Bamaiyi & Redhuan, 2016). Chez les jeunes ruminants (nouveau-nés), cette maladie est responsable de pertes économiques considérables, de par sa morbidité (diarrhée, déshydratation, retard de croissance, perte de poids), et les mortalités engendrées qui peuvent être très élevées dans certains élevages (De Graaf *et al.*, 1999; Paraud & Chartier, 2012; Thomson *et al.*, 2017). En plus de ces conséquences économiques auxquelles se rajoutent les frais de soins et de traitements réalisés, la cryptosporidiose a un impact en santé publique puisque les ruminants nouveau-nés peuvent excréter une grande quantité d'oocystes qui peuvent se transmettre à d'autres animaux et à l'Homme (transmission zoonotique). La résistance des oocystes, à la fois dans le milieu extérieur et à la plupart des désinfectants usuels, rend la maîtrise de cette maladie très difficile en élevage. Plusieurs produits ont été testés chez les ruminants, d'une manière préventive ou curative, et aucun n'a donné des résultats satisfaisants, ni capable de complètement éliminer l'infection (Dinler *et al.*, 2017). De plus, certains produits étaient considérés comme très cytotoxiques ou pouvant engendrer une antibiorésistance. Les recherches actuelles s'orientent sur l'utilisation des produits naturels, dans une stratégie préventive. Dans cette optique, une attention particulière a été consacrée ces dernières années à l'utilisation des produits naturels (chitosan, probiotiques, pré-biotiques...) qui sont considérés comme des produits « sans danger », et acceptables par le grand public. L'objectif de ce travail était de rechercher des stratégies thérapeutiques et préventives innovantes basées sur l'utilisation de ces produits naturels pour



B.

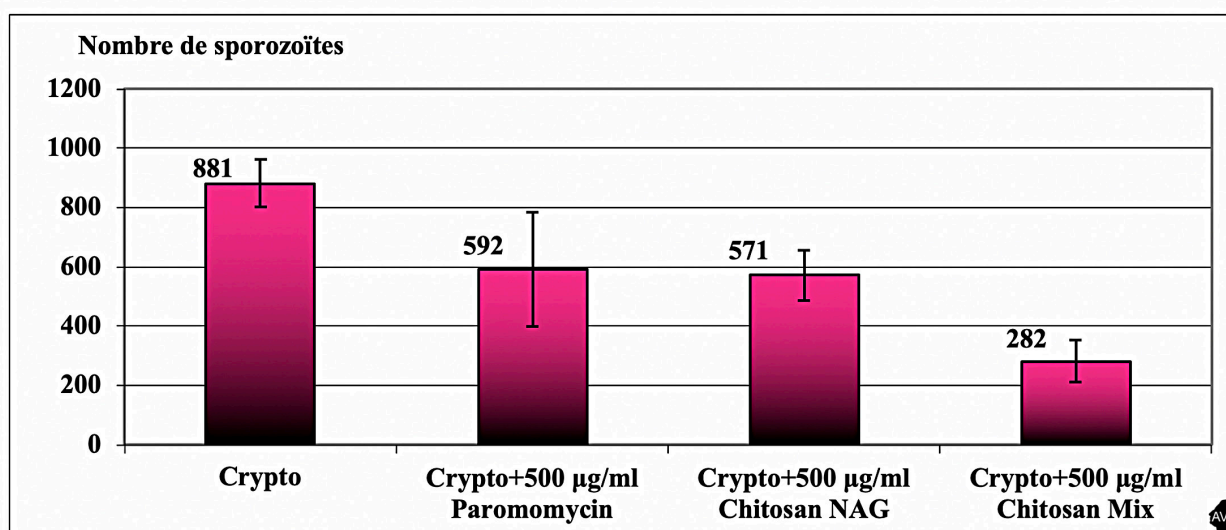


Figure 1 : 1 A. Effets du sulfate de paromomycine, du chitosan Nag et du chitosan Mix sur le développement de *C. parvum* dans le modèle cellulaire HCT-8. Les cellules dans chaque puits ont été infectées avec des oocystes de *C. parvum*. Après 48h, les trois produits ont été rajoutés à la dose de 500 µg/ml. Les valeurs sont comparées avec celles des cellules contrôles infectées non traitées \pm SEM. L'analyse statistique a été effectuée avec le test de Kruskal-Wallis. La différence est significative quand $P < 0,05$ entre les cellules traitées et les cellules contrôles.

1 B. Effets du sulfate de paromomycine, du chitosan Nag et du chitosan Mix sur le développement de *C. parvum* dans le modèle cellulaire Caco-2. Les cellules dans chaque puits ont été infectées avec des oocystes de *C. parvum*. Après 48h, les trois produits ont été rajoutés à la dose de 500 µg/ml. Les valeurs sont comparées avec celles des cellules contrôles infectées non traitées \pm SEM. L'analyse statistique a été effectuée avec le test de Kruskal-Wallis. La différence est significative quand $P < 0,05$ entre les cellules traitées et les cellules contrôles.

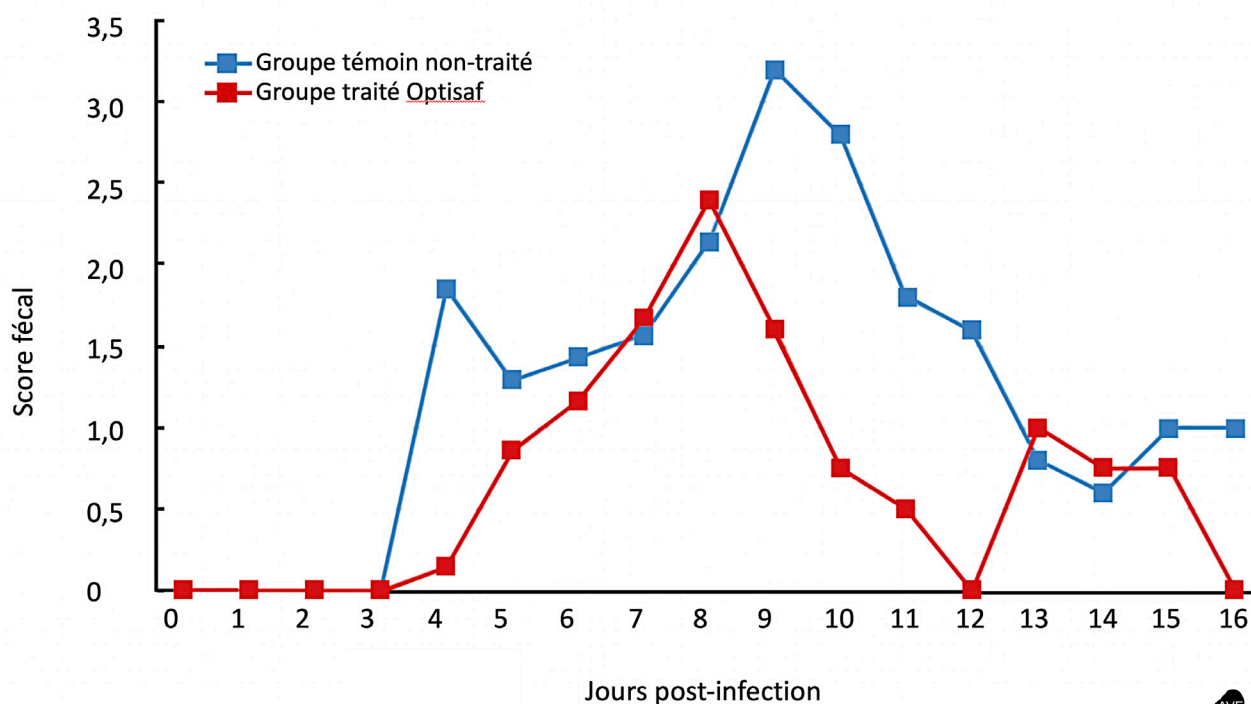


Figure 2 : Effets de l'Optisaf® sur la diarrhée des chevreaux (scores fécaux) au cours du temps durant 2 semaines post-infection. En bleu les animaux infectés non traités. En rouge, les animaux infectés par une souche de *C. parvum* à la dose de 10⁵ par voie orale à J3 et traités par l'Optisaf®.

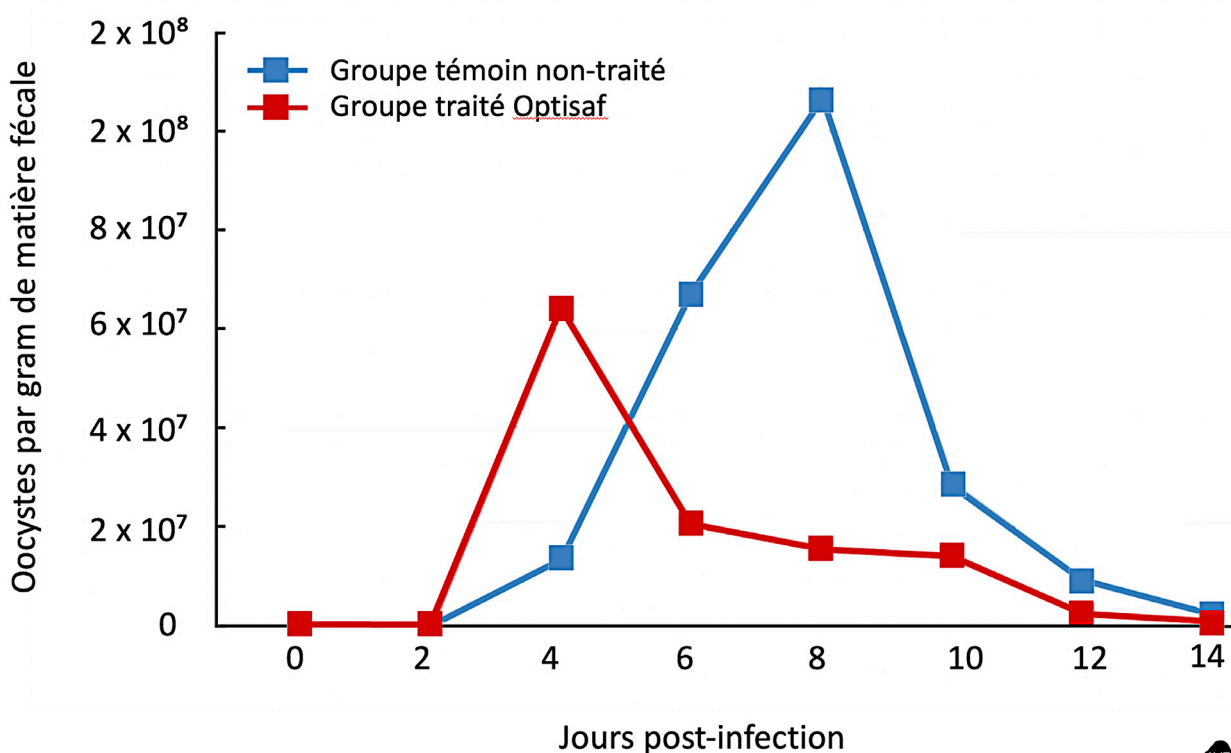


Figure 3 : Effets de l'Optisaf® sur l'excrétion fécale d'oocystes de *C. parvum* par les chevreaux au cours du temps durant 2 semaines post-infection. En bleu les animaux infectés non traités. En rouge, les animaux infectés par une souche de *C. parvum* à la dose de 10⁵ par voie orale à J3 et traités par l'Optisaf®.

lutter contre la cryptosporidiose chez les jeunes ruminants (veau, chevreau, agneau). Ces produits pourraient constituer une très bonne alternative à l'utilisation des antibiotiques, limitant ainsi l'apparition de résistance (ou de multi-résistances) aux agents antimicrobiens. Des produits naturels (chitosans Nag et Mix) ont été évalués *in vitro* et *in vivo*. Concernant l'essai thérapeutique *in vitro*, les modèles HCT-8 et Caco-2 ont été choisis car les cellules sont sensibles à l'infection par *Cryptosporidium parvum*. Ces lignées se caractérisent par une croissance lente (pour les Caco-2) et rapide (pour les HCT-8), elles sont également dotées des caractéristiques épithéliales typiques (bordures en brosses) qui permettent de mimer les entérocytes et donc la croissance des cryptosporidies (Favennec, 1997; Hijjawi, 2010). Les cellules Caco-2 et HCT-8 se sont révélées comme de très bons modèles pour les cultures de cryptosporidies (Karanis & Aldeyari, 2011; Maillot *et al.*, 1997). Notre étude montre clairement que ces polysaccharides naturels réduisent le nombre de formes intracellulaires du parasite et de manière efficace. Ces résultats encourageants et prometteurs obtenus en culture cellulaire nous ont amené à réaliser un essai *in vivo* chez le chevreau. En effet, la recherche d'un traitement ou d'une prévention efficace en utilisant des produits naturels dans les élevages permettra de limiter les pertes économiques en élevages de ruminants et atténuer la contamination de l'environnement. Les chevreaux sont les ruminants les plus sensibles à l'infection cryptosporidienne. Ce modèle a été caractérisé suite à l'infection expérimentale par 6×10^6 oocystes de *C. parvum*. Les symptômes classiques de la cryptosporidiose (diarrhée jaunâtre avec présence du mucus) apparaissent 72h après l'infection. L'excrétion des oocystes commence à partir du quatrième jour post-infection, et diminue vers le septième jour post-infection. Les lésions intestinales (partie distale du duodénum et l'iléon) sont identiques à celles observées chez les autres ruminants, mais elles sont beaucoup plus sévères, ce qui en fait un modèle expérimental de choix recommandé par plusieurs auteurs (Koudela & Jiri, 1997; Mancassola *et al.* 1997; Castro-Hamida *et al.*; 2004; Viel *et al.*, 2007; Petermann *et al.*, 2014). Dans notre modèle *in vivo* chez le chevreau, l'excrétion fécale d'oocystes observée chez la totalité des animaux confirme l'infectiosité de l'inoculum de *C. parvum* utilisé. Le profil d'excrétion obtenu dans le lot témoin est très proche de celui

observé lors de cryptosporidiose naturelle. Par ailleurs, le délai d'apparition de l'excrétion fécale des oocystes suggère que les chevreaux n'avaient pas été infectés dans leur élevage d'origine. Dans le groupe témoin l'excrétion fécale d'oocystes a débuté à J6 pour atteindre un maximum à J8 alors que chez le groupe traité, les animaux avaient des excrétions fécales largement inférieures aux témoins infectés non traités. Le décalage dans le niveau d'excrétion fécale d'oocystes est un phénomène déjà décrit aux cours d'essais thérapeutiques impliquant d'autres produits tels que le sulfate de paromomycine ou le lactate d'halofuginone. La supplémentation du lait par de l'Optisaf[®] contenant du chitosan retarde le développement du parasite. Le mécanisme d'action précis est inconnu et pourrait être lié à une action sur les trophozoïtes et/ou la production d'oocystes (effets directs sur la viabilité du parasite, et/ou sa multiplication dans les entérocytes). Une autre hypothèse est que le chitosan piège les oocystes en les attirant et les empêchant de se fixer aux cellules. Aucune preuve n'existe pour étayer ces hypothèses. Concernant la diarrhée, elle apparaît à J4 et atteint un maximum à J9 chez les chevreaux témoins infectés non traités avec une moyenne de score diarrhéique de 3,3 versus 2,4 chez les animaux traités. En tenant compte de la corrélation qui existe entre l'excrétion fécale d'oocystes et l'intensité de la diarrhée, les résultats laissent à penser que le produit utilisé améliore l'état clinique des animaux infectés par *C. parvum*. De plus, la supplémentation par l'Optisaf[®] améliore la croissance des chevreaux traités (gain de 1 kg de poids vif par rapport aux témoins) qui font une infection moins sévère que les témoins.

CONCLUSION

Ce travail a permis de montrer pour la première fois la capacité inhibitrice des polysaccharides naturels (chitosan Nag et chitosan Mix) sur la multiplication *in vitro* de *C. parvum* dans deux modèles connus de culture cellulaire (HCT-8 et Caco-2) et, *in vivo*, chez le chevreau infecté expérimentalement. Ces résultats intéressants, encourageants et prometteurs ouvrent de nouvelles pistes dans la lutte contre la cryptosporidiose animale.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie pour leur participation à cette étude Aurélie Chevillot, Oleg Chihai, Mohamed Mameri, Myriam Thomas, Bruno Polack et Isabelle Vallée de l'UMR BPAR (Enva, Anses, Inra). Merci à Jean-Philippe Marden et Eric Auclair de Phileo-Lesaffre pour le financement de l'étude ainsi que Mr Christian Mage pour sa collaboration dans la partie expérimentation animale.

BIBLIOGRAPHIE

- Adjou K. Actualités sur le traitement et la prévention de la cryptosporidiose des ruminants. *Point Vét.* 2014 ; 346 : 50-54.
- Alvares AL, Garcia EB, Callejas FG, Couso GH, Mendez JB. *In vitro* evaluation of suppressive effect of chitosan/poly (vinyl alcohol) microspheres on attachment of *C. parvum* to enterocytic cells. *Eur J Pharm Sc.* 2012; 47: 215-227.
- Bamaiyi, P.H. & Redhuan, N.E.M. Prevalence and risk factors for cryptosporidiosis: a global, emerging, neglected zoonosis. *Asian Biomed.* 2016; 10: 309–325.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004; 38: 818-862
- Castro-Hermida JA, Gonzales-Losada YA, Ares-Mazas E. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.* 2002; 106: 1-10.
- Castro-Hermida, JA, Pors, I., Otero-Espinar, F, Luzardo-Alvarez, A., Ares-Mazás, *et al.* C. Efficacy of α -cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats. *Vet Parasitol.* 2004; 120: 35–41.
- Chartier C & Paraud C. La cryptosporidiose des ruminants. *Bull GTV.* 2010; 52: 83-92.
- De Graaf DC, Spano F, Petry F, Sagodira S, Bonnin A. Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or a fantasy. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 1289-1306.
- Dinler, C., Ulutas, B., Dinler, C., Ulutas, B. Cryptosporidiosis in ruminants: Update and current therapeutic approaches. *Am J Anim Vet. Sci.* 2017; 12: 96–103.
- Fayer R, Santin M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 2008; 156: 191-198.
- Favennec L. Physiopathologic and therapeutic studies *in vitro* and *in vivo* models of *Cryptosporidium parvum* infection. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; 44: 69–70.
- Hijjawi N. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Exp Parasitol.* 2010; 124, 54–60.
- Karanis P. & Aldeyarbi HM. Evolution of *Cryptosporidium in vitro* culture. *Int J Parasitol.* 2011 ; 41 : 1231–1242.
- Koudela B. & Jirí, V. 1997. Experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol.* 1997; 71: 273–281.
- Maillot C, Favennec L, Francois A, Ducrotte P, Brasseur P. Sexual and asexual development of *Cryptosporidium parvum* in five oocyst- or sporozoite-infected human enterocytic cell lines. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; 44: 582–585.
- Mammeri M. Chevillot A, Thomas M, Polack B, Julien ., Marden JP. *et al.* Efficacy of chitosan, a natural polysaccharide, against *Cryptosporidium parvum in vitro* and *in vivo* in neonatal mice. *Exp Parasitol.* 2018; 194 : 1-8.
- Mancassolla R, Richard A, Naciri M. Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol.* 1997; 69: 31-37.
- Paraud C & Chartier C. Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 2012; 103: 93–97.
- Park Y., Kim M, Park S, Hyeonsook C, Mi-Kyeong J., Jae-Woon N, Kyung-Soo H. “Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-Chitosan”, *J Microbiol Biotech.* 2008; 18(10) :1729-1734.
- Petermann J, Pors I, Paraud, C. & Chartier, C. Efficacy of halofuginone lactate against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Vet Parasitol.* 2014; 202: 326–329.
- Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison EA *et al.*, Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res.* 2017 ; 48: 42.
- Viel H, Roques H, Martin J, Chartier C. Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Parasitol Res.* 2007; 102: 163-166.