

## VALOR PREDICTIVO POSITIVO DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DIARREA NEONATAL EN TERNEROS<sup>1</sup>

*Selma Franco<sup>2</sup>; Marcelo Signorini<sup>3</sup>; Héctor Tarabla<sup>4</sup>*

### RESUMEN

En el diagnóstico a campo, el médico veterinario clínico debe estimar el diagnóstico etiológico más probable ante una serie de signos y datos anamnésticos y epidemiológicos de un ternero con diarrea neonatal. El objetivo de este trabajo fue determinar el valor predictivo positivo del diagnóstico parasitológico y bacteriano efectuado por veterinarios de campo en terneros con diarrea. Durante un período de ocho meses, se recolectaron muestras de heces provenientes de 92 terneros con diarrea. Se registró 118 diagnósticos presuntivos, 68 bacterianos, 46 parasitarios y cuatro virales. En el laboratorio se efectuaron 86 diagnósticos, 63 bacterianos (*E. coli* 60,2%, *Salmonella* spp. 1,0%) y 23 parasitarios (*Eimeria* spp. 5,8%, *Cryptosporidium* spp. 16,5%). El diagnóstico clínico presuntivo estuvo significativamente asociado a los resultados del laboratorio, en el caso de presunción de etiologías bacterianas ( $P < 0,05$ ), pero no en las parasitarias. La concordancia entre los diagnósticos bacterianos presuntivos y de laboratorio fue moderada con un valor de  $\kappa = 0,54$  (0,358; 0,717). Recibieron tratamiento quimioterápico específico 26 de los 65 casos de laboratorio bacterianas, mientras que tres de los seis terneros con coccidiosis confirmada recibieron sulfonamidas. Existe una concordancia de pobre a moderada entre el diagnóstico presuntivo y el clínico en terneros con diarrea neonatal. En el estudio no se presentaron signos patognomónicos que permitirían pronosticar con precisión aceptable el agente etiológico asociado a la presencia de diarrea neonatal en terneros, razón por la cual, el diagnóstico basado exclusivamente en el examen clínico tiene un margen de error.

**PALABRAS CLAVES:** Pronosticar, anamnéstico, epidemiológico, parásito, bacterial.

<sup>1</sup> Recepción: 29 de mayo de 2015. Aceptación: 12 de octubre de 2015. Extracto de la tesis de Maestría del primer autor.

<sup>2</sup> M.Sc. en Medicina Preventiva. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC).  
e-mail: pkfranco91@hotmail.com

<sup>3</sup> Ph.D. en Epidemiología Veterinaria. INTA. FCV, UNL Santa Fe, Rafaela Argentina. e-mail: msignorini@gmail.com

<sup>4</sup> Ph.D. en Epidemiología Veterinaria. INTA. CC 22, 2300 Rafaela, Santa Fe. e-mail: htarabla@rafaela.inta.gov.ar

## POSITIVE PREDICTIVE VALUE OF CLINICAL DIAGNOSIS OF NEONATAL DIARRHEA IN CALVES

### ABSTRACT

During field practice, veterinarians must estimate the etiological diagnosis upon a series of signs, anamnesis and epidemiological data on a calf with neonatal diarrhea. The objective of this study was to find out the positive predictive value of parasitological and bacteriological diagnoses performed by veterinary clinicians on calves with diarrhea. Over an eight month period, there were collected feces samples from 92 calves with diarrhea. In total, 118 clinical diagnosis were registered, 68 bacterial, 46 parasitic and four viral. In the laboratory were registered 86 diagnosis, 63 bacterial (*E. coli* 60,2%, *Salmonella* spp. 1,0%) and 23 parasitic (*Eimeria* spp. 5,8%, *Cryptosporidium* spp. 16,5%). Clinical diagnosis was significantly associated to laboratory findings upon bacterial presumption ( $P < 0,05$ ), but not in the case of parasites. The concordance between clinical and laboratory bacterial diagnoses was moderate with kappa = 0,538 (0,358; 0,717). Received specific chemotherapeutic treatment 26 of 65 bacterial laboratory cases, while three out of six calves with confirmed coccidia infestation got sulfonamides. The concordance between clinical and laboratory diagnoses ranged from poor to moderate o calves with acute diarrhea. In this study no clinical signs allowed a precise prognosis of the etiological agent associated to calf neonatal diarrhea; for these reasons, diagnosis based exclusively upon clinical examination has a margin of error.

**KEY WORDS:** Prognosis, anamnestic, epidemiology, parasite, bacterial.

### INTRODUCCIÓN

La diarrea neonatal de los terneros es uno de los problemas sanitarios de mayor relevancia en las primeras semanas de vida, representa una importante fuente de pérdidas económicas. Estudios desarrollados en diferentes países demostraron que *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Salmonella* spp., *Cyptosporidium* spp., *Eimeria* spp., Rotavirus y Coronavirus son los principales agentes etiológicos diagnosticados en brotes de esta patología en terneros (Bellinzoni *et al.*

1990, Naciri *et al.* 1999, Lorino *et al.* 2005). Sin embargo, para que se manifieste el síndrome clínico los agentes causales y los factores contribuyentes pueden actuar en diferentes combinaciones, habiéndose demostrado la relevancia de factores como la transferencia de inmunidad pasiva y las condiciones ecológicas en las cuales se cría el ternero en sus primeros días (Krogh 1987, Williams *et al.* 2007).

En el diagnóstico a campo, el veterinario debe estimar el diagnóstico presuntivo más probable ante una

serie de signos y datos anamnésicos y epidemiológicos del ternero con diarrea (Tarabla 2000). Efectuado este diagnóstico, el tratamiento se inicia inmediatamente aunque no pueda ser verificado en el laboratorio.

Como paso inicial, el veterinario efectúa la anamnesis del caso, lo que permite conocer la historia del hato y del ternero en particular. Durante la evaluación clínica se considera la edad de los terneros, se inspecciona la región anal, se determina la consistencia y el color de la materia fecal, la turgencia de la piel y la temperatura rectal. Conjuntamente con los datos epidemiológicos se emite un diagnóstico presuntivo de los posibles agentes etiológicos responsables de la diarrea. Sin embargo, solo el diagnóstico de laboratorio podrá determinar el agente etiológico de la diarrea. La identificación del agente patógeno es importante, para determinar las medidas de prevención y el tratamiento adecuado basándose en las características epidemiológicas del mismo.

El valor predictivo de la prueba positiva o valor predictivo positivo (VP) es la probabilidad de que un animal positivo a una prueba diagnóstica esté realmente enfermo (Tarabla 2000).

En un estudio sobre mastitis realizado en Nueva York (EE.UU), se efectuaron cultivos bacterianos en 118 muestras de leche, comparando los resultados de laboratorio con los diagnósticos que habían efectuado los veterinarios basados en la inspección clínica. De un total de 51 diagnósticos presuntivos de bacterias Gram positivas, 31 fueron confirmados por los cultivos bacterianos (VP+60,8%). En el caso de bacterias coliformes, 23 de 55 diagnósticos fueron confirmados por el laboratorio (VP+41,8%). En la práctica, esto significa que el 39,2% de los casos de infecciones por bacterias Gram positiva y el 58,2% de las causadas por coliformes recibieron tratamiento inadecuado (White *et al.* 1986).

El trabajo intentó cuantificar la probabilidad que los diagnósticos etiológicos bacteriológicos y parasitarios efectuados por veterinarios de campo sean confirmados por pruebas de laboratorio específicas. Por lo antes expuesto, el objetivo fue determinar el valor predictivo positivo del diagnóstico parasitológico y bacteriano efectuado por veterinarios clínicos en terneros con diarrea.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Del 12 de agosto 2009 al 7 de junio 2010, se recolectaron muestras de

materia fecal provenientes de 92 terneros Holstein con diarrea, localizados en Santa Fe, Argentina. Los terneros tenían entre 2 y 60 días de edad, pertenecían a nueve establecimientos lecheros de la región central Santafesina, Argentina.

Se consideró como caso de diarrea, la presencia de heces acuosas o pastosas. El valor predictivo positivo (VP+) fue definido como la probabilidad de aislar agentes etiológicos parasitarios (*Cryptosporidium* y *Eimeria* spp.) o bacterianos (*E. coli* y *Salmonella* spp.) en terneros con diarrea y diagnóstico clínico de uno o más de estos cuatro agentes etiológicos.

#### **Recolección de muestras:**

Se entregó un protocolo a los Médicos Veterinarios clínicos para recabar información sobre el caso que remitían. El formulario incluyó información sobre la raza, sexo, edad, alimentación, diagnóstico presuntivo de la diarrea, mortalidad del ternero, características de la diarrea, tiempo de duración de la diarrea. Las muestras de materia fecal de cada ternero fueron obtenidas directamente del recto, se utilizaron bolsas de polietileno rotuladas con el número del ternero y la fecha de muestreo, luego fueron conservadas en refrigeración a 4° C y enviadas al Laboratorio del Hospital de Grandes Animales de la Facultad de

Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral en cajas de hielo seco refrigeradas.

#### **Procedimiento de laboratorio:**

Para la identificación y caracterización microbiológica de las parasitarias *Cryptosporidium* spp. se utilizó la tinción de Ziehl Neelsen modificada (Rosileira 2006). Se dejó secar al aire una gota de sedimento de materia fecal (MF) en un portaobjetos, se cubrió con fucsina fenicada durante 5 min, se lavó con agua corriente y se decoloró con alcohol clorhídrico al 3%. Posteriormente, se lavó con agua corriente y se cubrió con azul de metileno al 1% durante 10 min, se lavó, secó y se observó al microscopio (45 x y 100 x). Con esta coloración los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., se tiñeron de color rosado intenso o claro, con bordes definidos.

Para identificar la *Eimeria* spp. se realizó un conteo de ooquistes por gramo de heces (opg) utilizando la técnica de Mc Master modificada (Roberts y O'Sullivan 1949), con un límite de detección de 100 opg. Se colocó 3 g de materia fecal y 60 ml de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) se tapó y agitó para disolver las heces. Se coló recogiendo la suspensión en otro envase y se dejó reposar unos segundos hasta que flotaran las burbujas mayores. Posteriormente, se tomó una

muestra con pipeta. Luego de cargar las cuatro celdas de la cámara de Mc Master; se esperó tres minutos y, posteriormente, se observó al microscopio con un aumento de 100x.

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se utilizó como medio de pre-enriquecimiento caldo tetrionato adicionado con iodine, se incubó por 24 horas a 37° C, posteriormente, se realizaron repiques a medios selectivos y diferenciales como SS (*Salmonella-Shiguella*, Britania, Argentina), incubándose de 24 a 48 horas a 37° C en aerobiosis, fueron seleccionadas como colonias sospechosas aquellas de 2 a 3 mm de diámetro, lactosa negativas y productoras de sulfhídrico. Las mismas fueron sembradas en agar tripticasa soya y a partir de ahí, se realizaron pruebas bioquímicas para la determinación de género: Tinción de Gram, oxidasa, ureasa, fenilalanina desaminasa, lisina, ornitina, hierro triple azúcar (TSI) (Terragno 2003).

#### **Prueba TSI:**

Se realizó la siembra partiendo de un cultivo puro, se picó el fondo con un asa y se extendió sobre la superficie del medio. Se incubó a 37° C durante 24 horas. La presencia de ácido sulfhídrico fue un indicativo de *Salmonella*, por lo cual se realizaron otras pruebas bioquímicas para diferenciarla de otras bacterias (Murray *et al.* 1999).

#### **Prueba IMVIC (Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer y Citrato)**

##### **Indol:**

Se inoculó tubos con caldo triptonada y se incubaron a 37° C por 24 horas. Luego, se agregaron unas gotas del reactivo Kovacs y, tras unos minutos, se observó en la superficie el cambio a un color rojizo, lo que indicó que la prueba era positiva (Faddin y Jean 2000).

##### **Rojo metilo:**

Se inocularon tubos con caldo de Rojo metilo y Voges Proskauer e incubaron a 37° C por 48 horas. Luego, se agregaron cinco gotas de solución de rojo metilo. Se consideró positivo cuando se desarrolló un color rojo y negativo cuando el color era amarillo (Boop *et al.* 1999)

##### **Voges Proskauer (VP):**

Se inocularon tubos con caldo RM-VP e incubaron a 37° C por 48 horas, luego se le agregaron cinco gotas de solución de VP, 1 ml de KOH (hidróxido de potasio) al 10%, positivo cuando se desarrolló un color rosa en la superficie (Bopp *et al.* 1999).

##### **Citrato:**

Se inoculó en la superficie del tubo, luego se incubó a 37° C por 24 horas y la presencia de un color azul indicó que la prueba era positiva (Simmons *et al.* 1999)

La Prueba IMVIC debe generar un resultado negativo, positivo, negativo, positivo (- + -- +) para que se considere presuntivo de *Salmonella*.

Para realizar el aislamiento e identificación de *Escherichia coli* a partir de las muestras de materia fecal, se tomó una alícuota con un asa de ojal y se estirió sobre la superficie en agar Mc Conkey (Merck, Argentina), se incubó durante 24 horas a 37°C. A las colonias fermentadoras de lactosa (2 ó 3 por placa) se repicaron en agar tripticasa soya (Britania, Argentina) para obtener un cultivo puro y abundante. Luego, se realizó la determinación de su perfil bioquímico utilizando la siguiente metodología estandarizada (Koneman *et al.* 1999) Morfología microscópica, Gram, oxidasa, TSI (agar hierro triple azúcar Britania, Argentina) e IMVIC (Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer y Citrato).

#### **Prueba de hierro triple azúcar:**

Se sembró a partir de un cultivo puro picando el fondo con un asa y se extendió sobre la superficie del medio. Se incubó a 37°C durante 24 horas. Resultó positiva para *Escherichia coli* cuando existió producción de gas. Los resultados positivo positivo negativo negativo de las pruebas IMVIC (Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer y Citrato) indicaron la presencia de *E. coli* (Murray y Barron 1999).

#### **Análisis Estadístico:**

En este estudio se incluyeron los diagnósticos presuntivos de etiologías bacterianas y parasitarias efectuados a campo, los diagnósticos efectuados en el laboratorio confirmaron o negaron los agentes etiológicos.

El análisis estadístico se realizó en tres etapas: a) análisis descriptivo, b) búsqueda de asociaciones entre los diagnósticos y las características de los terneros, de las diarreas y los tratamientos efectuados y c) búsqueda de asociaciones entre los diagnósticos clínicos presuntivos y de laboratorio.

El análisis incluyó chi-cuadrado para establecer la existencia de asociaciones y el índice kappa para estimar el grado de concordancia entre el diagnóstico clínico presuntivo y de laboratorio. La valoración de este índice se basó en la siguiente escala: mayor a 0,75 excelente, 0,5-0,40 buena a regular y menor a 0,40 pobre (Fleiss 1981). En este trabajo el valor predictivo positivo (VPP) fue definido como la probabilidad para detectar agentes etiológicos parasitarios (*Cryptosporidium* y *Eimeria* spp.) o bacterianos (*E. coli* y *Salmonella* spp.) en terneros con diarrea y diagnóstico clínico etiológico de estos cuatro agentes. Todos los análisis se efectuaron con el programa

estadístico SPSS® Statistical product and service solution (Pardo *et al.* 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de materia fecal procedentes de terneros (n=92) con signos de diarrea (81% de los casos) se detectó la presencia de alguno de los cuatro agentes etiológicos investigados. Las etiologías presuntivas fueron mayoritariamente

bacterianas (n=68), parasitarias (n=46), y virales (n=4), ya sea como únicas entidades o combinadas entre sí (Cuadro 1).

Los agentes etiológicos detectados en laboratorio fueron en su mayoría de naturaleza bacteriana (n=63), en 11 oportunidades combinados con agentes parasitarios (Cuadro 2).

**CUADRO 1. FRECUENCIA DE DIAGNÓSTICOS ETIOLÓGICOS PRESUNTIVOS DE DIARREA EN TERNEROS (N=118). SANTA FE, ARGENTINA.**

Diagnóstico presuntivo			
	Agente etiológico	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Bacterias (n= 68)	<i>E. coli</i>	57	48,3
	<i>Salmonella</i> spp.	11	9,3
Parásitos (n= 46)	<i>Eimeria</i> spp.	10	8,5
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	36	30,5
	Rotavirus	4	3,4
Total		118	100,0

**CUADRO 2. FRECUENCIA DE AGENTES ETIOLÓGICOS DETECTADAS EN LABORATORIO SOBRE EL TOTAL DE DIAGNÓSTICOS EFECTUADOS (N=103), SANTA FE, ARGENTINA.**

Diagnóstico laboratorio			
Agente etiológico		Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Bacterias (n= 63)	<i>E. coli</i>	62	60,2
	<i>Salmonella</i> spp.	1	0,9
Parásitos (n= 23)	<i>Eimeria</i> spp.	6	5,8
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	17	16,5
Diagnósticos negativos		17	16,5
Total		103	100,0

Los cuatro agentes etiológicos investigados son reconocidos como responsables de 75% a 95% de los casos de diarreas en terneros (Bellinzoni *et al.* 1990, Pérez *et al.* 2005, Ruíz *et al.* 2000, Achá *et al.* 2004, Williams *et al.* 2007). Igualmente, la menor detección de *Cryptosporidium* y *Eimeria* podrían estar indicando una menor agresividad de estos agentes, su menor presencia en el medio rural de la zona estudiada y/o la mayor frecuencia de agentes bacterianos en la zona de estudio. Asimismo, Nagy y Fekete (2005) especulan que podrían ser agentes causales co-laterales a la presencia de un agente más agresivo (como por ejemplo la presencia de cepas patógenas de *E. coli*) para desencadenar trastornos gastrointestinales de tipo diarreico detectable clínicamente.

Se evaluaron los agentes etiológicos bacterianos y parasitarios diagnosticables por las técnicas tradicionales. Los terneros con diarrea que no pudieron ubicarse en ninguna de las categorías diagnosticadas (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Eimeria* spp., *Cryptosporidium*), estuvieron presentes otros microorganismos responsables de la diarrea neonatal.

Estos resultados no reflejan la prevalencia de agentes etiológicos en la población en riesgo, sino la tasa

proporcional dentro de los terneros que padecían diarrea. Esta última, influenciada por la probabilidad de diarreas y de cada agente etiológico en la población susceptible, también por la frecuencia relativa dentro de la población con diarrea. Es importante recordar que *E. coli* es una presencia habitual en la flora intestinal de animales sin diarrea (Martín *et al.* 2003), por lo que su detección no es sinónimo de causalidad. Sin embargo, el diagnóstico de laboratorio se efectuó simplemente para corroborar el diagnóstico clínico presuntivo del veterinario.

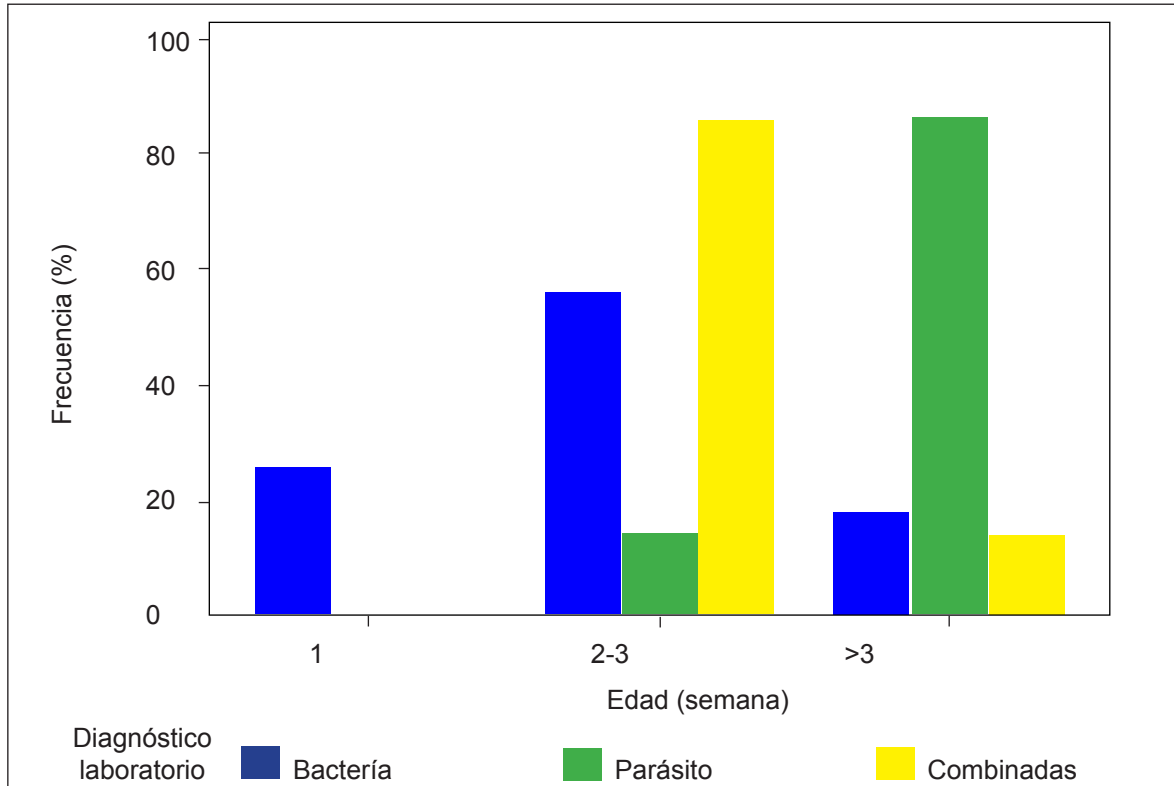
Como es lógico la probabilidad para detectar un agente etiológico aumenta con el número de muestras analizadas. Por consiguiente, se analizó una muestra donde quizás la concentración de agentes etiológicos en las heces era baja. Por ello, su ausencia en el laboratorio puede reflejar un diagnóstico presuntivo falso positivo se pudo deber a una falla del veterinario en detectar la ausencia del agente en el examen clínico, o también el efecto del diagnóstico falso negativos en el laboratorio a una falla en detectar un agente existente en la diarrea o la combinación de ambos. Por otra parte, a medida que aumenta la prevalencia de un agente en la población, aumenta también la probabilidad de diagnósticos verdadero positivos (Tarabla 2000), por lo que no puede descartarse que



el mayor valor predictivo positivo (VPP) en los diagnósticos bacterianos y específicamente *E. coli*, se deba simplemente a su mayor prevalencia en la población en riesgo.

Con relación al diagnóstico de laboratorio y la edad de los terneros,

los resultados indicaron una mayor proporción de infección por bacterias y combinadas (bacterias y parásitos) entre la segunda y tercera semana de edad. Con respecto a las de origen parasitario se presentaron con mayor frecuencia de la tercera semana en adelante (Figura 1).



**Figura 1. Frecuencia de la edad en función al diagnóstico de laboratorio en la diarrea neonatal de terneros.**

La edad de los terneros que muestrearon fue el período de mayor exposición a los factores ambientales y agentes infecciosos (Tadich 1994). La vacunación de la madre antes del parto, resulta en un aumento de las concentraciones de anticuerpos calostrales y títulos de anticuerpos pasivos en terneros.

El calostro es el mecanismo que los terneros pueden obtener inmunidad específica contra agentes infecciosos. La provisión de un volumen adecuado y de buena calidad de calostro dentro de las primeras 12 horas de nacido es sumamente importante para una mejor absorción de inmunoglobulinas (Leyán 1994).

La mayor proporción de diarreas con el agente bacteriano y combinado (bacterias y parásitos) presentaron una

materia fecal de tipo pastosa, mientras que el agente parasitario se halló una diarrea de tipo líquida (Cuadro 3).

**CUADRO 3. ASOCIACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO Y LA CONSISTENCIA DE LA MATERIA FECAL EN LA DIARREA NEONATAL DE TERNEROS.**

Diagnóstico clínico	Consistencia de la diarrea	
	Pastosa	Líquida
Bacteria	32 72,7%	12 27,3%
Parásito	3 27,3%	8 72,7%
Combinadas	5 62,5%	3 37,5%

Diferencia significativa  $P < 0,02$ .

En referencia a la consistencia de las diarreas, ésta estuvo asociada tanto al diagnóstico presuntivo como al laboratorio. Las consistencias líquidas se mostraron asociadas con las etiologías parasitarias, coincidiendo con lo publicado por Heine *et al.* (1984), Vergara y Quilez (2004) y Sánchez *et al.* (2008).

El 76% de los casos de diarrea con diagnóstico presuntivo bacteriano

fueron confirmados por el laboratorio, seguido por las de de origen parasitario y combinados (parásitos y agentes bacterianos). El diagnóstico clínico presuntivo estuvo significativamente asociado con los resultados de laboratorio en el caso de presunción de etiologías bacterianas pero no en las parasitarias. La concordancia entre los diagnósticos bacterianos presuntivos y de laboratorio fue moderada ( $k = 0,54$ ) (Cuadro 3).

**CUADRO 4. CONCORDANCIA Y PARÁMETRO DE EVALUACIÓN ENTRE EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y EL DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO EN LA DIARREA NEONATAL EN TERNEROS.**

Muestras	VPP (%)	Índice kappa
Bacterias	76	0,28
Parásitos	26	0,02
Combinadas	12	-0,03

VPP = Valor predictivo positivo

Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).

Uno de los objetivos del diagnóstico clínico presuntivo es instrumentar medidas terapéuticas inmediatas. Sin embargo, se observó que una gran proporción de los terneros no recibieron tratamiento para *E. coli*, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Eimeria* spp.

De los terneros diagnosticados presuntivamente como afectados por agentes bacterianos, la tercera parte recibió un antimicrobiano. De igual manera, menos de la mitad de los terneros con diarreas diagnosticadas clínicamente como coccidiosis recibieron sulfamidas. La mayor parte de los terneros enfermos recibieron una terapia de apoyo basada en re-hidratantes y anti-diarreicos.

### CONCLUSIONES

- Existe una concordancia de pobre a moderada ( $k=0,54$ ) entre el diagnóstico presuntivo y el diagnóstico clínico en terneros con diarrea neonatal.
- En el estudio no se presentaron signos patognomónicos, que permitan pronosticar con precisión aceptable el agente etiológico asociado a la presencia de diarrea neonatal en terneros.
- El diagnóstico basado exclusivamente en el examen clínico tiene un amplio margen de error y deja a una gran

proporción de terneros con diarrea sin un diagnóstico y tratamiento adecuado.

### BIBLIOGRAFÍA

- Achá, SA; Kuhn, I; Jonsson, P; Kotouli, M; Möellby, R. 2004. Studie on calf diarrhoea in Mozambique prevalence of bacterial pathogens. Rev. Vet. Scan. 45:27-36.
- Bellinzoni, RC; Blackhall, J; Terzolo, HR; Moreira, AR; Auza, N; Mattion, N. 1990. Microbiology of diarrhea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 22:130-137.
- Bopp, CHA; Brenner, FW; Wells, JG; Strockbine, NA. 1999. *Escherichia*, *Shiguella* and *Salmonella*. In Manual of microbiology 7 ed. American Society for microbiology Washington, DC. 27:442-458.
- Faddin, MC; Jean, F. 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Panamericana. AR. p. 173-183.
- Fleiss, JL. 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions. 2 ed. Wiley & Sons Inc., New York. p. 321.

- Heine, J; Pohlens, J; Moon, H; Woode, G. 1984. Enterics lesions and diarrhea in notobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. J. Infect Dis. 150:768-775.
- Koneman EW; Allen, SD; Janda, WM; Schreckenberger, PC; Winn, WC. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Médica Panamericana, p. 171-250.
- Krogh, K. 1987. Presentación de *E. coli* enterotoxigénica en terneros con diarrea aguda neonatal. Información Express 9(52):20-22.
- Leyán, V. 1994. Desarrollo del sistema inmune del ternero. Patología Animal 8:3-9.
- Lorino, T; Daudin, JJ; Robin, S; Sanaa, M. 2005. Factors associated with time to neonatal diarrhea in French beef calves. Prev. Vet. Med. 68:91-102.
- Martín, MJ; Martín Sosa, S; Alonso, JM; Hueso, P. 2003. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains bind bovine milk gangliosides in a ceramide-dependent process. Lipids 38:761-768.
- Murray, PR; Baron, P. 1999. Manual of clinical microbiology 7 ed. American Society for microbiology, Washington, DC. 45:5-20.
- Naciri, M; Lefay, MP; Mancassola, R; Poirie, P; Chermette, R. 1999. Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal complex in suckling and dairy calves in France. Vet. Parasitol. 85:245-257.
- Nagy, B; Fekete, PZ. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295:443-454.
- Pardo, A; Ruiz, MA. 2002. SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid: McGraw-Hill.
- Pérez, MA; Bruzual, E; Brito, A; Hurtado, MP. 2005. *Cryptosporidium* spp. Criptosporidiosis. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 25:1.
- Roberts, FH; O' Sullivan, PJ. 1949. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. Austr. J. Agr. Res. 1:99-102.
- Rosileira, M. 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and ZIEHL NEELSEN staining methods. Parasitol Latinoam 61:117-120.

- Ruíz, JA; García, A; Orden, JA; Cid, D; De La Fuente, R. 2000. Detección de los enteropatógenos principales en brotes diarreicos de terneros. Rev. Med. Vet. 17:155-162.
- Sánchez, R; Romero, J; Fonrouge, R. 2008. Dynamic of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the province of Buenos Aires (Argentina) during their first 2 months of age. Vet. Parasitol 151:133-138.
- Simmons, JS. 1999. Culture médium for differentiating organisms of the typhoid aerogenes groups and for isolation certain fungi. J infect Dis. 39:209-214.
- Tadich, N. 1994. Ambiente y enfermedad en los animales de crianza artificial. Patología Animl. 8:10-14.
- Tarabla, H. 2000. Valor Predictivo. Epidemiología Diagnostica. Centro de Publicaciones, Secretaria de Extensión UNL. Santa Fe, AR. p. 60.
- Terragno, T. 2003. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. In Malbran, CG. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas. Dep. de bacteriología. AR. p. 1-37.
- Vergara, C; Quilez, J. 2004. Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. Rev. MVZ.-CORD. 9:363-372.
- Williams, T; Martin, W; Leslie, K; Duffield, T; Nydam, D; Prergrine, A. 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. Prev. Vet. Med. 82:12-28.
- White, M; Glickman, LT; Pallesen, FD; Stem, ES; Dinmore, P; Powers, MS; Powers, P; Smith, M; Jasko, D. 1986. Accuracy of clinicians in predicting the bacterial cause of clinical bovine mastitis. Can Vet. J. 27:218-220.