



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AĞRI YÖRESİNDE İNSAN VE BUZAĞILARDAN ELDE EDİLEN
DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *Cryptosporidium* TÜRLERİNİN
MİKROSKOPİ VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Öğr. Gör. Fethi BARLIK
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan YILMAZ

VAN-2023

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AĞRI YÖRESİNDE İNSAN VE BUZAĞILARDAN ELDE EDİLEN
DIŞKI ÖRNEKLERİNDE *Cryptosporidium* TÜRLERİNİN
MİKROSKOPİ VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Öğr. Gör. Fethi BARLIK
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan YILMAZ

VAN-2023

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı
tarafından TDK-2021-9602 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Ağrı yöresinde insan ve buzağılardan elde edilen dışkı örneklerinde Cryptosporidium türlerinin mikroskopi ve moleküler yöntemlerle araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Fethi BARLIK

Tarih:

İmza:

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince tez konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan YILMAZ'a, tezin hazırlanmasında ve laboratuvar çalışmalarında bana rehberlik edip tüm bilgi ve tecrübelerini aktaran, araştırmanın sonuçlanması için fedakarlıkta bulunan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Abdurrahman EKİCİ ve Arş. Gör. Dr. Selahattin AYDEMİR'e, saha çalışmalarında beni yalnız bırakmayan değerli meslektaşım Vet. Hekim Milad TORAKAMANIAN AFSHAR'a, tüm hayatım boyunca hep yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve maddi/ manevi desteklerini eksik etmeyen çok değerli aileme, hayatıma girdiği andan itibaren her konuda olduğu gibi tez çalışmamda da desteğini hissettiğim çok değerli eşime teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Doktora Tez Projesi olarak yürütülen bu çalışmayı (Proje No: TDK-2021-9602) maddi olarak destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederim.

ÖZET

Barlık F, Ağrı yöresinde insan ve buzağılardan elde edilen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin mikroskopi ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Parazitoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van, 2023. Bu çalışmanın amacı, Ağrı yöresinde insanlarda ve buzağılarda *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığını, modifiye asit-fast boyama (mAF), immünokromatografik kaset test (İKT) ve nested PCR yöntemleriyle araştırmaktır. Çalışmaya başlamadan önce, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmaları Etik Kurulundan çalışma onayı alındı. Çalışma, 01.02.2022- 01.12.2022 tarihleri arasında ishalleri 100 gönüllü hasta ve 193 adet buzağı üzerinde yürütüldü. Sindirim sistemi şikayetleri ile Patnos Devlet Hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran 18-85 yaş aralığındaki ishalleri hastalardan dışkı örnekleri alındı. Ağrı iline bağlı ve rastgele seçilen 14 farklı köye gidilerek, burada bulunan ve rastgele seçilen 193 buzağının direkt olarak rektumundan dışkı örnekleri alındı. Elde edilen tüm dışkı örnekleri, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına ulaştırıldı. Laboratuvarında bütün dışkı örnekleri, modifiye asit-fast boyama (mAF), immünokromatografik kaset test (İKT) ve moleküler yöntemler ile incelendi. İnsanlardan alınan dışkı örneklerinin beşinde (%5), buzağılardan alınan dışkı örneklerinin ise 59'unda (%30,56) *Cryptosporidium parvum* saptandı. Modifiye asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* spp. görülen örneklerde, İKT ve nested-PCR yöntemi ile de parazit belirlendi. Ancak mAF boyama yöntemi ile parazit görülmeyen yedi örnekte, İKT ve nested-PCR yöntemi ile parazit saptandı. Nested-PCR yöntemi ile parazit saptanan bütün örneklerde, İKT yöntemi ile de parazit belirlendi. Sonuç olarak, Ağrı ili ve yöresinde buzağılarda *C. Parvum*'un yüksek oranda saptanması, buzağının ve bölge sakinlerinin cryptosporidiosis açısından risk altında olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca hastanelerde *Cryptosporidium* spp. teşhisinde mAF boyama yöntemine ilave olarak nested PCR veya İKT yönteminin de rutin tanıda kullanılması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium* spp., İnsan, Buzağı, İmmünokromatografik Kaset Test, Modifiye Asit-Fast Boyama, Nested PCR, Ağrı Province, Türkiye

ABSTRACT

Barlık F, Investigation of *Cryptosporidium* species in stool samples obtained from humans and calves by microscopy and molecular methods in Ağrı province, Van Yüzüncü Yıl University, Health Sciences Institute, Department of Medical Parasitology, PhD Thesis, Van, 2023. The aim of this study is to investigate the prevalence of *Cryptosporidium* species in humans and calves in Ağrı province by using modified acid-fast staining (mAF), immunochromatographic cassette test (ICT) and nested PCR methods. Before starting the study, study approval was obtained from Van Yüzüncü Yıl University Animal Researches Local Ethic Committee and Van Yüzüncü Yıl University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee. The study was carried out on 100 volunteer patients with diarrhea and 193 calves between 01.02.2022 and 01.12.2022. Stool samples were taken from patients aged 18-85 years with diarrhea, who applied to various polyclinics of Patnos State Hospital with digestive system complaints. Stool samples were taken directly from the rectum of 193 randomly selected calves in 14 different villages in Ağrı province. All stool samples were delivered to Research Laboratory of Parasitology Department, Faculty of Medicine, Van Yüzüncü Yıl University. In the laboratory, all stool samples were examined by modified acid-fast staining (mAF), immunochromatographic cassette test (ICT) and molecular methods. *Cryptosporidium parvum* was detected in five (5%) stool samples from humans and 59 (30.56%) stool samples from calves. Parasites were also detected by IKT and nested-PCR methods in the samples with *Cryptosporidium* spp. seen by the modified acid-fast staining method. However, in seven samples that did not show parasites by mAF staining method, parasites were detected by ICT and nested-PCR method. Parasites were also detected by the IKT method in all samples in which parasites were detected by the Nested-PCR method. In conclusion, in the high rate detection of *C. parvum* in calves in Ağrı province revealed that calves and residents of the region are at risk for cryptosporidiosis. In addition, it was concluded that in addition to the mAF staining method, nested PCR or ICT method should be used in routine studies in the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. in hospitals.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., Human, Calf, Immunochromatographic Cassette Test, Modified Acid-Fast Staining, Nested PCR, Ağrı Province, Türkiye

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi	4
2.2. Tarihçe	6
2.3. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü	7
2.4. Epidemiyoloji	10
2.4.1. Buzağılardaki epidemiyolojisi	11
2.4.2. İnsanlardaki epidemiyolojisi	13
2.5. Patojenite ve Klinik Belirtiler	16
2.6. İmmünoloji	19
2.7. Tanı	20
2.8. Tedavi	24
2.9. Korunma ve Kontrol	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereç	28
3.1.1 Kullanılan başlıca cihazlar ve sarf malzemeler	30
3.2. Yöntem	32
3.2.1. mAF boyama yöntemi	32
3.2.2. İmünokromatografik kaset test yöntemi	32
3.2.3. Moleküler yöntemler	33
3.2.4. İstatistiksel analiz	38

4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	61
EKLER	62
EK 1: İnsan Etik Kurul Raporu	62
EK 2: Hayvan Etik Kurul Raporu	63
EK 3: Tez Orijinallik Raporu	64



SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
bp	: Base Pair
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
Cl⁻	: Klor
COWP	: <i>Cryptosporidium</i> Oocyst Wall Protein
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFM	: İmmünofloresan Mikroskopi
Ig	: İmmunoglobulin
İKT	: İmmünokromatografik Kaset Test
mAF	: Modifiye Asit-Fast
NTZ	: Nitazoksanid
P	: Fosfor
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PV	: Parazitofor Vakuol
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
sn	: Saniye
SSU rRNA	: Küçük Alt Birim Ribozomal Ribonükleik Asit
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	2021 yılına kadar tanımlanan <i>Cryptosporidium</i> türleri	6
Şekil 2.	<i>Cryptosporidium</i> türlerinin yaşam döğüsü	11
Şekil 3.	<i>C. parvum</i> ve <i>C. hominis</i> 'in neden olduğu insan cryptosporidiosis'inin küresel dağılımı	17
Şekil 4.	Dışkı örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin tanısında kullanılan başlıca yöntemler	25
Şekil 5.	Dışkı örnekleri alınan Ağrı ili merkez köyleri	30
Şekil 6.	Dışkı örnekleri alınan Patnos ilçesine bağlı köyler	30
Şekil 7.	Dışkı örnekleri alınan Tutak ilçesine bağlı köyler	31
Şekil 8.	Dışkı örnekleri alınan Hamur ilçesine bağlı köyler	31
Şekil 9.	Buzağı rektumundan dışkı örneği alımı	32
Şekil 10.	mAF yöntemi ile tespit edilen <i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri	40
Şekil 11.	İKT çalışması ile pozitif olarak değerlendirilen buzağı (B-106) ve insan (İ-2) örneği	41
Şekil 12.	Nested PCR sonrası elektroforez jel görüntüsü	41
Şekil 13.	SnapGene programı sekans sonuçlarının karşılaştırma görüntüsü	43
Şekil 14.	B-161 izolatının 350. baz çiftinde görülen mutasyon	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Birinci PCR bileşenleri ve miktarları	37
Tablo 2.	İkinci PCR bileşenleri ve miktarları	37
Tablo 3.	Birinci PCR ısı döngüsü	37
Tablo 4.	İkinci PCR ısı döngüsü	38
Tablo 5.	<i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif buzağuların ilçe ve köylere göre dağılımı	42
Tablo 6.	<i>Cryptosporidium parvum</i> 'un hastaların yaş ve cinsiyetine göre dağılımı	42
Tablo 7.	Cryptosporidiosis'li hastalarda gözlenen klinik belirtiler	42
Tablo 8.	<i>Cryptosporidium</i> spp. tanısında nested PCR, mAF ve İKT yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri	42

1. GİRİŞ

Paraziter hastalıklar tüm dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli oranlarda morbidite ve mortaliteye neden olurlar. Yenidoğan, yaşlı ve kronik hastalığı olan bireyler sağlıklı bireylere göre paraziter enfeksiyonlar için daha fazla risk altındadır (Piperaki ve Tassios, 2016; Thell ve Pritt, 2016). Paraziter hastalıkların klinik seyrinde konağın bağışıklık durumunun önemi büyüktür. Bu enfeksiyonlar malnütrisyon, malabsorbsiyon, anemi, bağırsak tıkanıklığı, mental ve fiziksel büyüme geriliği ve diyare gibi önemli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Günümüzde, bağırsak parazitozları genellikle ölümcül olmayan klinik bir tablo oluştursa da bazı fırsatçı patojenler, özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerin yaşamını tehdit etmeleri sebebiyle bilim dünyasında önemleri giderek artmaktadır. Bağırsak parazitozlarının toplumdaki yaygınlığının sınırlandırılması için korunma ve kontrol programları oluşturarak uygun girişimsel önlemlerin alınması büyük önem arz etmektedir (Polat ve ark., 2020; Feleke ve ark., 2021; Jayaram ve ark., 2021; Waly ve ark., 2021; Teimouri ve ark., 2022).

Cryptosporidium, *Cystoisospora*, *Cyclospora* ve *Microsporidia* gibi koksidian parazitler insanlarda değişen şiddette ishale neden olabilmektedir. Fırsatçı enterik parazitler arasında bulunan *Cryptosporidium* türleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından B kategorisindeki biyolojik etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Çünkü *Cryptosporidium* türleri genellikle, bağışıklık sistemi sağlam olan bireylerde kendi kendini sınırlayan hastalığa neden olurken, bağışıklığı baskılanmış bireylerde yaşamı tehdit eden hastalığa yol açabilmektedir (Ghoshal ve ark., 2016; Vanathy ve ark., 2017; Zorbozan ve ark., 2018). *Cryptosporidium* spp.'nin neden olduğu zoonotik hastalığa cryptosporidiosis denir. İnsanlarda cryptosporidiosis, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde ve bebeklerde parazitozlara bağlı diyarenin en sık görülen zoonotik etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Razakandrainibe ve ark., 2018).

Cryptosporidium spp., hayvanlarda ve insanlarda oluşturduğu enfeksiyonlar nedeniyle son yüzyılın önemli enterik patojenleri arasında yer almaktadır. *Cryptosporidium* spp.'nin bağışıklığı baskılanmış hastalarda oluşturduğu patojenite,

gündüz bakım merkezlerinden bildirilen salgın raporları ve dünya çapında bildirilen su kaynaklı salgın raporları nedeniyle günümüzde bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca *Cryptosporidium* spp., suyla taşınan en yaygın parazitlerden biri olup ookist formunun, su arıtma cihazlarında kullanılan filtrelerden geçebildiği ve iyi bilinen dezenfektanlara karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Cunha ve ark., 2019).

Cryptosporidium spp. ile enfekte buzağılarda oluşan ishal, buzağılarda büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyerek ve et kalitesini düşürerek verim kaybına yol açtığı, ayrıca buzağı ölümlerine de sebep olduğu bilinmektedir. Bunların yanı sıra enfekte buzağılar, çevreye çok fazla sayıda ookist bulaştırmaları nedeniyle, diğer çiftlik hayvanları ve insanlar için tehlike arz etmektedir (İpek, 2021; Yasur-Landau ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında Ağrı yöresindeki insanlardan alınan ve buzağılardan elde edilen dışkı örneklerinde cryptosporidiosis yaygınlığını modifiye asit-fast boyama (mAF), immünokromatografik kaset test (İKT), nested PCR ve sekans analizi yöntemleri ile araştırarak, parazitin yöredeki yaygınlığını ve baskın türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Cryptosporidium türleri, insanların, evcil ve vahşi hayvanların önemli patojenleri olarak bilim dünyasında giderek daha fazla tanınmaktadır. Bu türler, zorunlu hücre içi (intraseküler) ve ekstrasitoplazmik protozoon canlılar olup gastrointestinal sistem ve solunum sistemindeki fırça epitel hücrelerinin sınırlarında yaşayan apikompleksan parazitlerdir (Şahin ve ark., 2018; Xiao ve Cama, 2018). Parazit, bağışıklık sistemi sağlam bireylerde hafif ishale neden olup, bir süre sonra kendiliğinden sonlanırken bazen kronikleşebilir. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise yaşamı tehdit eden şiddetli ishal ve sıvı kaybına neden olabilir (Ryan ve Xiao, 2014). Enfeksiyonun şiddeti *Cryptosporidium*'un türüne göre değişmektedir. *Cryptosporidium*'un bazı türleri birden fazla konağı enfekte edebilirken, bazı türleri kemirgenler veya geviş getirenler gibi sınırlı bir grubu enfekte edebilmektedir (Fayer, 2008).

Cryptosporidium spp. günümüzde, dünya çapında rastlanan ishallerin önde gelen nedeni olarak ortaya çıkmış olup, küçük çocuklar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde beş yaşından küçük çocuklarda ise orta ile şiddetli gastrointestinal şikayetlerin başlıca nedeni olduğu bildirilmiştir. Gastrointestinal hastalıkların dünyada yayılışı ile alakalı yapılan bir çalışmada; *Cryptosporidium* spp.'nin 2005 ile 2015 yılları arasında yaklaşık yarım milyonu beş yaşın altındaki çocuklar olmak üzere 1 milyondan fazla ölümden ve 71 milyondan fazla insanda kalıcı bozukluklardan sorumlu olduğu, en yüksek ölüm oranlarının ise gelişmekte olan ülkelere, özellikle Sahra altı Afrika ülkelerinde görüldüğü belirtilmiştir (O'Leary ve ark., 2021). *Cryptosporidium* spp., çocuklarda ölümlere sebep olmalarının yanı sıra, inatçı enfeksiyonlara, mental sorunlara, yetersiz beslenmeye ve fiziksel gelişme yetersizliklerine neden olabilmektedir (Troeger ve ark., 2017; Dhal ve ark., 2022).

Cryptosporidiosis'in neden olduğu ishal salgınları son yıllarda birçok ülkede sıklıkla meydana gelse de bu salgınlar, sadece insanları olumsuz etkilemekle kalmamakta, ayrıca özellikle yenidoğan ve buzağı ishallerine ve buna bağlı ölümlere ülkemizde de büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cacciò ve Tosini, 2017; Ertaş ve Ayan, 2021).

Cryptosporidium spp.'nin tanısında temel olarak mikroskopi kullanılsa da bu yöntem birçok araştırmacı tarafından yetersiz olarak görülmektedir. Çünkü mikroskopi, aside dirençli olan *Cryptosporidium* ookistlerinin tanımlanmasında uzmanlık ve deneyim gerektirmektedir. Bu durum, alternatif teşhis tekniklerine doğru bir arayışa neden olmuştur. Tanı teknolojisindeki son gelişmeler ile moleküler yöntemler ve antijen saptama yöntemleri kullanılarak *Cryptosporidium* spp.'nin doğru bir şekilde teşhis edilmesini mümkün hale getirmiştir. Moleküler yöntemler, özellikle PCR yöntemi, *Cryptosporidium* spp.'nin teşhisinde mikroskopinin yerini almaya başlamıştır. *Cryptosporidium* türlerini saptamak amacıyla hem DNA izolasyon teknikleri hem de kopro-antijen kaset test kitleri günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniklerin daha yüksek maliyetli ve zaman alıcı olmasına rağmen, mikroskopik tabanlı tekniklerin kullanımına kıyasla oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *Cryptosporidium* spp.'nin karakterizasyonu ve filogenetik analizi için kullanılan moleküler yöntemler, bu parazitin biyolojisine, epidemiyolojisine ve sağlıkla ilgili önemine büyük katkı sağlamaktadır (Cunha ve ark., 2019; O'Leary ve ark., 2021; Sharma ve ark., 2022).

2.1. Taksonomi

Cryptosporidium cinsinin tüm üyeleri ökaryotik protozoonlar olup zorunlu hücre içi parazitlerdir. Omurgalıların mide-bağırsak sisteminde gelişir ve yaşam döngülerinin tüm evrelerini tek bir konakta geçirirler (Fayer, 2008).

Cryptosporidium cinsi, 6000'den fazla türü ve 300'den fazla cinsi içeren *Apicomplexa* şubesindeki cinslerden biridir. *Cryptosporidium* spp., diğer enterik koksidiyan parazitlerin yaşam döngüsündeki benzerliklerine dayanılarak, *Eucoccidiidae* takımından bir koksidiyan parazit olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, *Cryptosporidium* spp.'nin gelişim aşamalarında bir besleyici (feeder) organelinin varlığı, sporokistlerinin yokluğu ve konak hücrelerdeki episelüler lokalizasyonunu da kapsayan biyolojik ve moleküler benzerliklerine dayanılarak gregarin parazitlerine daha yakın olduklarına dair teoriler ortaya atılmıştır (Ryan ve ark., 2021b). Gregarinler, doğal su kaynaklarında bol miktarda bulunan, omurgasız ve alt omurgalı canlıların bağırsaklarında veya hücre dışı boşluklarında yaşayan büyük, tek hücreli parazitlerden oluşan apikompleksan bir parazit grubudur (Ryan ve Xiao, 2014). *Ascogregarina taiwanensis* adlı gregarinin ilk tüm

genom dizilimi, *Cryptosporidium* spp. ile aralarındaki monofiletik bir ilişkiyi desteklerken metabolik kapasitelerindeki önemli farklılıkları ortaya koymuştur (Ryan ve ark., 2021b). Ayrıca, genomik ve biyokimyasal veriler *Cryptosporidium* spp.'nin apikoplast organelini kaybettiği için diğer apikomplekslerden farklı olduğunu göstermiştir (Ryan ve Xiao, 2014).

Cavalier-Smith 2014 yılında, 18S ribozomal DNA verilerine dayanarak, mevcut taksonomiye revize etmiş ve *Cryptosporidium*'u coccidia'dan gregarin'lere aktarmıştır. Daha sonra *Gregarinomorphea* sınıfı içinde *Cryptogregarina* adlı yeni bir alt sınıf oluşturmuştur. Adl ve ark.'ları 2019 yılında, bu sınıflandırmayı *Gregarinasina* içindeki *Cryptogregarinorida* alt sınıfı olarak değiştirmiştir (Ryan ve ark., 2021b).

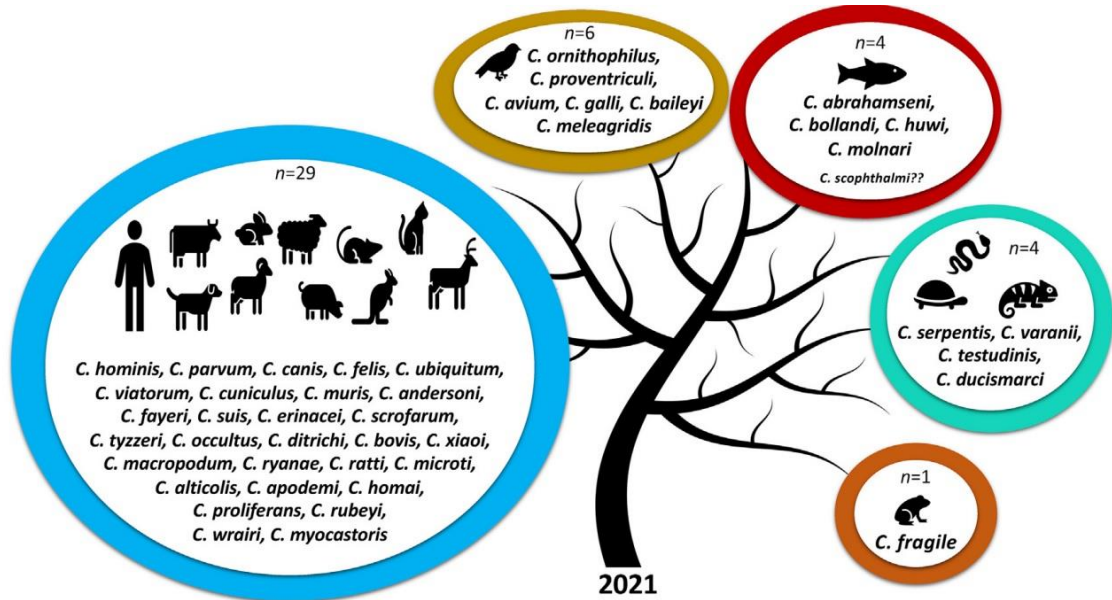
Cryptosporidium cinsi içinde, 1971 yılından önce, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium parvum* ve *Cryptosporidium meleagridis* olmak üzere yalnızca üç geçerli tür mevcuttu. Yeni bir tür olan *Cryptosporidium wrairi*, 1971 yılında kobaylarda tanımlanmıştır ve toplam dört geçerli türe ulaşmıştır. Cryptosporidiosis hakkında 1970'li yıllara kadar 100'den az rapor yayınlanmış, ancak 1980'lerin son yıllarında yaklaşık 1200 rapor sunulmuştur (Ryan ve ark., 2021b).

CDC 1982 yılında, *Cryptosporidium* nedeniyle şiddetli uzun süreli ishali ve acquired immune deficiency syndrome (AIDS) olan 21 erkek hakkında bir rapor yayınlamıştır. Bu rapor, cryptosporidiosis'e olan ilginin artmasına ve HIV/AIDS hastalarında cryptosporidiosis'in kalıcı ve yaşamı tehdit eden bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur (Ryan ve ark., 2021b).

Cryptosporidium ditrichi, Avrupa'dan *Apodemus* cinsi tarla farelerinden 2018 yılında tanımlanmıştır. İnsanlarda *C. ditrichi*, bağırsak cryptosporidiosis'i ile uyumlu klinik semptomlar gösteren İsveç'teki üç hastadan 2020 yılında ilk kez izole edilmiştir (Mathison ve ark., 2021).

Günümüzde, en az 44 *Cryptosporidium* türü ve 120'den fazla *Cryptosporidium* genotipi tanımlanmıştır. Ancak, insanlarda oluşturdukları enfeksiyonların büyük çoğunluğundan *C. hominis* ve *C. parvum*'un sorumlu olduğu bildirilmiştir (Ryan ve ark., 2021a). Ayrıca, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium cuniculus*,

Cryptosporidium ubiquitum, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis* ve *Cryptosporidium viatorum* dahil olmak üzere, insanlarda yaklaşık 20 farklı tür/genotip saptanmıştır (Şekil 1) (Ledbad ve ark., 2021).



Şekil 1. 2021 yılına kadar tanımlanan *Cryptosporidium* türleri (Ryan ve ark., 2021b).

2.2. Tarihçe

Ernest Edwart Tyzzer, 1907 yılında laboratuvar farelerinin mide epitellerinde ve dışkılarında bir parazitin aseksüel, seksüel ve ookist evrelerine sıkça rastladığını yayınladıktan sonra bu paraziti belirsiz taksonomik statüye sahip bir protozoon olarak ilk kez tanımlanmış ve *Cryptosporidium muris* olarak adlandırmıştır (Dragomirova, 2022; Chalmers, 2014). Parazitin sporozoitleri içinde bulunan sporokistleri olmadığı için ‘gizli sporokistler’ anlamına gelen *Cryptosporidium* olarak isimlendirilmiştir (Ekici, 2018). Tyzzer, 1912 yılında laboratuvar fareleri ve tavşanlarının ince bağırsağında bulunan ve *C. parvum* adını verdiği yeni, daha küçük bir türün tanımını yayınlamıştır. 1955 yılında yeni bir tür olan *Cryptosporidium meleagridis*’in genç hindilerde hastalığa ve ölüme neden olduğu bildirilmiştir. 1971 yılında *Cryptosporidium* spp.’nin sığır ishali ile ilişkilendirildiği bir rapor yayınlanmıştır. İlk insan cryptosporidiosis’i 1976 yılında, sığır çiftliğinde yaşayan iki farklı hastada rapor edilmiştir. Hastalardan birinin, kusma, sulu ishal ve karın ağrısı semptomları olan 3

yaşında sağlıklı bir kız çocuğu olduğu, diğer hastanın ise kronik sulu ishali olan, ciddi şekilde dehidrate ve bağışıklığı baskılanmış olduğu belirtilmiştir (Chalmers, 2014).

Cryptosporidiosis'in insan sağlığı üzerindeki rolü ve etkisi 1980 yıllarında anlaşılmaya başlanmıştır. Cryptosporidiosis'in ortaya çıkmasına ve bir insan patojeni olarak tanınmasını sağlayan durum, AIDS salgını sonucu bağışıklığı baskılanmış bireylerin sayısındaki artışla olmuştur. *Cryptosporidium* spp.'nin ince duvarlı ookistlerinin sebep olduğu otoenfeksiyonlara ek olarak hem kırsal hem de kentsel bölgelerde yaşayan immünitesi sağlam her yaştan insanı etkileyen bir dizi su kaynaklı salgının meydana gelmesi de bu parazite olan ilgiyi arttırmıştır (Chalmers, 2014).

Daha yakın tarihli salgınlar incelendiğinde, 2004 ve 2010 yılları arasında *Cryptosporidium* spp.'nin, su kaynaklı protozoon salgınlarının baskın ajanı olmaya devam ettiğini ve 199 belgelenmiş salgın raporunun %60'ından fazlasının *Cryptosporidium* enfeksiyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Robertson, 2014). Ülkemizde ise *Cryptosporidium* spp. ookistleri ilk kez 1984 yılında saptanmıştır (Burgu, 1984).

2.3. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium türleri arasında *C. parvum*, veterinerlik alanındaki ekonomik önemi, insan cryptosporidiosis'ine neden olan bir ajan ve geniş konak yelpazesi olması nedeniyle en kapsamlı olarak çalışılan türdür. Bu nedenle, *Cryptosporidium* spp.'nin yaşam döngüsü ve konaklarındaki patojen özelliği, bu türle yapılmış çalışmaların bilgi birikimine dayanılarak açıkça gösterilmiştir. Günümüzde, *C. parvum*'un evreleri ve yaşam döngüsü yeniden çalışılıp değerlendirilerek *Cryptosporidium* spp.'nin gregarinlerle ortak morfolojik ve biyolojik özellikler taşıdığı gösterilmiştir (Tomazic ve ak., 2018).

Cryptosporidium türleri, monoksen bir parazit olup seksüel ve aseksüel aşamaları içeren karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir (Ryan ve Hijjavi, 2015). Sadece ookist evresi konak dışında canlı kalabilmektedir (Cacciò ve Tosini, 2017; Şahin ve ark., 2018).

Cryptosporidium spp. ookistleri genellikle küreseldir ve çapları, türüne göre 3,2 ile 8,3 µm arasında değişmektedir. Yaşam döngüleri boyunca iki tip ookist üretirler; ilki, dışkı ile dış ortama atılan ve çevreye yayılan kalın duvarlı ookistler olup ikincisi ise, otoenfeksiyona sebep olan ince duvarlı ookistlerdir. Jenkins ve ark.'ları, kalın duvarlı ookistlerin dört, ince duvarlı ookistlerin ise üç katmandan oluştuğunu ve ince duvarlı ookistlerde kalın bir iç granüler tabaka olmadığını göstermiştir. Ookistler, ekskistasyon sırasında salınan dört enfektif sporozoit içermektedir. Ookistin dış yüzeyini içe doğru sırasıyla glikokaliks, lipid hidrokarbon tabakası, proteinler ve yapısal polisakkaritler oluşturmaktadır. Ookisti kaplayan glikokaliks tabakası ise glikoproteinler ve asidik polisakkaritlerden oluşmaktadır. Lipid tabakasında bulunan yağ asitleri, tanı amaçlı yaygın olarak kullanılan asit-fast boyama özelliğini kazandırdığı ayrıca, oosit duvar proteinlerinde (COWP) bulunan sistein açısından zengin alanların, moleküller arası disülfid bağları oluşturduğundan dolayı duvar sertliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Tomazic ve ark., 2018).

Cryptosporidium spp. ookistleri dört adet sporozoit içerir. Haploit karakterde olan sporozoitler, fekal-oral yolla konak vücuduna giren ookistlerin bağırsakta ekskiste olmasıyla ortaya çıkarak özellikle jejunum ve ileum epitel hücrelerini istila eder. *C. parvum* sporozoitleri yaklaşık $5,0 \times 0,5$ µm boyutunda olup uzun şekillidir (genellikle muza benzetilir) ve altında subpelliküler mikrotübüllerin bulunduğu pelikül ile çevrilidir. Sporozoitin anteriorundaki hücresel yapılar, konak hücreye invazyon ve tutunmada görev alan apikal bir kompleks oluşturmaktadır. Apikal kompleks ise apikal halkalar, konoid, dens granülleri, mikronemler, rhoptiri ve sekretuvar organellerinden oluşmaktadır. İnvazyon sürecinde, mikronemal proteinler konak hücrelere göç, penetrasyon ve bazen de hücreden çıkış için kullanılan kayma hareketinde görev alırken, rhoptiri organeli parazitofor vakuol (PV) oluşumundan sorumludur (Khan, 2008; Heintzelman, 2015; Tomazic ve ark., 2018).

Cryptosporidium spp.'nin yaşam döngüsü, enfektif form olan kalın duvarlı ookistlerin fekal-oral yolla alınmasıyla başlar (Şekil 2) (Pinto ve Vinayak, 2021). Konak tarafından yutulan ookistler ince bağırsakta pH ve safra tuzlarının etkisiyle parçalanır (ekskistasyon). Ookist içerisindeki dört sporozoit serbest kalarak bağırsak lümenine dökülür (Warren ve Lima, 2021). Serbest kalan sporozoitler, konağın epitel

hücrelerine (enterositler) bağlandıktan sonra episelüler yerleşim olarak adlandırılan hücre içine ancak ekstrasitoplazmik bölgeye yerleşerek ihtiyacı olan besin maddelerini almasını kolaylaştıran PV oluşturur. Sporozoitler, burada tek çekirdekli trofozoitlere ve daha sonra tip 1 merontlara (şizontlar) dönüşür. Şizogoni ile eşeysiz olarak çoğalan trofozoitlerden 6-8 çekirdekli merozoit meydana gelir. Tip I Meront hücrelerinin parçalanmasıyla serbest hale geçen merozoitler, tekrar eşeysiz çoğalma ile sağlam epitel hücrelerine girip yeni bir merogoni döngüsü başlatarak ya tip I ya da tip II merontları oluşturur. Tip I merontlardan 6-8 merozoit oluşurken tip II merontlardan ise sadece 4 merozoit oluşur (Tomazic ve ark., 2018; Pinto ve Vinayak, 2021; Warren ve Lima, 2021). Cryptosporidiosis'te, özellikle immünsüpresif hastalarda meydana gelen inatçı enfeksiyonun asıl sebebinin Tip I meront oluşumunun sürekli tekrarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993; Caccio ve Putignani, 2014).

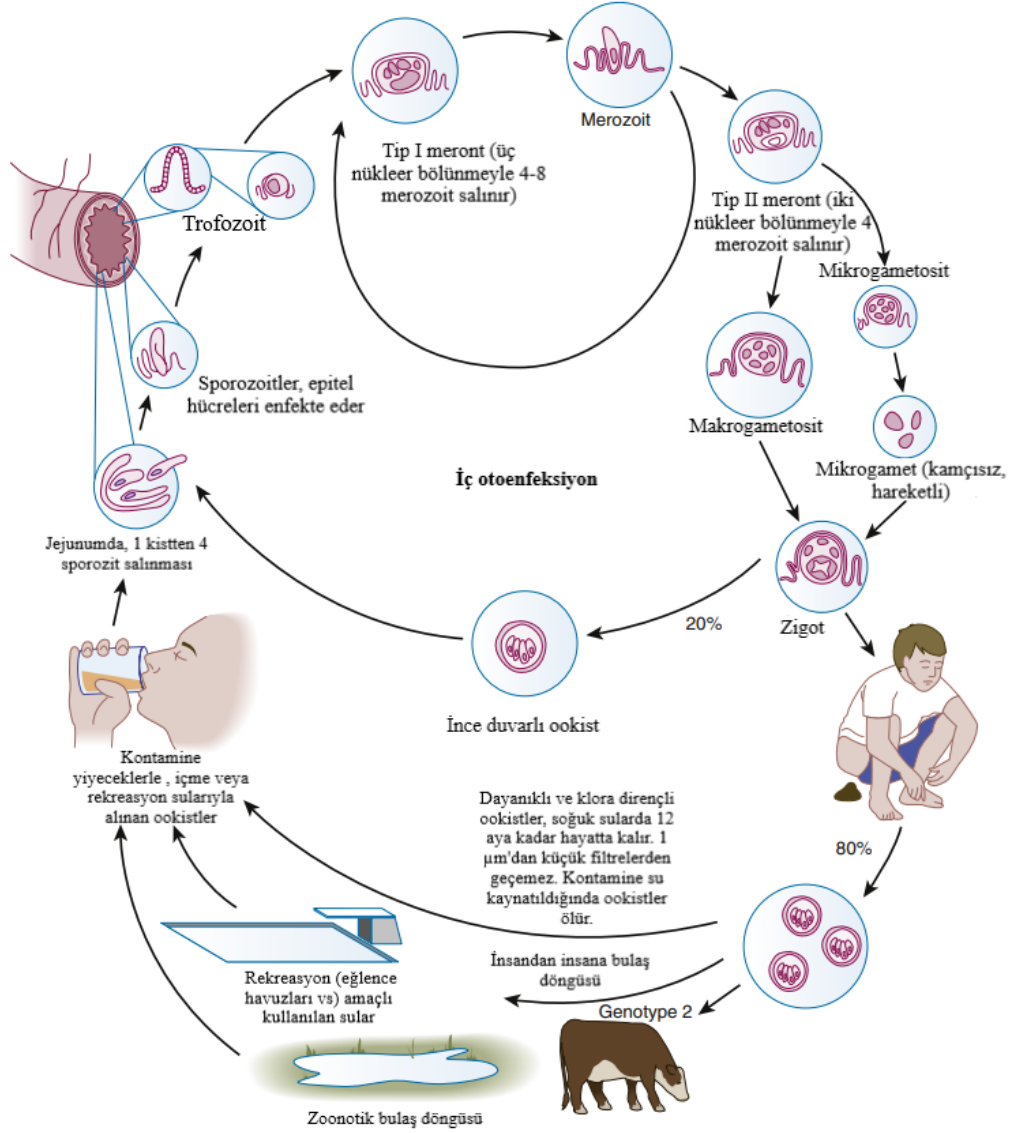
Gametogoni dönemi: Tip II merontlardan oluşan merozoitler yeni bir döngü başlatmazlar. Ancak, konak içinde girdikleri yeni hücrelerde eşeyli üreme fazını, yani gametogoniye başlatırlar. Bu aşamada merozoitler, makrogamont (dişi) ve mikrogamont'a (erkek) dönüşmektedir. Her bir mikrogamonttan 16 adet kamçısız mikrogamet oluşurken her bir makrogamonttan ise sadece bir adet makrogamet meydana gelmektedir (Guerin ve Striepen, 2020; Pinto ve Vinayak, 2021; Warren ve Lima, 2021).

Dölleme dönemi: Mermi benzeri bir yapısı olan mikrogamet, makrogameti döllemesiyle enfektif ookist haline gelecek olan zigot oluşur (Ryan ve Hijjawi, 2015).

Ookist dönemi: Zigot, ookist içinde dört adet sporozoite farklılaşır. Bağırsak lümenine salınan sporlanmış oositler, dış çevre koşullarına dayanıklı ve dışkı ile vücuttan atılır atılmaz diğer konaklar için enfektiftir. Solunum yollarında sporlanan ookistler, burun salgılarında ve balgamda bulunmaktadır (Caccio ve Putignani, 2014).

Sporogoni dönemi: Diğer koksidiyanlardan farklı olarak *Cryptosporidium* türlerinde sporlanma konak içerisinde gerçekleşmektedir. Dölleme sonucu oluşan zigotların %80'i çift katmanlı kalın duvarlı ookistlere, %20'si ise tek katmanlı ince duvarlı ookistlere dönüşür. Kalın duvarlı ookistler yeni konaklar için enfektifken, ince duvarlı ookistler aynı konağı enfekte etmektedir (otoinfeksiyon) (Sastry ve Bhat, 2018).

Prepatent dönem: Konak tarafından alınan ookistlerin yaşam döngüsünün tamamlanmasıyla yeni gelişen ookistlerin de konak dışkıyla atılmasına kadar geçen, yaklaşık 4-22 günlük süredir (Sastry ve Bhat, 2018).



Şekil 2. *Cryptosporidium* türlerinin yaşam döngüsü (Warren ve Lima, 2021).

2.4. Epidemiyoloji

Cryptosporidium spp.'nin hem doğrudan (insandan insana ve hayvandan insana) hem de dolaylı (kontamine su ve gıda yoluyla) bulaşma yollarının olması, epidemiyolojisini karmaşık hale getirmektedir (Cacciò ve Tosini, 2017). *Cryptosporidiosis* epidemiyolojisini belirleyen başlıca faktörler arasında, az sayıda

ookistin konağı enfekte edebilmesi, ookistlerin olumsuz çevre koşullarında uzun süre hayatta kalabilmesi, ookistlerin hastanelerde kullanımı önerilen dezenfektanlara bile dirençli olması ve konak vücudundan atıldığında enfektif olması ile bazı genotiplerinin hayvanların rezervuar konumunda olması yer almaktadır (Casemore, 1991).

Çiftlik hayvanlarında rapor edilen türlerden *C. parvum* ve *C. hominis*, halk sağlığı açısından büyük öneme sahiptir. Buzağılar, zoonotik *C. parvum*'un en önemli hayvan rezervuarı olarak kabul edilirken keçiler de buzağılardan sonra önemli bir rezervuar kabul edilmektedir. Ayrıca, *C. parvum*'un insanlarla yakın temas halinde olan evcil hayvanlardan atlara ve köpeklere bulaştığı rapor edilmiştir (Tomazic ve ark., 2018).

2.4.1. Buzağılardaki epidemiyolojisi

Farklı konaklardan (buzağı, kuzu, insan, geyik) elde edilen parazit izolatları kullanılarak gerçekleştirilen bir dizi deney sonucunda, *Cryptosporidium* spp.'nin yeni doğan hayvanlara (fareler, sıçanlar, kobaylar, domuz yavruları, buzağılar ve kuzular) daha kolay bulaşabileceğini göstermiştir. Bu sonuç, *Cryptosporidium* spp.'nin konak özgüllüğünün olmadığını ve zoonotik bir potansiyelinin olduğunu göstermektedir (Caccio ve Putignani, 2014).

Neonatal buzağı ishali, sığır endüstrilerinde yüksek morbidite ve mortaliteye neden olup tedavi maliyetleri nedeniyle de önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Çeşitli patojenler (*Cryptosporidium*, *Escherichia coli*, *Rotavirus*, *Coronavirüs*) genç buzağılarda ishale neden olurken buzağılarda bulunan en yaygın patojen *Cryptosporidium* spp.'dir (Brunauer ve ark., 2021; Zolova ve ark., 2022).

Sığırlarda ilk cryptosporidiosis vakası, anoreksi ve kaşeksi belirtileri olan 8 aylık bir buzağıda 1971 yılında yapılan bir çalışmayla bildirilmiştir. En az dört *Cryptosporidium* türü, sığırları yaşa bağlı olarak enfekte etmektedir. Sütten kesim öncesi buzağılar daha çok *C. parvum* ile, sütten kesim sonrası buzağılar *C. bovis* ve *C. ryanae* ile ve yaşlı ve yetişkin sığırlar *C. andersoni* ile enfekte olmaktadır. Dünya genelinde, mandıra sürülerinde bildirilen cryptosporidiosis prevalansı, %13,6 ile %78 oranında değişmektedir. Prevalansı etkileyen faktörler ise bölgenin iklim şartları,

mevsimler ve işletme uygulamalarıdır. Daha genç sığırlarda daha yüksek prevalans oranları saptandığı bildirilmiştir (Tomazic ve ark., 2018).

Dünya’da sığırlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaygınlığı, hangi türlerin bulunduğu, zoonotik önemi ve bu hastalığın yayılışında etkili olan risk faktörlerinin durumu ile ilgili araştırmalar son çeyrek yüzyılda daha sık olarak yapılmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı ve klinik önemi dikkate alındığında cryptosporidiosis ile ilgili araştırmaların daha çok buzağılarda yapıldığı görülmektedir. *Cryptosporidium* enfeksiyonları dünyada 106 ülkeden, 79 hayvan türünden bildirilmiştir (Ekinci, 2015).

İskoçya’da yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* genotip çeşitliliğini belirlemek için gebe ineklerden doğum öncesi dönemde ve bu ineklerden doğan buzağılardan dışkı örnekleri toplanmıştır. Çalışmada yetişkin sığırların, buzağılardan daha fazla *C. parvum* genotip çeşitliliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca süt çiftliklerinde, yetişkin sığırlardaki genotiplerin çoğunlukla buzağılarda bulunan genotiplerden farklı olduğu, sığır çiftliğinde ise bazı yetişkin sığırların buzağılarla aynı genotipi taşıdığı belirtilmiştir. Yetişkin sığırlar ve genç buzağılar arasındaki bu genotipik farklılıklar nedeniyle araştırmacılar, yetişkin sığırlarının buzağılar için *Cryptosporidium* enfeksiyonunun ana kaynağı olmadığı kanaatine varmıştır (Shaw ve ark., 2019).

Kore’de 425 çiftlikteki üç aydan küçük 951 buzağıdan toplanan ishalleri dışkı örneklerinin *Cryptosporidium* spp. pozitifliği %9,9 oranında bildirilmiştir (Lee ve ark., 2016). Tayland’da modifiye kinyoun asit fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* türlerinin yaygınlığı 1 ile 28 günlük buzağılarda %51 olarak saptanmıştır (Doungmala ve ark., 2019).

Cezayir’de *Cryptosporidium* spp.’nin ilk moleküler araştırması, 17 süt çiftliğindeki 8 haftadan küçük 132 buzağıdan toplanan dışkı örneği ile gerçekleştirilmiş ve parazitin yaygınlığı %40 oranında saptanmıştır (Benhoua ve ark., 2017).

Arjantin’de 27 süt ineği sürüsündeki 552 buzağıdan toplanan dışkı örnekleri incelenmiş ve cryptosporidiosis enfeksiyonu %16 oranında saptanmıştır (Garro ve ark., 2016).

Türkiye’de *Cryptosporidium* türlerinin varlığı ilk olarak 1984’te Bursa Karacabey Tarım işletmesindeki buzağılarda bildirilmiş olup, bu işletmedeki 51’i ishalleri olan 56 adet 1–28 günlük buzağının 15’inde (%26,7) *Cryptosporidium* oocisti saptanmıştır. *Cryptosporidium* etkenlerinin prevalansı bir ağıya kadar olan diyareli buzağılarda Elâzığ yöresinde %7,2, Aydın’da %20,6 ve Ankara’da %48,8 olarak bulunmuştur. Ankara çevresinde yapılan başka bir araştırmada da ise *Cryptosporidium* oocistlerine ishalleri buzağılarda %35,8 oranında rastlanmıştır (Ekinci, 2015).

Cryptosporidium türlerinin yaygınlığı Sivas yöresindeki normal dışkı buzağılarda %8 ile %62,4 arasında değışmekle beraber bu oran Erzurum’da %10, Van’da ise %13,2 olarak saptanmıştır. Erzurum ve çevresinde sütü işletmelerindeki üç ağıya kadar olan ishalleri buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonları %30,3 oranında saptanmıştır (Ekinci, 2015).

2.4.2. İnsanlardaki epidemiyolojisi

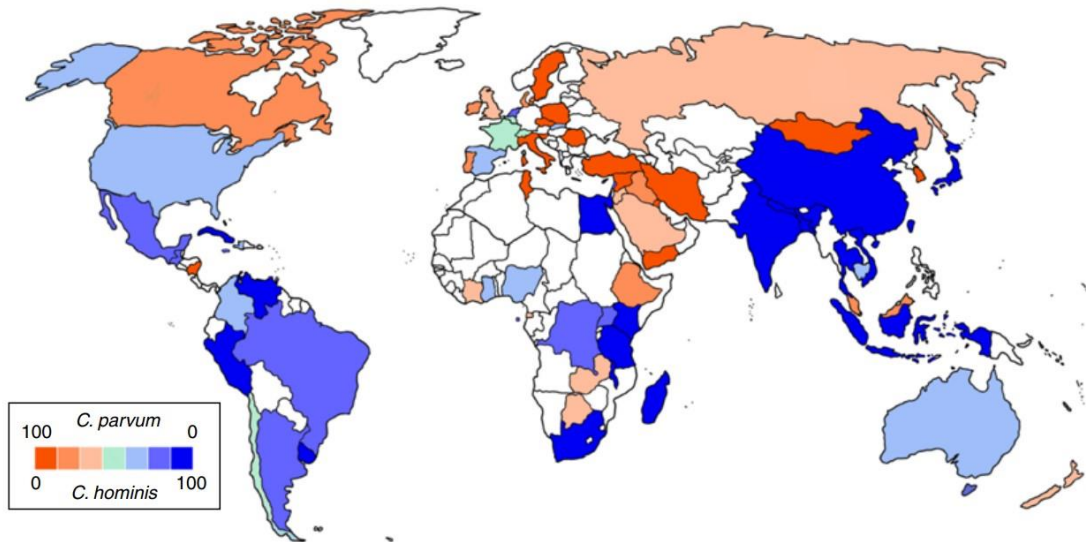
İlk insan cryptosporidiosis vakaları 1976’da üç yaşında bir çocuk ve 39 yaşında bir çiftçide rapor edilmiştir. Her iki hastanın da şiddetli sulu ishal şikâyeti olduğu, sığır ve köpeklerin bulunduğu bir çiftlikte yaşadıkları belirtilmiştir (Fayer ve ark., 2000; Caccio ve Putignani, 2014).

Cryptosporidium spp.’nin önemli bir insan patojeni olduğu 1980 yılının başlarında HIV/AIDS’li bireylerde gösterilmiştir. 1993 yılında ABD’nin Wisconsin eyaletinin Milwaukee şehrinde yaklaşık 403.000 kişinin etkilendiği ve 100 ölümün rapor edildiği su kaynaklı cryptosporidiosis salgını dünya çapında büyük bir endişe uyandırmıştır. Bu olay, *Cryptosporidium* spp.’nin içme suyuyla da bulaşabileceğini göstermiştir (Caccio ve Putignani, 2014; Xu ve ark., 2020). Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada cryptosporidiosis’in enfektif doz aralığı, *C. parvum* için 132 oocist ve *C. hominis* için 10-83 oocist olarak hesaplanmıştır (Costa ve ark., 2020).

Moleküler yöntemlerin gelişmesi, *Cryptosporidium* spp.'nin taksonomisi ve epidemiyolojisine ilişkin anlayışı önemli ölçüde değiştirmiştir. 1990'lı yılların başlarında, Southern blot, Western blot gibi yöntemlerin uygulanmasıyla insanlardan ve çiftlik hayvanlarından izole edilen *Cryptosporidium* spp. arasında genetik çeşitlilik olduğu ilk kez gösterilmiştir (Caccio ve Putignani, 2014).

Genotipik ve biyolojik farklılıklara dayanılarak 2002 yılında, yalnızca insanları enfekte eden *C. parvum* parazitleri için yeni bir tür olan *C. hominis* adı önerilmiştir (Xiao ve Cama, 2018).

İnsanlara en çok bulaşan *Cryptosporidium* türleri *C. hominis* (önceki adıyla *C. parvum* genotip I) ve *C. parvum*'dur (önceki adıyla *C. parvum* genotip II) (Şekil 3). İnsanları ve insan olmayan primatları enfekte ederek antroponotik yolla bulaşan tür *C. hominis*'dir. Çoğunlukla insanları, geniş getiren hayvanları ve atları enfekte ederek hem antroponotik hem de zoonotik yolla bulaşan tür ise *C. parvum*'dur. İnsanlarda saptanan diğer *Cryptosporidium* türleri ve genotipleri az sayıda bildirilmiştir (Caccio ve Putignani, 2014; Xiao ve Cama, 2018).



Şekil 3. *C. parvum* ve *C. hominis*'in neden olduğu insan cryptosporidiosis'inin küresel dağılımı (Nader ve ark., 2019).

Gıda kaynaklı bildirilen ilk büyük salgın, bir sığır çiftliğinde yetiştirilen elmalardan taze sıkılmış elma şarabı tüketimiyle gerçekleşmiştir. Bu salgınla

Cryptosporidium spp., dünya çapında gıda kaynaklı en önemli beşinci etken olarak yerini almıştır (Ryan ve ark., 2021b). 2010 ve 2011 yıllarında İsveç'in Östersund kentinde şebeke edilmiş içme suyu kaynağının kirlenmesinden dolayı büyük bir cryptosporidiosis salgını meydana gelmiştir. İngiltere, Galler, Kuzey İrlanda ve İrlanda Cumhuriyeti'nde de kirli su kaynaklı salgınlar bildirilmiştir. Son zamanlarda Finlandiya, İsveç ve Birleşik Krallık'ta birkaç gıda kaynaklı salgın bildirilmiştir. Sebzeler, özellikle salatalar, gıda kaynaklı *Cryptosporidium* spp. salgınlarında önemli bir ajan olarak bilinir (Carnicer-Pont ve ark., 2011; McKerr ve ark., 2015)

Cryptosporidiosis, dünya genelinde ishalleri hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Ancak, az gelişmiş ülkelerde ve 2 yaşından küçük çocuklarda daha yaygındır. Gelişmiş ülkelerdeki enfeksiyon oranlarının %0,6 ila %20 arasında değiştiği, daha az gelişmiş ülkelerde ise bu oranın %32'ye kadar çıktığı bildirilmiştir. Seroprevalans çalışmaları, cryptosporidiosis'in gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın olduğunu doğrulamaktadır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da, insanların yaklaşık %25 ila %35'inde *Cryptosporidium* spp.'ye karşı antikor bulunurken, Peru ve Venezuela'da bu oran %64 olarak belirlenmiştir. Artan enfeksiyon oranlarının, genellikle yetersiz sanitasyon, temiz su eksikliği, kalabalık yaşam koşulları ve hayvanlarla yakın temastan kaynaklandığı belirtilmektedir (Mhaissen ve Flynn, 2017). Kanada'da ishalleri hastaların %15,7'sinde *Cryptosporidium* spp. saptanırken Mısır'da çocuklarla yapılan bir çalışmada %1,4 oranında saptanmıştır (Iqbal ve ark., 2015; Naguib ve ark., 2018). Mmbaga ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları bir çalışmada, *Cryptosporidium* spp.'nin 4 Afrika bölgesinin tamamında (Gambiya, Mali, Mozambik ve Kenya'da) ve Hindistan'da, rotavirüslerden sonra bebeklerde görülen ishalleri en çok ilişkilendirilen ikinci patojen olduğu belirtilmiştir.

Cryptosporidiosis prevalansı, incelenen popülasyona ve çalışılan hasta gruplarına bağlı olarak büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin, bağışıklığı yetersiz veya baskılanmış diyaliz hastalarındaki yaygınlık Endonezya'da %4,8 (Idris ve ark., 2010) iken Pakistan'da %40 (Baqai ve ark., 2005), Suudi Arabistan'da %70 (Sanad and Al-Malki, 2007), Türkiye'de %61 (Arıkan ve ark., 1999) oranında saptanmıştır. Hindistan'da böbrek nakli hastalarında %20 (Udgiri ve ark., 2004), Pakistan'da %53 (Raja ve ark., 2014), İran'da karaciğer nakli hastalarında %11,4 oranında (Agholi ve

ark., 2012) cryptosporidiosis prevalansı rapor edilmiştir. Yine İran'da, bağışıklığı baskılanmış hastalarda *C. parvum* %69 oranında, *C. hominis* %25 oranında saptanmıştır (Rafiei ve ark., 2014).

Ülkemizde, Sarjanov ve arkadaşlarının (2020) Ankara'da 2 farklı devlet hastanesine başvuran 4303 hastada enterik parazit oluşumunu değerlendirdikleri bir çalışmada *Cryptosporidium* spp. %0,5 oranında saptanmıştır. Okullu ve arkadaşlarının (2020) kanser hastası ve organ nakli yapılan hastalarda intestinal protozoonları araştırdığı bir çalışmada *Cryptosporidium* spp. oranını %53,8 olarak saptanmıştır. Van'da, 450 çocuk parazitolojik yönden incelenmiş ve *Cryptosporidium* spp. oranı %2,2 olarak saptanmıştır (Çiçek ve Yılmaz, 2011). Beyhan ve Yılmaz (2020), Van'da 2010 ve 2018 yılları arasında sindirim sistemi şikayeti ile farklı kliniklere başvuran hastaların dışkı örneklerini incelenmiş ve %2,8 oranında *Cryptosporidium* spp. antijen pozitifliği saptanmıştır.

2.5. Patojenite ve Klinik Belirtiler

Cryptosporidiosis'in patogenezi ile ilgili çalışmaların çoğu *C. parvum* ve *C. hominis* türleri ile yapılmış olup bu türlerin bağırsak epitelleri üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda her iki türün de ince bağırsağı etkileyerek gastrointestinal hastalıklara neden oldukları gösterilmiştir (Cacciò ve Tosini, 2017).

Cryptosporidiosis'te, enfeksiyonun meydana geldiği bağırsaklardaki enterositlerin yapıları önemli ölçüde değişir. Cryptosporidiosis'in karakteristik özelliklerinden biri olan sulu ishalin temel sebebinin enterositlerin geçirgenliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ancak, ishale neden olan mekanizma çeşitli hipotezlerle formüle edilmiş olsa da sebebi, tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılar, cryptosporidiosis'in şiddetinin daha çok konağın immünolojik durumuna bağlı olduğunu belirtirken bazı araştırmacılar ise enfeksiyon şiddetinin *C. parvum* veya *C. hominis* ile enfekte olma durumuna göre değiştiğini, hatta aynı türün izolatları arasındaki farklılıklara bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (Cacciò ve Tosini, 2017).

Parazitin patolojik tablosu, parazitik vakuolün yırtılmasıyla serbest kalan merozoitlerin diğer enterositlere yayılması ile oluşur. Histolojik bulgular,

cryptosporidiosis'in villus atrofi, kript hiperplazisi, yangısal infiltrasyon ve fırçamsı mikrovillusların kısalmasına neden olduğunu göstermektedir. Böylece, glikoz-NaCl taşınması azalırken klor (Cl^-) salınımı artar. Bu durum, villusların emme kapasitesini oldukça azaltır ve dolayısıyla, ishal ve dehidratasyon gibi ana klinik belirtiler ortaya çıkar. Enflamasyon alanında, Cl^- iyonunun aktif sekresyonunu uyaran bir nöropeptit olan fosfor (P) elementinin, deneysel olarak enfekte olmuş bireylerde ve cryptosporidiosis'li AIDS hastalarında yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. P seviyesi, ishalin şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Cacciò ve Tosini, 2017).

Enfeksiyon bölgesinde epitel hücre ölümü, cryptosporidiosis'in bir diğer patolojik belirtisidir. Enterositlerin hem nekrozu hem de apoptozu bu duruma katkıda bulunur. Parazit, enfekte olmuş hücrelerin programlanmış hücre ölümünü belirsiz bir mekanizma ile geciktirir. Ancak parazit hücre içindeki yaşam döngüsünü tamamladığında, parazitofor vakuolden çıkmadan önce konak hücrelerinin apoptozunu tetikler (Cacciò ve Tosini, 2017).

Cryptosporidiosis, mukus ve nadiren beyaz veya kırmızı kan hücrelerini de içerebilen bol sulu ishal ile karakterizedir. Enfekte kişilerin %50'sinde kramp şeklinde karın ağrısı, mide bulantısı ve kusma görülür. Asemptomatik enfeksiyonların yanı sıra miyalji, yorgunluk, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı ve düşük dereceli ateş gibi spesifik olmayan semptomlar da ortaya çıkabilir. Semptomların şiddeti, atılan ookistlerin yoğunluğu ile orantılıdır. Semptomlar, enfekte olunan *Cryptosporidium* türüne göre değişebilmektedir. Malabsorpsiyon, laktoz intoleransı, dehidrasyon ve yetersiz beslenme ciddi vakalarda sıklıkla ortaya çıkar. Radyografik bulgular spesifik olmayıp, bulgulara belirgin mukozal kıvrımlarına ve bağırsak duvarının kalınlaşması görülebilir (Mhaissen ve Flynn, 2017).

Cryptosporidiosis'in kuluçka süresi 2-14 gündür. Enfeksiyon asemptomatik seyredebildiği gibi kendi kendini sınırlayabilir veya immünsüpre hastalarda uzun süreli olabilir. İmmünkompetan bireylerin çoğunda, genellikle 10 ila 14 gün içinde düzelen veya kendi kendini sınırlayan bir ishal tablosu görülebilir, bu tablo 5 hafta kadar uzun sürebilir. Ookist atılımı, iyileşmeden sonra 2 haftaya kadar devam edebilir. İmmünsüpre hastalarda, organ veya kök hücre nakli alıcılarında, hemodiyaliz

hastalarında veya yetersiz beslenen kişilerde aşırı kilo kaybı görülebilmektedir (Mhaissen ve Flynn, 2017; Xiao ve Cama, 2018).

Cryptosporidiosis, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda şiddetli ve yaşamı tehdit eden ishalin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Hatta, cryptosporidiosis'in neden olduğu kronik ishal sonucunda gelişmekte olan ülkelere yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (Diptyanusa ve Sari, 2021).

Safra yolu tutulumu, bağışıklığı baskılanmış birçok hastada bildirilmiştir. Bu hastalarda enfeksiyon ateş, sağ üst kadranda ağrısı, mide bulantısı, kusma ve ishal ile karakterizedir. Ayrıca sarılık ve serum alkalik fosfataz, γ -glutamiltanspeptidaz, bilirubin seviyelerinde artış oluşabilmektedir. Safra kesesi, radyografi ve ultrasonografide genişlemiş ve kalın duvarlı olarak görünebilir. Cryptosporidiosis'li AIDS hastalarının %15'inde safra yolu tutulumu görülmektedir (Mhaissen ve Flynn, 2017).

HIV ile enfekte bireylerdeki enfeksiyonlar bağırsak dışından başka safra kesesi, safra yolları, pankreas ve pulmoner sistemde görülebilmektedir (Mead ve Arrowood, 2014; Diptyanusa ve Sari, 2021).

Cryptosporidium spp., AIDS'li bir çocuğun pankreas kanalında saptanmış hatta immünkonpetan bir hastada da pankreatit ve sklerozan kolanjit ile ilişkilendirilmiştir (Mhaissen ve Flynn, 2017).

Cryptosporidium spp., öksürük, nefes darlığı, hırıltı, krup ve ses kısıklığı gibi solunum yolu semptomları olan kişilerde de saptanmıştır. Semptomların ishalleri ve ishalsiz ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. Bu hastaların balgam ve bronkoalveoler lavaj örneklerinde ookistler tanımlanmıştır (Cacciò ve Tosini, 2017; Mhaissen ve Flynn, 2017).

Yapılan bir araştırmada, *C. hominis* enfeksiyonu ile eklem ağrıları, göz ağrıları, baş ağrısı ve yorgunluk arasında bir ilişkili olduğu saptanmıştır. Kanıtlar net olmasa da cryptosporidiosis'in Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin nüksetmesine neden olabileceği de öne sürülmüştür (Chalmers, 2014).

Son zamanlarda, insanlarda cryptosporidiosis ve neoplazi (tümör) arasındaki olası ilişkiler hakkında bazı teoriler de ortaya atılmıştır. Polonya'da yapılan iki epidemiyolojik çalışmada, teşhisi yeni konulmuş kolorektal kanserli hastalarda ve herhangi bir immünoşüpresif tedavi görmemiş hastalarda sırasıyla, %18 ve %12,6 oranında cryptosporidiosis saptanmıştır. Genel Avrupa nüfusuyla karşılaştırıldığında bildirilen bu oranların yüksek olduğu görülmektedir. Shebl ve arkadaşlarının hem AIDS hem de cryptosporidiosis'li 471.909 kişiden 320 kolorektal vakayı analiz ettiği bir çalışmada, kolorektal skuamöz hücreli karsinom riskinin cryptosporidiosis'li AIDS hastalarında önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yüzden, Kutikhin ve arkadaşları epidemiyolojik kanıtlara dayanarak, *Cryptosporidim* spp.'nin kanser gelişimine neden olabilecek ajanların listesine dahil edilmesi gerektiğini bildirmiştir (Shikani ve Weiss, 2014; Certad ve ark., 2016).

Çocukluk çağındaki cryptosporidiosis'in uzun süreli etkileri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz beslenen çocuklarda bildirilmiştir. Molbak ve arkadaşları, Gine-Bissau'da yetersiz beslenen 3 yaşın altındaki cryptosporidiosis'li çocukların önemli ölçüde kilo kaybı ve büyüme geriliği yaşadıklarını bildirmiştir. Benzer şekilde, Checkley ve arkadaşları, Peru'da gecekondu mahallelerinde yaşayan ve ishal belirtisi olmayan cryptosporidiosis'li çocuklarda büyüme geriliği olduğunu bildirmiştir (Chalmers, 2014; Xiao ve Cama, 2018).

2.6. İmmünoloji

Hücresel yanıt: Tüm hastalıklarda olduğu gibi, *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonuna karşı konağın immün yanıtını anlamak, konaktaki patolojiyi ve klinik belirtileri kontrol etmede kritik öneme sahiptir. Bu yanıtta rol oynayan en önemli hücre tipi CD4+ T lenfosit hücreleridir. HIV nedeniyle hücre sayısı düşük olan hastalarda cryptosporidiosis'in başlıca fırsatçı enfeksiyonlardan biri olarak ortaya çıkmasıyla CD4+ T lenfosit hücre yanıtının artması bu durumu kanıtlar niteliktedir. Bu T hücresinin önemi, in vivo fare modellerinde gösterilmiştir. CD4+ T hücreleri olmayan kronik cryptosporidiosis'li farelerin, bu lenfositlerin aşılmasıyla anlamlı düzeyde iyileşme gösterdikleri bildirilmiştir (Shikani ve Weiss, 2014; Cacciò ve Tosini, 2017).

Efektör CD8+ T lenfosit hücrelerinin cryptosporidiosis'teki rolü net değildir. Ancak, bu hücrelerin enfeksiyon bölgelerine yerleşip enfeksiyonla savaşmak için çok önemli bir sitokin olan IFN- γ 'yı ürettikleri bilinmektedir (Shikani ve Weiss, 2014; Cacciò ve Tosini, 2017).

Humoral yanıt: İmmunoglobulinlerin (Ig), cryptosporidiosis'teki rolleri halen tartışma konusudur. Ancak yapılan araştırmalar, parazit tarafından indüklenen humoral tepkilerin, semptomları azaltabilen etkili antikorlar ürettiğini göstermektedir. Hiperimmün sığır kolostrumuyla beslenen enfekte farelerde parazit yükünün azaldığı gösterilmiştir. Bu koruyucu etkiyi, çoğunlukla spesifik IgG1 ve IgA'nın sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle, cryptosporidiosis'li AIDS hastalarına sığır kolostrumunun uygulanması ishali ve kısmen ookist dökülmesini azalttığı bildirilmiştir.

Sağlıklı insan gönüllüleriyle yapılan araştırmalarda, enfekte kişilerin *C. parvum* enfeksiyonuna immün yanıt olarak fekal IgA salgıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, daha önce enfeksiyon geçirip anti-*Cryptosporidium* IgG antikorları olan bireylerin yeniden enfekte olmaları halinde, enfeksiyonları daha az şiddette geçirdikleri ve ishal semptomlarının azaldığı gösterilmiştir (Shikani ve Weiss, 2014; Cacciò ve Tosini, 2017).

2.7. Tanı

Cryptosporidiosis'in laboratuvar tanısı, hastalara doğru tedavinin uygulanması için gerekliken çevresel örneklerden parazitin saptanması, genellikle salgınların kaynağını bulmak ve bu salgınları önlemek için gereklidir. Laboratuvarların çoğu, özel olarak istenmedikçe *Cryptosporidium* spp.'yi araştırmamaktadır. Ancak, özel bir talep olmasa bile *Cryptosporidium* spp.'yi teşhis etmek için bazı özel durumlar vardır. Bunlar; bağışıklığı baskılanmış bireyler, 5 yaşından küçük çocuklar, endemik olmayan ülkelere endemik ülkelere seyahat edenler, çiftlik ziyaretleri ve salgınlardır. *Cryptosporidium* spp.'nin teşhisinde en sık kullanılan örnek gaitadır. Bazen, ince bağırsak aspiratları, biyopsi veya doku örnekleri de kullanılmaktadır (Khurana ve Chaudhary, 2018).

Günümüzde *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında, mikroskopi, modifiye asit-fast veya floresan boyalar ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Cryptosporidiosis'te, dışkı ile atılan ookist miktarı farklılık gösterebildiği için, kesin negatif sonuç farklı günlerde alınan en az üç gaita örneğinin incelenmesi gerekmektedir. *Cryptosporidium* spp., biyogüvenlik seviyesi II olarak sınıflandırılır. Bu nedenle, örneklerin bir güvenlik kabininde incelenmesi gerekmektedir (Khurana ve Chaudhary, 2018).

Mikroskopi

Gaitanın mikroskopik incelenmesi ucuz bir yöntem olduğu için *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şahin ve ark. 2018). *Cryptosporidium* spp. ookistleri yaklaşık 5µm çapında, renksiz, küresel veya hafif oval şekilde oldukları için ışık mikroskobu altında incelendiğinde, dışkıda bulunan diğer organizmalardan ayırt edilmesi zordur (Cacciò ve Tosini, 2017; O'Leary ve ark., 2021).

Cryptosporidium spp.'nin dışkıda mikroskopik olarak incelenmesi, boyalı preparatlarda yapılabilmektedir. Boyasız preparatlarda yapılan mikroskopik incelemelerde ookistlerin içyapısı görülmediği için morfolojik olarak mayalarla karışabilmektedir. *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde birçok özel boya kullanılmaktadır. Ancak düşük maliyetli olmaları ve *Cystoisospora*, *Cyclospora* gibi patojenleri de tespit edebildiği için özellikle gelişmekte olan ülkelerde modifiye asit-fast boyama yöntemi en yaygın kullanılan yöntemdir. En sık kullanılan boyalar ise, modifiye Ziehl-Neelsen ve modifiye Kinyoun'un asit-fast boyalarıdır. Bu boyalarla boyanmış preparatlarda ookistler, kırmızı veya pembe renkte, dışkı artıkları ve mayalar ise yeşil veya mavi renkte boyanmaktadır (Cacciò ve Tosini, 2017; Xiao ve Cama, 2018).

Dışkıdaki ookistlerin sayısı az olabileceğinden dolayı çoklaştırma yöntemi kullanılabilir. Bu yöntem, yüzdürme ve çöktürme olmak üzere iki çeşittir. Çoklaştırma yönteminin kullanılması, ookist sayısının az olduğu durumlarda daha fazla ookiste rastlama ihtimalini arttırmaktadır. Yüzdürme yönteminde, Sheather'in şeker çözeltisi, doymuş sodyum klorür (%36) ve doymuş çinko sülfat (%33) çözeltileri en çok tercih edilen yöntemlerdir (Smith, 2007; O'Leary ve ark., 2021). Daha sonra

incelenecek dışkıların, pH'sı 7,2 olan 0,15M fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içinde; %2,5'lik Potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$), %10'luk formalin, sodyum asetoasetik asit-formalin (SAF) veya merkürük klorit çözeltileri içerisinde muhafaza edilmesi önerilmektedir. %2,5'lik $K_2Cr_2O_7$ içerisinde ve +4°C'de muhafaza edilen dışkılardaki ookistlerin uzun süre (3 aydan- 12 aya kadar) enfektif kalabildikleri bildirilmektedir (Smith, 2007).

Günümüzde, immünofloresan mikroskopi (IFM) kullanımının arttığı görülmektedir. Hatta, ABD ve Avrupa'daki referans laboratuvarları genellikle bu tekniği altın standart olarak kabul etmektedir. Gıda, su ve çevresel numuneler incelenirken çapraz reaksiyonlar oluşabilmesine rağmen, IFM sonuçlarının yorumlanması ışık mikroskopisine kıyasla daha kolay olup duyarlılığı (%98,5-%100) ve özgüllüğü (%96-%100) yüksek orandadır (Certad ve ark., 2016; Cacciò ve Tosini, 2017; Xiao ve Cama, 2018).

İmmünolojik yöntemlerle antijen tespiti

Cryptosporidiosis, dışkı örneklerindeki *Cryptosporidium* spp.'ye spesifik antijenlerin immünolojik testlerle saptanmasıyla teşhis edilebilmektedir. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testi, 1990 yılından beri cryptosporidiosis tanısında kullanılmaktadır. Son zamanlarda, deneyimli personel gerektirmedikleri ve aynı anda, çok sayıda örneği taramak için kullanılabildikleri için ELISA testi popülerlik kazanmıştır. Çeşitli ticari ELISA kitleri, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin aranmasına yönelik immünokromatografik yöntemi de günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Ookist miktarının az olduğu veya boyama yöntemlerinde ookistlerin gözden kaçabildiği durumlarda bu yöntemin oldukça kullanışlı olduğu bildirilmiştir. İmmünokromatografik yöntemlerin en büyük avantajı ise hem test süresinin kısa olması (5-10 dakika) hem de deneyimli personele ihtiyaç olmadan güvenilir bir sonuç alınabilmesidir (Certad ve ark., 2016; Cacciò ve Tosini, 2017; Xiao ve Cama, 2018; O'Leary ve ark., 2021).

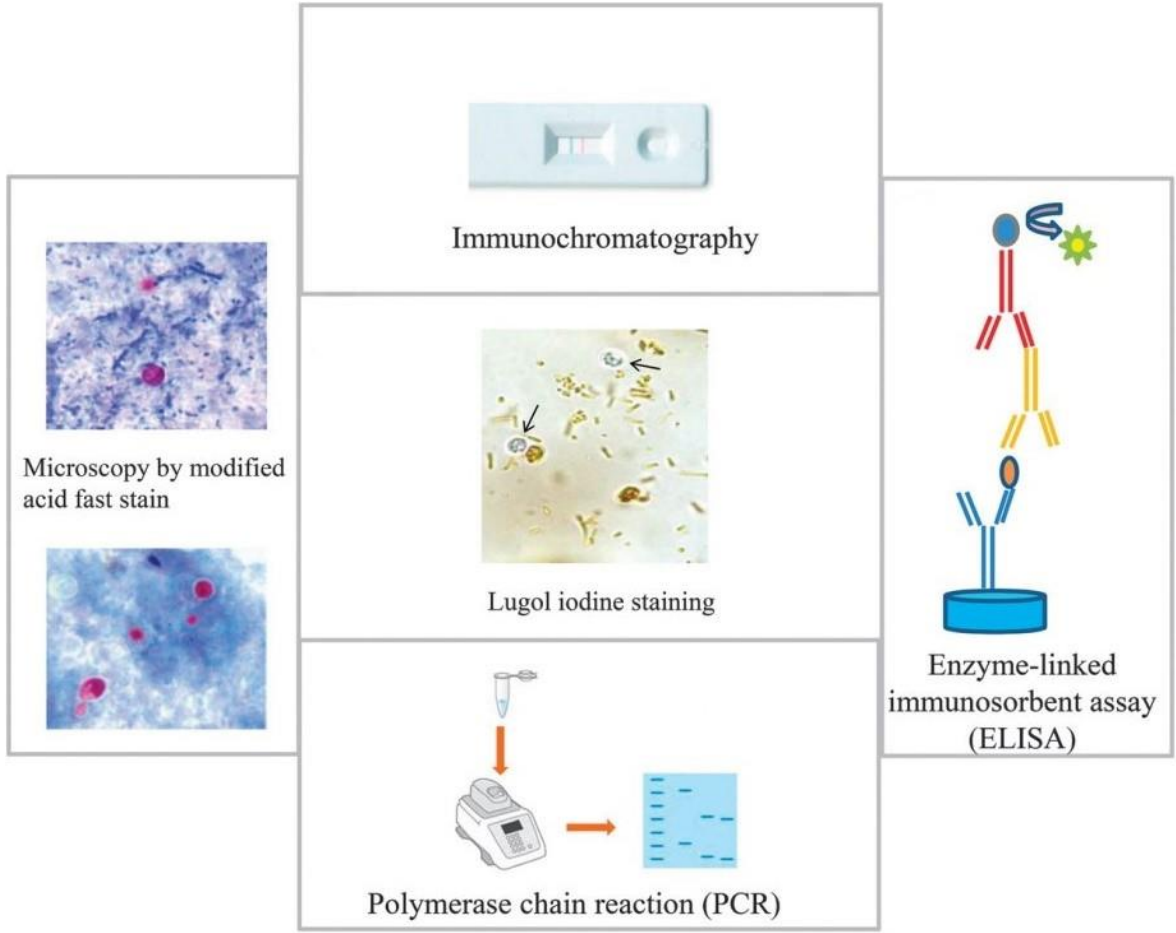
Moleküler yöntemler

Paraziter hastalıkların tanısında ve parazitlerin genotiplendirilmesinde günümüzde moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle, salgın durumunda etkili olan türlerin belirlenip etkenin kaynağı ve enfeksiyonun şiddeti hakkında ayrıntılı bilgi edinmeye olanak sağladığı için moleküler çalışmalar günümüzde önem kazanmıştır. Ayrıca, mikroskopi ve immünolojik yöntemlere göre hem daha duyarlı ve hassas hem de daha düşük maliyetli olduğu için moleküler yöntemler daha kullanışlıdır (Hassan ve ark., 2021, Luka ve ark., 2022).

Günümüzde, *Cryptosporidium* türlerinin karakterizasyonunda kullanılan moleküler yöntemler PCR yönteminden köken almaktadır. Bunlardan bazıları; nested-PCR, Tek Zincirli Konformasyon Polimorfizmi-PCR (SSCP-PCR), DNA prob hibridizasyonu, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP-PCR), multiplex-PCR ve gerçek zamanlı PCR şeklindedir. Nested PCR, yüzey sularında, atık sularda ve hem insan hem de hayvan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerini saptamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü, klasik PCR yönteminden farklı olarak ikinci bir primer takımı kullanılarak amplifikasyon yapılmaktadır. Böylece, istenilen amplifikasyonun spesifitesi daha çok artmaktadır (Ahmed ve Karanis, 2018; O’Leary ve ark., 2021).

En sık kullanılan geleneksel PCR yöntemleri, farklı *Cryptosporidium* türlerini ve genotiplerini tanımlamak için korunmuş gen bölgelerini hedef alır. Literatürde en çok bildirilen hedef gen bölgeleri ise 18S rRNA’nın daha küçük ribozomal alt birimini kodlayan rRNA (SSU) geni, ookist duvar proteinini kodlayan COWP geni, ısı şok proteinlerini kodlayan hsp 70mRNA geni, rRNA içerisinde tekrarlanan ITS-1 ve ITS-2 genleri, tuzak genleri (*Cryptosporidium* spp.’nin trombospodin ile ilişkili adeziv proteini) ve gp60 veya gp15/40 glikoproteinlerini kodlayan genler (Certad ve ark., 2016; Cacciò ve Tosini, 2017; Xiao ve Cama, 2018; Cunha ve ark., 2018; Hassan ve ark., 2021).

Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.’nin tanısı için kullanılan yöntemler Şekil 4’te özetlenmiştir.



Şekil 4. Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında kullanılan başlıca yöntemler (Grace ve ark., 2019).

2.8. Tedavi

İnsan cryptosporidiosis'ini tedavi etmeyi amaçlayan birçok çalışma yapılmasına rağmen, diğer koksidian parazitlerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ilaçların hiçbirinin cryptosporidiosis'e karşı güçlü bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Cacciò ve Tosini, 2017). Konak-patojen etkileşiminin tam olarak bilinmemesi, hastalığa karşı aşının olmaması ve hastalıkta kullanılan ilaçların etkinlikleri sınırlı olması sebebiyle, günümüzde cryptosporidiosis tedavisinde daha etkili ve pratik seçenekler arayışı devam etmektedir (Kaçar ve ark., 2022).

İmmünkompetan kişilerde hastalık hafif seyrederek kendiliğinden iyileşebileceği gibi, hastalığın tekrar nüksetmesi tehlikeli olabilmektedir. Bu tür hastalarda sıvı-elektrolit düzeyinin optimum düzeyde tutulması tedavi için yeterli olmaktadır (Mhaissen ve Flynn, 2017). Hastalığın, immünsuprese veya immün yetmezliği olan

kişilerde kronik ve daha şiddetli olma olasılığı çok yüksektir. Bu hastaların tedavisinde en önemli adım, hastaların bağışıklık sistemini güçlendirmektir (Certad ve ark., 2016). Özellikle AIDS hastalarında CD4+ hücre sayısının 200/mm³'ün altına düşmesi ölümcül olabilmektedir. Bu yüzden, anti-retroviral tedavilerle hastaların CD4+ hücre sayısı yükseltilip daha sonra hastalığın tedavisine başlanmalıdır (Aksoy ve Özkoç, 2005).

Günümüzde, bir yaşımdan büyük immünitesi sağlam kişilerde cryptosporidiosis'i tedavi etmek için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2004 yılında onaylanan tek ilaç Nitazoksanid (NTZ)'dir. Klinik çalışmalar, NTZ ile tedaviden sonra diare süresinde ve ookist atılımında azalma olduğunu göstermiştir. Ancak NTZ, bağışıklığı sağlam bireylerin tedavisinde etkili olsa bile HIV ile enfekte, lenfoma ve lösemi gibi bağışıklığı yetersiz hastalarda sadece orta düzeyde etki gösterir veya hiç etki göstermez. Afrika kıtasında yer alan Zimbabve ülkesinde HIV ile enfekte çocuklarla yapılan çalışmalarda, uzun süreli ve yüksek doz NTZ tedavisinin faydalı olmadığı bildirilmiştir. Bu yüzden, son yıllarda bu parazitin hem güvenli hem de etkili tedavilerini bulmak için yeni tedavi çalışmaları başlatılmıştır (Certad ve ark., 2016; Chaveza ve White, 2018; Tomazic ve ark., 2018; Xiao ve Cama, 2018).

Hüseyin ve arkadaşları, cryptosporidiosis'li hastalarda letrazuril, miltefosin ve klofazimin gibi ilaçları denemiş ancak etkili bir sonuç elde edememişlerdir. Paromomisin'in, immün yetmezlikli çocuklarda NTZ'den daha iyi bir etki göstermediği bildirilmiştir. Ancak, yüksek dozlarda albendazol, probiyotik veya somatostatin analoglarının kullanımının, ishalin şiddetinde ve dışkı ile atılan *Cryptosporidium* spp. ookistlerin sayısında önemli bir azalma gösterdiği rapor edilmiştir. Azitromisin, eritromisin ve roksitromisin gibi makrolidlerin uygulanmasıyla da ookist atılımının azaldığı bildirilmiştir (Pane ve Putignani, 2022).

Buzağı cryptosporidiosis'inde de NTZ'nin, ookist atılımını ve hastalığın şiddetini azalttığı bildirilmiştir (Tomazic ve ark., 2018; Kaçar ve ark., 2022). Cryptosporidiosis tedavi ve profilaksisinde, ilaçlar, sanitasyon ve dezenfeksiyon protokollerine ek olarak buzağının bağışıklık sisteminin desteklenmesi de önerilmektedir. Çünkü, immünoglobulinler ve immünoglobulin olmayan proteinler (HAP; yüksek bol proteinler ve LAP; düşük bol proteinler) içeren sığır kolostrumunun buzağının immün sistemi üzerinde etkili olduğu öne sürülmüştür. Hatta kolostrumun

buzağı, kuzu, fare ve domuz yavrularında da cryptosporidiosis metafilaksisi için kullanıldığında başarılı sonuçlar alındığı bilinmektedir (Kaçar ve ark., 2022).

2.9. Korunma ve Kontrol

Cryptosporidiosis'e karşı etkili bir tedavi bulunmadığından dolayı hastalığı önlemek için enfektif ookistlerin çevreye yayılmasını engellemek gerekmektedir. *Cryptosporidium* spp. ookistleri dış çevre koşullarına ve çoğu dezenfektana karşı oldukça dayanıklıdır. Ookistler, yaygın olarak kullanılan birçok dezenfektana karşı dirençli olsalar da %10 formol, %5'lik sulu veya gazlı amonyak ve %3'lük hidrojen peroksit gibi kimyasallarla enfektivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Ookistlerin, nispeten toksik olmayan hidrojen peroksitle oda sıcaklığında 10 dakika, amonyak ve formol solüsyonlarıyla ise 4°C sıcaklıkta 18 saat maruz bırakılmasıyla enfeksiyon yeteneklerini kaybettikleri belirtilmiştir. Fayer tarafından yapılan bir çalışmada, %2,63 ve %5,25 konsantrasyonunda çamaşır suyu ile inkübe edilmiş ookistlerin farelere inoküle edildiğinde enfeksiyon gözlemlenmediği belirtilmiştir. Amin bazlı dezenfektan olan KenoTMcox'un %2-3 konsantrasyonda *C. parvum* ookistlerine karşı yüksek etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Shahiduzzaman ve Dauschies, 2012; Tomazic ve ark., 2018).

Fekal-oral bulaşmayı önlemek için kişisel hijyene, özellikle el yıkamaya çok dikkat edilmesi gerekir. Enfekte suların yutulmasından kaçınılması, besinlerin iyi pişirildikten sonra tüketilmesi hastalıktan korunmada dikkat edilmesi gereken hususlardandır. Besinlerdeki ookistlerin 60°C'de 30 dakika ısıtılmasıyla veya -7°C'de 1 saat dondurulmasıyla öldüğü bildirilmiştir. Cryptosporidiosis ishale sebep olduğundan dolayı, ishali olan kişilerin toplu kullanılan havuzlara girmemeleri konusunda bilgilendirilmesi hastalığın bulaşma riskini azaltacaktır (Xiao ve Cama, 2018; Xiao ve Griffiths, 2020).

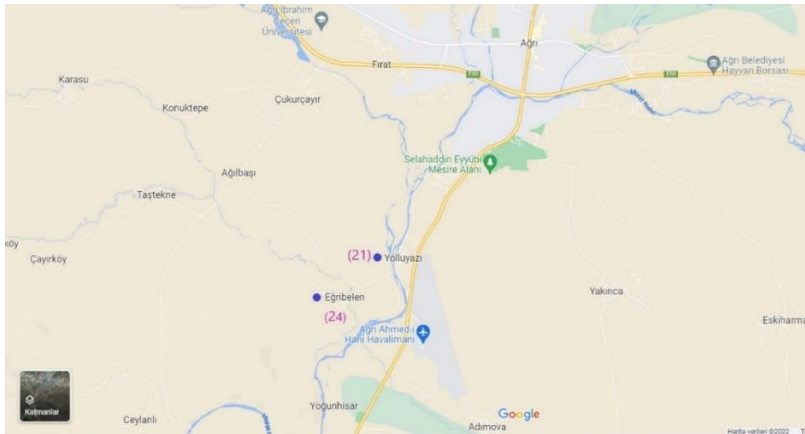
Buzağılarda meydana gelen cryptosporidiosis'te temel kaynağın aynı çiftlikte yaşayan enfekte buzağılar olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden, mera hayvanlarının temiz ve kuru yerlerde barındırılması ayrıca kirlenmiş alanların dezenfekte edilmesi tavsiye edilir. Ancak hayvan sayısının fazla olduğu çiftliklerde dezenfeksiyon işlemleri maliyetli olduğundan dolayı çoğunlukla uygulanmamaktadır. Öte yandan, ishali tek bir

buzağı dışkısının bir gramında 10^7 ookist bulunabileceği ve yenidoğan buzağılar için 17 ookistin hastalık yapmaya yeterli olduğu belirtilmektedir (Almawly ve ark., 2013; Innes ve ark., 2020). Cryptosporidiosis ve giardiasis nedeniyle yaklaşık 10 yıl boyunca ciddi buzağı ishali sorunu yaşayan bir işletmenin başarılı bir şekilde sanitasyonu hakkında bir rapor sunulmuştur. Rapora göre, buzağı ahırlarındaki altlıklar çıkartılıp dışkıları temizlenmiş sonrasında ağılları birkaç gün kurumaya bırakılmış. Ahırlar kaynar suyla yıkanıp üzerlerini kireçli suyla kaplanmış ve bölmeleri ayıran tüm tahta levhalar değiştirilmiştir. Sanitasyondan sonraki iki yıllık süre boyunca hiçbir buzağının ölmediği ve *C. parvum* ookistleri veya *G. intestinalis* kistleri saptanmadığı belirtilmiştir. Böylece, kireçli su dezenfeksiyonunun sığır sürülerinde etkili bir kontrol önlemi olabileceği belirtilmiştir (Björkman ve ark., 2018; Shaw ve ark., 2020).

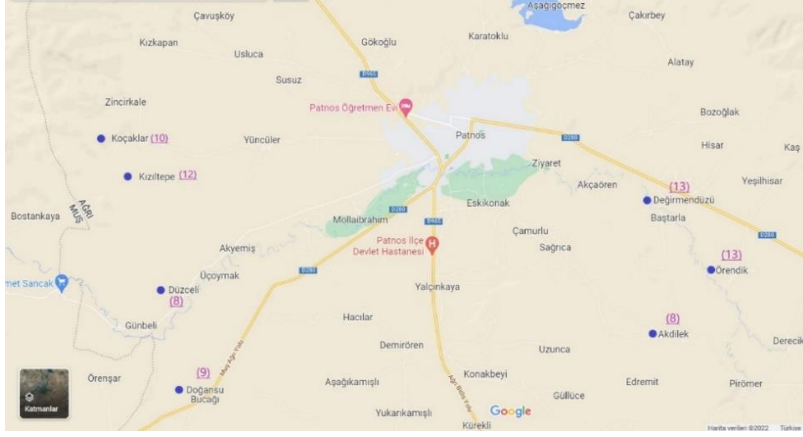
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

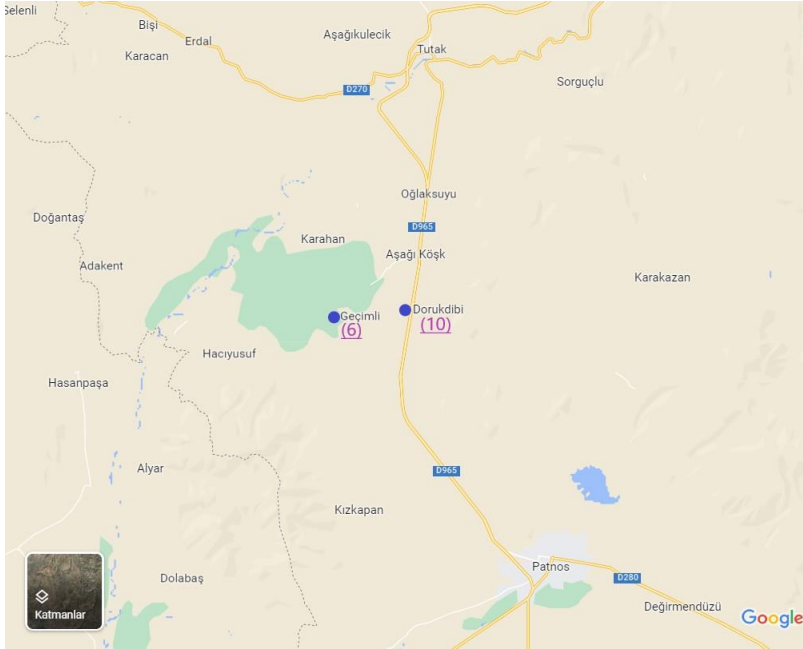
Çalışmaya başlamadan önce Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmaları Etik Kurulundan etik kurul onayı alındı. Çalışma, 01.02.2022- 01.12.2022 tarihleri arasında Ağrı Patnos Devlet Hastanesi ve Ağrı iline bağlı bazı merkez köyleri ile Patnos, Tutak ve Hamur ilçelerine bağlı bazı köylerde yürütüldü. Çalışmaya, Ağrı Patnos Devlet Hastanesinin farklı kliniklerine başvurup Parazitoloji Laboratuvarına yönlendirilen 18-85 yaş aralığında 100 gönüllü insan ile Ağrı ilinin merkezine bağlı Eğribelen ve Yolluyazı köyleri (Şekil 5), Patnos ilçesine bağlı Koçaklar, Kızıltepe, Düzceli, Doğansu, Örendik, Değirmendüzü ve Akdilek köyleri (Şekil 6), Tutak ilçesine bağlı Geçimli ve Dorukdibi köyleri (Şekil 7), Hamur ilçesine bağlı Aşağıkarabal, Civrik ve Ekincik köyleri (Şekil 8) olmak üzere toplam 14 köyden örnekleme usulü ile seçilen 193 buzağı dahil edildi. Ağrı Patnos Devlet Hastanesinin farklı kliniklerine başvurup Parazitoloji Laboratuvarında incelenen dışkı örneklerinin artan kısımları ile buzağılardan elde edilen dışkı örnekleri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına ulaştırıldı. Dışkı örnekleri alınan hastalara ait bilgiler hastanenin otomasyon sisteminden temin edildi. Hayvan sahiplerinin izni alınarak ahır ve çiftliklerdeki buzağı dışkıları, rektumlarından direkt olarak alındı (Şekil 9). Ayrıca, buzağların yaşı, ırkı ve cinsiyeti kaydedildi.



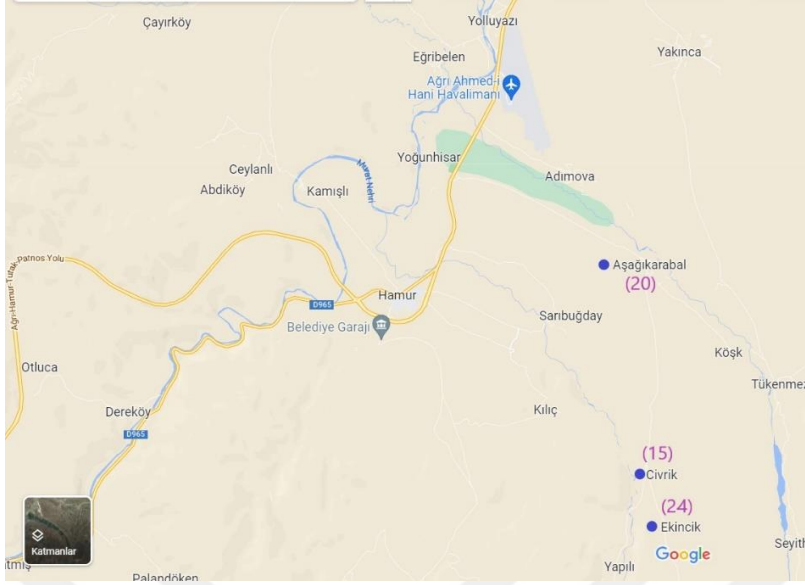
Şekil 5. Dışkı örnekleri alınan Ağrı ili merkez köyleri



Şekil 6. Dışkı örnekleri alınan Patnos ilçesine bağlı köyler



Şekil 7. Dışkı örnekleri alınan Tutak ilçesine bağlı köyler



Şekil 8. Dışkı örnekleri alınan Hamur ilçesine bağlı köyler



Şekil 9. Buzağı rektumundan dışkı örneği alımı (Orijinal)

3.2.1. Kullanılan başlıca cihazlar ve sarf malzemeler

- Santrifüj
- Vortex
- Hassas terazi

- Gradient PCR cihazı
- Elektroforez
- UV translüminatör
- Mikroskop
- Mikropipet
- Soğutucu dolap
- Heater
- Mikrodalga fırın
- Steril pipet uçları
- DNA izolasyon kiti (GeneMATRIX Stool DNA Purification Kiti, Polonya)
- Primerler:
BCOWPF: 5' -ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCTC-3'
BCOWPR: 5-CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC-3'
Cry-15: 5 -GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3'
Cry-9: 5 GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3'
- Solis biodyne 5X firepol master mix
- Kaset test kiti (Certest Crypto Biotec İspanya)
- Kristal fenol
- Bazik fuksin
- %95'lik etil alkol
- Metilen mavisi
- Konsantre sülfürik asit
- Mezür
- Eppendorf tüpü, lam ve lamel
- Lam
- Lamel

3.2. Yöntem

Bu çalışmada, modifiye Asit-Fast boyama (mAF), immünokromatografik kaset test (İKT) ve moleküler yöntemler kullanıldı.

3.2.1. mAF boyama yöntemi

- Taze dışkı örneğinden yayma preparatlar hazırlanıp havada kurutulduktan sonra, lamalar beş dakika metanol ile tespit edildi.
- Tespit sonrası preparatların üzerine her tarafını kaplayacak şekilde bazik fuksin dökülerek kaynatılmadan hafif duman çıkacak şekilde yaklaşık beş dakika ısıtıldı.
- Çok hızlı akan çay suyu ile yıkayıp atık boyalar temizlendikten sonra dekolizasyon işlemi için %5'lik sülfürik asit içeren şalede bir dakika bekletildi.
- Sülfürik asitin uzaklaştırılması için su ile yıkama işlemi yapıldı ve sonrasında metilen mavisi dökülerek bir dakika bekletildi.
- Preparat tekrar su ile yıkandıktan sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Değerlendirme: mAF boyama yöntemiyle boyanan her preparat, ışık mikroskobu altında X1000 büyütme ile incelendi. Mavi zeminde koyu kırmızı renge boyanan, içinde birden fazla sayıda siyah ve muntazam olmayan granüller bulunan ve 4-6µm çapındaki yuvarlak-oval yapılar, *Cryptosporidium* spp. ookisti olarak değerlendirildi.

3.2. İmmünokromatografik kaset test yöntemi

Çalışmada İKT kiti (Certest crypto Biotec, İspanya) kullanıldı. Kaset testler üretici firmanın önerdiği kullanma talimatı doğrultusunda çalışıldı.

Test Prosedürü

- Kaset testler, teste başlamadan önce oda sıcaklığına (15-30°C) getirildi. Testler, uygulanacağı zamana kadar ambalajlarından çıkarılmadı.
- Kullanıma hazır olarak gönderilen dışkı seyreltme tüpünün kapağı açılarak kapakla birleşik olan çubuk yardımıyla bir parça (yaklaşık 125mg) dışkı alınıp

tüpün içine yerleştirildi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Sıvı halde olan dışkı örneklerinden ise mikro pipet yardımıyla yaklaşık 125µl çekilerek tüpe aktarıldı.

- c) Uygun örnek dağılımı elde edebilmek için tüplerdeki çözelti, homojenize oluncaya kadar vortekslendi.
- d) Kaset testler kullanılmak üzere ambalajından çıkarıldı. Tüpün, damla şeklinde akışının sağlanması için kapaklardaki üst kısım koparıldı.
- e) Kaset testler yatay olarak düz bir zemine yerleştirildi. Kaba partiküller olmayacak şekilde kaset testin dairesel penceresine 4 damla çözelti damlatıldı.
- f) Zamanlayıcı, geri sayım için 10dk'ye ayarlandı.
- g) Sonuçlar, 10dk'nin hemen sonunda değerlendirildi.

Değerlendirme: Kaset testin dikdörtgen penceresinde C harfi (kontrol çizgisi) ile belirtilen alanda yeşil bant beliren testler negatif olarak değerlendirildi. Yeşil bant ek olarak T harfi (test çizgisi) ile gösterilen alanda ayrıca kırmızı bant beliren testler pozitif olarak değerlendirildi. Sonuç çizgisinin (kırmızı) belirmesine bakılmaksızın kontrol bandının (yeşil) oluşmadığı testler ise geçersiz olarak kabul edildi.

İmmunokromatografik Kaset Test ve mAF yöntemleri sonrası tüm dışkı örneklerine 2ml distile su eklenerek, moleküler yöntemlerle daha sonra incelemek üzere buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Moleküler yöntemler

Çalışma için gerekli olan DNA, ekstraksiyon kiti (EURx GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit, Poland) kullanılarak elde edildi. Kitin detaylı çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir.

Modifiye edilmiş GeneMatrix dışkı izolasyon kiti çalışma prosedürü

1. DNA izolasyonuna başlamadan önce, saf su eklenmiş dışkı örneklerine pastor pipetle pipetaj yapılarak örneklerden 1ml alındı. Ardından 1ml PBS çözeltisi eklenerek 30sn vortekslendi. Elde edilen karışım 5000 devirde 5dk santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası süpernatant tek hamlede atılarak eppendorf tüpündeki çökeltilere DNA ekstraksiyon işlemi uygulandı.
2. Kolon aktivasyonu için spin kolon tüpüne 40µl BUFFER ST eklendi.
 3. Yoğunlaştırma sonrası elde edilen çökelti, BEAD tüplerine eklenerek homojen hale gelinceye kadar vortekslendi.
 4. Çökelti eklenmiş BEAD tüplerine 60µl LYSE ST eklendi. Eğer LYSE ST partikül şeklinde ise kuru blok ısıtıcıda 70°C'ye kadar ısıtıldı.
 5. Tüpler vortekslendikten sonra 70°C'de beş dk, daha sonra 95°C'de 45dk boyunca kuru blok ısıtıcıda inkübe edildi. Inkübasyon süresince beş dk aralıklarla vorteksleme işlemine devam edildi.
 6. Inkübasyon sonrasında tüpler yatay vortekse yerleştirilerek maksimum hızda 30dk boyunca vortekslendi.
 7. Vorteksleme işleminden sonra 14000 rpm'de iki dk santrifüj yapıldı.
 8. Süpernatanttan 400µl, 1,5ml'lik yeni eppendorf tüplerine alındı.
 9. 400µl PR BUFFER eklenerek beş sn vortekslendi.
 10. PR BUFFER eklenmiş tüpler -20°C'den çıkarılmış soğuk metal bloğa yerleştirilerek beş dk inkübe edildi.
 11. Inkübasyon sonrasında 14000 rpm'de iki dk santrifüj edildi.
 12. Santrifüjden sonra süpernatantın 550µl'si içi boş 2ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı (Miktarı 550 µl'den az olan numunelerde, diğer reaksiyon miktarları ona göre ayarlandı.).
 13. Süpernatantın üzerine 650µl SOL ST ve daha sonra 400µl %95'lik etanol eklenip tüpler alt üst edildi.
 14. 14000 rpm'de bir dk santrifüj edildi.
 15. Bu karışımdan 600µl spin kolona aktarıldı ve 12000 rpm'de bir dk santrifüj edildi.
 16. Spin kolondan alta geçen sıvı dikkatli bir şekilde dökülerek, spin kolon tekrar eppendorf tüpüne yerleştirildi.
 17. Eppendorf tüpündeki sıvı bitene kadar 14 ve 15. basamaklar tekrarlandı.
 18. 500µl WASH STX spin kolona eklenerek 12000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi.
 19. Spin kolondan alta geçen sıvı dikkatli bir şekilde dökülerek, spin kolon tekrar eppendorf tüpüne yerleştirildi.

20. Tekrar spin kolona 500 µl WASH STX eklendi ve iki dk 12000 rpm’de santrifüj edildi.
21. Spin kolon başka bir steril 1,5 ml’lik eppendorf tüpüne yerleştirildi.
22. Daha önce kuru blokta 70°C’ye kadar ısıtılan ELUTION BUFFER’dan 100µl spin kolona eklendi ve beş dk boyunca oda ısısında inkübe edildi.
23. Bir dk santrifüj edilerek DNA’nın elüsyonu sağlandı. Elde edilen DNA kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

PCR amplifikasyonu

PCR işlemi, dışkı örneklerinden elde edilen DNA’lar ve primer çiftleri ile gerçekleştirildi. Pozitif kontrol için laboratuvarımızda daha önce elde edilen *Cryptosporidium* spp. DNA’ları kullanıldı.

Nested PCR ile *Cryptosporidium* spp.’nin COWP gen bölgesinin amplifikasyonu için öncelikle etkene özgü primerler seçildi. Birinci PCR için 769 bp uzunluğundaki bölgeyi amplifiye eden BCOWPF: 5-ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCTC-3’ ve BCOWPR: 5’ CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC-3’ primerleri kullanıldı (Sadek, 2014). İkinci PCR için 553 bp uzunluğundaki bölgeyi amplifiye eden Cry-15: 5’ GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3’ ve Cry-9: 5’ GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3’ primerleri kullanılarak istenilen bölge çoğaltıldı (Sadek, 2014). Primerler 10 nM olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Solis Biodyne 2X Firepol (12,5 nM MgCl₂) hazır master miks kullanılarak PCR protokolü oluşturuldu. PCR karışımında kullanılan malzeme ve miktarları Tablo 1 ve Tablo 2’de gösterildi.

Tablo 1: Birinci PCR bileşenleri ve miktarları

Malzeme	Miktar
2X Master Mix	12,5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Q solution	2 µl
MgCl ₂	2,5 µl
DNA	1,5 µl
Deiyonize saf su	4,5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

Tablo 2: İkinci PCR bileşenleri ve miktarları

Malzeme	Miktar
2X Master Mix	20 µl
Primer F	1,75 µl
Primer R	1,75 µl
Q solution	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
DNA	2 µl
Deiyonize saf su	9,5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	40 µl

Örneklerin spesifik gen bölgelerinin çoğaltılması Thermo Fisher SimpliAmp marka PCR cihazı ile gerçekleştirildi. Birinci ve ikinci PCR sıcaklık ve süreleri, sırasıyla Tablo 3 ve Tablo 4’te verildi.

Tablo 3: Birinci PCR ısı döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95°C	4dk	1
Denatürasyon	95°C	33sn	18
Bağlanma	58°C	45sn	
Uzama	72°C	45sn	
Son uzama	72°C	10dk	1

Tablo 4: İkinci PCR ısı döngüsü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95°C	4dk	1
Denatürasyon	95°C	33sn	40
Bağlanma	45°C	45sn	
Uzama	72°C	45sn	
Son uzama	72°C	10dk	1

Jel elektroforezi

Test prosedürü

- 1- Thermo 50X Tris Asetat EDTA (TAE) Electrophoresis Buffer stok solüsyonununundan 500 ml 1X TAE hazırlandı.
- 2- Katı halde olan agarozdan 2 gr tartılıp, üzerine 100ml 1X TAE eklendi.
- 3- Oluşan karışım mikrodalga fırında iyice çözülene kadar ısıtıldı.
- 4- Mikrodalga fırından çıkartılan solüsyon, oda sıcaklığında ılık hale gelinceye kadar bekletildi.

- 5- Solüsyona 3µl etidyum bromür eklendi.
- 6- Karışım taraklı tanka dökülerek jelin polimerize olması için 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda jel TAE tankına yerleştirildi.
- 7- Elde edilen PCR ürünlerinden 7,5µl agaroz jele yüklenerek 90 voltta 45 dakika yürütüldü. Amplifiye edilmek istenen 550 bp'lik bölgede bantların oluşup oluşmadığını kontrol etmek için 100 bp DNA ladder marker (Thermo Scientific GeneRuler) kullanıldı.
- 8- Süre sonunda agaroz jel tanktan çıkarılarak translüminatörde UV ışık altında incelendi.

***Cryptosporidium* spp. COWP gen bölgesinin çift yönlü sekans analizi ve sekans analiz sonuçlarının karşılaştırılması**

Cryptosporidium spp.'nin COWP gen bölgesinin PCR ürünleri ile amplifikasyonu neticesinde 550 bp'lik bölgede bant veren 19 PCR ürünü, sekans analizi için BM Lab. firmasının Ankara temsilcisine gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı. İlgili merkezde PCR ürünleri, önce saflaştırma işlemine tabi tutulup daha sonra çift yönlü sekans analizi yapıldı. Sekans analizinde Sanger Metodu tercih edildi. Bunun için firmaya PCR ürünlerinden 35µl ve her bir örnek için Cry-15 ve Cry-9 primerlerinden 10 pmol/µl konsantrasyonda 10µl primer gönderildi.

Elde edilen sekans analiz sonuçları SnapGene 3.3 yazılımı ile kontrolden geçirildi. Bu kontroller yapılırken her nükleotit için oluşan grafikler dikkate alındı. Çift yönlü incelenen sekans sonuçlarında nükleotit farklılığı olan bölgelerde belirgin şekilde yüksek olan grafiklere denk gelen nükleotitler doğru olarak kabul edildi. Sekans analiz sonuçları kontrol edildikten sonra www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST adresinde blastlama işlemi yapılarak *Cryptosporidium* türleri belirlendi. Elde edilen sekans verileri GenBank'taki referans türlerin dizi analizleri ile karşılaştırılıp gerekli raporlamalar yapıldı.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Bu çalışmada sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değerler olarak ifade edilirken, kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede χ^2 (ki kare) testi kullanıldı. Kullanılan yöntemlerin başarı kriterlerini

belirlemek üzere sensitivite ve spesifite değerleri bulundu. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 ($p<0.05$) olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, Ver.26) istatistik paket programı kullanıldı.



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 100 hastanın beşinde (%5) ve 193 buzağının 59'unda (%30,56) *Cryptosporidium parvum* saptandı. *C. parvum* saptanan buzağların ilçe ve köylere göre dağılımı Tablo 5'de verildi. Parazitin hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı Tablo 6'da verildi.

Bu çalışma için öngörülen bütçe göz önünde bulundurularak, *Cryptosporidium parvum* saptanan toplam beş insan ve ayrıca 14 buzağı örneğinin nested PCR amplikonuna sekans analizi yapıldı. Genbank'ta bulunan referans suşlar ile sekans analiz sonuçları karşılaştırıldığında insan ve buzağılara ait tüm izolatların *C. parvum* olduğu görüldü. Sekans analizi yapılan 19 örneğin Genbank'taki referans Z22537.1 suşu ile %100 uyumlu olduğu belirlendi. Bir buzağı izolatında ise single nükleotit polimorfizm'i saptandı (Şekil 13, Şekil 14).

Tablo 5. *Cryptosporidium parvum* pozitif buzağların ilçe ve köylere göre dağılımı

İlçe	Köy	Toplanan örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı (%)	Negatif örnek sayısı (%)
Merkez	Eğribelen	24	8 (33,3)	16 (66,6)
	Yolluyazı	21	4 (19)	17 (81)
Patnos	Akdilek	8	1 (12,5)	7 (87,5)
	Düzceli	8	1 (12,5)	7 (87,5)
	Doğansu	9	3 (33,3)	6 (66,6)
	Koçaklar	10	5 (50)	5 (50)
	Kızıltepe	12	4 (33,3)	8 (66,6)
	Örendik	13	5 (38,4)	8 (61,5)
	Değirmendüzü	13	2 (15,3)	11 (84,6)
Tutak	Geçimli	6	0 (0)	6 (100)
	Dorukdibi	10	4 (40)	6 (60)
Hamur	Aşağıkarabal	20	7 (35)	13 (65)
	Civrik	15	5 (33,3)	10 (66,6)
	Ekincik	24	10 (41,6)	14 (58,3)
Toplam	14 köy	193	59 (30,5)	134 (69,4)

Tablo 6. *Cryptosporidium parvum*'un hastaların yaş ve cinsiyetine göre dağılımı

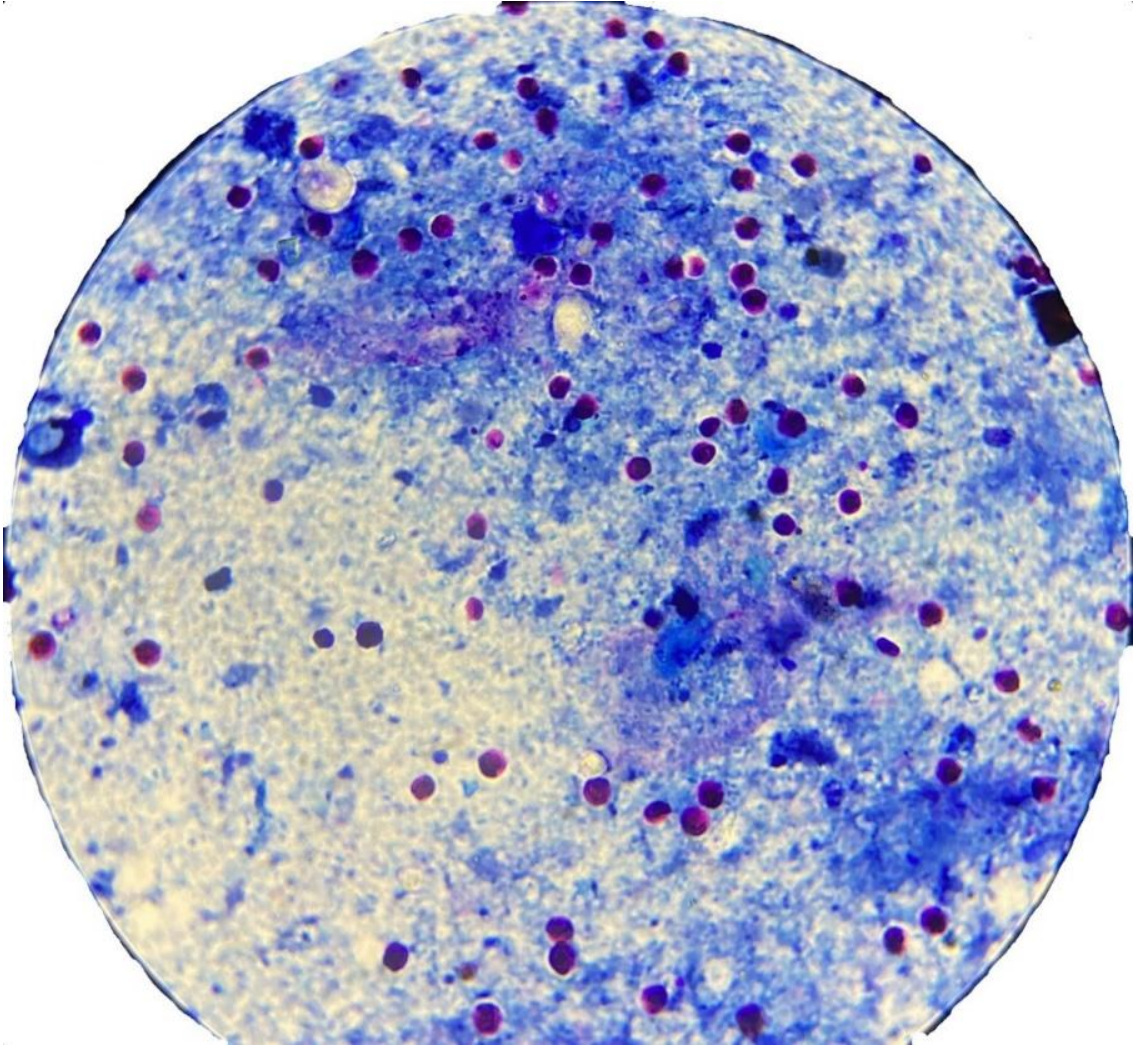
	Cinsiyet	Yaş
Hasta 1	Erkek	21
Hasta 2	Erkek	35
Hasta 3	Kadın	37
Hasta 4	Kadın	41
Hasta 5	Kadın	77

Cryptosporidiosis'li hastalarda gözlenen klinik belirtiler Tablo 7'de verilmiş olup, en sık rastlanan klinik şikayetlerin ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık, halsizlik ve ateş olduğu saptandı.

Tablo 7. Cryptosporidiosis'li hastalarda gözlenen klinik belirtiler

Hastalar	Klinik belirtiler
Hasta 1	İshal, ateş, bulantı, kusma
Hasta 2	İshal, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık, halsizlik
Hasta 3	İshal, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı, kronik hastalık
Hasta 4	İshal, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı
Hasta 5	İshal, karın ağrısı, iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı

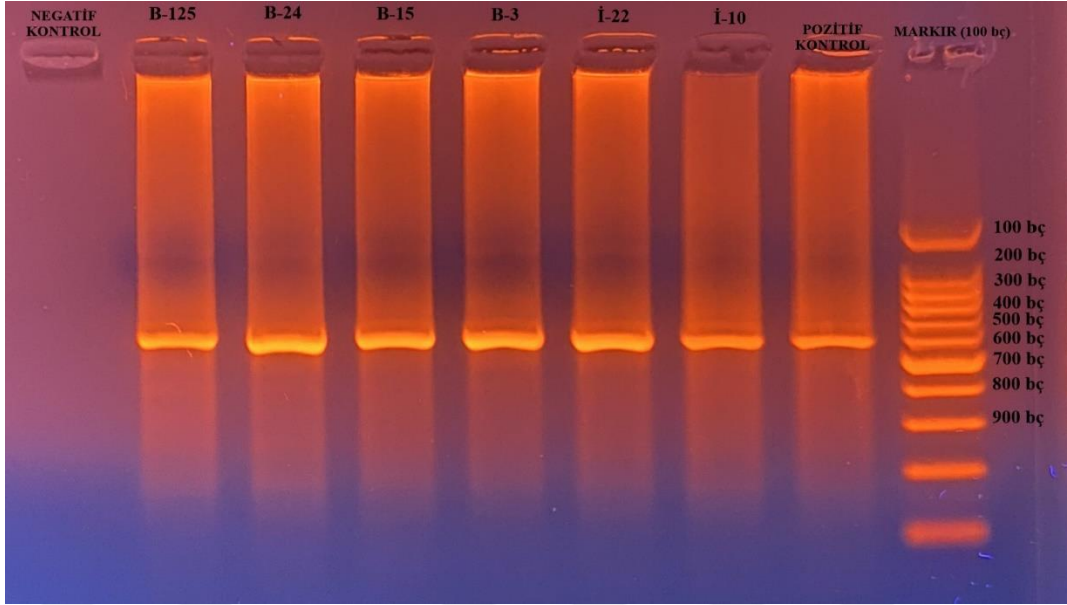
Çalışmada mAF boyama yöntemi ile pozitif bulunan 57 örnek (Şekil 10), İKT (Şekil 11) ve nested-PCR yöntemi (Şekil 12) ile de pozitif bulundu. Ayrıca, mAF boyama yöntemi ile negatif bulunan yedi örnek diğer iki yöntem ile pozitif bulundu (Tablo 8).



Şekil 10. mAF yöntemi ile tespit edilen *Cryptosporidium parvum* ookistleri (X1000)



Şekil 11. İmmunokromatografik Kaset Test çalışması ile pozitif olarak değerlendirilen buzağı (B-106) ve insan (İ-2) örneği

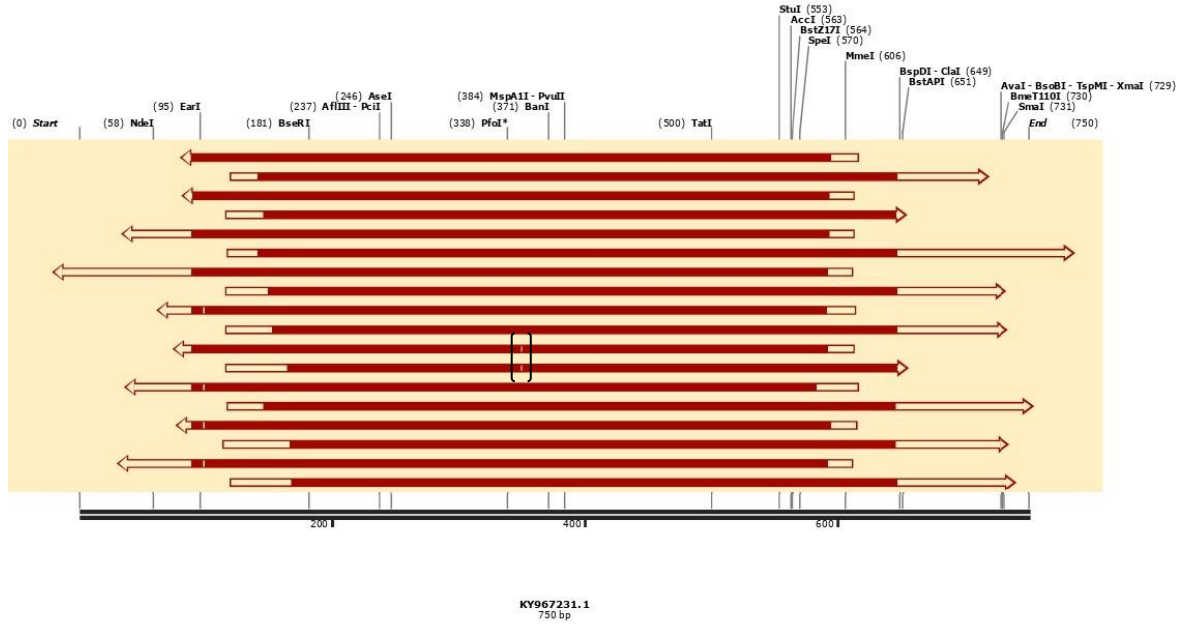


Şekil 12. Nested PCR sonrası elektroforez jel görüntüsü

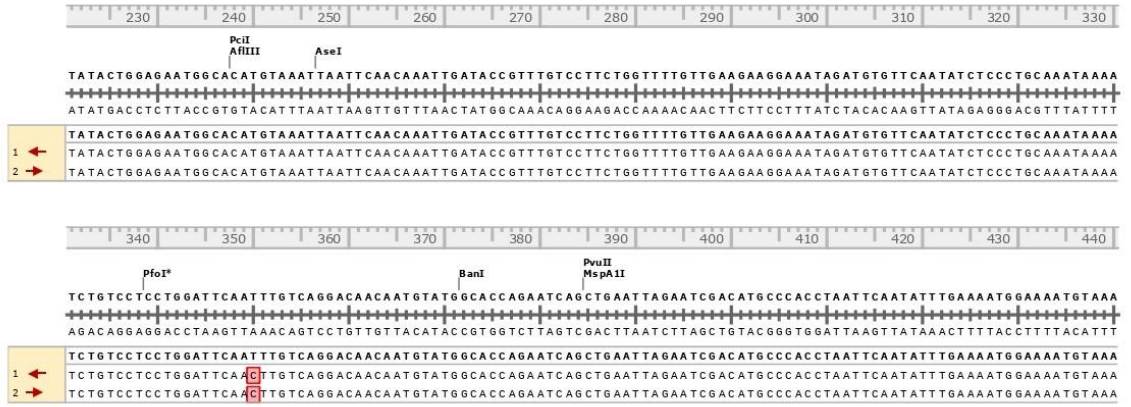
Bu çalışmada, nested PCR altın standart olarak kabul edildiğinde mAF boyama yönteminin sensitivitesi (duyarlılığı) %89,1 spesifitesi (özgüllüğü) %100 olarak saptandı. İmmunokromatografik Kaset Test yönteminin mAF boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğu (sensitivite ve spesifitesi %100) belirlendi (Tablo 8).

Tablo 8. *Cryptosporidium parvum* tanısında nested PCR, mAF ve İKT yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri

Yöntemler	Pozitif	Negatif	Sensitivite	Spesifite
Nested PCR	64	0	%100	%100
İKT yöntemi	64	0	%100	%100
mAF yöntemi	57	7	%89,1	%100



Şekil 13. SnapGene programına göre sekans sonuçlarının karşılaştırma görüntüsü



Şekil 14. B-161 izolatının 350. baz çiftinde görülen mutasyon

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar cryptosporidiosis'in, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde ishale seyreden hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olduğunu ve gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek oranda seyrettiğini göstermiştir. Bu parazitoz, gelişmekte olan ülkelerde çocuk ölümlerinin %30-50'sinden sorumlu olup özellikle beş yaş altı çocuklarda ishale neden olan en önemli etkenlerden biridir (Mahmoudi ve ark., 2017). Hatta, iki yaşından küçük çocuklarda orta ve şiddetli ishalin rota virüsünden sonra en yaygın nedeni olarak gösterilmektedir (Dhal ve ark., 2022). Bağışıklığı baskılanmış yetişkin bireylerde, özellikle AIDS hastalarında ve organ nakli alıcılarında çok daha ağır seyretmekte, hatta ölümcül ishallerine sebep olabilmektedir (Chaveza ve White, 2018).

Son 30 yılda, çeşitli ülkelerde bu fırsatçı protozoonun insan ve hayvanlardaki prevalansını araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır (Cunha ve ark., 2019). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. sıklığının Kuveyt'te %0,9 (Albert ve ark., 2016), İran'da %4,9 (Berahmat ve ark., 2017), İngiltere'de %5,6 (King ve ark., 2017), Çin'de %9,5 (Liu ve ark., 2020), Batı Afrika'da %14 (Aldeyarbi ve ark., 2016), Katar'da %15,5 (Boughattas ve ark., 2017), Brezilya'da %15,7 (Peralta ve ark., 2016), Fransa'da %24 (Costa ve ark., 2020), İsveç'te %26 (Insulander ve ark., 2013) ve Pakistan'da %53 (Raja ve ark., 2014) oranlarında saptanmıştır.

Ülkemizde insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium* türlerine Sivas'ta %4,1 (Eren ve ark., 2022), Van'da %5 (Körkoca ve ark., 2013) ve %20 (Ekici ve ark., 2022), Mersin'de %5,5 (Otağ ve ark., 2007), Malatya'da %6,1 (Karaman ve ark., 2015), Kocaeli'nde %6,25 (Tamer ve Gülenç, 2008), Tekirdağ'da (Yılmaz ve ark., 2017) %8,9 ve İzmir'de %21,5 (Zorbozan ve ark., 2018) oranlarında saptanmıştır. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, *Cryptosporidium parvum*'a 100 ishali hastanın beşinde (%5) rastlanmıştır olup, yukarıda belirtilen çalışmalardan ikisi hariç (Ekici ve ark., 2022; Zorbozan ve ark., 2018) diğer çalışmalarda bulunmuş olan oranlara benzediği görülmüştür.

Cryptosporidium spp.'nin sıklığı ile ilgili buzağılarda yapılan çalışmalar Çin'de %13,3 (Zhang ve ark., 2015), Etiyopya'da %16,2 (Tarekegn ve ark., 2021), Irak'ta %21

(Alseady ve Kawan, 2019), Estonya’da %21,6 (Santoro ve ark., 2018), İran’da %22,3 (Mirzai ve ark., 2014), Brezilya’da %25,7 (Conceição ve ark., 2021), Mısır’da %32,3 (Helmy ve ark., 2014), Hindistan’da %39,6 (Venu ve ark., 2012) ve Arjantin’de %67 (Garro ve ark., 2016) oranında saptanmıştır. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ise 193 buzağının 59’unda (%30,56) *Cryptosporidium parvum* saptanmış olup bu oran, Hindistan ve Mısır’da saptanan oranlara benzer olduğu görüldü.

Ülkemizde *Cryptosporidium* spp.’nin buzağılardaki sıklığı Erzurum’da %3,9 (Güven ve ark., 2013), Burdur’da %6 (Şimşek ve Akkan, 2021), Sivas’ta %7 (Küliş ve Coşkun, 2019), Siirt’te %10 (Kozat ve Tuncay, 2018), Kayseri’de %18 (Ekinci ve ark., 2022), Nevşehir’de %20,7 (Şimşek ve ark., 2012), İzmir’de %30,5 (Karakavuk ve ark., 2020) ve Diyarbakır’da %56,2 (İpek, 2022) oranında saptanmıştır. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada buzağılarda saptanan %30,56 pozitiflik oranının Diyarbakır’da yapılan çalışma hariç diğer illerde yapılan çalışmalardan daha yüksek olduğu görüldü. Bu sonuç, Ağrı ilinde cryptosporidiosis’in buzağılar için önemli bir sorun ve insanlar için ise önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Cryptosporidium türlerinin tanısında ookistlerin doğrudan görülmesi esasına dayanan mAF yöntemi rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak ookist sayısının az olması veya deneyimli personelin bulunmaması gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak ookistlerin gözden kaçabilmesi bu yöntemin dezavantajlarından. Duyarlılığı daha yüksek olan İKT ve diğer serolojik yöntemlerin kullanılması bu etkenlere rastlama ihtimalini artırmaktadır. Ayrıca, daha ileri ve ayrıntılı çalışmalar için PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Doğruman-Al, 2011; Pacheco ve ark., 2022). Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, mAF boyama yöntemi ile insan ve buzağılara ait 293 dışkı örneğinin 64’ünde (%21,84) *Cryptosporidium* spp. saptandı. Çalışmada, mAF yöntemiyle yanlış pozitif sonuç alınmamış, ancak bu yöntemle *Cryptosporidium* spp. görülmeyen yedi örnekte İKT ve nested PCR yöntemleri ile parazitozun saptanmış olması, laboratuvarlarda mAF yöntemine ilave olarak daha hassas olan bu iki yöntemin de kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Puebla ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, modifiye Ziehl-Neelsen yöntemiyle 133 hastanın üçünde (%2,2) *Cryptosporidium* spp. saptanırken, PCR yöntemiyle bu hastaların beşinde (%3,7) bu parazitin saptandığı bildirilmiştir.

Khalil ve arkadaşlarının (2016) yaptığı bir çalışmada parazitoloji laboratuvarına farklı servislerden gönderilen 450 ishali hastanın gaita örneğinde mAF yöntemiyle %9,1, Real Time PCR ve Dot blot hibridizasyon yöntemleriyle %9,3 ve qPCR yöntemiyle %9,5 oranlarında *Cryptosporidium* spp. pozitifliği saptanmıştır.

Tamer ve arkadaşları (2008) tarafından ishali çocuklarda *Cryptosporidium* spp.'yi ELISA yöntemiyle %12,3 oranında saptanırken, Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile %7,9 oranında saptanmıştır.

Moore ve arkadaşları (2016), tarafından 498 hastanın dışkı örneği, Evergreen fekal parazit yoğunlaştırma kitiyle hazırlanıp mikroskopik yöntemle incelenmiş ve örneklerin %2,2'sinde, PCR yöntemiyle örneklerin %7,6'sında *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

Hailu ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada kırsalda ve kentte sağlık merkezlerini ziyaret eden 187 hastanın dışkı örneklerinde modifiye Ziehl-Neelsen yöntemiyle %17,1, nested PCR yöntemiyle %24,6 ve Real Time PCR yöntemiyle %41,7 oranında *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

Karabey ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada kemoterapi alan 94 hastada, modifiye Ziehl-Neelsen yöntemiyle %2,1 ve Real Time PCR ve ELISA yöntemiyle %5,3 oranlarında *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

Cengiz ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, immün sistemi baskılanmış hastaların dışkı örneklerinde ELISA yöntemiyle %11,3, mAF yöntemiyle %5,7 ve İKT yöntemiyle %0,7 oranında *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

El-Missiry ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, ishal şikâyeti ile hastaneye başvuran 350 hastanın mAF boyama yöntemiyle %5,7'sinde, İKT yöntemiyle %9,4'ünde ve nested PCR yöntemiyle %11,4'ünde *Cryptosporidium* spp. saptanmıştır.

Ekici ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, immünsüprese 150 hastanın %20'sinde ve 50 buzağının %10'unda *C. parvum* saptanmıştır. Çalışmada mAF yöntemiyle *Cryptosporidium* spp. saptanamayan sekiz örneğin İKT ve nested PCR

yöntemleriyle pozitif olarak saptandığı ve böylece İKT yönteminin mAF boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Abdul-Hussein ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* spp.'nin saptanmasında hem İKT hem de ELISA yöntemlerinin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip oldukları ve *Cryptosporidium* spp.'nin tanısında İKT yönteminin konvansiyonel yöntemlere göre güvenilirliğinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, İKT ve Neseted PCR yöntemlerinin mAF yöntemine göre daha yüksek sensitivite ve spesifite gösterdiği belirlenmiş olup, bu sonuç diğer çalışmanın sonuçlarına benzemektedir.

Cryptosporidium türlerinin ve subtiplerinin bir ülke veya bölgedeki dağılımının bilinmesi, cryptosporidiosis'in bulaşmasını önlemede, kontrolünde ve potansiyel zoonoz kaynaklarını belirlemede oldukça önemlidir (Lebbad ve ark., 2021). Günümüzde, en az 44 *Cryptosporidium* türü ve 120'den fazla *Cryptosporidium* subtipi tanımlanmıştır. Ancak, insanlarda oluşan enfeksiyonların büyük çoğunluğundan *C. parvum* ve *C. hominis* sorumludur (Ryan ve ark., 2021a). Günümüze kadar sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri bildirilmiştir. Bunlardan *C. parvum*'un konak yelpazesi daha geniş olup, buzağılarda daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Gündüz ve Arslan, 2017; Shaw ve ark., 2020).

Kenya'da 151 hastadan izole pozitif örneğin %11,9'unun *C. parvum* ve %82,8'inin *C. hominis* (Mbae ve ark., 2015), Sudan'da buzağılar üzerinde yapılan bir çalışmada %73,5'inin *C. parvum* (Taha ve ark., 2017), İsveç'te insanlar üzerinde yapılan geniş kapsamlı bir subtiplendirme çalışmasında %75,1'inin *C. parvum* ve %12,3'ünün *C. hominis* (Lebbad ve ark., 2021), İngiltere'de 2009-2017 yılları arasında cryptosporidiosis salgınlarının görülmesi nedeniyle insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada %72'sinin *C. parvum* (Chalmers ve ark., 2019), İran'da kanser hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada %2,1'inin *C. parvum* (Pestechian ve ark., 2022), Belçika, Fransa ve Hollanda'da buzağılar üzerinde yapılan farklı araştırmalarda sırasıyla %73, %68 ve %86'sının *C. parvum* (Pinto ve ark., 2021), Arjantin'de buzağılar üzerinde yapılan bir çalışmada %25,5'inin *C. parvum* (Lombardelli ve ark., 2019), İsrail'de buzağılar üzerinde yapılan bir çalışmada %71'inin *C. parvum* (Yasur-Landau ve ark.,

2021) ve Katar’da gıda sektöründe çalışan göçmenler üzerinde yapılan bir çalışmada %4,5’inin *C. parvum* (Boughattas ve ark., 2019) olduğu saptanmıştır.

Yıldırım ve arkadaşları (2020) tarafından Kayseri ve Burdur’da buzağılar üzerinde yapılan bir çalışmada buzağıkların %70,8’inde *C. parvum* saptanmıştır.

Kabir ve arkadaşları (2020) tarafından Konya’da buzağıklar üzerinde yapılan bir çalışmada %27,3 oranında *C. parvum* saptandığı bildirilmiştir.

Direkel ve arkadaşlar (2008) tarafından yapılan bir çalışmada Malatya Huzurevi sakinlerinde %13,4 ve Turgut Özal Tıp Merkezi’ne başvuran hastalarda %5,6 oranında *C. parvum* saptanmıştır.

Çetinkaya ve arkadaşları (2015) böbrek nakli yapılan bir hastada birkaç hafta sonra bol sulu ishal şikâyeti başlaması üzerine, hastanın dışkı örneğinin incelenmesi sonucunda *C. parvum* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ataş (2020) tarafından yapılan bir araştırmada, Sivas’ta 2006 - 2018 tarihleri arasında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine gastrointestinal şikayetler ile başvuran hastalarda %0,3 oranında *C. parvum* saptanmıştır.

Cryptosporidiosis, mukus içerebilen ancak nadiren beyaz veya kırmızı kan hücreleri içeren bol sulu ishal ile karakterize olduğu, etkilenen kişilerin %50’sinde kramp şeklinde karın ağrısı, mide bulantısı ve kusma görüldüğü, buna ilave olarak asemptomatik enfeksiyonlarda olduğu gibi, bazen miyalji, yorgunluk, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı ve düşük dereceli ateş vb. spesifik olmayan semptomlarla da ortaya çıkabildiği bildirilmiştir (Mhaissen ve Flynn, 2017). Khalil ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, dışkı örneğinde *Cryptosporidium* spp. saptanan hastaların %40’ında iştahsızlık görüldüğü bildirilmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, *C. parvum* saptanan hastaların %40’ında iştahsızlık semptomu bildirilmiş olup bu oran, Khalil ve arkadaşlarının çalışmalarında elde edilen sonuçlara birebir uygunluk göstermiştir. Tamer ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, cryptosporidiosis saptanan ishallerli çocukların %73’ünde ateş, %48,3’ünde bulantı ve %65’inde karın ağrısı görüldüğü bildirilmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ise,

dışkı örneklerinde *C. parvum* görülen hastaların %80'inde ateş, bulantı ve karın ağrısı saptandı. El-Missiry ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, hastaneye başvurup dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. görülen hastaların %82,1'inde ateş saptandığı belirtmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ise hastaların %80'inde ateş saptanmış olup, bu oranın El-Missiry ve arkadaşları (2019)'nın bulgularına benzer olduğu görüldü.

Sonuç olarak;

1. Ağrı yöresinde insan ve buzağılarda *C. parvum*'un varlığı ilk kez yapılan bu çalışmaya ile ortaya konulmuştur.
2. Bölgede, insan ve hayvanlarda sadece *C. parvum* türüne rastlanmıştır.
3. Bölgede özellikle buzağılarda yüksek oranda *C. parvum* saptanması hem çiftlik hayvanları hem de bölge sakinleri için büyük bir önem arz etmektedir.
4. Moleküler yöntemlerin olmadığı laboratuvarlarda, mikroskopi yöntemine alternatif olarak hem hızlı hem de güvenilir sonuç veren immünokromatografik kaset test yönteminin de rutin çalışmalara ilave edilmesi gerekmektedir.
5. Bilimsel çalışmalarda sadece etkeni saptamanın yetersiz olduğu, cryptosporidiosis'in bulaşmasını önlemede, kontrolünde ve potansiyel zoonoz kaynakların belirlenmesinde *Cryptosporidium* türlerinin tiplendirilmesinin önemli olduğu anlaşılmaktadır.
6. Ülkemizde *Cryptosporidium* türlerinin tiplendirilmesi ile ilgili yapılmış yeterli sayıda çalışmaya rastlanmamış olup, Ağrı yöresinde tür düzeyinde yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle elde edilen sonuçların literatüre katkı sağladığı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abdul-Hussein SM, Jassim AH, Hassan JG. Immunochromatographic Test for detection of *Cryptosporidium* in children with malignancies before & during chemotherapy in Basra. Int J Sci Eng Res. 2016;7(3):800-5.
- Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH. Microsporidia and coccidia as causes of persistence diarrhea among liver transplant children: incidence rate and species/genotypes. Pediatr Infect Dis J. 2012;32:185-7.
- Ahmed SA, Karanis P. Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. Int J Hyg Environ Health. 2018;221(5):743-763.
- Aksoy Ü, Özkoç S. Barsak ve genital protozoon hastalıklarında tedavi. Akısü Ç, Korkmaz M, editör. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. İzmir: Meta basım; 2005.
- Albert MJ, Rotimi VO, Iqbal J, Chehadeh W. Evaluation of the xTAG gastrointestinal pathogen panel assay for the detection of enteric pathogens in Kuwait. Med Princ Pract. 2016;25(5):472-6.
- Aldeyarbi HM, Abu El-Ezz NM, Karanis P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the African perspective. Environ Sci Pollut Res. 2016;23(14):13811-21.
- Almawly J, Prattley D, French NP, Lopez-Villalobos N, Hedgespeth B, Grinberg A. Utility of halofuginone lactate for the prevention of natural cryptosporidiosis of calves, in the presence of co-infection with rotavirus and Salmonella Typhimurium. Vet Parasitol. 2013;197(1-2):59-67.
- Alseady HH, Kawan MH. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp in cattle in Baghdad province, Iraq. Iraqi J Vet Sci. 2019;33(2):389-394.
- Arikan S, Erguven S, Akyon Y, Gunalp A. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in a Turkish university hospital. Acta Microbiol. Immunol Hung. 1999;46:33-40.
- Ataş AD. The distribution of pathogenic intestinal parasites in Sivas Cumhuriyet University faculty of medicine research and application hospital between 2006-2018. Türkiye Parazitol Derg. 2020;44(1):25-30.
- Baqai R, Anwar S, Kazmi SU. Detection of *Cryptosporidium* in immunosuppressed patients. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2005;17:38-40.
- Benhouda D, Hakem A, Sannella AR, Benhouda A, Cacciò SM. First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. Parasite. 2017;24:15.
- Berahmat R, Spotin A, Ahmadpour E, Mahami-Oskoue M, Rezamand A, Aminisani N, Mikaeili-Galeh T. Human cryptosporidiosis in Iran: a systematic review and meta-analysis. Parasitology Res. 2017;116(4):1111-28.
- Beyhan YE and Yılmaz H. Investigation of *Cryptosporidium* spp. Antigen by ELISA in stool specimens: nine year evaluation. Türkiye Parazitol Derg. 2020;44(2):68-71.
- Björkman C, von Brömssen C, Troell K, Svensson C. Disinfection with hydrated lime may help manage cryptosporidiosis in calves. Vet Parasitol. 2018;264:58-63.

- Boughattas S, Behnke JM, Al-Ansari K, Sharma A, Abu-Alainin W, Al-Thani A, Abu-Madi MA. Molecular analysis of the enteric protozoa associated with acute diarrhea in hospitalized children. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:343.
- Boughattas S, Behnke JM, Al-Sadeq D, Ismail A, Abu-Madi M. *Cryptosporidium* spp., prevalence, molecular characterisation and socio-demographic risk factors among immigrants in Qatar. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(10): e0007750.
- Brunauer M, Roch FF, Conrady B. Prevalence of worldwide neonatal calf diarrhoea caused by bovine rotavirus in combination with bovine coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp.: A meta-analysis. *Animals.* 2021;11(4):1014.
- Burgu A. Türkiye'de Buzağlarda *Cryptosporidium*'ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar. *A Ü Vet Fak Der.* 1984;31(3):573-585.
- Caccio SM, Putignani L. Epidemiology of Human *Cryptosporidiosis*. Caccio SM, Widmer G, editors. *Cryptosporidium: parasite and disease.* 1st ed. London: Springer-Verlag Wien; 2014.
- Caccio SM, Tosini F. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Bruschi F, editor. *Frontiers in Parasitology.* 1st ed. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2017.
- Carnicer-Pont D, Almeda J, Luis Marin J, Martinez C, Gonzalez-Soler MV, Montoliu A, Muñoz R, Casabona J. Unlinked anonymous testing to estimate HIV prevalence among pregnant women in Catalonia, Spain, 1994 to 2009. *Euro Surveill.* 2011;16: 19940.
- Casemore DP. Laboratory methods for diagnosing *Cryptosporidiosis*. *J Clin Pathol.* 1991;44:445.
- Cengiz ZT, Yilmaz H, Sahin IH, Kapmaz M, Ekici P. The frequency of *Cryptosporidium* spp. in immunocompromised patients by modified acid-fast staining, cassette kit and ELISA methods: comparison of the diagnostic techniques. *Jundishapur J Microbiol.* 2017;10(2): e36479.
- Certad G, Osman M, Benamrouz S. Pathogenesis of *Cryptosporidium* in Humans. Singh SK, editör. *Human Emerging and Re-emerging Infections Viral and Parasitic Infections.* 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2016.
- Chalmers RM, Robinson G, Elwin K, Elson R. Analysis of the *Cryptosporidium* spp. and gp60 subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. *Parasites Vectors.* 2019;12:95.
- Chalmers RM. *Cryptosporidium*. Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF, editors. *Microbiology of Waterborne Diseases microbiological aspects and risks.* 2th ed. USA: Elsevier Ltd.; 2014.
- Chavez MA, White Jr AC. Novel treatment strategies and drugs in development for cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(8):655-661.
- Conceição AI, Almeida LPS, Macedo LO, Mendonça CL, Alves LC, Ramos RAN, Carvalho GA. Prevalence of infection by *Cryptosporidium* spp. in calves and associated risk factors in Northeastern Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2021;73:34-40.

- Costa D, Razakandrainibe R, Valot S, Vannier M, Sautour M, Basmaciyan L, Favennec L. Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms*. 2020;8(9):1358.
- Cunha FS, Peralta RHS, Peralta JM. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e28.
- Çetinkaya Ü, Dursun İ, Kuk S, Şahin İ, Yazar S. *Cryptosporidium parvum* gastroenteritis in a patient with renal transplantation. *Türkiye Parazitol Derg*. 2015;39:231-3.
- Çiçek M and Yılmaz H. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and other intestinal parasites in children with diarrhea. *Dicle Tıp Derg*. 2011;38(1):70-75.
- Dhal AK, Panda C, Yun SI, Mahapatra RK. An update on *Cryptosporidium* biology and therapeutic avenues. *Journal of Parasitic Diseases*, 2022;46(3):923–939.
- Diptyanusa A, Sari IP. Treatment of human intestinal cryptosporidiosis: A review of published clinical trials. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist*. 2021;17:128-138.
- Direkel Ş, Özerol İH, Durmaz R. İshalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemleriyle araştırılması. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg*. 2008;1(1):20-25.
- Doğruman-Al F. Cryptosporidiosis. Korkmaz M, Ok ÜZ, editörler. *Parazitolojide Laboratuvar*. İzmir: META Basım; 2011.
- Doungmala P, Phuektes P, Taweean W, Sangmaneeet S, Japa O. Prevalence and species identification of *Cryptosporidium* spp. in the newborn dairy calves from Muang District, Khon Kaen Province, Thailand. *Vet World*. 2019;12(9):1454-59.
- Dragomirova PV. Cryptosporidiosis: History, Etiology, Biology, Pathogenesis and Pathoanatomy-A Review. *JBCR*. 2022;15(1):22-29.
- Ekici A, Unlu A, Aydemir S, Barlik F, Yılmaz H. Subtyping of *Cryptosporidium parvum* Obtained from Humans and Calves in Van, Turkey. *Iran J Parasitol*. 2022;17(3):366-374.
- Ekinci G, Tüfekçi E, Onmaz AC, Çitil M, Keleş İ, Güneş V. Erciyes üniversitesi hayvan hastanesi'ne 2019-2021 yılları arasında getirilen neonatal ishalli buzağılarda majör enteropatojenlerin yaygınlığının araştırılması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*. 2022;19(2):113-122.
- Ekinci A. Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu [Doktora tezi]. Kars: Kafkas Üniversitesi; 2015.
- El-Missiry A, El-Hameed A, Saad G, El-Badry A, Helmy Y, Shehata M. Molecular genetic characterization of human *Cryptosporidium* isolates and their respective demographic, environmental and clinical manifestations in Egyptian diarrheic patients. *PUJ*. 2019;12(3):187-196.
- Eren MT, Değerli S, Yönm Ö. Investigation of the Precence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. in Patients Who Undergone Endoscopy and Colonoscopy. *Türkiye Parazitol Derg*. 2022;46(4):281-7.

- Ertaş F, Ayan A. Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves through Nested PCR and Kinyoun's acid-fast methods in Iğdır, Turkey. IJEES. 2021;11(4):791-6.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000;30:1305-1322.
- Fayer R. General Biology. Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. New York: CRC Press; 2008.
- Feleke DG, Alemu Y, Bisetegn H, Mekonnen M, Yemanebrhane N. Intestinal parasitic infections and associated factors among street dwellers and prison inmates: A systematic review and meta-analysis. PloS One. 2021;16(8):e0255641.
- Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- Garro CJ, Morici GE, Utgés ME, Tomazic ML, Schnittger L. Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. Parasite Epidemiol Control. 2016;1(2): 36-41.
- Ghoshal U, Dey A, Ranjan P, Khanduja S, Agarwal V, Ghoshal UC. Identification of opportunistic enteric parasites among immunocompetent patients with diarrhoea from Northern India and genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Microsporidia*. IJMM. 2016;34(1):60-66.
- Gerace E, Presti VDML, Biondo C. *Cryptosporidium* infection: epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis. Eur J Immunol. 2019;9(4):119-123.
- Guérin A, Striepen B. The biology of the intestinal intracellular parasite *Cryptosporidium*. Cell Host & Microbe. 2020;28(4):509-515.
- Güven E, Avcıoğlu H, Balkaya I, Hayırlı A, Kar S, Karaer Z. Prevalence of Cryptosporidiosis and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in calves in Erzurum. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2013;19(6): 969-974.
- Hailu AW, Degarege A, Adamu H, Costa D, Villier V, Mouhajir A, Petros B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from humans in Ethiopia. Plos one. 2021;16(6):e0253186.
- Hassan EM, Örmeci B, DeRosa MC, Dixon BR, Sattar SA, Iqbal A. A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. Water Sci Technol. 2021;83(1):1-25.
- Heintzelman MB. Gliding motility in apicomplexan parasites. In Seminars in cell & developmental biology. Academic Press. 2015; 46:135-142.
- Helmy YA, von Samson-Himmelstjerna G, Nöckler K, Zessin KH. Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. Epidemiol Infect. 2015;143(6):1208-18.
- Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. J Infect Dev. 2010;4:309–317.
- Innes EA, Chalmers RM, Wells B, Pawlowic MC. A one health approach to tackle cryptosporidiosis. Trends Parasitol. 2020;36(3):290-303.

- Insulander M, Silverlås C, Lebbad M, Karlsson L, Mattsson JG, Svenungsson B. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiol Infect.* 2013;141(5):1009-20.
- İpek DNS. Diyarbakır Yöresinde İshalli Buzağılarda *Cryptosporidium* spp. Yaygınlığı ve Moleküler Karakterizasyonu. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 2022;15(1):9-13.
- Iqbal A, Goldfarb DM, Slinger R, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. *Int J Circumpolar Health.* 2015;74(1):27713.
- Jayaram S, Saya GK, Rajkumari N, Ulaganeethi R, Roy PK, Mathavaswami V. Prevalence of intestinal parasitic infection and its associated factors among children in Puducherry, South India: a community-based study. *J Parasit Dis.* 2021;45(4):897-902.
- Kabir MHB, Ceylan O, Ceylan C, Shehata AA, Bando H, Essa MI, Kato K. Molecular detection of genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* infection in diarrheic calves, lambs, and goat kids from Turkey. *Parasitol Int.* 2020;79:102163.
- Kaçar Y, Baykal AT, Aydın L, Batmaz H. Evaluation of the efficacy of cow colostrum in the treatment and its effect on serum proteomes in calves with cryptosporidiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2022;248:110429.
- Karakavuk M, Can H, Döşkaya M, Karakavuk T, Alak SE, Köseoğlu AE, Döşkaya AD. Investigation of a Cryptosporidiosis Outbreak Caused by *Cryptosporidium parvum* in a Dairy Farm [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 10 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://www.researchsquare.com/article/rs-55465/v1>
- Karaman Ü, Daldal N, Özer A, Engiyurt Ö, Ertürk Ö. Incidence of *Cryptosporidium* spp. in the human population of Malatya in Turkey. *Acta Medica Mediterranea.* 2015;31:263.
- Khalil S, Mirdha BR, Paul J, Panda A, Makharia G, Chaudhry R, Bhatnagar S. Development and evaluation of molecular methods for detection of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples. *Exp Parasitol.* 2016;170:207-213.
- Khan NA. *Emerging Protozoan Pathogens.* USA: Taylor & Francis Group; 2008.
- Khurana S and Chaudhary P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Trop Parasitol.* 2018;8(1):2-7.
- King P, Robinson G, Elwin K, Tyler KM, Hunter PR, Chalmers RM. Prevalence and epidemiology of human *Cryptosporidium parvum* IIC infections in England and Wales. *The Lancet.* 2017;389:S56.
- Kozat S, Tuncay İ. Prevalance of Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* K 99, and *Giardia lamblia* pathogens in neonatal calves with diarrheic in Siirt Region. *Van Vet J.* 2018;29(1):17-22.
- Körkoca, H., Yasar G, Ataş AD, Kurtoglu MG, Ekici K, Berktaş M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic food workers. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2013;37(4):241-4.
- Kuliğ CC, Coşkun A. Sivas ve ilçelerindeki neonatal ishalleri buzağılarda *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, Rotavirüs ve Coronavirüs Prevalansı. *Türk Vet J.* 2019;1(2):69-73.

- Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Stensvold CR, Beser J. High diversity of *Cryptosporidium* species and subtypes identified in cryptosporidiosis acquired in Sweden and abroad. *Pathogens*. 2021;10(5):523.
- Liu A, Gong B, Liu X, Shen Y, Wu Y, Zhang W, Cao J. A retrospective epidemiological analysis of human *Cryptosporidium* infection in China during the past three decades (1987-2018). *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008146.
- Lombardelli JA, Tomazic ML, Schnittger L, Tiranti KI. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. *Parasitol Res*. 2019;118(7):2079-86.
- Luka G, Samiei E, Tasnim N, Dalili A, Najjaran H, Hoorfar M. Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of *Cryptosporidium*. *J Hazard Mater*. 2022;421:126714.
- Mahmoudi MR, Ongerth JE, Karanis P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the Asian perspective. *Int J Hyg Environ Health*. 2017;220(7):1098-1109.
- Mathison BA, Bradbury RS, Pritt BS. Medical parasitology taxonomy update, January 2018 to May 2020. *J Clin Microbiol*. 2021;59(2):e01308-20.
- Mbae C, Mulinge E, Waruru A, Ngugi B, Wainaina J, Kariuki S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* in children in an urban informal settlement of Nairobi, Kenya. *PloS One*. 2015;10(12):1-18.
- McKerr C, Adak GK, Nichols G, Gorton R, Chalmers RM, Kafatos G, Morton S. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. *PLoS One*. 2015;10:e0125955.
- Mead JR, Arrowood MJ. Treatment of Cryptosporidiosis. Caccio SM, Widmer G, editors. *Cryptosporidium: parasite and disease*. 1st ed. London: Springer-Verlag Wien; 2014.
- Mhaissen MN, Flynn PM. *Cryptosporidium* Species. Long SS, Prober CG, Fischer M, editors. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
- Mirzai Y, Yakhchali M, Mardani K. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* infection in naturally infected cattle of northwest Iran. *Vet Res Forum*. 2014;5(1):55.
- Mmbaga BT and Eric RH. *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children: a review. *Pediatric Clinics*. 2017;64(4):837-850.
- Moore CE, Elwin K, Seng C, Mao S, Suy K, Kumar V, Chalmers RM. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* from symptomatic Cambodian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):e0004822.
- Nader JL, Mathers TC, Ward BJ, Pachebat JA, Swain MT, Robinson G, Tyler KM. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. *Nat Microbiol*. 2019;4(5):826-836.
- Naguib D, El-Gohary AH, Roellig D, Mohamed AA, Arafat N, Wang Y, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in children in Egypt. *Parasites Vectors*. 2018;11(1):1-9.

- Nwosu A, Berke O, Trotz-Williams LA, Pearl DL. Exploring the geographical distribution of human cryptosporidiosis in Southern Ontario from 2011 to 2014. *Zoonoses Public Health*. 2022;69:425-438.
- O'Leary JK, Sleator RD, Lucey B. *Cryptosporidium* spp. diagnosis and research in the 21st century. *Food Waterborne Parasitol*. 2021;24:e00131.
- Öktem Okullu S, Kurt Ö, Akgül Ö, Çalışkan R. PCR-based detection of intestinal protozoa in cancer and organ transplant recipient patients compared to a healthy control group. *Int J Clin Exp Med*. 2020;13(6):4434-40.
- Otağ F, Asla G, Emekdaş G, Aydın E, Taylan Özkan A, Çeber K. Mersin ilinde ilkökul öğrencilerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg*. 2007;31(1):17-19.
- Pacheco FTF, Freitas HFD, Silva RKNR, Carvalho SSD, Martins AS, Menezes JF, Teixeira MCA. *Cryptosporidium* diagnosis in different groups of children and characterization of parasite species. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2022;55.
- Pane S, Putignani L. *Cryptosporidium*: still open scenarios. *Pathogens*. 2022;11(5):515.
- Peralta RHS, Velásquez JN, Cunha FDS, Pantano ML, Sodré FC, Silva SD, Carnevale S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:30-36.
- Pestechian N, Manesh RM, Tavakoli S, Mokarian F, Rahmani M. Identification and subtyping of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in cancer patients, isfahan province, central iran. *Iran J Parasitol*. 2022;17(4):497-505.
- Pinto P, Ribeiro CA, Hoque S, Hammouma O, Leruste H, Détriché S, Tsaousis AD. Cross-border investigations on the prevalence and transmission dynamics of *Cryptosporidium* species in dairy cattle farms in western mainland Europe. *Microorganisms*. 2021;9(11):2394.
- Pinto DJ, Vinayak S. *Cryptosporidium*: host-parasite interactions and pathogenesis. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2021;8(2):62-67.
- Piperaki ET, Tassios PT. Parasitic infections: their position and impact in the postindustrial world. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):469-470.
- Polat E, Özdemir S, Sirekbasan S. The Distribution of intestinal parasites in patients presenting to a university hospital in ıstanbul: a seven-year retrospective analysis. *Türkiye Parazitol Derg*. 2020;44(3):139-42.
- Puebla LEJ, Núñez-Fernández FA, Nodarse JF, Millán IA, Rodríguez IC, Silva IM, Robertson LJ. Diagnosis of intestinal protozoan infections in patients in Cuba by microscopy and molecular methods: advantages and disadvantages. *J Microbiol Methods*. 2020;179:106102.
- Rafiei A, Rashno Z, Samarbafzadeh A, Khademvatan S. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from immunocompromised patients and children. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7:e9183.
- Raja K, Abbas Z, Hassan SM, Luck NH, Aziz T, Mubarak M. Prevalence of cryptosporidiosis in renal transplant recipients presenting with acute diarrhea at a single center in Pakistan. *J Nephropathol*. 2014;3:127-131.

- Razakandrainibe R, Diawara EHI, Costa D, Goff LL, Lemeteil D, Ballet JJ, Favennec L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(3):e0006355.
- Reh L, Muadica AS, Köster PC, Balasegaram S, Verlander NQ, Chércoles ER, Carmena D. Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. Eurosurveillance. 2019; 24(43).
- Robertson LJ. *Cryptosporidium* as a Foodborne Pathogen. New York: Springer; 2014.
- Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. Animals. 2021a;11(11):3307.
- Ryan U, Feng Y, Fayer R, Xiao L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia*-a 50 year perspective (1971–2021). Int J Parasitol. 2021b;11:3307.
- Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. Int J Parasitol. 2015;45(6):367-373.
- Ryan U, Xiao L. Taxonomy and Molecular Taxonomy. Caccio SM, Widmer G, editors. *Cryptosporidium: parasite and disease*. 1st ed. London: Springer-Verlag Wien; 2014.
- Sadek GS. Use of nested PCR-RFLP for genotyping of *Cryptosporidium* parasites isolated from calves and children suffering from diarrhea. PUJ. 2014;7(2):129-137.
- Sanad MM, Al-Malki JS. Cryptosporidiosis among immunocompromised patients in Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol. 2007;37:765-774.
- Santoro A, Dorbek-Kolin E, Jeremejeva J, Tummeleht L, Orro T, Jokelainen P, Lassen B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. Parasitology. 2019;146(2):261-7.
- Sarjanov F, Köster PC, Doğruman-Al F, Bailo B, Dashti A, Demirel-Kaya F, Carmena D. Detection of enteric parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in patients admitted to hospital in Ankara, Turkey. Parazitoloji. 2021;148(5):550-561.
- Sastry AS, Bhat S. Essentials of medical parasitology. India: Jp Medical Ltd; 2018.
- Shahiduzzaman M, Dauschies A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. Vet Parasitol. 2012;188:203-214.
- Sharma AK, Gururaj K, Sharma R, Goel A, Paul S, Sharma DK. Development of duplex real-time PCR for quick detection of cryptosporidiosis in goats. Cell Biochem Funct. 2022.
- Shaw H, Thomson S, Innes EA, Katzer F. What is the source of *Cryptosporidium parvum* infection for beef and dairy calves? [Poster]. VIIth International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference; June 2019; France.
- Shaw HJ, Innes EA, Morrison LJ, Katzer F, Wells B. Long-term production effects of clinical cryptosporidiosis in neonatal calves. Int J Parasitol. 2020;50(5):371-6.

- Shikani H, Weiss LM. Human Cryptosporidiosis: A Clinical Perspective. Caccio SM, Widmer G, editors. *Cryptosporidium: parasite and disease*. 1st ed. London: Springer-Verlag Wien; 2014.
- Smith H. Diagnostics. Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. New York: CRC Press; 2008.
- Starling CR, Arrowood MJ. Parasitic Protozoa. San Diego: Academic Press; 1993.
- Şahin S, Ağaoğlu S, Alemdar S. *Cryptosporidium* ve Cryptosporidiosis. Türkiye Klinikleri. 2018;35-41:35-41.
- Şen ZS, Taşar MA, Kaya FD, Güneş A, Vezir E, Gülşen HH. A Rare Complication of Acute Diarrhoea Caused by *Cryptosporidium*: Possible Hepatobiliary System Involvement in a Child without Immunodeficiency. Microbiol Bul. 2019;53(4):464-471.
- Şimşek G, Akkan HA. The relationships between passive transfer failure and neonatal diseases in calves in Burdur province. Curr Perspect Health Sci. 2021;2(1):37-43.
- Şimşek AT, İnci A, Yıldırım A, Çiloğlu A, Bişkin Z, Düzlü Ö. Nevşehir yöresindeki yeni doğan ishalleri buzağılarda cryptosporidiosis'in real time PCR ve Nested PCR yöntemleri ile saptanması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2012;9(2):79-87.
- Taha S, Elmalik K, Bangoura B, Lendner M, Mossaad E, Dauschies A. Molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* isolated from diarrheic calves in the Sudan. Parasitol Res. 2017;16(11):2971-79.
- Tamer GS, Gülenç S. Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. Türkiye Parazit Derg. 2008;32(3):198-201.
- Tamer GS, Balıkcı E, Erbar A. Lösemi ve lenfoma tanısı alan çocuklarda cryptosporidiosis prevalansı. Türkiye Parazit Derg. 2008;32:192-7.
- Tarekegn ZS, Tigabu Y, Dejene H. *Cryptosporidium* infection in cattle and humans in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. Parasite Epidemiol Control. 2021;14:e00219.
- Teimouri A, Alimi R, Farsi S, Mikaeili F. Intestinal parasitic infections among patients referred to hospitals affiliated to Shiraz University of Medical Sciences, southern Iran: a retrospective study in pre-and post-COVID-19 pandemic. ESPR. 2022;29(24):36911-19.
- Theel ES, Pritt BS. Parasites. Microbiol Spectrum. 2016;4(4):1-53.
- Tomazic ML, Garro C, Schnittger L. *Cryptosporidium*. Florin-Christensen M, Schnittger L, editors. Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. Switzerland: Springer International Publishing; 2018.
- Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner RC, Mokdad AH. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Infect Dis. 2017;17(9):909-948.
- Turgay N, Ünver-Yolasigmaz A, Oyur T, Özdemir SB, Töz S. Monthly distribution of intestinal parasites detected in a part of western Turkey between May 2009-April 2010- results of acid fast and modified trichrome staining methods. Türkiye Parazit Derg. 2012;36(2):71.

- Udgiri N, Minz M, Kashyap R, Heer M, Gupta CS, Mohandas K, Minz RW, Malla N. Intestinal cryptosporidiasis in living related renal transplantrecipients. *Transplant Proc.* 2004;36:2128-29.
- Vanathy K, Parija SC, Mandal J, Hamide A, Krishnamurthy S. Detection of *Cryptosporidium* in stool samples of immunocompromised patients. *Trop Parasitol.* 2017;7(1):41.
- Venu R, Latha BR, Basith SA, Raj GD, Sreekumar C, Raman M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. *Vet Parasitol.* 2012;188(1-2):19-24.
- Waly WR, Ismail MAGM, Abu-Sarea EY, Abd El Wahab WM. Intestinal parasitic infections and associated risk factors in diabetic patients: a case-control study. *J Parasit Dis.* 2021;45(4):1106-1113.
- Warren CA, Lima AAM. *Cryptosporidiosis*. Goldman L, Schafer AI, editors. 26th edition. Spain; Elsevier: 2021.
- Xiao L, Cama VA. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. Ortega YR, Sterling CR, editors. *Foodborne Parasites*. 2th ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2018.
- Xiao L, Griffiths JK. *Cryptosporidiosis*. Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Aronson NE, Endy TP, editors. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 10th edition. Canada: Elsevier Inc.; 2020.
- Xu N, Liu H, Jiang Y, Yin J, Yuan Z, Shen Y, Cao J. First report of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium occultus* in humans in China, and of the unique novel *C. viatorum* subtype XVaA3h. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):1-11.
- Yasur-Landau D, Zilberberg M, Markovich MP, Behar A, Fleiderovitz L, Mazuz ML. *Cryptosporidium parvum* subtypes from diarrheic dairy calves in Israel. *Vet Parasitol: Reg Stud Rep.* 2021;25:100608.
- Yildirim A, Adanir R, Inci A, Yukari BA, Duzlu O, Onder Z, ve ark. Prevalence and genotyping of bovine *Cryptosporidium* species in the Mediterranean and Central Anatolia Region of Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2020;69:101425.
- Yılmaz N, Kaplan Küçük Ş, Akyıldız G, Gargılı A, Kar S. *Cryptosporidiosis* in humans with reference to the first case of *Cryptosporidium hominis* infection in Turkey. *Med Bull Haseki.* 2017;55:194-8.
- Zhang XX, Tan QD, Zhou DH, Ni XT, Liu GX, Yang YC, Zhu XQ. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle, northwest China. *Parasitol Res.* 2015;114(7):2781-87.
- Zolova A, Keidāne D, Zolovs M. Prevalence of susceptibility to *Cryptosporidium* spp. among dairy calves with different feeding regimens with an emphasis on the feeding of transition milk. *Vet World.* 2022;15(5):1256-60.
- Zorbozan O, Quliyeva G, Tunalı V, Özbilgin A, Turgay N, Gökengin AD. Intestinal protozoa in HIV-infected patients: A retrospective analysis. *Türkiye Parazitolo Derg.* 2018;42(3):187-190.

EK 3: Tez Orijinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



G19 –TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Ağrı Yöresinde İnsan ve Buzağılardan Elde Edilen Dışkı Örneklerinde <i>Cryptosporidium</i> Türlerinin Mikroskopi ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayısı	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
12	2	41	6	76
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
iThenticate		10/04/2023	%12	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayısı hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Fethi BARLIK				

Öğrencinin Adı Soyadı	Fethi BARLIK
Anabilim Dalı	Tıbbi Parazitoloji
Öğrenci No	18930002007
Programı	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR
Prof. Dr. Hasan YILMAZ	(Unvan, Ad Soyad, İmza)