

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI



**HATAY YÖRESİ KÖPEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
YAYGINLIĞININ MİKROSKOBİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

İpek ERDEM

Danışmanlar

Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Prof. Dr. Bilal DİK

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**HATAY YÖRESİ KÖPEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
YAYGINLIĞININ MİKROSKOBİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

İpek ERDEM

Danışmanlar

Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Prof. Dr. Bilal DİK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
22.D.001 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**HATAY YÖRESİ KÖPEKLERİNDE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
YAYGINLIĞININ MİKROSKOBİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

İpek ERDEM

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 19/12/2024 günü online olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof. Dr. Bilal DİK

Üye : Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Üye : Prof. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ

Üye : Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ

Üye : Doç. Dr. Özlem ORUNÇ KILINÇ

Bu tez, Enstitümüz Veterinerlik Parazitolojisi Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet YAMAN'a,

Tez çalışması süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan; Prof. Dr. Bilal DİK, Prof. Dr. Özlem Makbule KAYA, Doç. Dr. Sema ALAŞAHAN, Doç. Dr. Hüseyin ÖZKAN, Doç. Dr. Doğukan ÖZEN, Doç. Dr. Adnan AYAN'a

Laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını her daim yanımda hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Gonca SÖNMEZ, Dr. Öğr. Üyesi Aysel ERASLAN ŞAKAR'a

Tez sürecim boyunca gerek motivasyon desteği gerekse numune toplama konusunda desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ziya YURTAL'a

Numune toplama esnasında yardımlarını gördüğüm Veteriner Hekim Gizem YENER, Veteriner Hekim Duygu OY ve çalışma arkadaşları, Veteriner Hekim Mustafa KARAGÖZ, Veteriner Hekim Ekin DENGÜR, Ümit Av bayii yetkilisi Yusuf KILINÇ ve görev yaptığım fakülte'deki öğrenci arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini devamlı üzerimde hissettiğim, bu günlerimi görmeyi çokça arzulayan ve en çok hak eden değerli anne, baba ve kardeşlerime,

Hayatıma girdiği günden beri her daim yol gösterenim, en iyi arkadaşım, can yoldaşım, sevgili eşim Baran ERDEM'e

Tez sürecime hediye olarak katılan gözümün nuru canım kızıma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmasını 22.D.001 no'lu proje ile destekleyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. <i>Cryptosporidium</i> 'un Sınıflandırması.....	4
2.3. <i>Cryptosporidium</i> 'un Morfolojisi.....	8
2.4. <i>Cryptosporidium</i> 'un Yaşam Döngüsü	9
2.4.1. Ekskistasyon (Ookistin Açılması) Dönemi	10
2.4.2. Merogoni (Eşeysiz Çoğalma) Dönemi	11
2.4.3. Gametogoni (Eşeyli Çoğalma) Dönemi	11
2.4.4. Fertilizasyon (Döllenme) Dönemi	11
2.4.5. Ookist (Ookist Oluşumu) Dönemi	11
2.4.6. Sporogoni Dönemi	12
2.5. <i>Cryptosporidium</i> 'un Epidemiyolojisi.....	13
2.5.1. <i>Cryptosporidium</i> 'un Bulaşması	15
2.5.1.1. <i>Cryptosporidium</i> Ookistlerinin Toprakla ya da Mekanik Vektörler Yoluyla Taşınması.....	16
2.5.1.2. İçme Suyu Yoluyla Bulaşma	16
2.5.1.3. Havuz Suyu Yoluyla Bulaşma.....	17
2.5.1.4. Yiyecekler Yoluyla Bulaşma	18
2.5.1.5. İnhalasyon Yoluyla Bulaşma	19
2.5.2. Köpeklerde Cryptosporidiosis	20
2.5.2.1. Dünya’da Köpeklerde Yapılan Bazı Prevalans Çalışmaları	23
2.5.2.2. Türkiye’de Köpeklerde Yapılan Prevalans Çalışmaları.....	24

2.6. Cryptosporidiosisın Patojenitesi	25
2.7. Cryptosporidiosisın Klinik Bulguları	26
2.8. Cryptosporidiosisde Bağışıklık	27
2.8.1. Hücresel Bağışıklık	27
2.8.2. Humoral Bağışıklık	28
2.9. Cryptosporidiosisın Tanısı.....	28
2.9.1. Mikroskopik Yöntemler.....	29
2.9.1.1. Boyasız İnceleme	29
2.9.1.2. Boyalı İnceleme.....	30
2.9.1.2.1. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama.....	30
2.9.1.2.2. Modifiye Kinyoun Asit Fast Boyama	30
2.9.1.2.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama.....	31
2.9.1.2.4. Karbol Fuksin Boyama.....	31
2.9.1.2.5. Nigrosin Boyama	31
2.9.1.2.6. Malachite Green (Malaşit Yeşili) Boyama	32
2.9.1.2.7. Light Green Boyama	32
2.9.1.2.8. Floresan Boyama.....	32
2.9.1.2.9. İmmunofloresan Boyama.....	32
2.9.1.2.10. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	33
2.9.2. Serolojik Yöntemler	33
2.9.2.1. Antikor Tayini	33
2.9.2.2. Antijen Tayini	33
2.9.3. Moleküler Yöntemler.....	34
2.9.3.1. Klasik PCR.....	35
2.9.3.2. Nested PCR.....	35
2.9.3.3. RFLP-PCR	35
2.9.3.4. Real-time PCR.....	36
2.9.3.5. Multiplex PCR.....	36
2.9.3.6. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	36
2.9.4. Histopatolojik Yöntemler	36
2.9.5. Kültür Yöntemleri	37
2.9.6. Ekstraintestinal Cryptosporidiosis Teşhisi	37
2.10. Cryptosporidiosisın Tedavisi	38

2.11. Cryptosporidiosis'te Korunma ve Kontrol	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Çalışma Alanının Özellikleri.....	43
3.2. Çalışmanın Materyali	43
3.3. Dışkı Numunelerinin Alınması	45
3.4. Hayvanlara Ait Anamnez Bilgileri	46
3.4.1. Çalışmadaki Köpeklerin Yaş ve Cinsiyet Dağılımları.....	46
3.4.2. Çalışmadaki Köpeklerin Irk Dağılımları	47
3.4.3. Dışkı Numunelerinin Toplandığı İlçeler.....	49
3.4.4. Çalışmadaki Köpeklerin Yaşam Koşulları.....	50
3.4.5. Çalışmadaki Köpeklerin İçme Suyu Kaynakları	50
3.4.6. Çalışmadaki Köpeklerin Yiyecek Kaynakları	50
3.4.7. Çalışmadaki Köpeklerin Bağışıklık Sistemleri ile İlgili Bilgiler	51
3.5. Laboratuvar Muayeneleri.....	51
3.5.1. Dışkının Natif ve Flotasyon Yöntemi ile İncelenmesi	52
3.5.2. Kinyoun Asit Fast Boyama Yöntemi	52
3.5.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi	53
3.5.4. Dışkı Numunelerinden DNA İzolasyonu	53
3.5.5. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyonunun Belirlenmesi	56
3.5.6. Nested-PCR Yöntemi.....	57
3.5.7. PCR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi	58
3.6. Sekans Analizi.....	58
3.7. İstatistiksel Analiz	59
3.8. Etik Kurul Bilgileri.....	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. Sahipli köpeklerde tespit edilen protozoon ve helmintler	60
4.2. Sahipsiz köpeklerde tespit edilen protozoon ve helmintler.....	60
4.3. Köpeklerde tespit edilen ikili miks enfeksiyonlar	60
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ.....	85
KAYNAKLAR	87
EKLER.....	96
ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Ernest Edward Tyzzer	4
Şekil 2. 2. <i>Cryptosporidium</i> ookistlerine ait yaşam döngüsü	13
Şekil 3. 1. Hatay il haritası	43
Şekil 3. 2. Dışkı materyali alınan sahipsiz hayvanlardan biri	44
Şekil 3. 3. Dışkı numunesi alınan sahipli hayvanlar.....	45
Şekil 3. 4. Hasta sahibi bilgilendirme ve onam formu	45
Şekil 3. 5. Sahipli köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımları	47
Şekil 3. 6. Sahipsiz köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımları	47
Şekil 3. 7. Dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler (sahipli köpekler)	49
Şekil 3. 8. Dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler (sahipsiz köpekler)	49
Şekil 3. 9. DNA izolasyon kiti.....	55
Şekil 3. 10. a) Nanodrop cihazı, b) PCR cihazı, c) Jel elektroforez cihazı	56
Şekil 4. 1. Erişkin <i>Dipylidium caninum</i> halkaları, orijinal	62
Şekil 4. 2. <i>Cystoisospora canis</i> ookisti, orijinal a) 10X büyütme, sporlanmamış ookist b) 40X büyütme, sporlanmamış ookist c) 40X büyütme, sporlanmış ookist	63
Şekil 4. 3. <i>Toxocara canis</i> yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme	63
Şekil 4. 4. <i>Trichuris vulpis</i> yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme.....	64
Şekil 4. 5. <i>Ancylostoma</i> spp. yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme	64
Şekil 4. 6. Kinyoun asit fast boyama yöntemi sonucu teşhis edilen <i>Cryptosporidium</i> spp. ookisti, orijinal	65
Şekil 4. 7. Safranin metilen mavisi boyama sonucu teşhis edilen <i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri, orijinal	65
Şekil 4. 8. DNA konsantrasyon ve saflık ölçümü yapılan örneklerden biri, orijinal.....	66
Şekil 4. 9. Nested PCR ile pozitif bulunan örneklerin jel görüntüsü, orijinal	67
Şekil 4. 10. Pozitif numunelerin filogenetik ağaç görüntüsü, orijinal.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. <i>Cryptosporidium</i> cinsinin taksonomideki yeri	5
Çizelge 2. 2. <i>Cryptosporidium</i> türleri ve konakları	6
Çizelge 2. 3. Bazı <i>Cryptosporidium</i> türlerinin yerleşim yerleri ve ookist büyüklükleri	9
Çizelge 2. 4. Cryptosporidiosis çalışmalarında kullanılan yöntemler ve havuzlanmış prevalans değerleri.....	22
Çizelge 2. 5. Cryptosporidiosis çalışıldığı coğrafi bölgeler ve havuzlanmış prevalans değerleri	23
Çizelge 2. 6. <i>Cryptosporidium</i> spp. virulans faktörleri ve bunların işlevleri	26
Çizelge 2. 7. Cryptosporidiosis'e karşı etkinliği araştırılmış bitkiler	40
Çizelge 3. 1. Sahipli köpeklerin ırk dağılımları.....	48
Çizelge 3. 2. Sahipsiz köpeklerin ırk dağılımları	48
Çizelge 3. 3. Sahipli hayvanların yaşam koşulları ve sayıca dağılımları	50
Çizelge 3. 4. Sahipli hayvanların içme suyu kaynakları ve oransal dağılımları.....	50
Çizelge 3. 5. Sahipli hayvanların yiyecek kaynakları ve sayıca dağılımları	51
Çizelge 3. 6. Birinci PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı.....	57
Çizelge 3. 7. İkinci PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı.....	57
Çizelge 3. 8. Nested-PCR protokolü	58
Çizelge 4. 1. Köpeklerde tespit edilen protozoon parazitler, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%).....	61
Çizelge 4. 2. Köpeklerde tespit edilen helmintler, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%)	61
Çizelge 4. 3. Köpeklerde tespit edilen ikili miks enfeksiyonlar, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%)	62
Çizelge 4. 4. NCBI genbanktan elde edilen <i>C.canis</i> izolatları ile bu çalışmadaki pozitif numuneler arasındaki benzerlik oranları	69
Çizelge 4. 5. Pozitif numunelerin sahipli/sahipsiz olma durumu, cinsiyet, yaş, ishal varlığı, birlikte seyreden parazit enfeksiyonu, boyama yöntemine göre sonuçları, sekans analiz sonucu.....	70

Çizelge 4. 6. <i>Cryptosporidium</i> enfeksiyonu ile konağa ait faktörler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları	70
Çizelge 4. 7. <i>Cryptosporidium</i> enfeksiyonu ile teşhis metodu ve dışkı numunelerin toplandığı ilçeler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları	71



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat derece

µm : Mikrometre

Cl⁻ : Klor

L : Litre

m : Metre

m³ : Metreküp

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm³ : Milimetreküp

Na⁺ : Sodyum

P : Fosfor

AIDS : Acquired Immune Deficiency Syndrome

bp : Base pair

Caco-2 : İnsan kolon epidermal adenokarsinom hücresi

CDC : Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi

COWP : Cryptosporidium Oocyst Wall Protein

DFA : Direct Fluorescent Antibody

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dNTP : Deoksiribonükleotid

EIA : Enzyme Immunoassay

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FDA : Food and Drug Administration

gp60 : Glycoprotein gene 60

HCl : Hidroklorik asit

HCT-8 : İnsan iliosekal karsinoma hücre kültürü

HIV : Human Immunodeficiency Virus

hsp 70	: Heat Shock Protein 70
IFA	: Immunofluorescence Assay
IFN- γ	: Interferon gamma
IgA	: Immunoglobulin-A
IgE	: Immunoglobulin-E
IgG	: Immunoglobulin-G
IgM	: Immunoglobulin-M
IIF	: Indirect Immunofluorescence
ITS-1	: Internal Transcribed Spacer 1
ITS-2	: Internal Transcribed Spacer 2
LAMP	: Loop-Mediated Isothermal Amplification
MDBK	: Madin Darby Bovine Kidney
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of Hydrogen
pmol	: Pikomol
ppm	: Parts Per Million
RFLP	: Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
SSU rRNA	: Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TRAP-C1	: Thrombospondin-Related Adhesive Protein of Cryptosporidium 1
TRAP-C2	: Thrombospondin-Related Adhesive Protein of Cryptosporidium 2
TVT	: Transmissible Venereal Tumor
UV	: Ultra Viole Işık

ÖZET

Hatay Yöresi Köpeklerinde *Cryptosporidium* spp. Yaygınlığının Mikroskobik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Cryptosporidiosis, zorunlu hücre içi ekstrasitoplazmik bir protozoon olan *Cryptosporidium* türleri tarafından oluşturulan zoonoz nitelikte bir hastalıktır. İnsan ya da hayvan dışkılarında bulunan parazit ookistlerinin fekal-oral yolla alınması sonucu enfeksiyon şekillenir. Günümüzde köpekler aile fertlerinden biri haline gelmiştir. Dolayısıyla insan-köpek yakınlaşması ile köpeklerdeki bazı hastalıkların insanlara geçmesi riski doğmuştur. Bu tez çalışmasında Türkiye’de Hatay ilindeki köpeklerden elde edilen dışkı numunelerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığı ve yaygınlığını Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemleri ile nested PCR yöntemi kullanılarak araştırılması, tanı yöntemlerinin birbiri ile kıyaslanması, parazitin yaygınlığı ve baskın olarak görülen türün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; 125 adet sahipli, 125 adet de sahipsiz olmak üzere toplamda 250 adet köpeğe ait dışkı numunesi kullanıldı. Çalışmaya ait materyaller Ocak 2022-Ocak 2023 döneminde toplandı. Tüm dışkı numuneleri natif ve flotasyon yöntemi kullanılarak herhangi bir parazit varlığı açısından değerlendirildikten sonra Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi yöntemi ile boyanarak *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelendi. Ardından DNA izolasyonu ve nested PCR işlemi uygulandı. Reaksiyon sonunda pozitif çıkan numuneler sekans analizine gönderildi.

Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemleri sonucunda her ikisinde de aynı numaralı örnek olmak üzere %0.4 (1/250) oranında pozitiflik saptandı. Nested PCR sonrası sahipli hayvanlarda %0.8 (1/125) ve sahipsiz hayvanlarda %1.6 (2/125) toplamda ise %1.2 (3/250) oranında *Cryptosporidium* spp. ookisti tespit edildi. Sekans analizinde her üç numune de *Cryptosporidium canis* olarak belirlendi.

Sonuç olarak Hatay ilinde köpeklerde *Cryptosporidium* spp. varlığı ilk kez araştırılmıştır. Türkiye’de ise köpeklerde *Cryptosporidium canis* ilk kez sekans analizi ile doğrulanarak rapor edilmiştir. Köpeklerde bu parazitin varlığının saptanması daha ileri teşhis, tedavi ve kontrol çalışmalarının yapılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Köpek, *Cryptosporidium canis*, Nested PCR, Hatay, Türkiye

ABSTRACT

Investigation of The Prevalence of *Cryptosporidium* Spp. in Dogs in The Hatay Region Using Microscopic and Molecular Methods

Cryptosporidiosis is a zoonotic disease caused by species of *Cryptosporidium* spp., an obligate intracellular extracytoplasmic protozoan. The infection occurs through ingesting of parasite oocysts present in the faeces of humans or animals via the faecal-oral route. Today, dogs have become integral members of many families. Consequently, the close relationship between humans and dogs has increased the risk of transmission of certain diseases from dogs to humans. This thesis aims to investigate the presence and prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in faecal samples in dogs in the Hatay province in Türkiye using Kinyoun acid fast and safranin-methylene blue staining methods and the nested PCR technique. In addition, the study aims to compare these diagnostic methods, evaluate the prevalence of the parasite, and identify the predominant species.

In this study, faecal samples from 250 dogs were used, including 125 owned dogs and 125 stray dogs. The material for this study was collected between January 2022 and January 2023. After evaluating all faecal samples for the presence of any parasites using native and flotation methods, the samples were stained using the Kinyoun acid fast and safranin-methylene blue methods to examine them for *Cryptosporidium* spp. oocysts. DNA isolation and nested PCR were then performed. Positive samples were then sent for sequence analysis.

As a result of the Kinyoun acid fast and safranin-methylene blue staining methods, a positivity rate of 0.4% (1/250) was detected, with the same sample being positive in both staining methods. After nested PCR, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected at a rate of 0.8% (1/125) in owned dogs, 1.6% (2/125) in stray dogs, and 1.2% (3/250) overall. Sequence analysis identified all three samples as *Cryptosporidium canis*.

In conclusion, the presence of *Cryptosporidium* spp. in dogs has been investigated for the first time in the Hatay province. Furthermore, *Cryptosporidium canis* in dogs has been confirmed and reported for the first time in Türkiye, through sequence analysis. The detection of this parasite in dogs highlights the need for further diagnostic, treatment, and control efforts.

Keywords: Dog, *Cryptosporidium canis*, Nested PCR, Hatay, Türkiye

1. GİRİŞ

Paraziter hastalıklar özellikle gelişmekte olan ülkelerde yüksek oranda morbidite ve mortalite ile seyrederler. Geniş konak yelpazesine sahip parazit protozoonlardan olan *Cryptosporidium*, ABD Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (CDC)'nin verilerine göre B kategorisinde biyoterörizm ajanı olarak verilen tek parazittir.

Cryptosporidium spp. zorunlu, hücre içi ve ekstrasitoplazmik bir protozoondur. Parazit bağırsak mikrovilluslarına yerleşip enfeksiyona neden olan enterik bir patojen olmasına rağmen kanatlılarda ayrıca solunum sistemine, bursa fabriciuslarına ve trakea epitellerine, insanların solunum sistemlerine ve maymunların safra keseleri ile pankreaslarına da yerleşebilir (Fayer 2007, Sevinç ve Dik 2015).

Cryptosporidium soyuna ait tür sayısı moleküler çalışmaların ilerlemesi ile birlikte her geçen gün artmaktadır. Güncel raporlara göre geçerli olan en az 45 *Cryptosporidium* türü ve 120'den fazla genotipi mevcuttur (Ryan ve ark. 2021a, 2021b, Huang ve ark. 2023).

İnsan ve hayvan dışkılarında bulunan *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin genelde (bazen inhalasyon yolu) fekal-oral yolla alınması ile bulaşma olur. Ookistler dış ortama atılmalarından itibaren enfektif özelliktedir ve birçok dezenfaktana dirençlidir (Casemore 1991). Ookistler yaklaşık 3x7 µm çapında yuvarlağa yakın ovaldir. Kalın ve ince cidarlı olmak üzere iki çeşittir. Kalın cidarlı olanları sindirim kanalını geçer, dışkıyla dış ortama atılır ve konak tarafından alınır. İnce cidarlı olanları ise konağın sindirim sisteminde açılarak otoenfeksiyona neden olabilir (Öner 2019). *Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu cryptosporidiosis, hayvanlarda özellikle yenidoğan döneminde yüksek morbidite ve mortalite ile seyreder. İnsanlarda ise hayvancılıkla uğraşanlarda, gençlerde ve bağışıklık sistemi zayıf olanlarda sıklıkla rastlanır. Cryptosporidiosis klinik semptomlar insanlarda ve diğer hayvan türlerinde benzerdir, etkenin virulansına, konağın yaşına, direncine ve etkenin yerleşim yerine göre farklılıklar gösterebilir. Örneğin *Cryptosporidium* (*C.*) *baileyi* kanatlılarda solunum sistemi ile ilgili klinik belirtiler oluşturabilir (Öner 2019). Ancak cryptosporidiosis genel olarak fazla miktarda ookist atılımıyla seyreden şiddetli sulu ishal görülür (Dubey ve ark. 1990). Enfeksiyonun klinik bulgusu diğer gastroenteritis etkenlerinin oluşturduğu hastalık tablosu ile benzerlik gösterdiği için tanıda yetersiz kalır. Bunun için etkenin teşhisinde dışkı numunesinin çeşitli boyalarla boyanması, serolojik olarak test

edilmesi gibi klasik tanı yöntemleri kullanılır. Bu yöntemler ne kadar güvenilir olsa da günümüzde duyarlılığı daha yüksek olan moleküler yöntemler ön plana çıkmıştır. Tedavide sıvı-elektrolit uygulamaları yapılsa da enfeksiyonun kanıtlanmış etkili bir tedavisi yoktur (Lucio-Forster ve ark. 2010). Bu sebeple korunmada, temizlik ve hijyen şartlarına dikkat etmek gerekir.

Köpeklerde cryptosporidiosisden ilk bahsedenler Tzipori ve Campbell olmuştur. Bu araştırmacılar 1981 yılında köpek serumlarında *Cryptosporidium* antikorlarını tespit etmişlerdir (Tzipori ve Campbell 1981). İki yıl sonrasında, akut diyareli bir haftalık yavru köpekte ilk klinik cryptosporidiosis vakası tanımlanmıştır (Wilson ve ark. 1983). Köpekler yaygın olarak *C. canis* ile enfekte olsa da *C. parvum* ile enfekte oldukları da bildirilmiştir (Lucio-Forster ve ark. 2010).

Günümüzde köpekler aile fertlerinden biri haline gelmiştir. Dolayısıyla insan-köpek yaklaşması ile köpeklerdeki bazı hastalıkların insanlara bulaşma riski doğmuştur. Cryptosporidiosis immunsupresif kişiler için hayatı tehlikeye atabilecek en yaygın fırsatçı hastalıklardan biridir. Dünya çapında beş yaşın altındaki çocuklarda ishale bağlı ölümlerin ilk ikisi *Rotavirüs* ve *Shigella*'dan kaynaklanırken, üçüncü sırada ise *Cryptosporidium* yer almaktadır (Taghipour ve ark. 2020). İnsanlardaki cryptosporidiosis vakalarının çoğu *C. parvum* ve *C. hominis* tarafından oluşturulurken bazen *C. canis* tarafından da oluşturulabilmektedir (Xiao ve ark. 2007). *Cryptosporidium canis* ile enfekte köpekler genellikle klinik semptom göstermezler ve ookist saçılımına devam ederler (Scorza ve Tangtronsup 2010). Bu yüzden bir an önce tanı konup rezervuar köpeklerin tespit edilerek uygun korunma yöntemleri ile ookist saçmalarının önüne geçilmesi gerekir.

Bu tez çalışmasında Hatay yöresindeki köpeklerden elde edilen dışkı numunelerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin varlığı ve yaygınlığını Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemleri ile nested PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılarak araştırılması, tanı yöntemlerinin birbiri ile kıyaslanması, parazitin yaygınlığı ve baskın olarak görülen türün belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Cryptosporidium cinsi ilk kez Ernest Edward Tyzzer (Şekil 2. 1) (Fayer 2007) tarafından 1907 yılında tanımlanmıştır (Tyzzer 1907). Araştırmacının diğer coccidian parazitlerin aksine sporozoitleri çevreleyen bir sporokist bulunmayışından dolayı gizli sporokistler (hidden sporocysts) anlamına gelen *Cryptosporidium* ismini verdiği ifade edilmiştir (Çınar 2023). Aslında, J. Jackson Clark'ın 1895 yılında "fare mide epiteli üzerinde yer alan spor kümeleri" diye bahsettiği ve *Coccidium falciforme* diye isimlendirdiği ancak Clark'ın yanlışlığı ve bu canlının Clark'ın sandığının aksine Tyzzer'ın bahsettiği organizma ile aynı olduğu bildirilmiştir (Tyzzer 1910). Tyzzer (1910) laboratuvar farelerinin mide bez epitelinde tespit ettiği bu türe *C. muris* ismini vermiştir. Ardından 1912 yılında laboratuvar farelerinin ince bağırsağında, *C. muris*'ten daha küçük olan yeni bir türü keşfedip, *C. parvum* olarak adlandırmıştır (Tyzzer 1912). Tyzzer (1910) çalışmaları sırasında bu parazitin ekstraselüler olarak yerleştiğini, aseksüel ve seksüel olarak çoğaldığını, ookistlerin dışkı yoluyla dışarı atıldığını gözlemleyip ifade etmiştir. Daha sonra Slavin, 1955 yılında hindilerde görülen ishal ve ölümleri *Cryptosporidium* spp. ile bağdaştırıp yeni keşfettiği bu türü *C. meleagridis* olarak tanımlamıştır (Slavin 1955). Sığırlarda görülen ishallerin nedenlerinden birinin bu parazit olduğu 1971 yılında keşfedilmiştir (Panciera ve ark. 1971). İnsanlarda *Cryptosporidium*'a ilk kez 1976 yılında üç yaşında bir kızda ve 39 yaşında immunsuprese bir erkekte rastlanmıştır (Meisel ve ark. 1976, Nime ve ark. 1976). Daha sonra 1979 yılında biri dokuz, diğeri 52 yaşında iki insanda daha bu parazit tespit edilmiştir (Lasser ve ark. 1979, Weisburger ve ark. 1979). Bu dört insan vakasından sonra takip eden yıllarda, inekler, koyunlar, domuzlar, atlar, hindiler, tavşanlar, maymunlar, yılanlar ve gine domuzlarından cryptosporidiosis tespit edilen 40'a yakın yayın yapıldığı bildirilmiştir (Fayer 2007).



Şekil 2. 1. Ernest Edward Tyzzer

2.2. *Cryptosporidium*'un Sınıflandırması

Cryptosporidium cinsine ait tüm türler ökaryotik canlılar olup zorunlu hücre içi parazitlerdir. Omurgalıların mide-bağırsak sisteminde yaşarlar. Tüm gelişim evreleri tek bir konakta geçer (Fayer 2007).

Cryptosporidium'un sınıflandırılması Çizelge 2. 1' de (Yılmaz 2015) ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 2. 1. *Cryptosporidium* cinsinin taksonomideki yeri

Sınıflandırma	İsim	Biyolojik Özellikleri
Alem	Animalia	
Şube	Protista	Tek hücreli, ökaryotik canlıdır.
Alt Şube	Apicomplexa	Mikrotübüllerden oluşan apikal kompleks yapıları mevcuttur, veziküler bir çekirdeğe sahiptir, tüm türleri parazittir.
Sınıf	Sporozoa	Ookist oluşumu, seksüel ve aseksüel üreme evreleri, kayma kontraksiyon hareketi vardır.
Alt Sınıf	Coccidia	Yaşam döngüleri merogoni, gametogoni ve sporogoni şeklindedir. Seksüel aşama hücre içinde gerçekleşir.
Takım	Eucoccidia	Merogoni aşaması omurgalı konakta gerçekleşir.
Alt Takım	Eimeriina	Makro ve mikrogamet oluşumu farklıdır. Mikrogamonttan çok sayıda mikrogamet oluşurken, her bir makrogamonttan sadece bir makrogamet meydana gelir. Zigot hareketsizdir.
Aile	Cryptosporidiidae	Monoksen gelişim vardır. Konak süreci hücrenin yüzey membranı altında gerçekleşir. Ookistleri sporokist içermez. Mikrogametleri flagellasızdır.
Cins	<i>Cryptosporidium</i>	

Güncel raporlara göre geçerli olan en az 45 *Cryptosporidium* türü ve 120’den fazla genotipi mevcuttur. Bu türlerden altısı kuşlarda, dördü balıklarda, dördü sürüngenlerde, biri amfibilerde ve 30’u memelilerde bulunur. İnsanlardan 20 *Cryptosporidium* türü bildirilmiştir. İnsan vakalarının %95’ini *C. hominis* ve *C. parvum* oluşturmaktadır bununla beraber *C. meleagridis*, *C. canis* ve *C. felis* de rapor edilen türler arasındadır (Ryan ve ark. 2021a, 2021b, Huang ve ark. 2023).

Tanımlanan *Cryptosporidium* türlerine ait detaylı bilgiler Çizelge 2. 2’ de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. *Cryptosporidium* türleri ve konakları

	Geçerli olan tür ismi	Önceki ya da sinonim ismi	Başlıca konak/konakları	Türün tanımlandığı referans
1	<i>C. equi</i> *	<i>C. horse</i> genotype	At	Huang ve ark. 2023
2	<i>C. myocastoris</i>	Coypu genotype	Su maymunu	Ježková ve ark. 2021a
3	<i>C. abrahamseni</i>	Piscine genotype 7	Kırmızı göz tetra	Zahedi ve ark. 2021
4	<i>C. rattii</i>	Rat genotype 1	Kahverengi rat	Ježková ve ark. 2021b
5	<i>C. bollandi</i>	Piscine genotype II	Tatlı su balıkları	Bolland ve ark. 2020
6	<i>C. ornithophilus</i>	Avian genotype II	Deve kuşu	Holubová ve ark. 2020
7	<i>C. proventriculi</i>	Avian genotype III	Kuşlar, özellikle papağanlar	Holubová ve ark., 2019
8	<i>C. microti</i>	-	Tarla faresi	Horčíčková ve ark. 2019
9	<i>C. alticolis</i>	-	Tarla faresi	Horčíčková ve ark. 2019
10	<i>C. occultus</i> *	<i>C. suis</i> like genotype <i>C. parvum</i> VF383	Kemirgenler	Kváč ve ark. 2018
11	<i>C. apodemi</i>	-	Kemirgenler Genellikle fareler	Čondlová ve ark., 2018
12	<i>C. ditrichi</i> *	-	Kemirgenler Genellikle fareler	Čondlová ve ark. 2018
13	<i>C. homai</i>	-	Kobay: Gine domuzu	Zahedi ve ark. 2017
14	<i>C. testudinis</i>	Tortoise genotype I	Kaplumbağa	Ježková ve ark. 2016
15	<i>C. ducismarci</i>	Tortoise genotype II	Kaplumbağa	Traversa 2010 Ježková ve ark. 2016
16	<i>C. avium</i>	Avian genotype V	Muhabbet kuşu Tavuk	Holubová ve ark. 2016
17	<i>C. proliferans</i>	<i>C. muris</i> strain TS03	Kemirgenler	Kváč ve ark. 2016
18	<i>C. rubeyi</i>	Genotype Sbey03c	Yer sincabı	Li ve ark. 2015a
19	<i>C. huwi</i>	Piscine genotype I	Lepistes	Ryan ve ark. 2015
20	<i>C. erinacei</i> *	Hedgehog genotype	Kirpi Nadiren at	Kváč ve ark. 2014
21	<i>C. scrofarum</i> *	Pig genotype II	Domuz	Kváč ve ark. 2013
22	<i>C. viatorum</i> *	-	İnsan	Elwin ve ark. 2012
23	<i>C. tyzzeri</i> *	Mouse genotype I	Fare	Ren ve ark. 2012

Çizelge 2. 2. Devam *Cryptosporidium* türleri ve konakları

24	<i>C. ubiquitum</i> *	Cervine genotype	Ruminantlar Kemirgenler Primatlar	Fayer ve ark. 2010
25	<i>C. cuniculus</i> *	Rabbit genotype	Tavşan	Inman ve Takeuchi 1979 Robinson ve ark. 2010
26	<i>C. xiaoi</i> *	C. bovis like genotype	Koyun	Fayer ve Santin 2009
27	<i>C. fayeri</i> *	Marsupial genotype I	Kızıl kanguru	Ryan ve ark. 2008
28	<i>C. macropodum</i>	Marsupial genotype II	Kanguru	Power ve Ryan 2008
29	<i>C. fragile</i>	-	Asya kara kurbağası	Jirku ve ark. 2008
30	<i>C. ryanae</i>	Deer like genotype	Sığır	Fayer ve ark. 2008
31	<i>C. bovis</i> *	Bovine B genotype	Sığır	Fayer ve ark. 2005
32	<i>C. suis</i> *	Pig genotype I	Domuz	Ryan ve ark. 2004
33	<i>C. galli</i>	Finch genotype I	Kuşlar	Pavlašek 1999 Ryan ve ark. 2003
34	<i>C. molnari</i>	-	Yaldızlı çipura Avrupa levreği	Alvarez-Pellitero ve Sitjà- Bobadilla 2002
35	<i>C. hominis</i> **	Genotype 1/human genotype	İnsan	Ryan ve ark. 2002
36	<i>C. canis</i> **	Canine genotype	Köpek	Fayer ve ark. 2001
37	<i>C. andersoni</i> *	C. muris like genotype	Sığır	Lindsay ve ark. 2000
38	<i>C. varanii</i>	<i>C. saurophilum</i>	Kertenkele	Pavlašek ve ark. 1995
39	<i>C. baileyi</i>	-	Tavuk	Current ve ark. 1986
40	<i>C. serpentis</i>	-	Yılan	Levine 1980
41	<i>C. felis</i> **	-	Kedi	Iseki 1979
42	<i>C. wairi</i>	-	Kobay: Gine domuzu	Vetterling ve ark. 1971
43	<i>C. meleagridis</i> **	-	Hindi	Slavin 1955
44	<i>C. parvum</i> **	-	Ruminantlar İnsanlar	Tyzzer 1912
45	<i>C. muris</i> *	-	Fare	Tyzzer 1910 Tyzzer 1907

*İnsanlardan rapor edilen/bildirilen türler, **İnsanlarda en çok görülen türler

2.3. *Cryptosporidium*'un Morfolojisi

Cryptosporidium spp. hücre içine yerleşir. Ancak diğer hücre içi parazitlerden farklı olarak ekstrasitoplazmik olarak konumlanır. *Cryptosporidium*'un yerleştiği konak hücre kökenli olarak meydana gelen, parazitin yerleştiği alana parazitofor vakuol denir (Yılmaz 2015). Bu parazitofor vakuol içinde bulunan *Cryptosporidium* spp. ookisti yuvarlağa yakın oval şekildedir. Büyüklükleri türlere göre değişmekle birlikte 3.2 µm ile 8.3 µm arasında seyreder (Çizelge 2. 3) (Plutzer ve Karanis 2009, Cui ve ark. 2018, Huang ve ark. 2023). Ookistler kalın ve ince cidarlı olarak ikiye ayrılır. Ookistlerin %80'i kalın cidarlı, %20'si ise ince cidarlı olarak şekillenir (Current ve Navin 1986). Kalın cidarlı olanlar sindirim sistemini geçerek dışkıyla dış ortama atılır. İnce cidarlı olanlar ise sindirim sisteminde açılarak otoenfeksiyona neden olabilirler (Barlık 2023). Ookist içinde dört adet enfektif sporozoit bulunur. Sporozoitler yaklaşık 5x1 µm boyutunda virgül şeklinde yapılardır ve apikal oluşumları sayesinde konağa tutunmayı sağlarlar. Sporozoitlerden sonra oluşan trofozoitler yuvarlak-oval şekilli olup 2x2.5 µm boyutundadır. Trofozoitler bir geçiş aşaması olup bir diğer gelişim şekli ise merozoitlerdir. Bunlar yuvarlak ya da yarım ay şeklinde olup 1x5 µm büyüklüğündedir (Öner 2019). Merozoitler morfolojik olarak iki tip (I, II) şeklinde sınıflandırılır ve bazı küçük farklılıkları vardır. Tip I merozoitler daha hareketli, dairesel veya yuvarlak şekilli iken, tip II merozoitlerin çoğu iğ şeklinde ve sivri uçlu aynı zamanda daha az aktiftir (Hijjawi ve ark. 2004). Tip II merozoitler farklılaşarak mikrogamont (mikrogametosit) ve makrogamontları (makrogametosit) oluşturur. Mikrogamontlar 4x5 µm olup, bunlardan her biri yaklaşık 0.4x1 µm ölçülerinde 16 adet mikrogamet (erkek) oluşur (Current ve Navin 1986, Fayer 2007) ve çivi şeklinde görünürler. Makrogamontlardan oluşan bir adet makrogamet (dişi) yuvarlak şekilli ve yaklaşık 4.5 µm boyutundadır (Öner 2019).

Çizelge 2. 3. Bazı *Cryptosporidium* türlerinin yerleşim yerleri ve ookist büyüklükleri

Tür	Enfeksiyonun öncelikli yerleşim yeri	Ortalama ookist büyüklüğü (µm)	Ookist ölçülerinin seyrettiği aralık (µm)
<i>C. andersoni</i>	Abomasum	7.4 x 5.5	(6.0-8.1) x (5.0-6.5)
<i>C. baileyi</i>	Kloaka, Bursa fabricius, Trakea	4.8 x 6.4	(4.8-5.7) x (5.6-7.5)
<i>C. bovis</i>	İnce bağırsak	4.9 x 4.6	(4.8-5.3) x (4.2-4.8)
<i>C. canis</i>	İnce bağırsak	4.9 x 4.7	(4.2-5.2) x (4.2-5.3)
<i>C. equi</i>	İnce bağırsak	5.1 x 4.5	(4.8-5.5) x (4.2-4.7)
<i>C. fayeri</i>	İnce bağırsak	4.9 x 4.3	(4.5-5.1) x (3.8-5.0)
<i>C. felis</i>	İnce bağırsak	4.5 x 5	(4.5-5.0) x (5.0-6.0)
<i>C. fragile</i>	Mide	6.2 x 5.5	(5.5-7.0) x (5.0-6.5)
<i>C. galli</i>	Proventrikulus	8.2 x 6.3	(8.0-8.5) x (6.2-6.4)
<i>C. hominis</i>	İnce bağırsak	4.8 x 5.2	(6.4-5.4) x (4.4-5.9)
<i>C. macropodum</i>	İnce bağırsak	4.9 x 5.4	(4.5-6.0) x (5.0-6.0)
<i>C. meleagridis</i>	İnce bağırsak	5.0 x 4.4	(4.5-6.0) x (4.2-5.3)
<i>C. molnari</i>	Mide ve İnce bağırsak	4.7 x 4.5	(3.2-5.4) x (3.0-5.0)
<i>C. muris</i>	Mide	6.1 x 8.4	(5.6-6.4) x (8.0-9.0)
<i>C. parvum</i>	İnce bağırsak	4.9 x 4.4	(4.5-5.4) x (4.2-5.2)
<i>C. ryanae</i>	İnce bağırsak	3.2 x 3.7	(2.9-4.4) x (2.9-3.7)
<i>C. serpentis</i>	Mide	6.2 x 5.3	(5.6-6.6) x (4.8-5.6)
<i>C. suis</i>	İnce ve kalın bağırsak	4.6 x 4.2	(4.9-4.4) x (4.0-4.3)
<i>C. varanii</i>	Mide ve İnce bağırsak	4.7 x 5	(4.2-5.2) x (4.4-5.6)
<i>C. wrairi</i>	İnce bağırsak	4.6 x 5.4	(4.0-5.0) x (4.8-5.6)

2.4. *Cryptosporidium*'un Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium türleri birbirini takip eden eşeysiz ve eşeyli çoğalma döngüleri ile biyolojisini devam ettirir. Monoksen gelişim gösterdikleri için yaşam döngülerinde herhangi bir ara konak yoktur (Yılmaz 2015).

Parazitin yaşam döngüsü enfektif formdaki kalın duvarlı ookistlerin genellikle fekal oral yolla vücuda alınması sonucunda başlar (Barlık 2023). Enfektif ookistlerin kaynakları enfekte hayvan ve kişiler ile bunların dışkısı ile bulaş olan gıda ve sulardır (Aynur 2020).

Cryptosporidium ookistlerinin yaşam döngüsü ve gelişim evreleri altı aşamadan oluşur bunlar sırasıyla;

- Ekskistasyon (ookistin açılması) dönemi
- Merogoni (eşeysiz çoğalma) dönemi
- Gametogoni (eşeyli çoğalma) dönemi
- Fertilizasyon (dölleme) dönemi
- Ookist (ookist oluşumu) dönemi
- Sporogoni dönemi

2.4.1. Ekskistasyon (Ookistin Açılması) Dönemi

Ookistler genel olarak oral yolla vücuda alınsa da bazen konjunktival yolla ya da inhalasyon yoluyla da alınabilirler (Fayer 2007). Konak tarafından ağız yoluyla alınan ookistler ince bağırsaklarda pH ve safra tuzlarının etkisi ile parçalanırlar, buna ekskistasyon denir. Ookistlerin açılabilmesi ve ookistlerden çıkan sporozoitlerin etkin olabilmesi için en uygun pH aralığının 6.8-7.4 olduğu ifade edilmektedir (Starling ve Arrowood 1993). Sıcaklık ve pH ookist açılımı için yeterlidir ancak karbondioksit, pankreatik enzimler ve safra tuzları da ookist parçalanmasında rol oynarlar (O'Hara ve Chen 2011). Bazen özel şartlar olmaksızın sadece ılık mukozal sıvıda da ookistler açılabilir. Böylelikle konjunktiva, solunum sistemi, vajina, uterus, ovaryum, testisler, lenf nodülleri, safra kesesi gibi ekstraintestinal yerlerde de enfeksiyon oluşabilir (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2007, Öner 2019).

Ookistler diğer koksidian parazitler gibi sporokist içermezler, içinde sadece dört adet sporozoit bulunur. Ookistin açılması ile serbest kalan sporozoitler bağırsak lümenine geçiş yapar. Ardından konağın epitel hücrelerine tutunarak *Cryptosporidium* türlerine özgü bir yerleşim yeri olan hücre içine ancak ekstrasitoplasmik bölgeye parazitofor vakuol oluşturarak yerleşir. Bu parazitofor vakuol, sporozoitlerin beslenmesine yardımcı olur (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2007).

2.4.2. Merogoni (Eşeyssiz Çoğalma) Dönemi

Virgül ya da iğ şeklinde olan sporozoitler parazitofor vakuol içinde, tek çekirdekli yuvarlak trofozoitlere dönüşürler. Trofozoitler eşeyssiz olarak çoğalıp (merogoni=şizogoni) tip I merontları oluştururlar. Tip I merontlar (şizont) altı-sekiz çekirdekli yapılardır. Her bir çekirdek, meront duvarı ile dışa doğru evagine olur (Dubey ve ark. 1990). Böylece tip I merontlardan altı-sekiz adet merozoit oluşur. Oluşan merozoitler bağırsak lümenine dökülürler. Bu merozoitlerin her biri birer epitel hücrelerine girerek yeniden eşeyssiz çoğalırlar. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış canlılarda meydana gelen persistent enfeksiyonların sebebinin tip I merontların sürekli olarak tekrarlanması kaynaklandığı ifade edilmektedir (Starling ve Arrowood 1993, Barlık 2023). Bu eşeyssiz çoğalma sonucunda merozoitlerin bazılarında yeniden tip I merontlar oluşurken, bazılarında tip II merontlar oluşur. Tip I merontların aksine, tip II merontlardan sadece dört adet merozoit oluşur (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2007, O'hara ve Chen 2011).

2.4.3. Gametogoni (Eşeyli Çoğalma) Dönemi

Tip II merontlardan meydana gelen merozoitler yeni bir eşeyssiz çoğalmayı başlatmazlar, bunun yerine eşeyli çoğalma dönemine geçip makrogamont (dişi) ve mikrogamontlara (erkek) dönüşürler (Thompson ve ark. 2005, Fayer 2007, O'hara ve Chen 2011). Her bir mikrogamonttan 16 kamçısız mikrogamet, her bir makrogamonttan bir adet makrogamet meydana gelir (Current ve Navin 1986, Çınar 2023).

2.4.4. Fertilizasyon (Dölleme) Dönemi

Mikrogamet in makrogameti döllemesi sonucunda diploid kromozomlu zigot oluşur. Bu evreye fertilizasyon denir (Thompson ve ark. 2005).

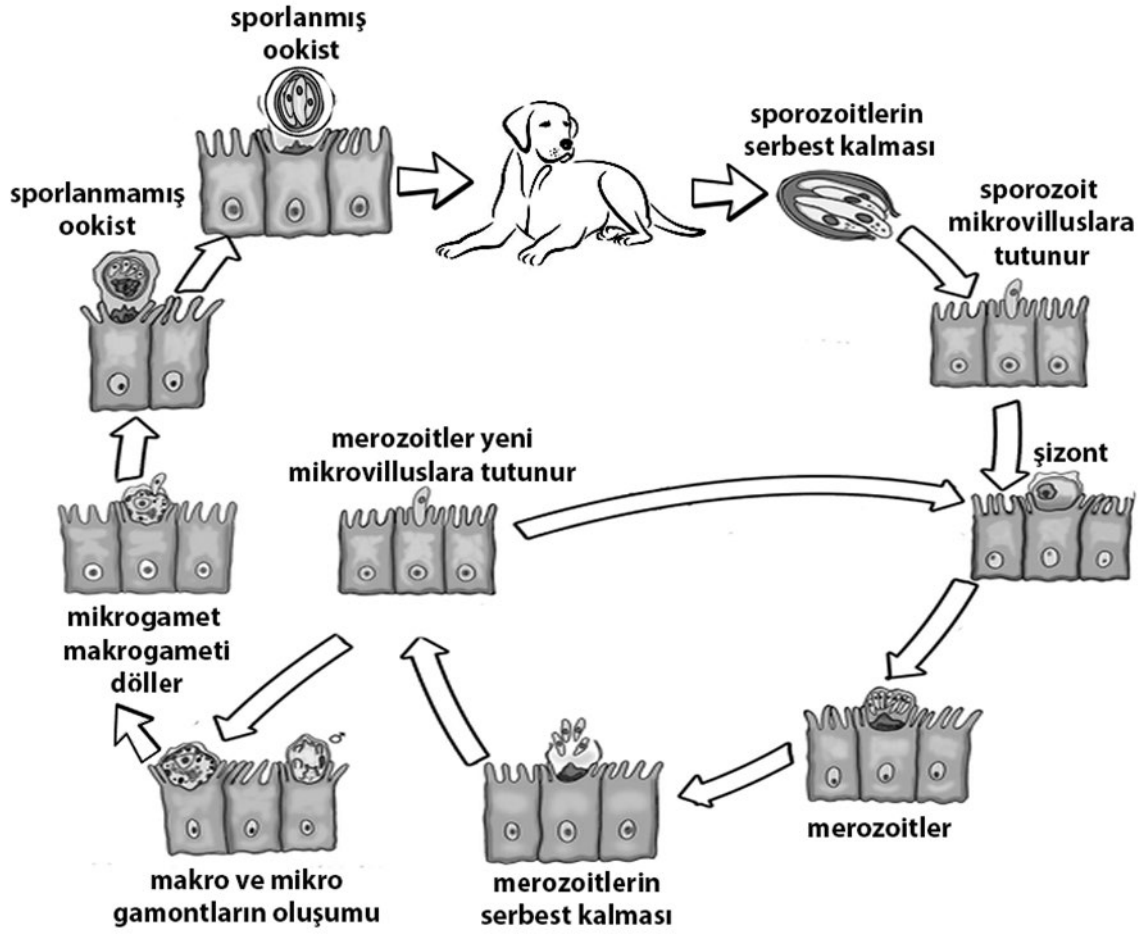
2.4.5. Ookist (Ookist Oluşumu) Dönemi

Bu dönemde döllemiş makrogametten zigot duvarının kalınlaşması ile olgunlaşmamış ookist oluşur. Meydana gelen bu ookist duvarı iki ya da üç katmanlıdır. Duvarın dış tabakası asidik özellikteki glikoprotein filamentleri ile çevrilidir. Orta kısımda mikobakteriyel lipidler ve sert muhteviyatta bal mumu benzeri karmaşık bir lipid tabakası vardır. İç tabaka ise glikoprotein yapıdadır. Bu kompleks yapı sayesinde *Cryptosporidium* ookistleri fiziksel ve kimyasal etkilere karşı dayanıklıdır. Bunun dışında duvarın kalın bir lipid tabakası içermesi sebebiyle karbol fuksin boyama aşamalarından biri olan asit-alkol

dekolarizasyon kısmında ookist aldığı boyayı geri bırakmamakta yani bu işlemten etkilenmemektedir (Yılmaz 2015).

2.4.6. Sporogoni Dönemi

Henüz olgunlaşmamış ookistler sporlanma sonucunda olgunlaşır ve içinde dört adet sporozoit oluşur. Diğer koksidiyan parazitlerin aksine sporlanma konak vücudunda gerçekleşir bundan dolayı sporlanmış ookistler dışkı ile dışarı atılır atılmaz dış çevre için, aynı zamanda da vücut içinde ookistin parçalanması durumlarında, içinde bulunduğu konak için, enfektiftir. Sindirim sistemindeki ookistler dışkı ile dışarı atılırken, solunum sistemindeki ookistler solunum ve nazal akıntılar (burun salgıları, balgam) ile konağı terk ederler. Ookistler duyarlı başka konak tarafından fekal-oral ya da solunum yoluyla alındığında döngü tamamlanır (Fayer 2007, O'Hara ve Chen 2011, Barlık 2023, Çınar 2023). *Cryptosporidium* ookistlerine ait yaşam döngüsü Şekil 2. 2' de (URL-1, modifiye edilerek alınmıştır) verilmiştir.



Şekil 2. 2. *Cryptosporidium* ookistlerine ait yaşam döngüsü

2.5. *Cryptosporidium*'un Epidemiyolojisi

Cryptosporidium türlerinin epidemiyolojisini etkileyen önemli faktörler arasında, ookistlerin aside, klor, fiziksel ve kimyasal ajanlara oldukça dayanıklı olmaları, küçük boyutta olmaları, düşük enfektif doza sahip olmaları, konak vücudunda sporlanmaları ve dışkı ile atıldığı an enfektif olmaları ile zoonotik (*C. parvum*) potansiyelleri sayılabilmektedir (Dillingham ve ark. 2002).

Cryptosporidium ookistleri bazı kimyasal ve fiziksel şartlara ancak uzun süre maruz bırakıldıkları zaman etkisiz kalırlar. Örneğin sıcaklık çok yükselmediği ya da düşmediği

sürece ookistler enfektif özelliğini uzun süre koruyabilmektedir. Farelerde' yürütülen bir çalışmada 20 °C'de tutulan ookistlerin altı ay boyunca enfektif özelliğini kaybetmediği belirtilmiştir (Fayer ve ark. 1998). Yine 5 °C'de 168 saat tutulan ookistlerin fareler üzerindeki enfektivitesini kaybetmediği ancak -20 °C'de 24 saat, -70 °C'de ise bir saatte tamamen inaktif oldukları ifade edilmiştir (Peng ve ark. 2008). Dondurma işlemi ister aşamalı ister ani bir şekilde yapılsın ya da ookist solüsyonu bazı kriyoprotektanlar içersin yine de *Cryptosporidium* ookistlerine fiziksel hasar verdiği için öldürücü etkiye sahiptir (Fayer ve ark. 2000, Peng ve ark. 2008). Kurutma işlemi ise çok kısa sürelerde ookistler üzerine etkili ve öldürücüdür. Kurutma işlemine iki saat maruz kaldıktan sonra ookistlerin sadece %30'unun canlı kalabildiği, dört saat sonra ise bütün ookistlerin öldüğü ifade edilmiştir (Fayer ve ark. 2000). Kimyasal ajan olarak kullanılan %10'luk formaldehitte 30 dk'da, ozonlama işleminde ise 1 ppm'de 10 dk'da inaktif olurlar. Ozonun diğer dezenfektanlara nazaran daha etkili olduğu bildirilmiştir (Fayer ve Nerad 1996).

Suyu dezenfekte etmede kullanılan klor çoğu zaman *Cryptosporidium* ookistlerine karşı yetersiz kalmaktadır. Bunun için filtrasyon işlemi uygulanır ancak burada da filtre çapına dikkat etmek gereklidir. Arıtma işlemlerinde 2.5 µm çapındaki filtreler kullanıldığında ookistlerin çok kolay geçebildikleri, bunun önüne geçebilmek için 1 µm'den daha küçük çapta filtrelerin kullanılması gerektiği ifade edilmiştir (Griffiths 1998, Yılmaz 2015).

Cryptosporidiosis insanlarda; yetişkinlerden daha çok, genç ve bağışıklık sistemi zayıf yaşlılarda görülür. Çocuklarda özellikle beş yaşın altındakilerde gerek hijyen konusunda çok becerikli olmamaları gerekse immun sistemlerinin yeterince kuvvetli olmayışından dolayı sıklıkla rastlanır (Yılmaz 2015, Cacciò ve Chalmers 2016). Hastalığın hayvanlarda görülme olasılığı insanlardakine benzerdir. Konağın direnci, ookistlerin konaktaki yerleşim yerleri gibi bir takım faktörlere bağlı olarak değişmesine rağmen genel olarak yaşlı hayvanlardan ziyade, bağışıklık sistemi zayıf genç hayvanlarda görülür (Fayer ve ark. 1999). Yenidoğan (bir haftalık) buzağılarda ve üç haftalıktan küçük kanatlılarda hastalığa daha fazla rastlanmasına karşın bağışıklık sistemi güçlü olduğu takdirde yaş kriteri önemini yitirmektedir (Starling ve Arrowood 1993).

Cryptosporidiosisin prevalansını etkileyen bir diğer husus da ülkelerin gelişmişlik düzeyidir. Dünya genelinde hastalığın görülme olasılığı gelişmiş ülkelerde %4.3 iken,

gelişmekte olan ülkelerde %10.4'dür. Hatta bazen bu rakamın %69.6'ya kadar çıktığı ifade edilmiştir (Çınar 2023).

Hastalığın mevsimsel dağılımına bakıldığında, bol yağışlı havalarda ookistlerin içme sularına karışma olasılıklarının artmasından dolayı Türkiye'de özellikle ilkbahar aylarında cryptosporidiosis olgularının arttığı Eylül-Ekim aylarında ise pik yaptığı ifade edilmiştir (Yılmaz 2015, Aynur 2020).

Cryptosporidiosis için risk grupları, veteriner hekimler, evcil hayvan besleyenler, hayvancılık ile uğraşanlar, laboratuvarlarda bu parazit ile çalışanlar, toplu yaşam alanlarında kalanlar (çocuk yuvaları, kreşleri ve bu gibi yerlerde çalışanlar), immun sistemi baskılanmış olanlar (HIV/AIDS bulaşmış kişiler, organ nakli geçirmiş olanlar, kemoterapi alanlar, böbrek hastaları) ile izciler ve kampçılar gibi işlem görmemiş içme suyunu içmek durumunda olanlardır (Yılmaz 2015, Aynur 2020). Risk grubunda tanımlananların ishalleri hastalar ve çiftlik hayvanları ile (özellikle altı aydan küçük olanlar) temastan kaçınmaları, gündüz bakım evlerinde çocukların tuvaletlerini yaptırma ya da bezlerini değiştirme sırasında hijyene dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Cacciò ve Chalmers 2016, Aynur 2020).

2.5.1. *Cryptosporidium*'un Bulaşması

Cryptosporidium türleri duyarlı konaklara genel olarak fekal-oral bazen de solunum yoluyla transfer edilir. Bu transfer genel olarak direkt temas (insandan-insana, hayvandan-insana, hayvandan-hayvana) veya indirekt temas (su, yiyecek-içecek, hava, toprak, mekanik vektörler gibi) olmak üzere iki şekilde gerçekleşir (Cacciò ve Chalmers 2016).

Enfeksiyonun şekillenebilmesi için ookistlerin vücuda alınması gerekir. Asgari kaç ookistin enfeksiyon oluşturabileceğinin cevabının arandığı bir çalışmada, seronegatif gönüllü insanlara 30 adet ookist verildiğinde beş kişiden birinin enfekte olduğu, 1000 adet ookist bu beş kişiden bağımsız yedi kişiye verildiğinde ise yedi kişinin tamamının enfekte olduğu bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda enfekte edici doz ortalama 132 olarak bulunmuştur (DuPont ve ark. 1995). Ancak sonradan yapılan çalışmaların birinde bu sayı 87 (Okhuysen ve ark. 1999), diğerinde 10-83 ookist (Chappell ve ark. 2006) olarak ifade edilmiştir. Ryan ve arkadaşları (2017) enfektif dozun çok düşük olduğunu ve ortalama 10-100 ookist arasında olduğunu bildirmiştir.

2.5.1.1. *Cryptosporidium* Ookistlerinin Toprakla ya da Mekanik Vektörler Yoluyla Taşınması

Cryptosporidium spp. ile pozitif dışkıların yerde uzun süre kalması, onların zamanla yağmur suları ve rüzgar yardımıyla toprağa karışmasına ve taşınmasına neden olur. Toprağın ya da suların dışkıyla kirlenmesi ise temiz yiyeceklerin, içme sularının ve havuzların kirlenmesine sebebiyet verir. Ookistlerin toprakta ne kadar ilerleyebildiğinin (ne kadar derine gittiği) test edildiği bir çalışmada (Mawdsley ve ark. 1996) hafif eğimli bir düzeneğe kurulup içi toprak ile doldurulmuştur. Aralıklı olarak sulanan bu toprak düzeneğe, hayvan dışkısındaki ookistler sulandırılıp püskürtülerek uygulanmıştır. Ookistler bu toprak düzeneğinde birkaç hafta hatta bazen 70 günden fazla tespit edilebilmiştir. Ookistler derinlik olarak ise çoğunlukla toprağın 2 cm'lik kısmında bulunmuştur. Derinlik arttıkça tespit edilen ookist sayısı azalmış 70 cm derinlikte hiç ookist elde edilememiştir. Çalışmada ookistlerin toprakta çökelişip kalmadığı dolayısıyla zaman da geçse yüzeyde tespit edilemese dahi derinlerde halen ookist olduğu ve toprağın önemli bir kirlilik kaynağı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kuşların *Cryptosporidium* ookistlerinin dağılımındaki rollerini göstermek için yapılan çalışmalarda Kanada kazları ve Pekin ördeği tarafından yutulan *C. parvum* ookistlerinin gastrointestinal kanaldan geçtiği, bir hafta boyunca dışkıları ile atıldığı ve fareleri enfekte edebildiği gösterilmiştir (Graczyk ve ark. 1996, Graczyk ve ark. 1997). Bir başka çalışmada ise Kanada kazlarının göç yolları boyunca dinlendikleri alanlardaki dışkılarda canlı *C. parvum* ookistleri tespit edilmiştir (Graczyk ve ark. 1998).

Laboratuvar koşullarında *C. parvum* ookistleri içeren sığır dışkısına maruz bırakılan ev sineklerinin hem dışkılarında hem de dış yüzeylerinde ookist tespit edilmiştir (Graczyk ve ark. 1999a).

Cryptosporidium spp. ile enfekte olan bir kişinin bulunduğu evden hamam böcekleri toplanarak bunların bağırsaklarında *C. parvum* ookistleri varlığı araştırılmıştır. Ookistlere rastlanmış olması, parazitin yayılımında hamam böceklerinin rolünün olabileceğini düşündürmüştür (Zerpa ve Huicho 1994).

2.5.1.2. İçme Suyu Yoluyla Bulaşma

Cryptosporidiosisin içme suyu kaynaklı ilk salgını 1984 yılında Texas eyaletinden bildirilmiştir. Bildirilen bu salgında en tipik klinik belirti ishaldir. Eyaletteki 1791 evin

rastgele 100 tanesi aranarak anket yapılmış ve salgın oranı %34 olarak bulunmuştur. Evlere içmek için sunulan su, filtrelanmemiş artezyen kuyu suyudur. Dışkı incelemeleri ve serolojik testler bu salgından sorumlu etiyolojik ajanın *Cryptosporidium* spp. olduğunu göstermiştir (D'Antonio ve ark. 1985).

Bir diğer salgın vakası 1987 yılında Gürcistan'da yaşanmıştır. Bölgede yaşayan 64900 kişinin 13000'i etkilenmiştir. Salgın esnasında gastroenteritis şikayeti olan 147 kişinin 58'inde (%39) *Cryptosporidium* spp. ookisti tespit edilmiştir. Bakteriyel, viral ya da diğer parazitik ajanlar yönünde incelemeler yapılsa da hiçbirine rastlanmamıştır. Denetleyici kurumun tüm kalite standartlarını sağlayan kum filtreli ve klorlu su sistemi kullanıldığını ifade etmesine rağmen bu salgının meydana gelmesi *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin bu sanitasyon tedbirlerinden geçip içme suyuna karışabildiğini göstermiştir (Hayes ve ark. 1989).

Cryptosporidiosis kaynaklı en büyük salgınlardan biri de Amerika'da 1993 yılında yaşanmıştır. Yaklaşık 1 milyon 610 bin insanın 403 000'i salgından etkilenmiştir (Mac Kenzie ve ark. 1994). Buna benzer birçok sayıda içme suyu kaynaklı salgın vakalarının olduğu bildirilmiştir (Fayer ve ark. 2000).

Güvenli olmayan içme sularının kitleler halinde yok edici etkisinden dolayı *C. parvum*'un CDC tarafından biyoterörizm ajanları listesine alındığı bildirilmiştir (Ceber ve ark. 2005).

2.5.1.3. Havuz Suyu Yoluyla Bulaşma

Dünya çapında en çok kullanılan ve popüler olan eğlence suları, yüzme havuzlarıdır. Yüzme havuzlarının dezenfeksiyonu için klor, kloramin, klor dioksit, ozon ve UV ışını kullanılır (Ryan ve ark. 2017). Bunlardan en çok tercih edilen klordur ve ne yazık ki *Cryptosporidium* spp. ookistleri klora çok dirençlidir. Dezenfeksiyonun etkili olabilmesi, dezenfektan konsantrasyonuna, suyun pH ve sıcaklığına bağlıdır. Suyun sıcaklığının 25 °C ve daha üzeri, pH'sının ise 7.5 ve daha altı olması gerektiği ifade edilmiştir (Pintar ve ark. 2010). Havuzlardaki klor miktarının CDC'nin tavsiye ettiği düzeyde (1-3 mg/L) olması halinde dahi *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin 3.5-10.6 gün canlı kaldığı bildirilmiştir (Ryan ve ark. 2017).

Ookistlerin dezenfektanlara oldukça dirençli olması, gastrointestinal belirtiler kesilse bile 60 gün süreyle çok miktarda ookistin atılımının devam etmesi, enfekte edici dozunun çok düşük olması (10-100 ookist) ve inkübasyon periyodunun uzun olması (ortalama yedi gün) (teşhisi ve alınabilecek önlemleri geciktirmesi) gibi parazite ait bir takım faktörlerin *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin su yoluyla bulaşmasını kolaylaştırdığı ifade edilmiştir (Ryan ve ark. 2017).

Enfekte bir kişinin havuzu diğer kişiler için nasıl enfektif doza ulaştırabileceğini anlatmak için şu hesaplama örneği verilmiştir:

Bir çocuk standart bir yüzme havuzuna (450 m³ su kapasiteli, 25x12 m ebatında) yanlışlıkla ya da bilinçli olarak 150 ml dışkı bırakırsa 20000 ookist/litre (20 ookist/ml) havuz suyuna karışır. Havuzda yüzen kişilerin hareketleri ile oluşan akıntılar sonucunda bu ookistler havuzun her yerine yayılır. Ortalama bir yüzücü saatte yaklaşık 10-150 ml su yutar yani bir yüzücünün 10 ml su yutması ile alacağı ookist miktarı 200'dür ve bu miktar enfeksiyona neden olabilecek minimum dozlar düşünüldüğünde (10-100 ookist) oldukça fazladır (Ryan ve ark., 2017).

Havuz suyu ile ilişkili çok sayıda cryptosporidiosis salgını rapor edilmiştir (Chalmers 2012, Lal ve ark. 2015, Painter ve ark. 2015).

Havuzları bebek bezi takan çocukların kullanması cryptosporidiosis bulaşma riskini artırmaktadır. Yakın geçmişte ishal olanların havuzu kullanmaması, çocukların havuzu kullanmadan önce ya da kullanma esnasında sık aralıklarla çıkarılarak duşa götürülmeleri kontrol amaçlı tavsiye edilmiştir (Fayer ve ark. 2000).

2.5.1.4. Yiyecekler Yoluyla Bulaşma

Yiyecek kaynaklı salgın raporlarının oldukça az sayıda olduğu ve belgelemenin de bir o kadar zor olduğu ifade edilmesine (Fayer ve ark. 2000) rağmen bazı salgın vakalarının cryptosporidiosis ile ilişkili olabileceğine dair bir takım raporlar sunulmuştur.

Yumuşakçalar deniz sularını filtre ederler ve böylelikle su kaynaklı patojenler için mükemmel biyolojik göstergelerdir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda istiridye ve midyeler toplanmıştır. Bunlarda *Cryptosporidium* ookistleri tespit edildiği bildirilmiştir (Chalmers ve ark. 1997, Fayer ve ark. 1999, Graczyk ve ark. 1999b, Gomez-Bautista ve ark. 2000). Ancak bu bulguların hiçbirisi cryptosporidiosis salgını ile ilişkili değildir. Yine de giderek popüler

hale gelen ve tüketimi artan midye gibi sokak yiyeceklerinin dikkatle tüketilmesi gerektiği ifade edilmiştir (Fayer ve ark. 2000).

Pazarlarda sergilenen sulu ve nemli meyve-sebzeler *Cryptosporidium* ookistleri için en uygun ortamlardandır. Kosta Rika’da marketlerden alınan kişniş yaprakları ve köklerinde, marul, turp, domates, salatalık ve havuç yüzeyinde *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilmiştir (Monge ve Chinchilla 1996). Peru’da yürütülen diğer bir çalışmada da fesleğen, lahana, kereviz, kişniş, yeşil soğan, pırasa, marul, maydanoz gibi sebzelerden *C. parvum* ookistlerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Fayer ve ark. 2000).

Süt kaynaklı ilk cryptosporidiosis salgını 1995 yılında İngiltere’den rapor edilmiştir. Bir çiftlikten temin edilen sütü içen öğrenciler hastalık semptomları göstermiştir. Hem sütte hem de öğrencilerden alınan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerine rastlanmıştır. Bunun üzerine çiftliğe gidip denetleme yapıldığında o tarihlerde pastörizasyon cihazının bozuk olduğu ve düzgün çalışmadığı anlaşılmıştır (Gelletlie ve ark. 1997).

Amerika’da sığırların otladıkları yere yakın alanlarda bulunan tarlalardan elmalar toplanıp bir tarım fuarında taze sıkım elma suyu olarak ikram edilmiştir. Bu fuara katılan 160 kişide cryptosporidiosis şekillenmiştir. Bu kişilerden alınan dışkı örneklerinde, elma suyunda ve elma suyunu sıkarken kullanılan makineden yapılan sürüntü örneklerinde *Cryptosporidium* spp. ookistleri tespit edildiği bildirilmiştir (Millard ve ark. 1994).

Çiğ meyve ve sebzelerin yendiği çeşitli etkinliklerde *Cryptosporidium* spp. vakalarına rastlanmıştır. Bu etkinliklerin ortak noktaları ise yiyecekleri hazırlayan kişilerin de enfekte oluşudur (Besser-Wiek ve ark. 1996, Bartleson ve ark. 1998, Quiroz ve ark. 2000). Bu tür salgınlar, özellikle yiyecek hazırlama işinde görevli kişilerin hijyen kurallarına dikkat etmesi ve mide-bağırsak problemleri yaşadıkları esnada bu işlerde çalıştırılmaması gerektiği gerçeğini bir kez daha göz önüne sermiştir (Fayer ve ark. 2000).

Cryptosporidium, dünya genelinde gıda yoluyla bulaşma potansiyeli bakımından, en önemli beşinci parazit olarak bildirilmiştir (Ryan ve ark. 2021a).

2.5.1.5. İnhalasyon Yoluyla Bulaşma

Cryptosporidium spp. ookistlerinin solunum yollarını etkilemesi genellikle kuşlardan bildirilse de sporodik vakalar halinde insanlardan da rapor edilmiştir (Fayer ve ark. 2000). Konuyla ilgili yürütülen en büyük çalışma Uganda’da bir hastaneden bildirilmiştir. İshali ve

açıklanamayan öksürüğü bulunan çocuklardan alınan tükürük ve dışkı örneklerinin cryptosporidiosis bakımından taraması sonucunda dışkı örnekleri pozitif çıkan 48 çocuğun 17'sinin tükürük örneği de pozitif bulunmuştur (Mor ve ark. 2010). Bu bulgu ile cryptosporidiosisin solunum yoluyla bulaşabileceği varsayılmış ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ifade edilmiştir (Sponseller ve ark. 2014).

2.5.2. Köpeklerde Cryptosporidiosis

Köpeklerde *Cryptosporidium* enfeksiyonundan ilk bahsedenler Tzipori ve Campbell olmuştur. Araştırmacılar 1981 yılında inceledikleri 20 adet köpek serumunun 16'sında *Cryptosporidium* antikorlarını tespit etmişlerdir (Tzipori ve Campbell 1981). İki yıl sonrasında akut diyareli bir haftalık köpekte ilk klinik cryptosporidiosis vakası tanımlanmıştır (Wilson ve ark., 1983). *Cryptosporidium* enfeksiyonu tür spesifik değildir ancak köpeklerde yaygın olarak görülen tür *C. canis*'tir.

Günümüzde köpekler aile fertlerinden biri haline gelmiştir. Dolayısıyla onların zoonoz hastalıkları insanlar için de önem taşımaktadır. İnsanlardaki cryptosporidiosis vakalarının çoğu *C. parvum* ve *C. hominis* tarafından meydana gelir ancak *C. canis* kaynaklı enfeksiyon da insanlardan bildirilmiştir (Xiao ve ark. 2007). HIV pozitif bir kişide ilk kez *C. canis* tespit edildikten sonra (Pieniazek ve ark. 1999) benzer birçok çalışma yayınlanmış ve immun sistemi baskılanmış insanlarda bu parazite karşı dikkat çekilmiştir (Cama ve ark. 2003, Sannella ve ark. 2019). Bunun yanı sıra *C. canis* immunkompetan kişilerde de görülmüştür (Pedraza-Diaz ve ark. 2001). Aynı evde yaşayan 32 aylık bir kız çocuğu ile altı buçuk yaşındaki erkek çocuğunda *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir. Kardeş olan bu çocukların evinde ayrıca civciv, tavuk, tavşan ve köpek olmak üzere dört çeşit hayvanın mevcut olduğu, bu hayvanlardan alınıp incelenen numunelerden sadece köpeğe ait olanda cryptosporidiosisin teşhis edildiği bildirilmiştir. Yapılan sekans analizinde ise hem çocuklarda hem de köpekte görülen türün *C. canis* olduğu rapor edilmiştir. Kız çocuğunda geçici olarak (iki gün) ishal görülürken, köpekte herhangi bir klinik semptom gözlenmemiştir. Su kaynaklı cryptosporidiosis salgınının ekarte etmek amacıyla komşu evlerde de tarama yapılmış ancak bu parazite rastlanmamıştır. Çocukların birbirini ve sonrasında köpeği mi, yoksa köpeğin çocukları mı enfekte ettiği net olarak anlaşılamasa da *C. canis* yaygın olarak köpeklerde görüldüğü için, etkenin köpekten çocuklara geçtiği düşünülmüştür. Dolayısıyla uygun koşullar altında köpeklerden insanlara *C. canis*'in geçebileceği ifade edilmiştir (Xiao ve ark. 2007).

Köpeklerde *Cryptosporidium* spp. ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda, prevalansın coğrafi bölgeye göre değişiklik gösterdiği (Taghipour ve ark. 2020), ancak yaş, cinsiyet ya da yaşam koşulları (ev ortamı, sokak ortamı) yönünden istatistiki bir değişiklik olmadığı (Huber ve ark. 2005, Mundim ve ark. 2007, Taghipour ve ark. 2020) ifade edilmesine rağmen, cryptosporidiosisin genç köpeklerde (altı aylıktan küçük), yaşlı köpeklere göre daha yüksek oranda görüldüğü (Yoshiuchi ve ark. 2010, Jian ve ark. 2014, Itoh ve ark. 2014) ve dış ortam ile ilişkisi olan köpeklerin ev ortamındakilere göre (Wang ve ark. 2012, Itoh ve ark. 2014), erkeklerin de dişilere göre (Chukwu ve ark. 2019) daha yüksek oranda enfekte olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca köpeklerde görülen cryptosporidiosisin mevsimle ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (Tangtrongsup ve ark. 2020).

Dünyada köpeklerde yapılan prevelans çalışmalarının sonuçları kullanılan yöntem ve coğrafyaya göre farklılık göstermiştir. Taghipour ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları bir metaanaliz çalışmasında köpeklerdeki cryptosporidiosisin havuzlaştırılmış (tüm çalışmaların bir havuzda toplanması sonucu elde edilen yaygınlık durumu) prevalansının mikroskopik yöntemler kullanıldığında %8, koproantijenik yöntemlerde (serolojik testlerde) %7 ve moleküler yöntemlerde ise %6 olduğunu bildirmişlerdir. Mikroskopik metotlardan Ziehl-Neelsen boyama yönteminin, moleküler yöntemlerden nested PCR metodunun, koproantijenik yöntemlerden IFA (Immunofluorescence Assay) metodunun en sık kullanılanlar olduğu rapor edilmiştir. Mikroskopik yöntemler kullanıldığında en yüksek prevalans %13 ile Güney Amerika bölgesi, moleküler yöntemlerde ise %18 ile Afrika bölgesi, koproantijenik metotlarda ise %9 ile Orta Doğu bölgesi olarak kaydedilmiştir (Taghipour ve ark. 2020). Cryptosporidiosisin kullanılan yöntemler ve havuzlanmış prevalans değerleri ile çalışılan coğrafi bölge ve havuzlanmış prevalans değerlerini veren bilgiler Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5’ de (Taghipour ve ark. 2020) gösterilmiştir.

Yapılan metaanaliz çalışması sonunda köpeklerde en çok görülen *Cryptosporidium* spp. türü *C. canis* (%3.64) olarak bildirilmiştir. *Cryptosporidium parvum* (%1.28) ikinci en çok görülen tür iken, nadir de olsa *C. muris* (%0.01), *C. ubiquitum* (%0.009), *C. andersoni* (%0.009) de bildirilmiştir (Taghipour ve ark. 2020).

Çizelge 2. 4. Cryptosporidiosis çalışmalarında kullanılan yöntemler ve havuzlanmış prevalans değerleri

KULLANILAN YÖNTEM		Taranan çalışma sayısı (n)	Havuzlanmış prevalans (%)
Mikroskopik yöntemler	Modifiye Ziehl-Neelsen boyama	50	9
	Kinyoun’s modifiye asit fast boyama	5	10
	Metilen mavisi-safranin boyama	5	11
	Auramin boyama	1	25
	Karbol fuksin boyama	1	0
	Malaşit yeşili boyama	1	1
	Flotasyon	13	2
Moleküler yöntemler	PCR	17	6
	Nested PCR	22	7
	Real time PCR	2	3
	RFLP PCR	1	0
Koproantijenik yöntemler	IFA (İmmünofloresan Testi)	20	6
	IIF (İndirekt İmmünofloresan)	1	6
	DFA (Direkt Floresan Antikor)	8	5
	EIA (Enzim İmmünotesti)	1	7
	ELISA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi)	10	8
	RIDA (hızlı tanı kiti ticari marka)	2	9

Çizelge 2. 5. Cryptosporidiosisın çalışıldığı coğrafi bölgeler ve havuzlanmış prevalans değerleri

Kullanılan Teşhis Yöntemleri	Mikroskopik Yöntemler ile Havuz Prevalansı (%)	Moleküler Yöntemler ile Havuz Prevalansı (%)	Koproantijenik Yöntemler ile Havuz Prevalansı (%)
Çalışmanın Yapıldığı Coğrafi Bölgeler			
Kuzey ve Orta Amerika ^a	5	6	7
Güney Amerika ^b	13	7	0
Avrupa ^c	3	2	7
Afrika ^d	11	18	7
Orta Doğu ^e	9	14	9
Batı Pasifik ^f	4	6	3
Güneydoğu Asya ^g	0	9	8

^a Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Meksika, Kosta Rika’da yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^b Peru, Brezilya, Arjantin, Kolombiya, Ekvador’da yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^c İspanya, Çek Cumhuriyeti, Yunanistan, Birleşik Krallık, Hollanda, İtalya, Rusya, Portekiz, Almanya, Fransa, Polonya, Norveç, Finlandiya, Belçika’da yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^d Nijerya, Zambiya, Mozambik ülkelerinde ve Güney Afrika bölgesinde yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^e İran, Mısır, Irak’ta yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^f Japonya, Avustralya, Çin, Filipinler, Kore, Samoa’da yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

^g Hindistan, Tayland’da yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi

2.5.2.1. Dünya’da Köpeklerde Yapılan Bazı Prevalans Çalışmaları

Dünya’da yapılan bazı prevalans çalışmalarında Ziehl-Neelsen boyama metodunda Brezilya’da %22.6 (29/128) (Alves ve ark. 2018), Polonya’da %2.7 (7/264) (Piekara-Stepinska ve ark. 2021), İran’da %8 (28/350) (Tavalla ve ark. 2017), Nijerya’da %22.75 (91/400) (Chukwu ve ark. 2019), karbol-fuksin boyama metodunda ise Almanya’da %0.4 (1/270) (Cirak ve Bauer 2004) yaygınlık bildirilmiştir.

Koproantijenik prevalans çalışmalarında, Kanada’da DFA sonucunda %2.4 (21/860) (Smith ve ark. 2020), Finlandiya’da ELISA’da %4 (6/150); IFA’da %4.7 (7/150)

(Rimhanen-Finne ve ark. 2007), Amerika'da IFA'da %7.1 (6/84) (Scorza ve Lappin 2017), Romanya'da ELISA'da %52.7 (197/374) (Titilincu ve ark. 2010), Irak'ta ELISA'da %13.35 (22/160) (Faraj ve ark. 2018), Nijerya'da ELISA'da %18.5 (51/276) (Olabanji ve ark. 2016), İran'da ELISA'da %4.3 (4/93) (Mosallanejad ve ark. 2010), Napoli'de ELISA'da %1.7 (7/415) (Rinaldi ve ark. 2008) oranlarında prevalans rapor edilmiştir.

Moleküler prevalans çalışmalarında İspanya'da %0 (0/233) (Regidor-Cerrillo ve ark. 2020), Kanada'da %0.3 (3/860) (Smith ve ark. 2020), İran'da %0.6 (2/315) (Homayouni ve ark. 2019), İtalya'da %1 (3/285) (Simonato ve ark. 2015), Çin'de %1.7 (10/604) (Cao ve ark. 2022), Nijerya'da %2.5 (5/203) (Ayinmode ve ark. 2018), Fransa'da %2.6 (3/116) (Osman ve ark. 2015), Polonya'da %3.4 (9/264) (Piekara-Stepinska ve ark. 2021), Finlandiya'da %4 (6/150) (Rimhanen-Finne ve ark. 2007), Brezilya'da %4.6 (6/128) (Alves ve ark. 2018), Birleşik Krallık'ta %4.6 (31/676) (Rosanowski ve ark. 2018), Tayland'da %7.6 (23/301) (Tangtrongsup ve ark. 2020), Almanya'da %10.0 (35/349) (Murnik ve ark. 2022), Japonya'da %21.1 (66/314) (Itoh ve ark. 2019) olarak bildirilmiştir.

2.5.2.2. Türkiye'de Köpeklerde Yapılan Prevalans Çalışmaları

Batman ilinde yapılan iki ayrı çalışmanın herbirinde 100'er köpek *Cryptosporidium* spp. varlığı yönünden araştırılmıştır. Bunlardan birinde Kinyoun asit fast boyama yöntemi kullanılırken (Aslan Çelik ve ark. 2023), diğerinde natif, flotasyon, karbol fuksin boyama, immunokromotografik hızlı tanı kiti gibi çeşitli dışkı muayene metotlarından yararlanılmıştır (Dinç ve Aslan 2023). Her iki çalışmada da taraması yapılan 100'er köpeğin hiçbirinde *Cryptosporidium* spp. tespit edilememiştir. Van'da 152 köpek dışkısının karbol fuksin boyama yöntemiyle incelenmesi sonucunda 24 köpek (%15.78) (Denizhan ve Karakuş 2019), ege bölgesinde Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile ise 200 köpeğin 31'i (%15.5) pozitif bulunmuştur (Öner 2019). Kırıkkale ve Ankara'da 200 köpek karbol fuksin boyama yöntemiyle cryptosporidiosis açısından araştırılmış ve dört köpekte (%2) etken tespit edilmiştir (Ünal ve Gokpinar 2020). Van'da 153 köpek hem Kinyoun asit fast boyama yöntemi hem de nested PCR ile incelenmiş ve sırasıyla %52.94 (81/153) ve %64.7 (99/153) oranında pozitiflik saptanmıştır bu çalışmada sekans analizi yapılmamıştır (Ayan ve Oruç Kılınç 2020). Diyarbakır'da aynı yöntemlerle incelenen 100 köpek dışkısında her iki yöntemle de %3 oranında *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir. Yapılan sekans analizinin sonucunda her üç örnek de *C. parvum* olarak rapor edilmiştir (Çelik ve ark. 2023). Bu

alışmalar dışında, bir köpekte distemper ile birlikte saptanan intestinal cryptosporidiosis olgusu bildirilmiştir (Aydın ve ark. 2004).

2.6. Cryptosporidiosisın Patojenitesi

Cryptosporidium spp. etkenlerinin hastalık oluşturabilmesi için öncelikle konak hücresine tutunması gerekir. Koksidian parazitlerde genel olarak bulunan rhoptri, mikronem ve yoğunlaşmış (dense) granüller salgı organelleri olarak görev yaparlar ve bunlara topluca apikal kompleks denir. Bu organellerden salınan salgılar sayesinde parazit, konak hücresine tutunur, invaze olur, parazitofor vakuol oluşturur (Pinto ve Vinayak 2021). Oluşan bu parazitofor vakuol içinde *Cryptosporidium* spp. kendine ait bir takım virülans faktörleri (izelge 2.6) sayesinde hayat döngüsünü devam ettirir (Bouزيد ve ark. 2013).

Cryptosporidiosisde patojenite hastalık etkeni olan türün virulansına, konağın almış olduğu ookist sayısına, konağın genetik yapısı ve immünolojik durumuna bağlı olarak değişmektedir. Patojen sindirim kanalının her bölgesine yerleşmesine rağmen genel olarak ince bağırsağın alt kısımları ve kolonun st bölgelerini tercih eder ve en ağır patojeniteyi jejunuma yerleştiği zaman oluşturur. Patolojik bulgulara dair çalışmalar mevcut olsa da etkenin hastalık oluşturma mekanizması (patogenezi) henüz anlaşılamamıştır (Yılmaz 2015).

Cryptosporidiosisde görülen diyarenin sebebi tam olarak bilinmese de ince bağırsak epitel hücrelerinin hasarı ya da ölümü, villusların atrofiye olması ve lamina propria da meydana gelen hücresel yangı olabileceği ifade edilmiştir. Bunlar dışında henüz tanımlanmamış bir *Cryptosporidium* toksininin neden olabileceği de ileri sürülen görüşler arasındadır (Barlık 2023, Pardy ve ark. 2024). Enfekte olmuş epitel hücrelerinden bol miktarda sitokin ve prostoglandin salgılanır. Sitolinler daha fazla prostoglandin salınımını uyarırken, prostaglandinler ise sodyum (Na⁺) emilimini azaltıp, klor (Cl⁻) retiminde artışa neden olurlar (Yılmaz 2015). Bozulan element dengesi villusların emme kapasitesini oldukça azaltır. Bunun sonucunda hastalığın en tipik belirtisi olan ishal ve dehidrasyon şekillenir. Enfeksiyonda n plana çıkan diğer bir elementin fosfor (P) olduğu, deneysel olarak enfekte olan kişilerde ve AIDS'li cryptosporidiosis hastalarında fosfor düzeyinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Barlık 2023).

Deneysel olarak immün sistemi baskılanmış yedi haftalık köpeklerde oluşturulan cryptosporidiosis modelinde duodenum ve jejunumda histopatolojik değişiklikler gözlenirken, mide, ileum, sekum ve kolonda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu

değişiklikler duodenum mukoza epitelinin orta ve alt kısımlarında ve jejunum mukoza epitelinin ise üst ve orta kısımlarında daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Patolojik olarak epitelyal metaplazi ve dilatasyon görülmüş, bağırsak mukozal epitel hücrelerinin bütünlüğü ise silia tabakalarının tamamının dökülmesi sonucu belirgin olarak hasar görmüştür (Cui ve ark. 2018).

Çizelge 2. 6. *Cryptosporidium* spp. virulans faktörleri ve bunların işlevleri

Eksistasyon	Tutunma-hareket etme	İnvazyon	Hücre içi çoğalma Konakçıda hayatta kalma
Serin proteaz	CSL	Cp2	CpABC
Aminopeptidaz	Gp900	Cpa135	CpATPase2
	Gp60/40/15	Fosfolipaz	CpATPase3
	P23	H4	HSP70
	P30	CpSUB	HSP90
	TRAP-C1	CpMuc	Sistein proteaz
	Cp47		Asetil ko-sentetaz
	Cps-500		
	CpMIC1		

2.7. Cryptosporidiosisın Klinik Bulguları

Cryptosporidiosis enfeksiyonunda semptomlar ookistin alınmasından iki ila 14 gün (genellikle beş-yedi gün) sonra ortaya çıkar (Chalmers 2012). Asemptomatikten ciddi diyare ve ölümle sonuçlanabilen geniş bir klinik bulgu yelpazesine sahiptir (Bolland ve ark. 2020). Fazla miktarda ookist içeren şiddetli sulu ishal, karın ağrısı, bulantı, kusma, hafif ateş, halsizlik, durgunluk ve kondisyon kaybı görülen semptomlar arasındadır. Bu belirtiler beş haftaya kadar sürebilir bu süre sonunda iyileşme görülse de ookist atılımı iki hafta kadar daha devam edebilir. Vakaların yaklaşık %10'unun ağır (hastaneye kaldırılacak derecede) seyrettiği bildirilmiştir (Chalmers 2012, Mhaissen ve Flynn 2017). Bu semptomlar çoğunlukla diğer enteropatojenlerin oluşturdukları ile aynıdır ve bu sebeple ayırt edilmesi güçtür. Enfeksiyonda şekillenen klinik belirtiler genel olarak bütün memelilerde benzerdir ancak etkenin virulansı, konağın bağışıklık durumu ve parazitin yerleşim yerine göre farklılıklar görülebilir (Öner 2019).

Cryptosporidium spp. temel olarak intestinal kanala yerleşse de bazen akciğerler, orta kulak, safra kanalı, pankreas ve mideye de yerleşebilir. Bu organlara yerleştiği zaman klinik belirtiler ona göre şekillenmektedir (Clark 1999). Etken safra kanalına yerleştiğinde ateş,

karnın sağ üst kısmında ağrı, mide bulantısı, kusma ve ishal, aynı zamanda sarılık, serum alkalın fosfataz, bilirubin seviyelerinde artış gözlenmiştir. AIDS'li bir çocukta cryptosporidiosis pankreas tutulumu yapmış ve pankreatite neden olmuştur. Öksürük, nefes darlığı, hırıltı gibi solunum sistemi belirtileri görülen hastaların balgam ve bronkoalveoler lavaj örneklerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerine rastlanmıştır (Mhaissen ve Flynn 2017, Barlık 2023). Yapılan bir araştırmada ise eklem, göz, baş ağrısı ve yorgunluk ile cryptosporidiosis arasında ilişki olduğu saptanmıştır (Chalmers 2014, Barlık 2023).

Cryptosporidium canis ile enfekte köpekler genelde klinik semptom göstermezler ancak ookist saçılımına devam ederek bir anlamda rezervuar konak görevi görürler. Bazen hastalık ciddi diyare, malabsorbsiyon ve kilo kaybıyla seyredebilir. Diyare genellikle suludur ve mukus, kan, melena içermez ayrıca dışkılamada herhangi bir zorluk görülmez. Semptomlar genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlardan rapor edilir. Cryptosporidiosisli köpeklerde hemogram ve serum biyokimyasal parametreler normaldir ancak diyare var ve çok şiddetli ise elektrolit kaybı ölçümlere yansiyabilir (Scorza ve Tangtronsup 2010).

Cryptosporidiosisde klinik bulgu görülüp görülmemesi ya da görülse bile şiddeti konağın bağışıklık durumuna bağlıdır. Deneysel olarak köpeklere *Cryptosporidium* spp. ookistleri verildiğinde kontrol ve immunkompetan gruplarda herhangi bir klinik semptom gözlenmezken, immunsupresif grupta tüylerde parlaklık kaybı, çevreye karşı ilgisizlik, letarji ve diyare saptanmıştır. İlk ookist çıkışı inokulum verilmesinden sonraki üçüncü günde gerçekleşmiştir. Ookist atılımı 10. ve 17. gün olmak üzere iki kere pik yapmıştır (Cui ve ark. 2018).

2.8. Cryptosporidiosisde Bağışıklık

Cryptosporidiosis ile savaşmada humoral bağışıklıktan daha çok hücresel bağışıklık rol oynamaktadır.

2.8.1. Hücresel Bağışıklık

Vücutta enfeksiyon şekillendiği zaman meydana gelen yangı sonucu ilk olarak T lenfositler artar. CD4+ T lenfositler enfeksiyon ile mücadelede önemlidir. Nitekim yapılan bir çalışmada AIDS hastalarında CD4+ T hücrelerinin miktarı 180 hücre/mm³ ve daha fazlası olduğunda hastalığın kendiliğinden sınırlandığı, 100 hücre/mm³ düzeyinde iken kronikleştiği, 50 hücre/mm³ ve daha altında seyrettiği zaman ise ölümcül bir hal aldığı ifade

edilmiştir (Clark 1999, McDonald 2000, Yılmaz 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise T hücreleri bulunmayan, kronik olarak cryptosporidiosis ile enfekte farelere, T lenfositler verildiği zaman anlamlı düzeyde iyileşme gösterdikleri bildirilmiştir. CD8+ T lenfositlerin bu enfeksiyondaki rolü çok bilinmese de bağışıklıktan sorumlu olan IFN- γ sitokininin salınımında görevli olduğu rapor edilmiştir (Barlık 2023). T lenfositlerin yanı sıra enfeksiyonun seyrinde interlökin-8, interlökin-12, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinlerin miktarı da artmaktadır (McDonald 2000). İntraperitoneal olarak anti-IFN- γ 'nın enjeksiyonu sonucunda IFN- γ 'nın tükenmesiyle birlikte prepatent sürenin kısaldığı, ookist atılımının arttığı ve hızla ölümün geliştiği ifade edilmiştir (Clark 1999).

2.8.2. Humoral Bağışıklık

Cryptosporidiosis'e karşı vücutta antikorlar üretilmekte ve yeniden enfeksiyon durumunda bu antikorlar hastalık kontrolünde rol oynamaktadır. Öncelikle IgM, daha sonrasında ise IgG antikorları artmakta, IgG seviyesi birkaç ay içinde azalmakta ancak yıllarca vücutta kalıp reenfeksiyon durumunda antikor yanıtından sorumlu olmaktadır. Bunların dışında IgA ve IgE antikor düzeylerinde de artış görülmektedir (Yılmaz 2015). Cryptosporidiosis ile enfekte farelere hiperimmün sığır kolostrumu verildiğinde etken miktarında azalma olduğu gözlenmiş buradan yola çıkarak *Cryptosporidium* spp. ile enfekte AIDS'li hastalara sığır kolostrumu verildiğinde ishal bulgusunda iyileşme olduğu ifade edilmiştir (Barlık 2023).

2.9. Cryptosporidiosis'in Tanısı

Cryptosporidiosis tanısını mikroskopik yöntemler, serolojik yöntemler, moleküler yöntemler, histopatolojik yöntemler ve kültür yöntemleri olarak alt başlıklar halinde incelemek mümkündür. Mikroskopik yöntemlerde, boyalı ya da boyasız preparatlarda (teşhis materyali olarak genellikle dışkı kullanılırken bazen balgam ve bronşiyal aspiratlar da kullanılabilir) ışık veya floresan mikroskobu yardımıyla *Cryptosporidium* spp. ookistleri incelenir. Serolojik yöntemlerde *Cryptosporidium*'a karşı oluşan antikorlar ya da parazite özgü antijenlerin varlığı çeşitli testler aracılığı ile araştırılır. Moleküler yöntemlerde aralarında bir takım farklılıklar bulunan bazı metotlar ile hastalık etkeninin DNA'sı aranır ve ayrıca tür, genotip gibi bilgilere ulaşılır. Histopatolojik yöntemlerde biyopsi materyali (çoğunlukla duodenumdan, bazen de karaciğer, akciğer, safra kesesi gibi organlardan alınan biyopsi örneği) boyanarak ookist varlığı yönünden incelenir. Kültürel yöntemlerde in vivo

ya da in vitro olarak parazit çoğaltılır, bu yöntem teşhisten daha çok bilimsel araştırmalar, aşı çalışmaları gibi durumlarda tercih edilir.

2.9.1. Mikroskopik Yöntemler

Mikroskopik teşhis yöntemleri boyalı ve boyasız örneklerde olmak üzere iki grupta incelenebilir.

2.9.1.1. Boyasız İnceleme

Cryptosporidium tanısında çoğunlukla kullanılan materyal dışkıdır. Bazen duodenum içeriği, safra salgısı, balgam, bronkoalveoler lavaj ve biyopsi örnekleri gibi diğer numuneler de kullanılabilir (Yılmaz 2015, Vanathy ve ark. 2017).

Öncelikle dışkı numunesi makroskopik olarak incelenir. Genelde mukuslu ve sıvı kıvamdadır. Ookist sayısı ne kadar çok ise dışkının kıvamı o oranda gevşek olur. Ancak bu durum her zaman geçerli değildir. Aseptomatik bireylerde dışkı katı kıvamlı olabilir (Vanathy ve ark., 2017).

Dışkı bir lam üzerinde serum fizyolojik ile karıştırılıp üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskopunun 40x büyütmesinde incelenir. Bazen lugol damlatılarak da inceleme yapılabilir. Ookistler yaklaşık 4-6 µm boyutunda oval, renksiz yapılar olarak görülür (Smith 2007, Vanathy ve ark. 2017). Çok küçük olmaları, iç yapılarının boyasız preparatlarda belli olmaması gibi nedenlerle çoğunlukla gözden kaçır ya da mayalarla karışırlar. Boyasız preparatlar ile yapılan inceleme ancak ön tarama olarak yapılır. Ayrıca bu şekilde hazırlanan preparatlar kalıcı olarak saklanamazlar (Dubey ve ark. 1990, Yılmaz 2015). Bu yüzden ookistleri çoklaştırma, belli bir alanda toplama amacıyla flotasyon ve sedimentasyon yöntemleri uygulanır. Dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin mikroskopla belirleme konsantrasyonu $1-5 \times 10^4/\text{ml}$ olarak belirtilmiş, zenginleştirme işlemlerinin ookiste rastlama olasılığını artırdığı ifade edilmiştir (Smith 2007).

Flotasyon yönteminde Sheather'in şeker solüsyonu, %33'lük çinko sülfat, %36'lık sodyum klorür çözeltileri kullanılır. Bunlardan en yaygın kullanılanı Sheather'in şeker solüsyonudur. Dışkı örnekleri 500 g'de 10 dakika santrifüj edilmelidir. İncelenecek numune 15 dakikadan daha uzun süre solüsyon içinde kalırsa, ookistler dibe çöker ve görünmez hale gelirler (Sheather 1923, Yılmaz 2015, Vanathy ve ark. 2017).

Sedimentasyon yönteminde ise solüsyon olarak formol-eter ve formol-etil asetat kullanılır. Duyarlı olması sebebiyle en sık tercih edilen formol-eter tekniğidir. Ookistleri elde edebilmek için yüksek devirde santrifüj (1200 g) gereklidir (Allen ve Ridley 1970, Vanathy ve ark. 2017, Khurana ve Chaudhary 2018).

2.9.1.2. Boyalı İnceleme

Cryptosporidium spp. ookistleri yüksek oranda lipid içerdiği için aside dirençli boyalarla boyanabilirler. Teşhis amacıyla kullanılan pek çok boyama yöntemi vardır (Dubey ve ark. 1990, Starling ve Arrowood 1993). Ancak en çok tercih edilenler daha spesifik, güvenilir ve düşük maliyetli olması nedeniyle modifiye Ziehl-Neelsen ve modifiye Kinyoun asit fast boyama yöntemleridir (Yılmaz 2015, Aynur 2020, Barlık 2023).

2.9.1.2.1. Modifiye Ziehl-Neelsen Boyama

Sıcak ve soğuk olarak iki şekilde uygulanır. Öncelikle dışkı numunesi temiz bir lama yayılır, havada kurutulur. Ardından hızlı bir şekilde alevden geçirilip sabitlenen preparatlar karbol fuksin boyası ile beş dakika boyamaya tabii tutulur. Sıcak ve soğuk metot arasındaki fark bu aşamada ortaya çıkar. Sıcak metotta preparat, duman çıkana kadar ancak boyanın kaynamasına izin vermeyecek şekilde alttan bir ateş yardımıyla ısıtılır. Soğuk metotta ise böyle bir ısıtma işlemi yoktur. Bu işlemden sonra preparat bir-iki dakika yıkanır, 30 saniye %5'lik sülfirik asitte bekletilir. En son olarak %3'lük metilen mavisi ile kaplanan preparat bir dakika sonunda yıkanır, kuruması beklenir ve mikroskop altında incelenir (Rekha ve ark. 2016). Ookistler pembe ya da kırmızı renkte, maya ve dışkıda bulunan diğer canlılar ile atıklar yeşil veya mavi renkte boyanırlar (Vanathy ve ark. 2017, Barlık 2023).

2.9.1.2.2. Modifiye Kinyoun Asit Fast Boyama

Dışkı numunesi lama yayılır, havada kurutulur, seyreltilmemiş metanolde bir dakika sabitleme işlemi yapılır. Ardından preparat Kinyoun'un karbol fuksin boyası ile kaplanır ve beş dakika beklenir. Süre sonunda preparat %50 etanolde üç-beş saniye bekletildikten sonra distile su ile yıkanır. Dekolarizasyon aşaması %1'lik sülfirik asitte iki dakikada tamamlanır. Preparat %1'lik metilen mavisi ile kaplanır bir dakika beklenir ardından yıkanır ve

mikroskop altında incelenir (Rekha ve ark. 2016). Ookistler mavi zeminde parlak kırmızı yapılar olarak görülürler (Aynur 2020).

2.9.1.2.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama

Dışkı numunesi lama yayılıp havada kuruduktan sonra ateşten geçirilip sabitlenir. Preparat üç-beş dakika kadar %3'lük asit alkolde (HCl+metanol) tekrar sabitleme işlemine tabii tutulur. Ardından %1'lik safranin boyası ile kaplanan preparat ateş yardımıyla bir dakika boyunca duman çıkana kadar ısıtılır. Süre sonunda yıkanır ve %1'lik metilen mavisi ile 30 saniye boyanır, tekrar yıkanır, kurutulup, mikroskopta incelenir (Rekha ve ark. 2016). Ookistler turuncu-kırmızı renkte, zemin ise mavi renkte boyanır. Ookistin iç yapısının ayırt edilememesi yöntemin dezavantajı olarak belirtilmektedir (Fayer ve ark. 2000).

Ookistin boyanmadığı, ancak zeminin boyandığı boyamalara negatif boyama yöntemleri denir. Böylelikle farklı renkte boyanan zeminlerde ookistler şeffaf, ışık kırıcı, renksiz olarak görülürler. Negatif boyama yöntemleri karbol fuksin, nigrosin, malaşit yeşili, safranin, %2-5'lik light green ile yapılabilmektedir. Dezavantajı ise faz-kontrast mikroskobuna ihtiyaç duyulmasıdır (Rekha ve ark. 2016, Vanathy ve ark. 2017).

2.9.1.2.4. Karbol Fuksin Boyama

Lam üzerine alınan eşit miktardaki dışkı ve karbol fuksin boyası karıştırılıp, lama yayılır, havada kurutulur, faz-kontrast mikroskobu ile incelenir (Sakarya ve ark. 2010). Ookistler şeffaf, ışık kırıcı, oval şekilde, zemin ise kırmızı renkte görülür (Öner 2019, Aynur 2020). Karbol fuksin dimetilsülfooksit ile beraber uygulanırsa zemin çok daha iyi boya alıp, ookistler rahatlıkla fark edilebilir (Fayer ve ark. 2000, Vanathy ve ark. 2017).

2.9.1.2.5. Nigrosin Boyama

Lam üzerinde bir damla dışkı bir damla %1'lik nigrosin ile karıştırılır, lama ince yayma yapılır, havada kurutulur. İmmersiyon yağı yardımıyla ile faz-kontrast mikroskobunda incelenir. Zemin yeşil renkte, ookistler şeffaf renkte görülürler (Rekha ve ark. 2016).

2.9.1.2.6. Malachite Green (Malaşit Yeşili) Boyama

Lam üzerinde bir damla dışkı bir damla %5'lik malachite green ile karıştırılır, lama ince yayma yapılır, havada kurutulur. İmmersiyon yağı yardımıyla ile faz-kontrast mikroskopunda incelenir. Zemin koyu yeşil renkte, ookistler şeffaf renkte görülürler (Rekha ve ark. 2016).

2.9.1.2.7. Light Green Boyama

Lam üzerinde bir damla dışkı bir damla %1'lik light green ile karıştırılır, lama ince yayma yapılır, havada kurutulur. İmmersiyon yağı yardımıyla ile faz-kontrast mikroskopunda incelenir. Zemin açık yeşil renkte, ookistler şeffaf renkte görülürler (Rekha ve ark. 2016).

Negatif boyama yöntemlerinden nigrosin ve light green boyamada hem mayalar hem de ookistler boyanmadan kalır ve böylelikle teşhis güçlükle yapılmaktadır ancak malaşit yeşili boyamada mayalar da boya aldığı için ookistlerin ayrımı kolay yapılmaktadır (Rekha ve ark. 2016).

2.9.1.2.8. Floresan Boyama

Auramin-rhodamin, auramin-fenol, auramin-karbol fuksin ve akridin turuncusu gibi boyalar kullanılır. Auramin fenol ile boyama yapıldığında ookistler siyah zemin üzerinde parlak yeşil floresans veren oval yapılar olarak görülür. Auramin rhodamin'le ise *Cryptosporidium* spp. ookistleri kırmızı zeminde parlak sarı renkte görülürler. Hızlıdır ancak duyarlılığı, özgüllüğü düşüktür ve pahalı bir yöntemdir (Smith 2007, Vanathy ve ark. 2017, Çınar 2023).

2.9.1.2.9. İmmunofloresan Boyama

Bu yöntemde *Cryptosporidium* spp. ookistleri yerine onun antijenlerine karşı floresan boyalı antikorlar kullanılır. Antijen-antikor birleşmesi sonucu teşhis yapılır. Daha duyarlı ve spesifiktir, bir çok laboratuvarında altın standart olarak kabul edilmiştir. Ancak test masraflı ve floresans mikroskopuna ihtiyaç duymaktadır. Bu durum kullanımını sınırlandırır (Vanathy ve ark. 2017).

2.9.1.2.10. Hematoksilen-Eozin Boyama

Cryptosporidium'un gelişim aşamalarını tanımlamak için yapılan bir boyamadır. İntestinal mukozanın mikrovilluslarında küçük, yuvarlak, bazofilik cisimcikler olarak görülürler. İnvazif bir metot olmanın yanında yöntemin doğrulanması için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gerektirmesi yöntemin dezavantajı olarak sayılabilir (Vanathy ve ark., 2017).

2.9.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik ya da immunolojik yöntemler antikor ya da antijen tayini olarak iki başlık altında incelenebilir. Antijen tespiti o anda vücutta mevcut olan enfeksiyonu gösterirken, antikor varlığı daha önceden geçirilmiş bir hastalığa işaret eder bu bakımdan sero-epidemiolojik çalışmalarda kullanılırlar (Smith 2007, Khurana ve ark. 2012). Serolojik testler, hayvanlarda ya da insanlarda hastalık teşhisi yapmanın yanında, çevreden toplanan numunelerden de (su gibi) etken tayini yapma imkanı sağlar (Starling ve Arrowood 1993).

2.9.2.1. Antikor Tayini

Bu yöntemde serumda *Cryptosporidium*'a karşı oluşan antikorlar çeşitli testler ile araştırılır. ELISA, IFAT ve Western Blot gibi metotlar kullanılır. Bu yöntemlerin dışkıda ookist saptama yöntemleri ile kombine olarak kullanılmasının daha doğru sonuçlar vereceği ifade edilmiştir. Üzerinde çalışılacak numune formolde ya da uygun olmayan saklama koşullarında muhafaza edildiğinde ELISA, IFAT gibi testler kurtarıcı teşhis yöntemleri olarak rol oynarlar. Kısa sürede çok sayıda numune bakılabilmesi açısından avantajlı olsa da kitlerin maliyetli olması, ELISA okuyucu, yıkayıcı gibi özel ekipmanlar gerektirmesi ve çapraz reaksiyonlara neden olması gibi sebeplerle dezavantajlıdır (Yılmaz 2015, Vanathy ve ark. 2017).

2.9.2.2. Antijen Tayini

Bu yöntemde dışkıda *Cryptosporidium*'a özgü antijenler çeşitli testler ile araştırılır. Bu amaçla kullanılan testlerden biri DFA'dır. Dışkıda bulunan *Cryptosporidium*'a özgü antijenler ile bunlara karşı boyalarla işaretlenmiş monoklonal antikorların reaksiyonu sonucu oluşan antijen-antikor kompleksinin floresans mikroskopta ışıldamalar şeklinde görölme prensibine dayanır. Yine benzer bir prensiple çalışan başka bir test de ELISA'dır. Deneyimli bir personel gerektirmemesi sebebiyle kliniklerde rutin laboratuvar analizi olarak

kullanılmaktadır (Barlık 2023). Hızlı sonuç alınabilmesi gibi bir avantajı varken kitlerin çok pahalı olması dezavantajıdır (Vanathy ve ark. 2017).

ELISA gibi serolojik testlerde ookist duyarlılık kapasitesi 10^3 - 10^4 ookist/ml olarak belirtilmiş olup mikroskopik inceleme yöntemlerinden daha yüksek duyarlılıkta olduğu ifade edilmiştir (Ghoshal ve ark. 2018).

Örneğin, ELISA ile boyama yöntemlerinden Kinyoun asit fast'ın karşılaştırıldığı bir çalışmada, Kinyoun asit fast boyama ile %3.75 (3/80), ELISA ile %6.25 (5/80) pozitiflik saptanmıştır. Boyama yöntemiyle pozitif bulunan üç örnek, serolojik yöntemde de pozitif bulunmuştur. Kontrol grubunda her iki yöntemle de pozitiflik elde edilmemiştir. ELISA yönteminin boyamaya göre daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tamer ve Gülenç 2008).

2.9.3. Moleküler Yöntemler

Cryptosporidium'un teşhisinde kullanılan bir diğer teşhis yöntemi de moleküler düzeyde olanlardır. Mikroskopik ve serolojik yöntemlere göre daha duyarlı ve hassas olduğu için moleküler yöntemler daha kullanışlıdır (Barlık 2023). PCR yönteminde pozitiflik elde edebilmek için gram dışıda 20 ookist, mikroskopik yöntemlerde ise gram dışıda 100-500 bin ookist olması gerektiği (Çınar 2023) ayrıca sıvı örneklerden ookist teşhisi konusunda PCR'ın ELISA yönteminden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Aynur 2020).

Numuneler donmuş ya da kötü muhafaza şartlarında saklanmış olsa dahi parazite uygun DNA izolasyon yönteminin seçilmesi ve uygun primerlerin kullanılması halinde moleküler yöntemler ile güzel sonuçlar elde edilebileceği ifade edilmiştir (Yılmaz 2015).

Kullanılan moleküler yöntemler genel olarak PCR'dan köken alırlar. Temel olarak molekül bazlı teknikler hedef alınan uzun bir gen bölgesinin çoğaltılıp daha sonra o bölge içindeki küçük kısımların çoğaltılması prensibi ile çalışırlar. PCR, nested-PCR, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP-PCR), multiplex-PCR, gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR) ve Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kullanılan moleküler yöntemlerden bazılarıdır. Genel olarak literatürde geçen ve sıklıkla çoğaltılması için hedef alınan gen bölgeleri, 18s SSU rRNA, gp60, hsp70, COWP, ITS-1, ITS-2, TRAP-C1 ve TRAP-C2'dir. Bunlardan nested-PCR yönteminde en çok kullanılanı ise genomda beş kopyası bulunan 18s SSU rRNA olduğu bildirilmektedir (Vanathy ve ark. 2017, Ahmed ve Karanis 2018).

PCR, hızlı, duyarlı ve çoğunlukla doğru sonuçlar veren bir yöntemdir ancak bununla beraber laboratuvar kontaminasyonlarından kaynaklı yanlış pozitif sonuç vermesi, mikroskopik ve serolojik yöntemlere göre daha zaman alıcı olması, ucuz bir metot olmaması ile deneyimli personel gerektirmesi gibi dezavantajlara da sahiptir (Fayer ve ark. 2000).

2.9.3.1. Klasik PCR

Bu metotta DNA polimeraz enzimi yardımıyla, deoksiriboz nükleotidler (dNTP) ve onların tamamlayıcısı olan baz dizilimleri yani primerler kullanılarak in vitro ortamda hedeflenen parazit DNA'sı çoğaltılır. Her türlü materyalden *Cryptosporidium* spp. teşhis etmeye olanak tanır. Parazitin genotip ve subtiplerinin bilgisine de ulaşılabilir (Vanathy ve ark. 2017, Çınar 2023).

2.9.3.2. Nested PCR

Dışkı materyali steril değildir başka bir deyişle kompozisyonu bir hayli karışıktır bu sebeple istenen hedef bölgesinin çoğaltılması klasik PCR ile her zaman mümkün olamamaktadır. Bazen spesifik olmayan bölgelerin de çoğalması ile yanlış sonuçlar alınabilmektedir. Bu hatanın önüne geçmek için nested-PCR yöntemi sıklıkla tercih edilir. Yani kısacası nested-PCR, klasik PCR'ın özgünlüğü ve hassasiyeti arttırılmış halidir (Çınar 2023).

Bu yöntemde ard arda iki kez PCR işlemi yapılır. İki ayrı primer takımı kullanılır. İlk PCR aşamasında daha uzun bir gen bölgesi çoğaltılırken, ikinci aşamada bu gen bölgesinin içinden daha küçük bir bölge amplifiye edilir (Vanathy ve ark. 2017). İkinci PCR aşamasında kullanılan primerin 3' ucunda bulunan iki veya üç nükleotitlik dizilim yöntemin hassasiyetini belirlemektedir. Bu dizilim sayesinde hedef olmayan kısımların çoğalmasının önüne geçilmektedir. Diğer bir ifadeyle bu dizilim sayesinde yalnızca istenen hedef bölge amplifiye olmaktadır (Çınar 2023).

Spesifik ve duyarlı bir yöntemdir ancak hem uzun süre alır hem de tiplendirme için sekans analizi ya da RFLP gereklidir (Vanathy ve ark. 2017).

2.9.3.3. RFLP-PCR

Hedef alınan bölge PCR ile çoğaltılır, uygun enzimlerle kesim işlemi yapılır, jelde yürütme işlem sonrası kesim yerlerine göre parazitin genetik analizi yapılır. Bu yöntemde

klasik PCR'dan farklı olarak genotiplendirme, alt tip analizi ve tür tayini yapılabilmektedir. Ancak zaman alıcı bir yöntemdir (Vanathy ve ark. 2017, Çınar 2023).

2.9.3.4. Real-time PCR

Bu yöntemde jel elektroforez aşaması yoktur. Bunun yerine varlığı araştırılan hedef molekülün analiz edilen numune içindeki miktarı bilgisine ulaşılır. Kapalı bir sistemde uygulanan bu yöntemde kontaminasyon riski azdır. Döngü süresi çok kısa olduğu için hızlı sonuç alınır. Hibridizasyon amaçlı özel probalar kullanılır, bunlar testin hassasiyetini ve güvenilirliğini artırır. Bu yöntemin kullanılmasını sınırlandıran tek husus özel ekipman gerektirmesidir (Vanathy ve ark. 2017, Khurana ve Chaudhary 2018).

2.9.3.5. Multiplex PCR

Klasik PCR'da parazite ait bir gen bölgesi hedef alınırken, multiplex PCR'da farklı hedef noktalar seçilip çoğaltılabilir. Başka bir deyişle bir reaksiyonda birden fazla DNA amplifiye edilebilir. Teknik açıdan uzmanlık gerektirmesi yöntemin dezavantajıdır. (Vanathy ve ark. 2017).

2.9.3.6. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Klasik PCR'da her bir aşamada farklı sıcaklık dereceleri kullanılır. LAMP'da ise 60-65°C'lik sabit bir sıcaklıkta bütün aşamalar tamamlanır. Reaksiyon sırasında ortaya çıkan yan ürünün oluşturduğu bulanıklık ya da kullanılan floresan boyalar sebebiyle, ampikon çıplak gözle görülebilir. Basit prosedüre sahip olması, pahalı ekipmanlar gerektirmemesi, nispeten maliyetinin düşük olması gibi avantajlara sahiptir (Vanathy ve ark. 2017).

2.9.4. Histopatolojik Yöntemler

Cryptosporidium spp. tanısı 1980'li yıllardan önce bu yöntemle konulabilmekteydi. Bağırsaklardan alınan biyopsi örnekleri hematoksilen ve eozin ile boyanıp, mikrovilluslarda yer alan küçük yuvarlak ookistler bakımından incelenmekteydi. Ancak yöntemin invazif olması, biyopsi materyalinin hızlıca tespit edilmesinin gerekliliği, ekonomik olmaması, uygulama süresinin çok uzun olması gibi dezavantajlar sebebiyle öncelikli olarak tercih edilen yöntemler arasında değildir (Öner 2019).

2.9.5. Kültür Yöntemleri

Cryptosporidium'un hücre kültüründe gelişim aşamalarının gösterilmesi ilk kez 2004 yılında gerçekleşmiştir. Daha önceleri bir çok kez kültür çalışmaları denense de tam olarak başarılı olunamamıştır. Bu amaçla kullanılan 25'ten fazla hücre hattı mevcuttur ve bunlardan en sık kullanılanları Caco-2 (insan kolon karsinoma hücre kültürü), sığır fallopian tüpü epiteli hücre kültürü, MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürü, HCT-8 (insan iliosekal karsinoma hücre kültürü), insan mide adenokarsinom hücre kültürleridir. En uygun kültür ortamının HCT-8 olduğu ifade edilmiştir. Ekimin yapılmasının ardından 24.-72. saatlerde kültür incelenirse *Cryptosporidium*'un farklı üreme formları görülebilmektedir. HCT-8 hücre kültüründe çalışılırken eğer iki-üç gün ara ile pasajlama yapılırsa kültürün 25 güne kadar devamlılığını sağlamak mümkündür (Hijjawi 2003, Hijjawi ve ark. 2004).

Hücre kültüründe başarılı olabilmek için; ookistin eksistasyonu, muhafaza şartları, parazit in izolasyonu, inokulum miktarı, kullanılan hücre kültürü, kültürün pH'sı, iyonları, oksijen, karbondioksit miktarları, kültüre eklenen vitamin mineral takviyeleri gibi bir dizi faktörün göz önünde bulundurulması gerekir. Hücre kültürlerinin en büyük dezavantajı devamlı olarak sürdürülememesi ve in vivo olarak enfeksiyon meydana geldiğinde şekillenen ince duvarlı ookistlerin in vitro ortamda oluşmamasıdır. Hücre kültürleri aşı çalışmalarında, ookistin canlılığının ve enfektif olup olmadığının belirlenmesinde ve konak hücresi ile parazit arasındaki etkileşimin gösterilmesinde kullanılmaktadır (Hijjawi 2003).

In vivo olarak; hastalığın biyolojisi, patolojisi, immunolojisi gibi konularda bilgi edinmek, çeşitli ilaç etkinliği çalışmaları yapmak için deney hayvanları da kullanılabilir. Bu amaçla yenidoğan ve immun sistemi baskılanmış hayvanlar (6-7 günlük fareler, 8-12 haftalık SPF (specific pathogen free) fareler, 200-250 gr ağırlığındaki ratlar), maymunlar, neonatal kuzu ve oğlaklar kullanılmaktadır. En uygun hayvanlar 6-7 günlük farelerdir. Düşük (10^6) ookist miktarı ile enfekte oldukları bildirilmiştir. Hayvan deneylerinin rutin olarak kullanılacak pratik ve ucuz bir yöntem olmadığı ifade edilmiştir (Widmer ve ark. 1999, Aynur 2020).

2.9.6. Ekstraintestinal Cryptosporidiosis Teşhisi

Safra kanalı ya da kesesinde hastalık meydana geldiği zaman safra yollarındaki kalınlaşma ve safra kesesindeki genişlemeyi görebilmek için ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ya da endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi yapılabilir. Endoskopi

yöntemi içlerinde en duyarlı olanıdır. Ayrıca serum aminotransferaz, alkalın fosfataz seviyelerine bakılabilir (Vanathy ve ark. 2017).

Pulmoner cryptosporidiosis şekillendiğı zaman balgam, trakeal aspirat, bronkoalveoler lavaj gibi numuneler toplanır ve incelenir. Etkenin görülmesi ile cryptosporidiosis teşhisi konulabilir (Vanathy ve ark. 2017).

2.10. Cryptosporidiosisın Tedavisi

Cryptosporidiosis tedavisi üzerine 30 yılı aşkın süredir çalışılmasına ve neredeyse 1000 kemoterapötik ajanın değerlendirilmesine rağmen bunların hiçbirini klinik belirtileri tam ve sürekli olarak kontrol altına alamamış veya enfeksiyonu daimi olarak ortadan kaldıramamıştır (Scorza ve Tangtrongsup 2010, Cacciò ve Chalmers 2016). Bu durum *Cryptosporidium* türlerinin hastalık oluşturma mekanizmasının (patogenez) tam anlaşılabilmesi ve *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*, *Plasmodium spp.* gibi akrabalarının aksine konak hücre içinde farklı bir yerleşim yeri (parazitofor vakuol) göstermesi ile açıklanabilir (Clark 1999).

Cryptosporidiosisın klinik seyri bireyin immun sistemine bağılı olarak şekillendiğı için tedavi seçeneğı de buna göre belirlenir. Şöyle ki; immunkompetan kişilerde hastalık genellikle kendi kendini sınırlar (iki-üç hafta kadar sürer ve geçer) bu sebeple özel bir tedavi prosedürü uygulamaya gerek yoktur ancak ishal yine de dikkatle gözlenmelidir. İmmüsupresif bireylerde ise öncelikle bağışıklık sistemini baskılayan duruma karşı önlem alınır (örneğin AIDS hastalarında anti-retroviral ilaç verilir) ve sonrasında kısmi olarak etkinliğı gösterilmiş ve hali hazırda cryptosporidiosis tedavisinde kullanılan anti-cryptosporidial ajanlar özenle kullanılmalıdır. Aksi takdirde hastalık tedavisi mümkün olmayan ishale ve hatta bazen ölüme neden olabilir (Clark 1999, Cacciò ve Chalmers 2016, Cui ve ark. 2018).

Nitazoksanid, bir yaş üzeri ve bağışıklık sistemi sağlam kişilerde cryptosporidiosis tedavisi için FDA (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan tek ilaçtır ancak Avrupa'da lisansı yoktur. İmmüsupresif bireylerde ve malnutrisyon görülen çocuklarda etkinliğı yok denecek kadar azdır (Painter ve ark. 2015, Cacciò ve Chalmers 2016, Pardy ve ark. 2024).

Etkinliği henüz kanıtlanmış bir ilaç olmadığından dolayı hastalığı önleme ve enfeksiyon şiddetini azaltmada aşların geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ancak sürekliliğin sağlandığı bir hücre kültürünün olmaması, uygun hayvan modelinin seçilmesindeki güçlük, parazit genomunun manipölasyonundaki eksiklikler gibi bir takım faktörler sebebiyle aşı çalışmalarında sınırlamalar söz konusudur. Parazitler genetik olarak modifiye edilip zayıflatılabilirlerse bunların oral aşı adayı olabilecekleri ifade edilmiştir. Bunun yanında bir aşıyı tasarlamak ve üretmek için hastalığın mekanizmasının anlaşılması hayati öneme sahiptir. Aksi takdirde zayıflatılmış bir aşı, bağışıklık sistemi tam olan kişilerde belki rahatlıkla kullanılabilse de immunsupresif bireylerde ciddi komplikasyonlar ile sonuçlanabilir (Cacciò ve Chalmers 2016).

Kedi ve köpek gibi pet hayvanlarında cryptosporidiosis'e temel hedef ishali durdurma'dır. Bu amaçla destek tedavi olarak sindirilebilirliği yüksek besinler diyet'e eklenebilir. Şiddetli ishal durumunda parenteral sıvı takviyesi önerilmektedir. Sekonder enfeksiyonları önlemek için antibiyotik verilebilir. Epitelyum oluşumunda rol alan glutamin, bozulan bağırsak yüzey epitelini onarmak için oral yolla verilebilir. Bunlar dışında kimyasal ajan olarak azitromisin, tylosin ve paromomisin'in tedavi etkinliği kedi ve köpeklerde denenmiş, optimal tedavi süresi bilinmemekle birlikte (yaklaşık bir-iki hafta) ishalde iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir. Paromomisin sistemik olarak emildiği, renal toksisite ve ototoksisiteye neden olabildiği bu sebeple asla kanlı ishali olan kedi ve köpeklere verilmemesi gerektiği vurgulanmıştır. Eğer ilacın uygulandığı ilk hafta tedaviye yanıt alınıyor ve toksisite gelişmediyse, ishal ortadan kalksa bile tedaviye bir hafta daha devam edilmesinin faydalı olacağı ifade edilmiştir. Nitazoksanid günde 25 mg/kg dozda ve beş gün boyunca uygulandığında ishalde iyileşme gözlemlendiği ancak gastrointestinal kanalı tahriş edici özelliği ve sıklıkla kusmaya neden olmasından dolayı dikkatle kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Scorza ve Tangtrongsup 2010). Etkili bir ilaç ya da aşı bulunana kadar klinisyenlerin uygulayacağı tek yol destekleyici, semptomatik tedavidir (Current ve Navin 1986).

Düşük toksik etkili ve çevre dostu olmaları, geniş bir terapötik potansiyele sahip olmaları, doğada bolca bulunmaları ve ulaşılabilirliğinin kolay olması gibi sebeplerden dolayı cryptosporidiosis tedavisi amacıyla birçok bitki araştırılmıştır. Bu bitkilerin polifenol, flavonoid, antosiyanin, kumarin, tannin ve alkaloid gibi biyoaktif bileşenleri içerdikleri bunlar arasından polifenol içerenlerin diğerlerine göre daha etkili bulunduğu ancak bunu

hangi mekanizma ile yaptığının açıklandığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir. Genel olarak ookist atılımında azalma, histopatolojik ve klinik bulgularda iyileşme ile parazitin gelişiminin engellenmesi gibi etkinliklere sebep olan bitkisel maddeler Çizelge 2.7’de verilmiştir (Namazi ve Razavi 2024).

Çizelge 2. 7. Cryptosporidiosis'e karşı etkinliği araştırılmış bitkiler

Bitkilerin Latince isimleri / Türkçe isimleri		
<i>Allium sativum</i> (sarımsak)	<i>Curcuma longa</i> (zerdeçal)	<i>Punica granatum</i> (nar)
<i>Anethum graveolens</i> (dereotu)	<i>Mangifera indica</i> (mango)	<i>Salvia officinalis</i> (ada çayı)
<i>Artemisia spicigera</i> (bozkıryavşanı)	<i>Moringa oleifera</i> (yaban turbu ağacı)	<i>Silybum marianum</i> (deve diken)
<i>Charcoal containing wood vinegar</i> (odun sirkesi içeren kömür)	<i>Olea europaea</i> (zeytin)	<i>Syzygium aromaticum</i> (karanfil)
<i>Cichorium intybus</i> (beyaz hindiba)	<i>Ficus carica</i> (incir)	<i>Vaccinium myrtillus</i> (yaban mersini)
<i>Citrus maxima</i> (pomelo)	<i>Origanum vulgare</i> (keklik otu)	<i>Zingiber officinale</i> (zencefil)
<i>Citrus sinensis</i> (portakal)	<i>Panax ginseng</i> (Kore ginsengi)	<i>Zygophyllum fabago</i> (yabani kimyon)

2.11. Cryptosporidiosis'te Korunma ve Kontrol

Cryptosporidium'dan korunmada bağışıklığın yüksek tutulması önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda bağırsak mikrobiyotasının *Cryptosporidium* enfeksiyonlarını önlediği bildirilmiştir. Bağışıklığı yeterli de olsa mikroorganizmalardan arındırılmış fareler *Cryptosporidium* spp. ile enfekte edilebilirken, bağışıklığı baskılanmış farelere probiyotik veya anaerobik bakteri florası verilmesi halinde hastalığa direnç gösterdikleri ve ookistlerinin atılımında azalma görüldüğü ifade edilmiştir (Ölmez ve ark 2023). Bağışıklığı baskılanmış farelere günlük *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus* ve *Bifidobacterium bifidum* verilmesi halinde serum antikor düzeyinde artışa paralel olarak parazit sayısında azalma tespit edilmiştir (Sanad ve ark 2015). Bağışıklığı etkilemesi nedeniyle bakım ve besleme şartlarının düzenlenmesi, mikrobiyotanın desteklenmesi açısından doğal probiyotik beslenmenin yanısıra mikrobiyotayı ve dolayısıyla immun sistemi olumsuz etkileyecek antibiyotik ve benzeri ilaçların gelişigüzel kullanılmasının önüne geçilmelidir.

Cryptosporiosis'ten korunmada ve hastalığı kontrol etmede dikkat edilecek en önemli husus ookistlerin çevreye yayılımının önlenmesidir. Ookistler birçok dezenfektana ve çevre koşullarına dirençlidir. Bu sebeple ookistleri yok etmek veya enfektivitesini kaybettirmek için ciddi ısı değerleri ya da kimyasal derişimleri kullanılmalıdır. Ookistlerin 45-55°C'de 20 dakika ısıtılması, -20°C'de 72 saat dondurulması ile enfektivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Aynur 2020). Ookistler üzerinde etkili olan ve en çok kullanılan kimyasal maddeler %2.5'luk sodyum hipoklorit, %5'lik amonyum ve %10'luk formalindir. Bunların dışında etilen oksit, amonyak, metil bromid ve ozon gibi toksik nitelikte ancak yüksek etkili dezenfektanlar da kullanılabilir (Yılmaz 2015, Barlık 2023).

Cryptosporidiosis su kaynaklı salgınlara sebep olduğu için suyun özenli bir şekilde dezenfekte edilmesi büyük salgınlara önüne geçecektir. Bu amaçla kullanılan klor ne yazık ki yetersiz kalmaktadır ancak ultraviyole işlemleri oldukça etkindir. Yine suyun filtrasyonunda çok küçük çapta filtreler kullanılmalıdır zira 1 µm'den daha büyük filtreler kullanıldığında başarısız olunmaktadır (Yılmaz 2015).

Özellikle toplu yaşam alanları olan hastaneler, gündüz bakımevleri, hapishanelerde genel hijyen kurallarına çok daha fazla özenli davranılmalıdır. Tuvalet sonrası, bebek bezi değiştirilince, ishalleri hayvanlara dokunulunca, toprakla herhangi bir sebeple temas ettikten sonra eller düzgünce yıkanmalıdır. İshalleri kişilerin havuz gibi toplu ve eğlence amacıyla

kullanılan sulara en azından ishali geçene kadar girmemesine özen gösterilmelidir. Havuz sularının dezenfeksiyon işlemleri sıkı takip edilmelidir, havuzlarda su yutulmamasına özen gösterilmelidir. Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri ya da meyve sularının tüketilmesinden imtina edilmelidir. Kaynatılmış soğutulmuş suların kullanılması, sebze ve meyvelerin iyice yıkandıktan sonra yenmesi özellikle immunsupresif bireylerde hastalık görülme olasılığını azaltır. Laboratuvarlarda enfekte atıkların uygun bir şekilde uzaklaştırılması sağlanmalıdır (Yılmaz 2015, Aynur 2020).

Kedi ve köpeklere çiğ et yerine pişmiş yiyecekler verilebilir. Dışkı üzerinde gezmiş ve ayaklarına *Cryptosporidium* spp. ookistleri bulaşmış sinek, böcek gibi paratenik konakların kedi-köpek gibi canlılar tarafından mümkün ise yenmelerinin önüne geçilmelidir. Mama ve su kaplarının kaynar su ile temizlenmesi faydalı olacaktır. Toplu yaşam alanlarında eğer imkan dahilinde ise ishali köpekler sağlıklı olan diğer hayvanlardan ayrılmalıdır (Scorza ve Tangtrongsup 2010).

sahipleri, dışkıların ne amaçla kullanılacağına dair sözlü olarak bilgilendirilerek dışkılar gönüllülük esası ile alındı.

Sahipsiz köpeklerin dışkıları Hatay Büyükşehir Belediyesi Sahipsiz Hayvan Bakım ve Rehabilitasyon Merkezi'nden sağlandı. Barınak sorumlu veteriner hekiminden alınan bilgiye göre barınağa getirilen köpekler gerekli işlemleri yapıldıktan sonra tekrar sokak ortamına salınmaktaydı.

Bu çalışmada hayvan barınaklarının yeterli alanı olmadığı için tedavisi yapılan, kısırlaştırılan hayvanların yeniden doğaya salınması dolayısıyla aynı hayvana tekrar ulaşamaması, bazı hayvan sahiplerinin çift örneklemeye izin vermemesi, sarf malzeme ve bütçe sıkıntısı gibi sebeplerden dolayı örnekleme tekrarı yapılamadı.

Dışkı materyali alınan sahipsiz hayvanlardan biri Şekil 3.2'de ve sahipli hayvanlardan ikisi Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. Dışkı materyali alınan sahipsiz hayvanlardan biri



Şekil 3. 3. Dışkı numunesi alınan sahipli hayvanlar

3.3. Dışkı Numunelerinin Alınması

Köpek sahipleri cryptosporidiosis hastalığı hakkında sözlü olarak bilgilendirildi. Hayvanlarına ait dışkı materyalini kullanım izni alındı. Bu amaçla bilgilendirme ve onam formu (Şekil 3.4) imzalatıldı.

HASTA SAHİBİ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1892211701 numaralı Doktora öğrencisi İpek Erdem'in "Hatay Yöresi Köpeklerinde Nested PCR ile *Cryptosporidium* spp. Yaygınlığının Araştırılması" isimli doktora tez çalışmasında; köpeğime hiçbir müdahale yapılmadan, köpeğimin defakasyonu sonucu elde edilen **dışkısının** teşhis ve tedavi yaklaşımı kapsamında kullanılmasına izin veriyorum.

Hasta Sahibi Adı/Soyadı:

İmza:

Tarih:

Şekil 3. 4. Hasta sahibi bilgilendirme ve onam formu

Çalışmada kullanılan dışkı numuneleri, hayvanların gaitalarını yaptıkları an, yerle temas etmeyen kısımlardan, yaklaşık iki ceviz büyüklüğü miktarında, steril dışkı saklama kaplarına alındı. Üzerlerine dışkının alındığı tarih, yer, hayvanın yaşı, cinsiyeti gibi bilgileri içeren etiket yapıştırıldı, ayrıca bütün veriler bilgisayara kaydedildi.

3.4. Hayvanlara Ait Anamnez Bilgileri

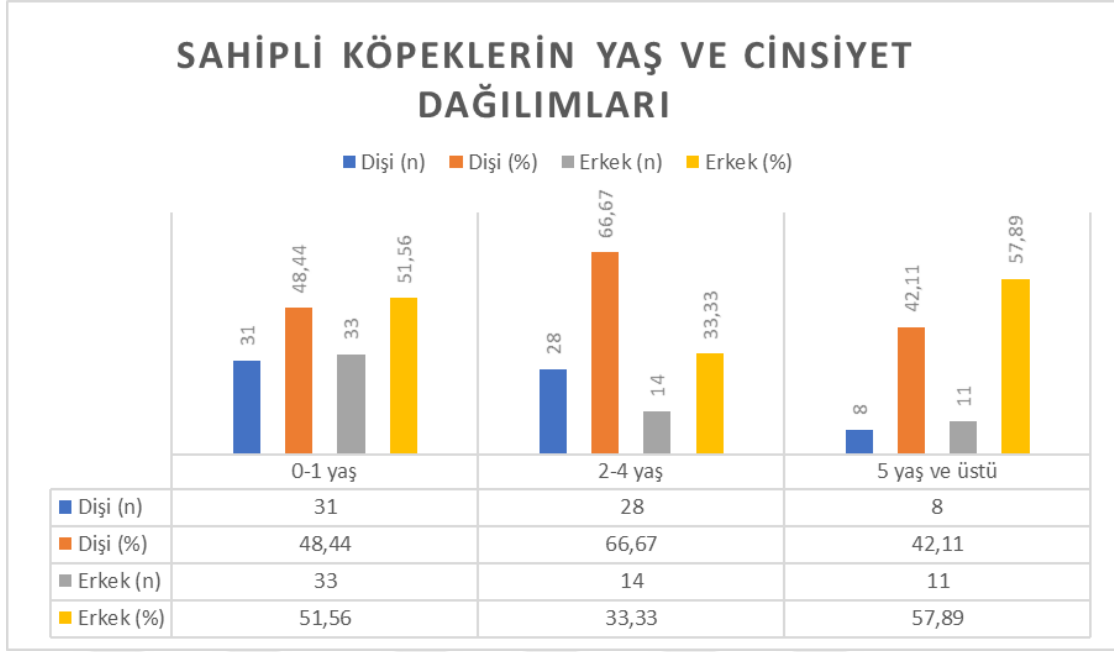
Sahipli hayvanlara ait dışkı örnekleri toplanırken aşağıdaki bilgiler;

- Yaşı (0-1 yaş, 2-4 yaş, 5 yaş ve üstü)
- Cinsiyeti (dişi/erkek)
- Irkı
- Yaşam koşulları (sokakta, evde, evde+bahçede, bahçede)
- İçtikleri suyun kaynağı (şebeke suyu, şebeke suyu+hazır su, arıtma suyu/ hazır su/ damacana)
- Yiyeceklerinin neler olduğu (ev yemeği, mama (kuru/yaş), mama+ev yemeği)
- Bağışıklık sistemini baskılayacak kronik seyirli herhangi bir hastalığın varlığı (Distemper, Parvoviral enterit vb)
- Bağışıklık sistemini baskılayacak bir ilacın kullanılıp/kullanılmadığı (Dekzametazon gibi)
- Klinik olarak semptom görülüp/görülmediği (ishal, halsizlik, iştahsızlık, dehidrasyon, kilo kaybı, kondisyon kaybı, çevreye karşı ilgisizlik, kıl örtüsünde parlaklık kaybı)
- Birlikte seyreden herhangi bir protozoon varlığı (*Giardia* spp. vb)
- Birlikte seyreden herhangi bir helmint varlığı (*Toxocara* spp. vb)

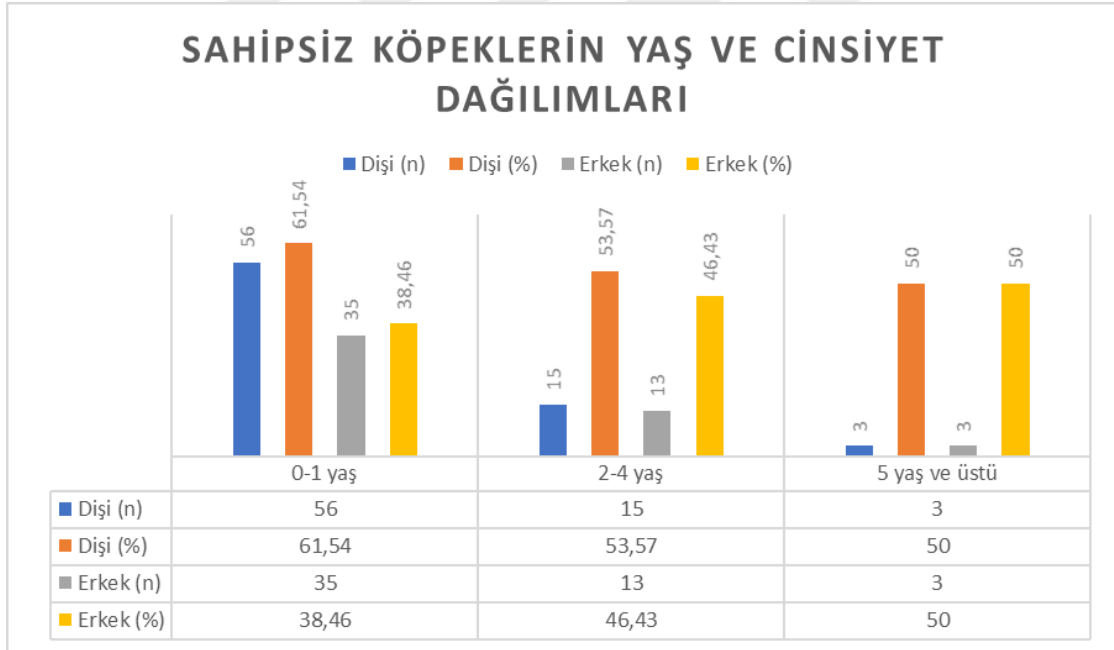
araştırılarak kayıt altına alındı. Sahipsiz hayvanlarda ise ulaşılabilen bilgiler not edildi. Hastalara ait anamnez bilgileri alınırken kullanılan şablon ek-2’de verildi.

3.4.1. Çalışmadaki Köpeklerin Yaş ve Cinsiyet Dağılımları

Çalışmamızda Hatay ilinin çeşitli ilçelerinden 125 sahipli, 125 sahipsiz köpeğe ait dışkı numuneleri kullanıldı. Sahipli köpeklerin 67’si dişi (%53.6), 58’i erkekti (%46.4). Sahipsiz köpeklerin 74’ü dişi (%59.2), 51’i erkekti (%40.8). Toplamda 141’i dişi (%56.4), 109’u erkek (%43.6) idi. Sahipli ve sahipsiz köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımları şekil 3.5 ve şekil 3.6’ da verildi.



Şekil 3. 5. Sahipli köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımları



Şekil 3. 6. Sahipsiz köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımları

3.4.2. Çalışmadaki Köpeklerin ırk Dağılımları

Sahipli ve sahipsiz köpeklerin ırk dağılımları çizelge 3.1 ve çizelge 3.2’ de verildi.

Çizelge 3. 1. Sahipli köpeklerin ırk dağılımları

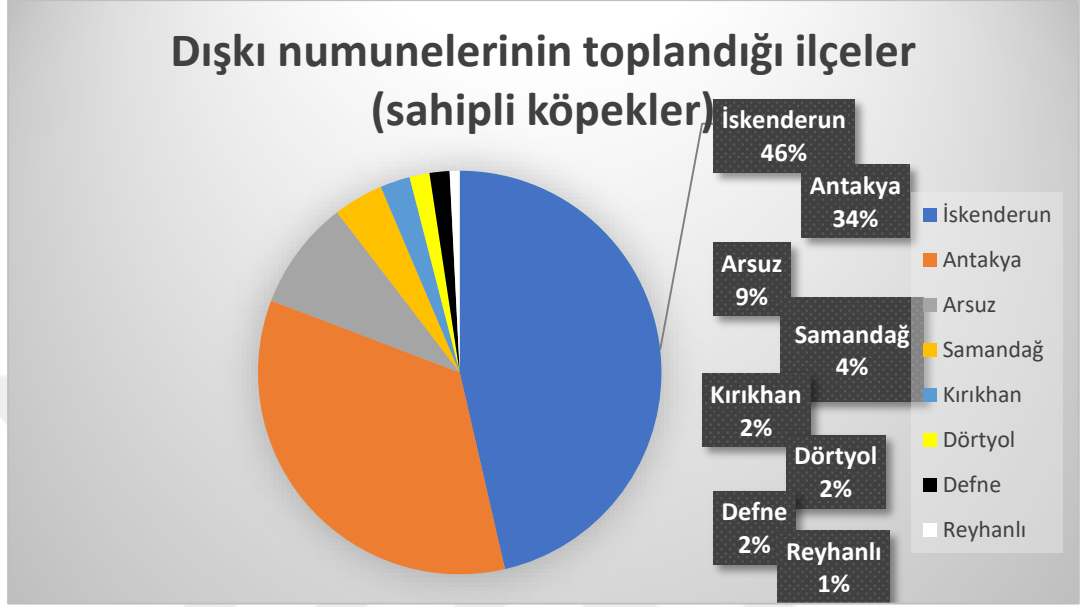
Irklar	Sayıları (n)	Yüzdeleri (%)
Av köpekleri (Kurzhaar, Drahthaar, Kopay, Brittany spaniel, Bloodhound, English setter)	25	20
Melez	24	19.2
Retriever (Labrador, Golden)	18	14.4
Terrier (Mable, Maltese, Havanese, Yorkshire, Cairn)	14	11.2
German Shepherd (Alman Kurdu)	4	3.2
Pitbull	4	3.2
English Pointer	4	3.2
Pincher	3	2.4
Pekingese	3	2.4
Rottweiler	3	2.4
English Cocker Spaniel	3	2.4
Kangal	3	2.4
Dogo Argentino	2	1.6
Doberman	2	1.6
Aksaray Malaklısı	2	1.6
Tibetan Spaniel	1	0.8
Chihuahua	1	0.8
Beagle	1	0.8
Mastiff	1	0.8
Poodle	1	0.8
Pomeranian	1	0.8
Chow chow	1	0.8
Siberian Husky (Sibirya Kurdu)	1	0.8
Malinois (Belçika Kurdu)	1	0.8
Border Collie	1	0.8
Pug	1	0.8
Toplam	125	100

Çizelge 3. 2. Sahipsiz köpeklerin ırk dağılımları

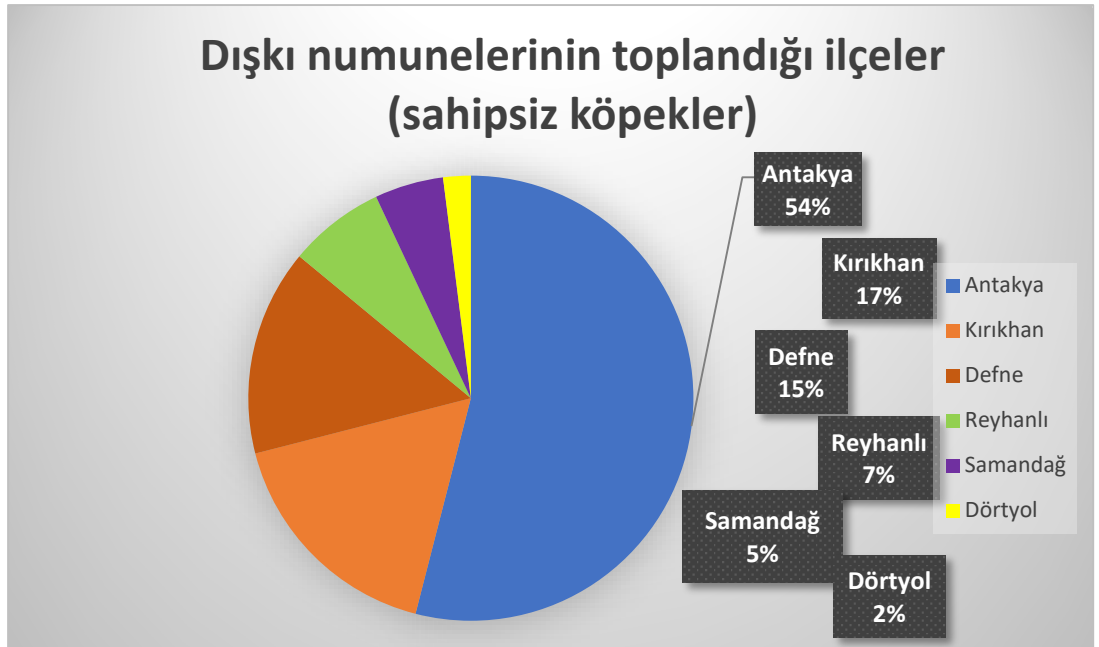
Irklar	Sayıları (n)	Yüzdeleri (%)
Melez	98	78.4
Terrier	11	8.8
Golden Retriever	5	4
German Shepherd (Alman Kurdu)	4	3.2
Siberian Husky (Sibirya Kurdu)	3	2.4
Kangal	2	1.6
Poodle	2	1.6
Toplam	125	100

3.4.3. Dışkı Numunelerinin Toplandığı İlçeler

Sahipli ve sahihsiz köpeklere ait dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler şekil 3.7 ve şekil 3.8’ te verildi.



Şekil 3. 7. Dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler (sahipli köpekler)



Şekil 3. 8. Dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler (sahipsiz köpekler)

3.4.4. Çalışmadaki Köpeklerin Yaşam Koşulları

Sahipsiz hayvanlarının bir kısmı daha önce sahiplenilmiş ve ev ortamında yaşamış olsa da sonrasında sokağa terkedilen ve barınağa getirilen köpekler oldukları için tamamının yaşam koşulları sokak ortamı olarak kaydedildi.

Sahipli hayvanların yaşam koşulları ise evde (tuvalet ihtiyacı dışında sokağa çıkmayanlar), evde ve bahçede (sahiplerinin müstakil evi ya da aile apartmanı olup da hem evde hem de bahçede yaşamalarına izin verilenler), bahçede (sınırları belli olan bir alanda dış ortamda yaşayanlar) şeklinde üç grupta toplandı ve kaydedildi. Sahipli hayvanların yaşam koşulları çizelge 3.3' te verildi.

Çizelge 3. 3. Sahipli hayvanların yaşam koşulları ve sayıca dağılımları

Yaşam Koşulları	Sayıları (n)	Yüzdeleri (%)
Evde	51	40.8
Evde+Bahçede	21	16.8
Bahçede	53	42.4
Toplam	125	100

3.4.5. Çalışmadaki Köpeklerin İçme Suyu Kaynakları

Sahipsiz hayvanların tamamının içme suyu kaynağı şebeke suyu olarak kaydedildi.

Sahipli hayvanlarda içme suyu kaynağı ise üç grupta toplandı. Bunlar sayıları ile beraber çizelge 3.4' te verildi.

Çizelge 3. 4. Sahipli hayvanların içme suyu kaynakları ve oransal dağılımları

İçme Suyu Kaynağı	Sayıları (n)	Yüzdeleri(%)
Şebeke suyu	96	76.8
Şebeke suyu+Hazır Su	3	2.4
Arıtma suyu/Hazır Su/Damacana	26	20.8
Toplam	125	100

3.4.6. Çalışmadaki Köpeklerin Yiyecek Kaynakları

Sahipsiz hayvanların tamamı dışkı numuneleri toplanırken barınakta mama tükettiği için yiyecek kaynakları mama (kuru/yaş) olarak kaydedildi.

Sahipli hayvanların yiyecek kaynakları ve sayıca dağılımları çizelge 3.5' te verildi.

Çizelge 3. 5. Sahipli hayvanların yiyecek kaynakları ve sayıca dağılımları

Yiyecek Kaynağı	Sayıları (n)	Yüzdeleri(%)
Ev yemeği	33	26.4
Mama (kuru/yaş)	68	54.4
Ev yemeği+mama	24	19.2
Toplam	125	100

3.4.7. Çalışmadaki Köpeklerin Bağışıklık Sistemleri ile İlgili Bilgiler

Sahipsiz hayvanlarda bağışıklığı baskılayacak bir hastalığın bilgisine ulaşamadı ancak sekiz hayvanda uyuz hastalığı mevcuttu. Uyuz hastalığı ise daha çok bağışıklık sistemi baskılandığı zaman ortaya çıktığı için bu hayvanlarda en iyi ihtimalle stres olmak üzere immunsupresyondan söz edilebilir. Hayvanlara bağışıklıklarını baskılayacak herhangi bir ilaç verilmediği bilgisi barınak sorumlu veteriner hekiminden alındı. Rutin olarak sestod, nematod ve ektoparazitlere karşı antiparaziter uygulama ve vitamin takviyesi yapıldığı belirtildi.

Sahipli hayvanlardan dördünde TVT (transmissible venereal tumor), dördünde Parvoviral enterit, ikisinde gebelik, birinde Coronavirus enfeksiyonu, birinde Distemper enfeksiyonu gibi bağışıklık sistemini baskılayacak durumlar kayıt altına alındı. Bağışıklık sistemini baskılayacak bir ilaç kullanımı konusunda; kanserli dört köpeğin Vincristine isimli bir kemoterapi ilacı, bir köpeğin de Kenakort adlı bir kortizon kullandığı bilgisi kaydedildi.

3.5. Laboratuvar Muayeneleri

Öncelikli olarak tüm dışkı numuneleri, natif ve flotasyon yöntemi ile direkt mikroskopik muayene ile herhangi bir parazit varlığı yönünden incelendi. Sonrasında dışkı örnekleri Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama yöntemleri ile boyanarak *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden 100'lük objektif altında immersiyon yağı yardımı ile mikroskopta incelendi. En son olarak alınan dışkı örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. İzole DNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldükten sonra her birine nested-PCR işlemi uygulandı. PCR ürünleri jel elektroforez cihazında yürütüldü. Nested-PCR işlemi sonucu pozitif çıkan numuneler sekans analizi için MacroGen şirketine gönderildi.

3.5.1. Dışkının Natif ve Flotasyon Yöntemi ile İncelenmesi

Dışkının Natif Muayenesi: Mercimek büyüklüğünde dışkı numunesi bir lama alındı, üzerine 3-4 damla serum fizyolojik damlatılarak homojen hale getirildi, dışkıdaki kaba partiküller bir kenara itilerek sulu saydam kısma bir lamel kapatıldı ve mikroskopta sırasıyla 4x, 10x ve 40x büyütmelemlerde incelendi.

Flotasyon Yöntemi ile Muayene: Bir ceviz büyüklüğünde dışkı, sert plastik bir kaba alındı üzerine doymuş tuzlu su eklendi. Homojen hale gelen karışım, bir çay süzgeci yardımı ile başka bir kaba süzülerek üzeri, kabın alabileceği maksimum hacme kadar doymuş tuzlu su ile dolduruldu. Suyun yüzeyine en az iki adet lamel atılarak 15-20 dakika parazit yumurta, kist ya da ookistlerinin lamelin yüzeyine yapışması için beklendi. Süre sonunda lamel altındaki damla düşürülmeden bir lam üzerine alındı ve mikroskopta sırasıyla 4x, 10x ve 40x büyütmelemlerde incelendi.

3.5.2. Kinyoun Asit Fast Boyama Yöntemi

Lam üzerine homojen hale getirilmiş dışkı numuneleri bir cam baget yardımıyla dairesel olarak yayıldı ve havada kuruması için 5 dk beklendi. Ardından sırasıyla aşağıdaki aşamalardan geçirildi (Rekha ve ark., 2016).

- Lam, saf metanol ile dolu kap içinde 1 dk bekletildi.
- Kinyoun'un Karbol-fuksin boyası içeren kapta 5 dk bekletildi.
- Çıkartılıp çeşme suyunda yıkandı.
- Ardından %50 eter-alkol karışımı içeren kapta iki tur çalkalanıp çıkarıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- %1'lik sülfirik asit içeren kapta 2 dk bekletildi.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Metilen mavisi içeren kapta 1 dk bekletildi.
- Çeşme suyunda yıkanıp kurutma kağıdına konarak havada kuruması beklendi.
- Mikroskopta 100X büyütmede immersiyan yağı yardımı ile *Cryptosporidium* spp. ookistleri yönünden incelendi.

3.5.3. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi

Dışkıyı ince bir tabaka halinde lama yaydıktan sonra havada kuruması için 5 dk beklendi. Ardından sırasıyla aşağıdaki aşamalardan geçirildi (Rekha ve ark. 2016).

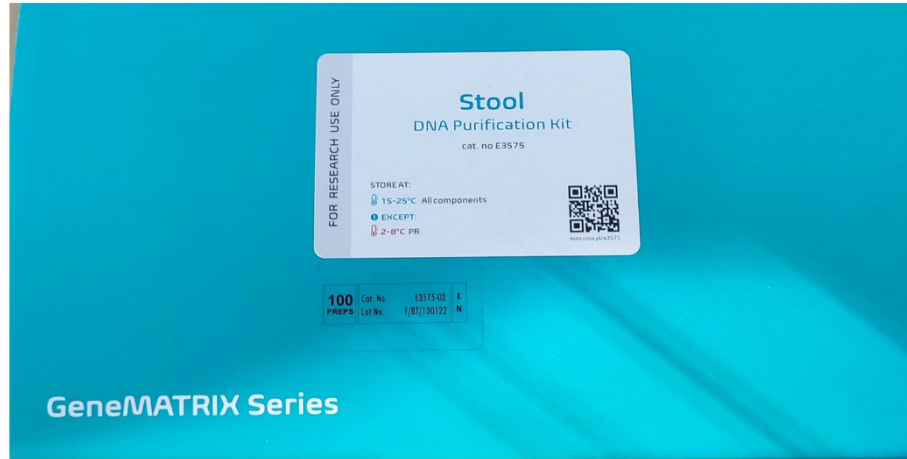
- Laminın arka yüzeyi bunzen beki alevinden hızlıca bir kere geçirilip sabitleme işlemi yapıldı.
- %3 HCl+%100 metanol olan asit alkol karışımında 3-5 dk bekletildi.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Lam düz bir ızgaraya yerleştirildi. Üzeri %1'lik sıvı safranin ile kaplandı. Eş zamanlı olarak lam alt kısmından 1 dk boyunca ısıtıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Lam düz bir ızgaraya yerleştirildi. Üzeri %1'lik metilen mavisi ile kaplandı. 30 sn bekletildi.
- Çeşme suyunda yıkandı, havada kurutuldu.
- Mikroskopta 100X büyütmede immersiyon yağı yardımı ile *Cryptosporidium* spp. oookistleri yönünden incelendi.

3.5.4. Dışkı Numunelerinden DNA İzolasyonu

Dışkı numunelerinden DNA izolasyonu için, ticari bir firmanın dışkıdan DNA izolasyonu için uygun olan kiti (GeneMATRIX stool DNA Purification Kit, cat. no. E3575) (Şekil 3.9) kullanıldı ve onun prosedürü uygulandı. Buna göre sırasıyla şu adımlar izlendi;

- İzolasyon prosedüre başlamadan en az 10 dk önce *DNA binding spin-column* (DNA bağlama spin kolonu) 30 µl *Buffer ST* ile ıslatıldı.
- *Bead tube* (boncuklu tüp) içine bir cam baget ile karıştırılarak iyice homojen hale getirilmiş dışkı numunesinden 200 mg tartılarak eklendi.
- Dışkı tüpün duvarlarından ayrılıp boncuklu solüsyon içinde asılı kalana kadar *Bead tube* bir vortex yardımıyla en yüksek ayarda çalkalandı.
- 37 °C su banyosunda bekletilen *Lyse ST buffer* solüsyonundan 60 µl, *Bead tube* içine eklendi.
- *Bead tube* 70 °C'ye ayarlanmış etüvde 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- *Bead tube* bir hücre parçalayıcıya (cell disrupter) yerleştirilip 10 dk boyunca horizontal olarak çalkalandı.

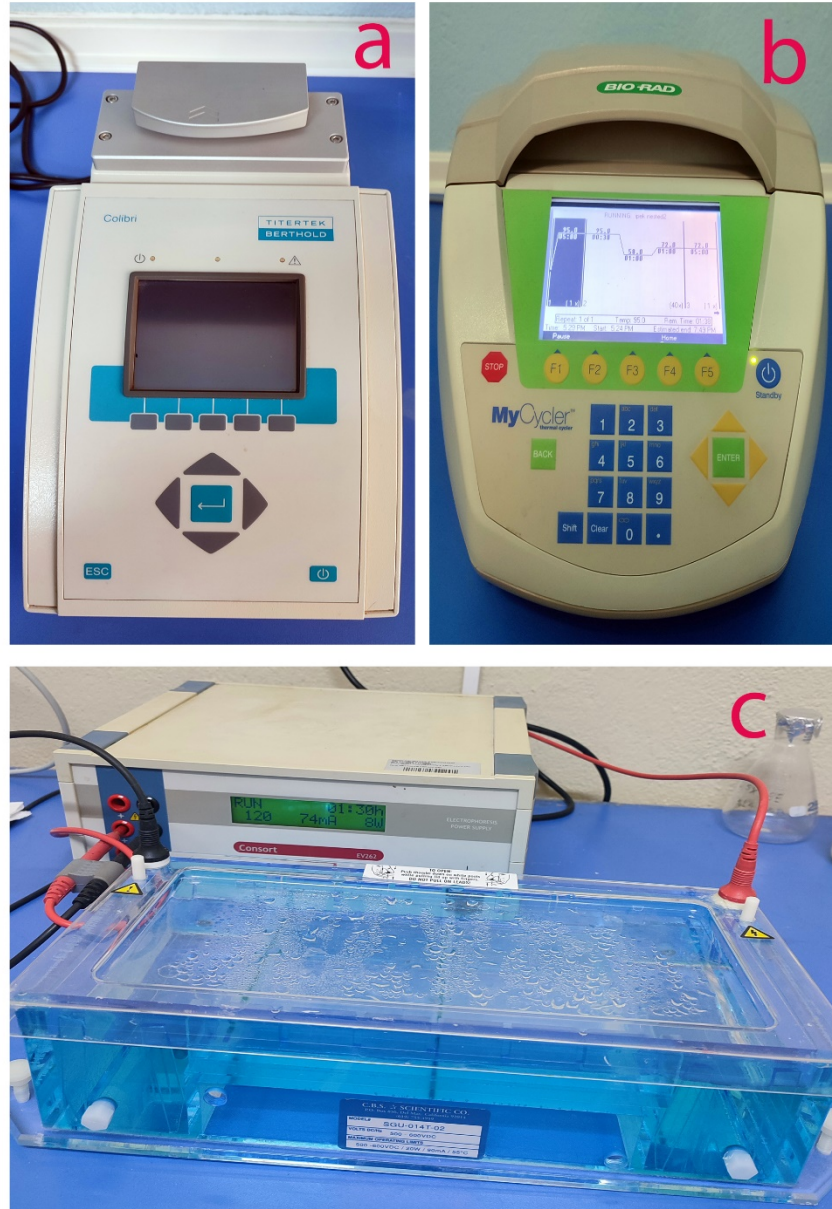
- *Bead tube* 12000 g'de 2 dk santrifüj edildi ve süre sonunda 400 µl süpernatant, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Süpernatant üzerine 400 µl *PR buffer* eklendi 5 saniye vorteks ile çalkalandıktan sonra 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi. 550 µl süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 650 µl *Sol ST buffer* ve 400 µl %99.9'luk etanol eklendi. Birkaç kez vorteks ile çalkalama yapıldı.
- Oluşan karışımdan 600 µl *DNA binding spin column* tüpüne aktarıldı. 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Spin column çıkarıldı, alta süzülen sıvı çöpe dökülerek toplama tüpü yeniden spin column'a takıldı ve bir önceki basamak tekrar edildi.
- Kalan karışım spin column'a transfer edildi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Alta süzülen sıvı dökülüp toplama tüpü yeniden spin column'a takıldı.
- 500 µl *Wash STX buffer* eklendi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin column çıkarıldı alta süzülen sıvı dökülüp toplama tüpü yeniden takıldı.
- Bir önceki basamak tekrarlandı.
- Hiçbir solüsyon eklemenden 11000 g'de 1 dk santrifüj işleminden sonra alttaki toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte çöpe atılarak spin column'a yeni bir toplama tüpü takıldı.
- 80 °C'de ısıtılıp etkisi artırılan *Elution buffer*'dan 50 µl spin column'a eklendi.
- Spin column/toplama tüpü oda ısısında 2 dk inkübe edildi.
- 11000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Spin column çıkarılıp atıldı. Toplama tüpüne biriken 50 µl DNA, nested PCR analizi için -20 °C' de saklandı.



Şekil 3. 9. DNA izolasyon kiti

3.5.5. İzole Edilen DNA'ların Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Elde edilen DNA'ların 2 µl'si "Colibri Microvolume Spectro" (Şekil 3.10.a) cihazına kondu ve konsantrasyonları ölçüldü. Elde edilen veriler not edildi. Bu sayede düşük DNA konsantrasyonuna sahip örnekler ile çalışırken PCR karışımına ilave edilen DNA miktarı hacim olarak artırılıp metotda kalibrasyon sağlandı.



Şekil 3. 10. a) Nanodrop cihazı, b) PCR cihazı, c) Jel elektroforez cihazı

3.5.6. Nested-PCR Yöntemi

Bu yöntem için *Cryptosporidium* türlerinin SSU rRNA kodlayan DNA bölgesinden 1325 bp (base pair, baz çifti) uzunluğundaki DNA parçasını amplifiye eden primerler kullanıldı (Xiao ve ark. 2001). Primerlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir;

Birinci PCR reaksiyonu için ;

Forward (F1) primer dizilimi: 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

Reverse (R1) primer dizilimi: 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'

İkinci PCR reaksiyonu için;

Forward (F2) primer dizilimi: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

Reverse (R2) primer dizilimi: 5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'.

PCR işlemi için “FIREPol® Master Mix Ready to Load” kullanıldı.

Birinci PCR karışımı (her bir örnek için) şu oranlarda hazırlandı: (Çizelge 3.6)

Çizelge 3. 6. Birinci PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşenin adı	Eklenen miktar (µl)
Master Mix	4
F1 Primer	0.5
R1 Primer	0.5
DNaz ve RNaz içermeyen su	10
İzole DNA	5
Toplam	20

İkinci PCR karışımı (her bir örnek için) şu oranlarda hazırlandı: (Çizelge 3.7)

Çizelge 3. 7. İkinci PCR amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşenin adı	Eklenen miktar (µl)
Master Mix	4
F2 Primer	0.5
R2 Primer	0.5
DNaz ve RNaz içermeyen su	10
Birinci PCR reaksiyon ürünü	5
Toplam	20

Her iki PCR aşaması için de 20 µl karışım hazırlandı.

Birinci PCR reaksiyonunda 95 °C’de 5 dk ön denatürasyon aşamasından sonra, 95 °C’de 30 sn, 58 °C’de 1 dk, 72 °C’de 1 dk şeklinde toplamda 25 döngü yapıldı. Son döngüyü takiben 72 °C’de 5 dk ekstensiyon (son uzama) aşaması uygulandı. İkinci PCR reaksiyonu da aynı şartlarda, ancak 40 döngü şeklinde yapıldı. Nested PCR protokol aşamaları Çizelge 3.8’ de, kullanılan PCR cihazı (reaksiyon sırasında) Şekil 3.10.b’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 8. Nested-PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü (1. PCR aşaması için)	Döngü (2. PCR aşaması için)
Ön denatürasyon	95	5 dk	1	1
Denatürasyon	95	30 sn	25	40
Bağlanma	58	1 dk		
Uzama	72	1 dk		
Son uzama	72	5 dk	1	1

3.5.7. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

Yürütmede kullanılacak agaroz jel %1 oranında hazırlandı. Yükleme boyası (Gel Loading Dye, Purple (6X)) ve PCR ürünü eşit oranda (5’er µl) karıştırılıp, karışımdan 10 µl jele yüklendi. Jel elektroforez cihazında (Şekil 3.10.c) 120 V’da 1.5 saat yürütüldü. Süre sonunda jel tanktan çıkarılarak translüminatörde, UV ışık altında görüntülendi. Elde edilen jel görüntüleri fotoğraflandı. Pozitif bant veren numunelere ait PCR ürünleri tür tespiti için sekans analizine gönderildi.

3.6. Sekans Analizi

PCR amplifikasyonu sonunda 826-864 bp’lik bölgede bant veren üç PCR ürünü pozitif kabul edildi ve Macrogen firmasına gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı. Sekans analizinde Sanger Metodu tercih edildi. Sekans analizi için firmaya PCR ürünlerinden 20 µl her bir örnek için F2 ve R2 primerlerinden 10 pmol/µl konsantrasyonda 5 µl primer gönderildi.

Sekans analiz sonuçları elde edildikten sonra www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST adresinde blastlama işlemi yapılarak *Cryptosporidium* türleri belirlendi. Genbank’taki referans türlerin dizi analizleri karşılaştırıldıktan sonra raporlamalar yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen kategorik değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak, frekans (n) ve yüzde (%) şeklinde ifade edildi. *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için, gözelerdeki beklenen frekansların değeri ve dağılımı ile tablo büyüklükleri dikkate alınarak, rxc ve 2x2 tablolar için sırasıyla Fisher-Freeman-Halton ve Fisher exact testlerinden yararlanıldı. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda $p < 0.05$ kriteri kullanıldı. İstatistik analizler için SPSS 26 paket programı kullanıldı.

3.8. Etik Kurul Bilgileri

Bu tez çalışması; 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı resmi gazetede yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğinin 2. Maddesi 2. Fıkrası gereği yönetmelik kapsamı dışında bırakılan deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını içeren çalışmalar kapsamında değerlendirildiğinden ve aynı yönetmeliğin 8. Maddesi K bendinin 1. Fıkrası “*Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar*” kısmında HADYEK iznine gerek olmadığı belirtilmiş olup HMKÜ HADYEK’in 2021/06-16 sayılı ve 20.10.2021 tarihli yazısı kapsamında yürütülmüştür.

4. BULGULAR

Çalışmamızda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun en belirgin semptomu olan ishal, sahihsiz hayvanların 30'unda (%24), sahipli hayvanların ise 19'unda (%15.2) olmak üzere toplamda 49 köpekte (%19.6) kayıt altına alındı.

Dışkının natif ve flotasyon yöntemleri ile incelenmesi sonucunda 250 köpeğin 66'sı (%26.4) helmint veya protozoonlar yönünden pozitif bulundu. Bu oran sahipli köpeklerde %22.4 (28/125) ve sahihsiz köpeklerde %30.4 (38/125) olarak tespit edildi.

4.1. Sahipli köpeklerde tespit edilen protozoon ve helmintler

Sahipli köpeklerde protozoon parazitlerden *Giardia* spp. kistlerine %10.4 (13/125), *Cystoisospora* (*Isospora*) *canis* ookistlerine %1.6 (2/125) (şekil 4.2), trikomonad kamçılılarına (*Pentatrichomonas hominis*, *Tritrichomonas foetus* gibi) %0.8 (1/125) oranında rastlandı (Çizelge 4.1). Helmintlerden *Toxocara canis* %5.6 (7/125) (şekil 4.3), *Trichuris vulpis* %2.4 (3/125) (şekil 4.4), *Ancylostoma* spp. %1.6 (2/125) (şekil 4.5) yumurtalarına rastlandı (Çizelge 4.2).

4.2. Sahipsiz köpeklerde tespit edilen protozoon ve helmintler

Sahipsiz köpeklerde protozoon parazitlerden *Cystoisospora canis* ookistlerine %8.8 (11/125) (şekil 4.2) *Giardia* spp. kistlerine %2.4 (3/125), trikomonad kamçılılarına %1.6 (2/125) oranında rastlandı (Çizelge 4.1). Helmintlerden *Toxocara canis* %14.4 (18/125) (şekil 4.3), *Ancylostoma* spp. %3.2 (4/125) (şekil 4.5), yumurtalarına rastlandı (Çizelge 4.2). Ayrıca altı köpeğin (%4.8) dışkısında erişkin halde *Dipylidium caninum* halkaları görüldü, teşhis halkaların birkaçının ezilmesi ve *D. caninum* yumurtalarının görülmesi ile kondu (Şekil 4.1).

4.3. Köpeklerde tespit edilen ikili miks enfeksiyonlar

Sahipli köpeklerin üçünde (%2.4), sahihsizlerin ise altısında (%4.8) ikili miks enfeksiyon tespit edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 1. Köpeklerde tespit edilen protozoon parazitler, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%)

	<i>Giardia</i> spp.		<i>Cystoisospora canis</i>		Trikomonad kamçılılar	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Sahipli köpekler (n=125)	13	10.4	2	1.6	1	0.8
Sahipsiz köpekler (n=125)	3	2.4	11	8.8	2	1.6
Toplam (n=250)	16	6.4	13	5.2	3	1.2

Çizelge 4. 2. Köpeklerde tespit edilen helmintler, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%)

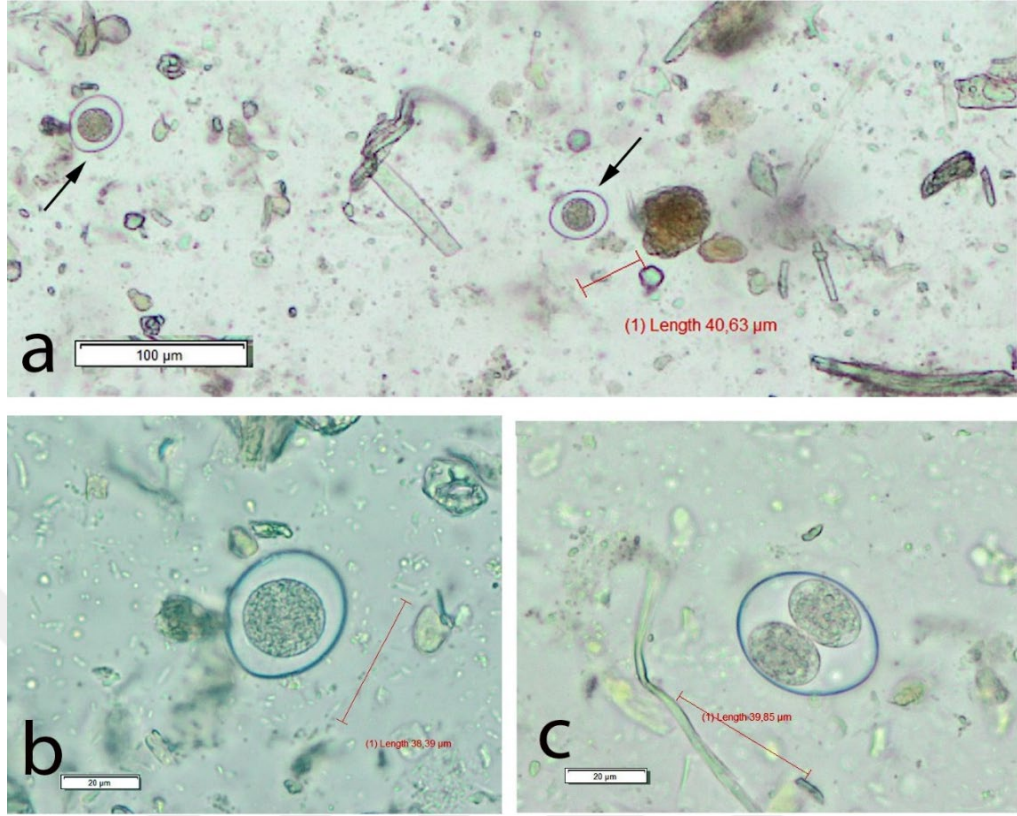
	<i>Toxocara canis</i>		<i>Trichuris vulpis</i>		<i>Ancylostoma</i> spp.		<i>Dipylidium caninum</i>	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Sahipli köpekler (n=125)	7	5.6	3	2.4	2	1.6	-	-
Sahipsiz köpekler (n=125)	18	14.4	-	-	4	3.2	6	4.8
Toplam (n=250)	25	10	3	1.2	6	2.4	6	2.4

Çizelge 4. 3. Köpeklerde tespit edilen ikili miks enfeksiyonlar, parazit teşhisi yapılan köpek sayısı (n) ve enfeksiyon oranı (%)

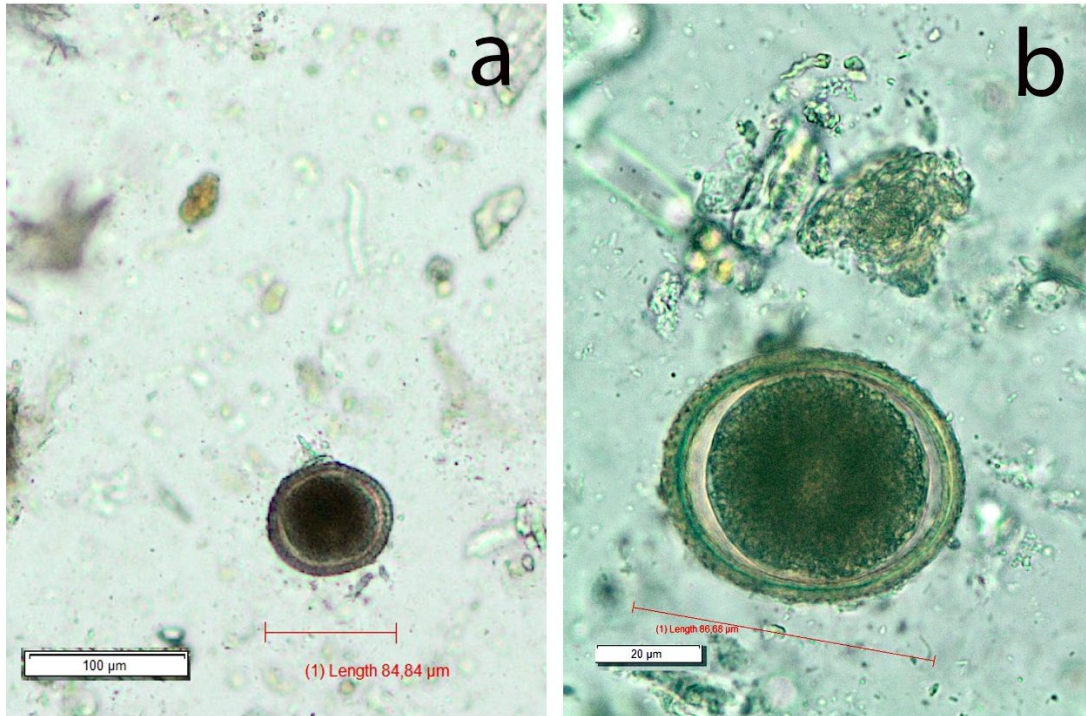
	<i>Toxocara canis</i> + <i>Ancylostoma</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.+ <i>Trichuris vulpis</i>		<i>Giardia</i> spp.+ <i>Toxocara canis</i>		<i>Cystoisospora</i> <i>canis</i> + <i>Toxocara canis</i>	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Sahipli köpekler (n=125)	1	0.8	1	0.8	1	0.8	-	0
Sahipsiz köpekler (n=125)	3	2.4	-	0	1	0.8	2	1.6
Toplam (n=250)	4	1.6	1	0.4	2	0.8	2	0.8



Şekil 4. 1. Erişkin *Dipylidium caninum* halkaları, orijinal



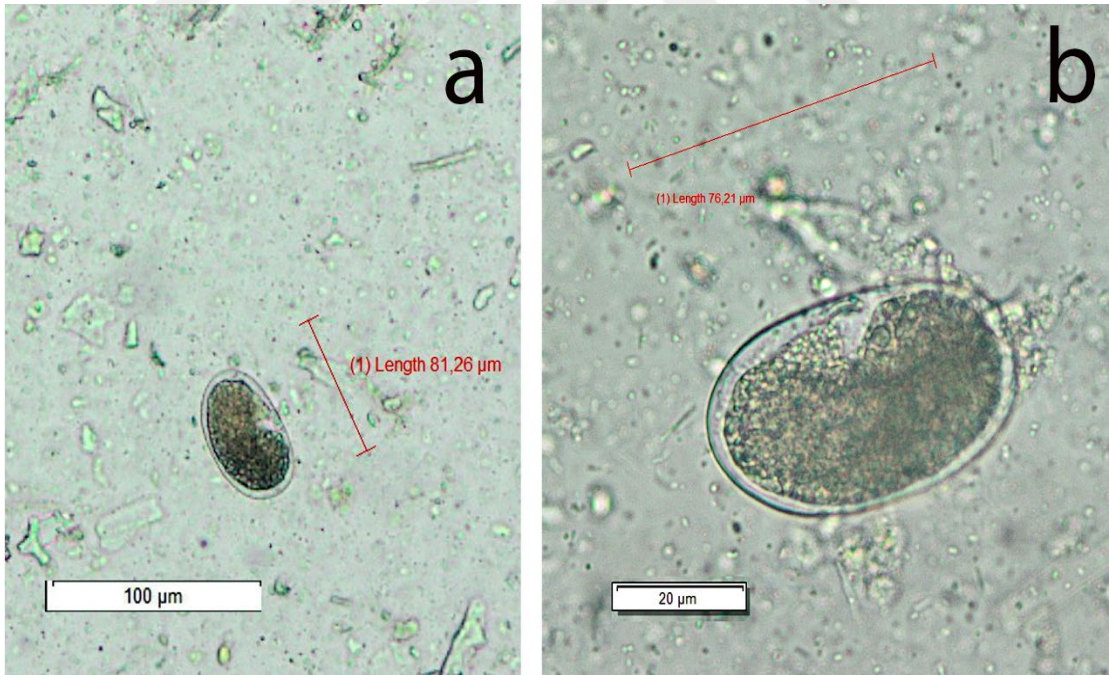
Şekil 4. 2. *Cystoisospora canis* ookisti, orijinal a) 10X büyütme, sporlanmamış ookist b) 40X büyütme, sporlanmamış ookist c) 40X büyütme, sporlanmış ookist



Şekil 4. 3. *Toxocara canis* yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme

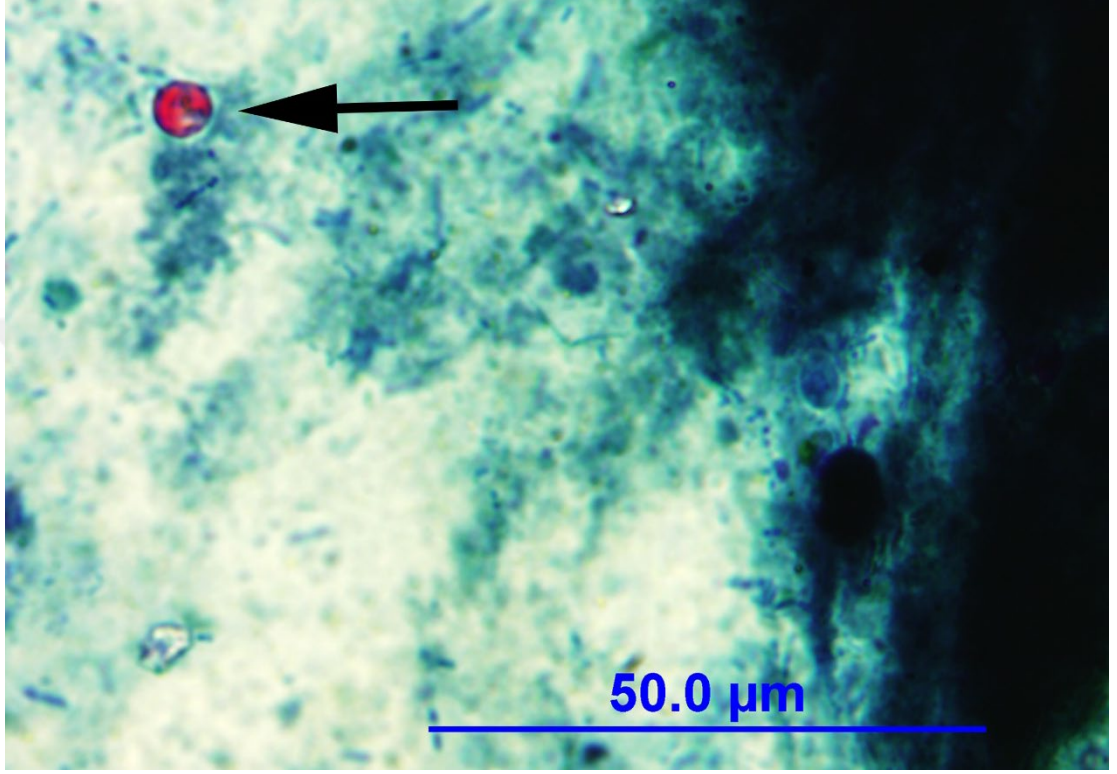


Şekil 4. 4. *Trichuris vulpis* yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme

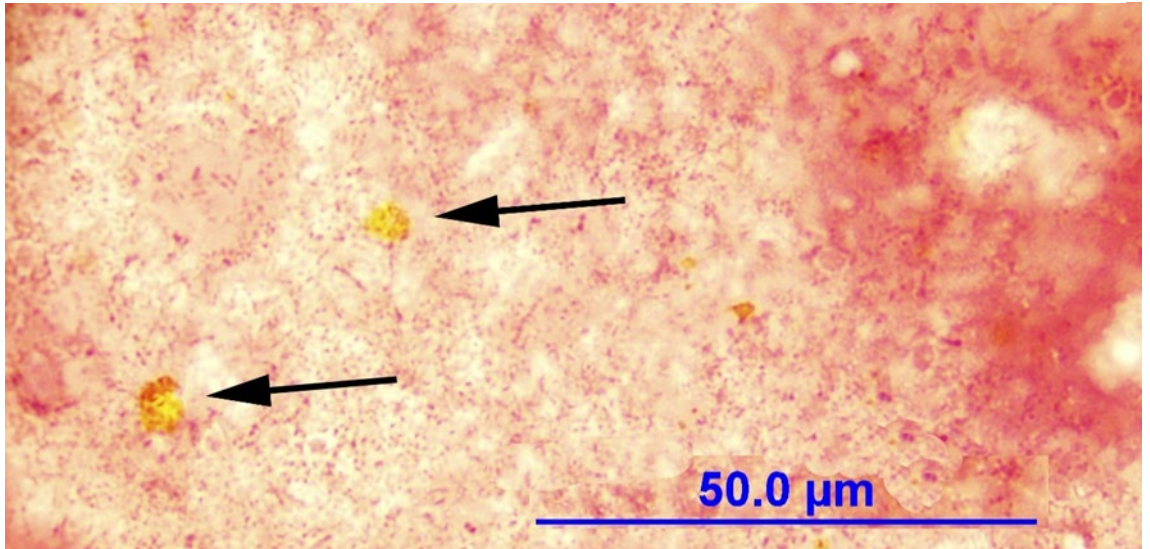


Şekil 4. 5. *Ancylostoma* spp. yumurtası, orijinal a) 10X büyütme, b) 40X büyütme

Tüm dışkı örnekleri Kinyoun asit fast (şekil 4.6) ve safranin-metilen mavisi (şekil 4.7) boyama yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp. ookistlerini teşhis amacıyla boyandı. Her iki boyama yönteminde de aynı numaralı numune (sahipli hayvanlara ait numunelerden 65 nolu örnek) olmak üzere %0.4 (1/250) pozitiflik saptandı.

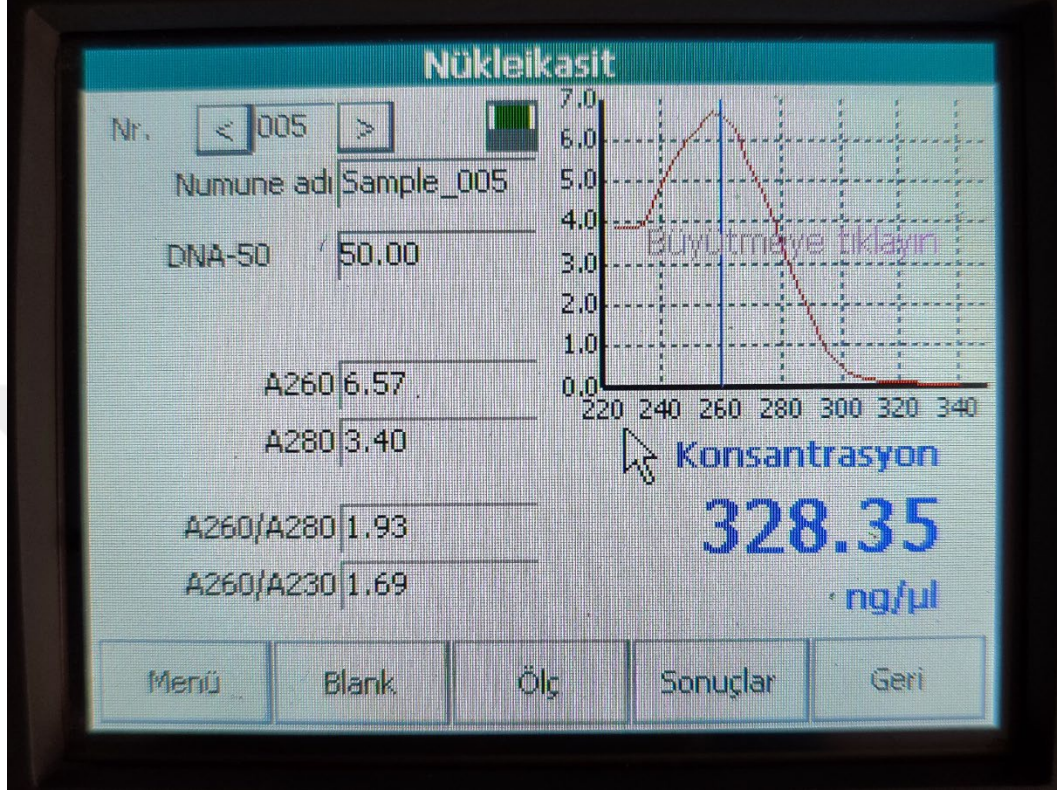


Şekil 4. 6. Kinyoun asit fast boyama yöntemi sonucu teşhis edilen *Cryptosporidium* spp. ookisti, orijinal



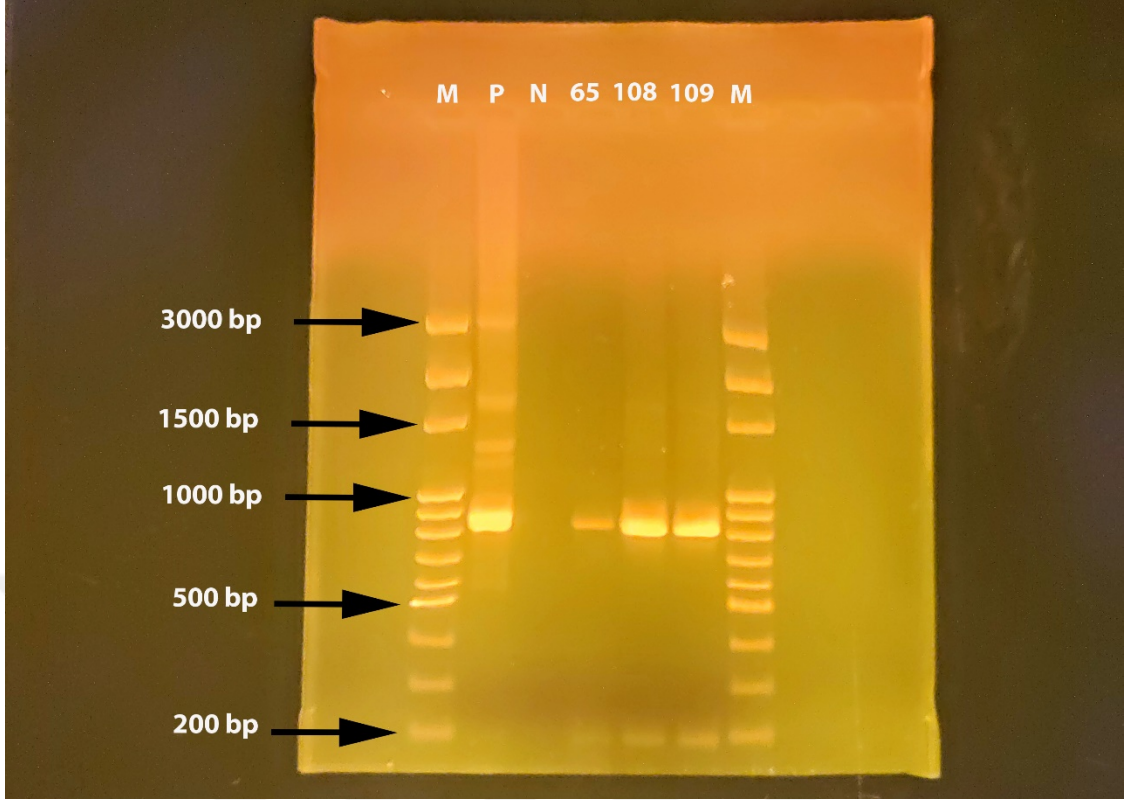
Şekil 4. 7. Safranin metilen mavisi boyama sonucu teşhis edilen *Cryptosporidium* spp. ookistleri, orijinal

Boyama yöntemlerinden sonra her bir numuneden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık değerleri ölçüldü, kayıt altına alındı (Ek-1). (Şekil 4.8)



Şekil 4. 8. DNA konsantrasyon ve saflık ölçümü yapılan örneklerden biri, orijinal

DNA konsantrasyon ve saflık değerleri ölçümünden sonra tüm örnekler nested-PCR uygulandı. Daha önceden *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiş buzağı dışkısı pozitif kontrol, ultra saf su ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Sahipli hayvanlardan bir (%0.8) ve sahipsiz hayvanlardan iki (%1.6) olmak üzere toplam üç örnek (%1.2) *Cryptosporidium* spp. yönünden pozitif bulundu. Pozitif örnekler ait jel görüntüsü şekil 4.9' da verildi.

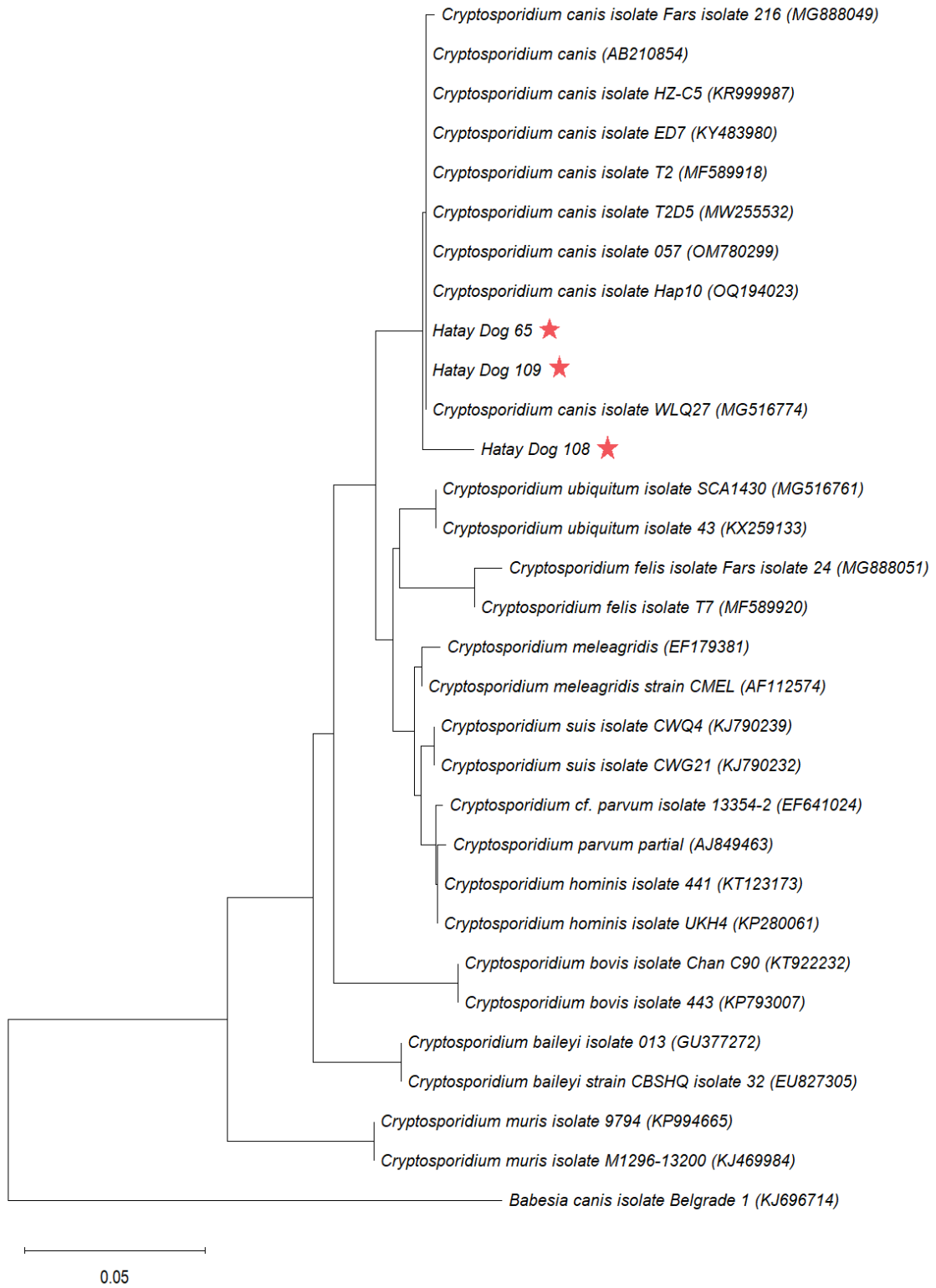


Şekil 4. 9. Nested PCR ile pozitif bulunan örneklerin jel görüntüsü, orijinal

M: Marker; P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol; 65, 108, 109: Çalışmada pozitif çıkan numuneler

PCR amplifikasyonu sonunda 826-864 bp'lık bölgede bant veren üç PCR ürünü pozitif kabul edildi ve Macrogen firmasına gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi yaptırıldı. Sekans analiz sonuçları elde edildikten sonra www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST adresinde blastlama işlemi yapılarak üç PCR ürünü de *Cryptosporidium canis* olarak belirlendi.

MEGA 11 software programı kullanılarak genetik yakınlık ilişkisini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4. 10). *Cryptosporidium* spp. izolatları'nın filogenetik ilişkileri SSU rRNA gen bölgesi baz alınarak Neighbor-Joining metodu ile belirlendi. Bootstrap değeri 1000 tekrar idi. *Babesia canis* dış grup olarak kullanıldı. Bu çalışmada pozitif bulunan örnekler kırmızı yıldız ile işaretlendi.



Şekil 4. 10. Pozitif numunelerin filogenetik ağaç görüntüsü, orijinal

★ Bu çalışmada pozitif bulunan örnekler

Bu çalışmada elde edilen pozitif örnekler filogenetik ağaçta *C. canis* ile aynı kümede yer aldı. NCBI genbanktan elde edilen bazı *C. canis* izolatları ile bizim çalışmamızda pozitif bulunan numuneler arasında %93.93-%100 oranında benzerlik tespit edildi. İzolatlar a ait ülke ve çalışmamızdaki numuneler arasındaki benzerlik oranları çizelge 4.4' te verildi.

Çizelge 4. 4. NCBI genbanktan elde edilen *C.canis* izolatları ile bu çalışmadaki pozitif numuneler arasındaki benzerlik oranları

Pozitif numune numarası	NCBI genbanktan elde edilen bazı <i>C. canis</i> izolatlarının bildirildiği ülkeler	NCBI genbanktan elde edilen bazı <i>C. canis</i> izolatlarının erişim kodu	Çalışmamızdaki numuneler ile NCBI genbanktaki izolatlar arasındaki benzerlik oranı (%)
65	İran	MG888049	99.13
	Japonya	AB210854	97.79
	Çin	KR999987	100
	İspanya	KY483980	100
	Brezilya	MF589918	100
	Tayland	MW255532	100
	Almanya	OM780299	100
	Ürdün	OQ194023	100
	Avustralya	MG516774	97.79
108	İran	MG888049	93.14
	Japonya	AB210854	93.93
	Çin	KR999987	93.93
	İspanya	KY483980	93.93
	Brezilya	MF589918	93.93
	Tayland	MW255532	93.93
	Almanya	OM780299	93.93
	Ürdün	OQ194023	93.93
	Avustralya	MG516774	95.49
109	İran	MG888049	96.74
	Japonya	AB210854	96.38
	Çin	KR999987	96.58
	İspanya	KY483980	96.70
	Brezilya	MF589918	96.41
	Tayland	MW255532	96.49
	Almanya	OM780299	96.61
	Ürdün	OQ194023	97.49
	Avustralya	MG516774	97.92

Pozitif numunelere ait bazı bilgiler çizelge 4.5’ te verildi.

Çizelge 4. 5. Pozitif numunelerin sahipli/sahipsiz olma durumu, cinsiyet, yaş, ishal varlığı, birlikte seyreden parazit enfeksiyonu, boyama yöntemine göre sonuçları, sekans analiz sonucu

Pozitif numune numarası	Sahipli	Sahipsiz	Cinsiyet		Yaş			İshal		Birlikte seyreden parazit enfeksiyonu	Boyama sonucunda <i>Cryptosporidium</i> spp. ookist varlığı (✓/-)		Sekans analizinde tespit edilen <i>Cryptosporidium</i> türü
			♀	♂	0-1 yaş	2-4 yaş	5 ≥	Var	Yok		Kinyoun asit fast	Safranin-metilen mavisi	
65	✓	-	✓	-	-	✓	-	-	✓	<i>Giardia</i> spp.	✓	✓	<i>C. canis</i>
108	-	✓	✓	-	✓	-	-	✓	-	-	-	-	<i>C. canis</i>
109	-	✓	-	✓	✓	-	-	-	✓	-	-	-	<i>C. canis</i>

Cryptosporidium enfeksiyonu görülme durumu ile konağa ait faktörler arasındaki ilişki istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6’da verilmiştir. Çizelge 4.6 incelendiğinde, enfeksiyonun görülme durumuna istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde etkili olabilecek bir faktöre rastlanmamıştır ($p>0.05$).

Cryptosporidium enfeksiyonu ile teşhis metodu ve dışkı numunelerin toplandığı ilçeler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları çizelge 4.7’ de verildi.

Çizelge 4. 6. *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile konağa ait faktörler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları

Konak faktörleri		Taranan köpek sayısı (n=250)	<i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif numune sayısı (n=3) (%)	P değeri	Anlamlı Bir İlişki (Var/Yok)
Yaş	0-1 yaş	155	2 (1.3)	1.000	Yok
	2-4 yaş	70	1 (1.4)		
	≥ 5 yaş	25	0 (0.0)		
Cinsiyet	Erkek	109	1 (0.9)	1.000	Yok
	Dişi	141	2 (1.4)		
İrk	Av köpekleri	25	1 (0.4)	0.727	Yok
	Melez	122	2 (1.6)		
	Terrier	25	0 (0.0)		
	Retriever	23	0 (0.0)		
	Diğer	55	0 (0.0)		
Yaşam koşulları	Sokakta	125	2 (1.6)	1.000	Yok
	Evde	51	0 (0.0)		
	Evde+bahçede	21	0 (0.0)		
	Bahçede	53	1 (1.9)		
İçtikleri suyun kaynağı	Şebeke suyu	221	3 (1.4)	1.000	Yok
	Şebeke suyu+hazır su	3	0 (0.0)		
	Hazır su	26	0 (0.0)		

Çizelge 4. 7. devam *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile konağa ait faktörler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları

Yiyeceklerinin kaynağı	Ev yemeği	33	1 (3.0)	0.542	Yok
	Mama	193	2 (1.0)		
	Mama+ev yemeği	24	0 (0.0)		
Bağışıklık sistemini baskılayacak hastalık varlığı	Var	20	0 (0.0)	1.000	Yok
	Yok	230	3 (1.3)		
Bağışıklık sistemini baskılayacak bir ilaç kullanımı	Var	5	0 (0.0)	1.000	Yok
	Yok	245	3 (1.2)		
İshal varlığı	Var	49	1 (2.0)	0.482	Yok
	Yok	201	2 (1.0)		
Birlikte seyreden paraziter bir hastalık olup olmadığı	Var	66	1 (1.5)	1.000	Yok
	Yok	184	2 (1.1)		
Sahipli olup olmama durumu	Sahipli	125	1 (0.8)	1.000	Yok
	Sahipsiz	125	2 (1.6)		

Çizelge 4. 8. *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile teşhis metodu ve dışkı numunelerin toplandığı ilçeler arasındaki istatistiksel analiz sonuçları

Numunelere uygulanan teşhis metotları ve toplandıkları ilçeler		Taranan köpek sayısı (n=250)	<i>Cryptosporidium</i> spp. pozitif numune sayısı (n=3) (%)	P değeri	Anlamlı Bir İlişki (Var/Yok)
<i>Cryptosporidium</i> spp. teşhis metodu	Boyama	250	1 (0.4)	0.623	Yok
	Moleküler	250	3 (1.2)		
Dışkı numunelerinin toplandığı ilçeler	Antakya	110	1 (0.9)	0.710	Yok
	İskenderun	58	1 (1.2)		
	Kırıkhan	24	1 (4.2)		
	Defne	21	0		
	Samandağ	12	0		
	Arsuz	11	0		
	Reyhanlı	10	0		
	Dört Yol	4	0		

5. TARTIŞMA

İnsanlar da dahil pek çok memeli, kanatlı ve sürüngen hayvanda görülen cryptosporidiosis ishalele karakterize, gastrointestinal sistemi etkileyen zoonoz nitelikte bir hastalıktır (Öner 2019, Ayan ve Orunç Kılınç 2020).

Günümüzde kedi ve köpek gibi pet hayvanları, insanlarla oldukça yakın ilişki kurmaktadır. Bu durumda insanların zoonotik hastalıklara maruz kalması onlar için önemli risk faktörleri arasındadır. Bundan dolayıdır ki özellikle zoonoz hastalıklara neden olan etkenlerin teşhis edilmesi, hastalığın kontrol altına alınması, hastalık etkenlerinin çevreyi kirletmesinin önüne geçilmesi, böylelikle insanlara ve diğer hayvanlara bu ajanın bulaşma riskinin azaltılması bir hayli önemlidir (Alves ve ark. 2018).

Cryptosporidiosis genel olarak mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemler ile teşhis edilirler. Boyama yöntemleri ucuz ve hızlı olması nedeniyle genellikle laboratuvarlarda rutin teşhis metodu olarak kullanılmaktadır. Serolojik teşhis yöntemlerinin, mikroskopik metotlara göre daha maliyetli ve çapraz reaksiyonlara neden olmaları sebebiyle rutinde çok tercih edilmese de epidemiyolojik ve prospektif çalışmalarda kullanılması önerilmektedir. Moleküler yöntemlerin ise çok az sayıda ookisti dahi teşhis edebilirliği, tür analizine fırsat vermesi gibi avantajlarından dolayı kullanılması gerektiği ancak klinisyen tecrübesi istemesi, yoğun emek gerektirmesi ve pahalı olması sebebiyle rutinde kullanımının tercih edilmediği, prevalans çalışmalarında kullanıldığı ifade edilmiştir (Yılmaz 2015, Ayan ve Orunç Kılınç 2020, Dinç ve Aslan 2023). Bu çalışmada köpeklerde *Cryptosporidium* protozoonuna ait ookistler Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama metotlarının yanısıra nested-PCR ile teşhis edildi.

Dünya’da ve Türkiye’de köpeklerde boyama yöntemleri ile *Cryptosporidium*’un görülme olasılığının araştırıldığı çalışmalardan Ziehl-Neelsen boyama metodunda Brezilya’da %22.6 (29/128) (Alves ve ark. 2018), Polonya’da %2.7 (7/264) (Piekara-Stepinska ve ark. 2021), İran’da %8 (28/350) (Tavalla ve ark. 2017), Nijerya’da %22.75 (91/400) (Chukwu ve ark. 2019), Türkiye’de %15.5 (31/200) (Öner 2019); Kinyoun asit fast boyama metodunda Türkiye’de %0 (0/100) (Aslan Çelik ve ark. 2023, Dinç ve Aslan 2023), %52.94 (81/153) (Ayan ve Orunç Kılınç 2020); Karbol-fuksin boyama metodunda Türkiye’de %2 (4/200) (Ünal ve Gokpinar 2020), %3 (3/100) (Çelik ve

ark. 2023), %15.78 (24/152) (Denizhan ve Karakuş 2019), Almanya’da %0.4 (1/270) (Cirak ve Bauer 2004); safranin-metilen mavisi boyama metodunda Brezilya’da %1.4 (6/433) (Mundim ve ark. 2007) ve %26.2 (131/500) (Balassiano ve ark. 2009) yaygınlık bildirilmiştir. Bu çalışmada ise Kinyoun asit fast ve safranin-metilen mavisi boyama metodlarının her ikisinde de aynı numaralı örnek olmak üzere 250 dışkı numunesinin sadece birinde (%0.4) *Cryptosporidium* spp. ookistlerine rastlanmıştır. Bu bakımdan Türkiye’deki Kinyoun asit fast boyama yönteminin kullanıldığı çalışmalarının bazıları ile (Aslan Çelik ve ark. 2023, Dinç ve Aslan 2023) benzerlik gösterirken, Ayan ve Orunç Kılınç’ın (2020) çalışmasından oldukça düşüktür. Araştırmacılar çalışmalarında tespit ettikleri oranın diğer çalışmalardan yüksek olduğunu ve bunun sebebinin yavru ve ishallerde çalışmış olmalarından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Bu çalışma, safranin-metilen mavisi boyama yönteminin kullanıldığı araştırmalardan biri (Mundim ve ark. 2007) ile uyumlu sonuç verirken, diğer araştırmadan (Balassiano ve ark. 2009) bir hayli düşük oranda kalmıştır. Balassiano ve ark., (2009) çalışmalarındaki yüksek prevalans oranını, değerlendirilen hayvanların hiçbirinde yeterli koruma, kontrol ya da tedavi yaklaşımının olmayışına bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Köpek dışkılarının *Cryptosporidium* spp. yönünden incelendiği moleküler prevalans çalışmalarında İspanya’da %0 (0/233) (Regidor-Cerrillo ve ark. 2020), Kanada’da %0.3 (3/860) (Smith ve ark. 2020), İran’da %0.6 (2/315) (Homayouni ve ark. 2019), İtalya’da %1 (3/285) (Simonato ve ark. 2015), Çin’de %1.7 (10/604) (Cao ve ark. 2022), Nijerya’da %2.5 (5/203) (Ayinmode ve ark. 2018), Fransa’da %2.6 (3/116) (Osman ve ark. 2015), Polonya’da %3.4 (9/264) (Piekara-Stepinska ve ark. 2021), Finlandiya’da %4 (6/150) (Rimhanen-Finne ve ark. 2007), Brezilya’da %4.6 (6/128) (Alves ve ark. 2018), Birleşik Krallık’ta %4.6 (31/676) (Rosanowski ve ark. 2018), Tayland’da %7.6 (23/301) (Tangtrongsup ve ark. 2020), Almanya’da %10.0 (35/349) (Murnik ve ark. 2022), Japonya’da %21.1 (66/314) (Itoh ve ark. 2019) Türkiye’de %3 (3/100) (Çelik ve ark. 2023) ve %64.7 (99/153) (Ayan ve Orunç Kılınç 2020) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ise %1.2 (3/250) oranında pozitiflik saptanmıştır. Bu oran ile İtalya (Simonato ve ark. 2015), Çin (Cao ve ark. 2022), Nijerya (Ayinmode ve ark. 2018), Fransa (Osman ve ark. 2015), Türkiye (Çelik ve ark. 2023) çalışmaları ile benzer-uyumlu sonuç vermiştir ancak Tayland (Tangtrongsup ve ark. 2020), Almanya (Murnik ve ark. 2022), Japonya (Itoh ve ark. 2019) ve Türkiye (Ayan ve Orunç Kılınç 2020) çalışmalarından prevalans oranı bakımından düşük kalmıştır. Almanya’da

yürütülen çalışmada (Murnik ve ark. 2022) dokuz haftalık yaşa kadar olan köpekler, Türkiye’deki çalışmada (Ayan ve Orunç Kılınç 2020) ise dört aylığa kadar olan genç ve ishalleri köpekler araştırmaya dahil edilmiştir. Her iki çalışmada da araştırmacılar elde ettikleri yüksek prevalans oranını köpeklerin yaşlarının küçük olması ile ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Japonya’da (Itoh ve ark. 2019) ise köpek yetiştirme merkezlerinde yapılan araştırmada *Cryptosporidium*’a yüksek oranda rastlanmasının sebebinin çevre kontaminasyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Tayland’daki (Tangtrongsup ve ark. 2020) çalışmanın prevalans değerinin yüksek olmasının nedeninin çalışılan lokasyon ya da numune sayısı ile ilişki olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda prevalans değerinin düşük bulunması, çalışılan köpeklerin büyük çoğunluğunun bağışıklık sistemlerini baskılayacak herhangi bir enfeksiyona sahip olmamaları (%7.2, 18/250) ya da immunsupresif bir ilaca maruz kalmamalarına (%2, 5/250) ve iyi bakım ve besleme şartlarına tabii tutulmalarına bağlanabilir.

Moleküler olarak klasik PCR, nested-PCR, real time PCR gibi yöntemler cryptosporidiosis teşhisi için kullanılmaktadır. Boyama, koproantijenik metotlar ve çeşitli moleküler yöntemlerin *Cryptosporidium* spp. oookistlerini teşhis etmedeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada; en fazla pozitif sonuç real-time PCR ile yapılan taramada elde edilmiştir. Ancak iş gücü gerektirmesi, zaman ve maliyet açısından standart ve tercih edilebilir bir yöntem olmadığı bildirilmiştir. Bunun dışında klasik PCR’ın ELISA yöntemine, nested-PCR’ın da ELISA’ya göre çok daha yüksek duyarlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir (Jaiswal ve ark. 2022). Yine Sungur ve ark. (2008) nested PCR yönteminin klasik PCR’a göre dört-beş kat daha duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da daha duyarlı olduğu ifade edilen nested-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Moleküler yöntemler kullanılırken 18s rRNA (SSU rRNA), HSP70, COWP gibi hedef gen bölgeleri seçilmektedir. Global düzeyde yapılan bir metaanaliz çalışmasında en çok kullanılan moleküler yöntemin nested-PCR, en çok hedef alınan gen bölgesinin ise 18s rRNA olduğu bildirilmiştir. Bunun muhtemel nedeni olarak ise bu hedef bölgenin (18s rRNA) genomda beş adet kopyasının bulunması ve geçirdiği yavaş evrim sayesinde daha az polimorfik olması gösterilmiştir (Taghipour ve ark. 2020). Nitekim bu çalışmada da 18s rRNA gen bölgesi hedef bölge olarak seçilmiştir.

Köpeklerde görülen *Cryptosporidium* türleri arasında *C. canis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. ubiquitum* ve *C. andersoni* rapor edilmiştir. Yapılan metaanaliz çalışmasında %3.64 oranında *C. canis*, %1.28 oranında *C. parvum* tespit edildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla en çok görülen tür *C. canis* iken ikinci tür *C. parvum*'dur (Taghipour ve ark. 2020). İtalya'da üç pozitif örneğin tamamı *C. parvum* (Simonato ve ark. 2015), Kanada'da üç pozitif numunenin ikisi başarılı bir şekilde sekanslanabilmiş ve ikisi de *C. canis* (Smith ve ark. 2020), İran'da iki pozitif örneğin hepsi *C. canis* (Homayouni ve ark. 2019), Çin'de altı pozitif örneğin beşi *C. canis*, biri *C. ubiquitum* (Li ve ark. 2015b), Çin'de 10 pozitif örneğin tamamı *C. canis* (Cao ve ark. 2022), Finlandiya'da altı pozitif numunenin üçü sekanslanabilmiş ve örneklerin üçü de *C. canis* (Rimhanen-Finne ve ark. 2007), Nijerya'da pozitif beş örneğin üçü *C. parvum*, ikisi *C. muris* (Ayinmode ve ark. 2018), Fransa'da üç pozitif örneğin hepsi *C. canis* (Osman ve ark. 2015), Tayland'da 23 pozitif örneğin 10'u sekanslanabilmiş ve bunların sekizi *C. canis*, biri *C. parvum*, biri de hem *C. canis* hem de *C. parvum* ile koenfekte (Tangtrongsup ve ark. 2020), Polonya'da pozitif dokuz numuneden sekanslanabilen beş örneğin üçü *C. canis*, ikisi *C. parvum* (Piekara-Stepinska ve ark. 2021), Brezilya'da altı pozitif numunenin dördü *C. canis*, ikisi *C. parvum* (Alves ve ark. 2018), Birleşik Krallık'ta 31 pozitif örneğin 28'i *C. canis*, ikisi *C. parvum*, biri *C. andersoni* (Rosanowski ve ark. 2018), Almanya'da pozitif 35 numunenin 33'ü *C. canis*, ikisi *C. parvum* (Murnik ve ark. 2022), Japonya'da 66 numunenin tamamı *C. canis* (Itoh ve ark. 2019) olarak teşhis edilmiştir. Özetlemek gerekirse taraması yapılan 4832 köpekten 208'i hastalık yönünden pozitif çıkmıştır. Bunlar arasında sekanslanabilenlerin 167'si *C. canis* (Rimhanen-Finne ve ark. 2007, Osman ve ark. 2015, Alves ve ark. 2018, Rosanowski ve ark. 2018, Homayouni ve ark. 2019, Itoh ve ark. 2019, Smith ve ark. 2020, Tangtrongsup ve ark. 2020, Piekara-Stepinska ve ark. 2021, Cao ve ark. 2022, Murnik ve ark. 2022), 15'i *C. parvum* (Simonato ve ark. 2015, Alves ve ark. 2018, Ayinmode ve ark. 2018, Rosanowski ve ark. 2018, Tangtrongsup ve ark. 2020, Piekara-Stepinska ve ark. 2021, Murnik ve ark. 2022), ikisi *C. muris* (Ayinmode ve ark. 2018), biri *C. andersoni* (Rosanowski ve ark. 2018) biri *C. ubiquitum* (Li ve ark. 2015b) ve biri hem *C. canis* hem de *C. parvum* ile (Tangtrongsup ve ark. 2020) enfekte bulunmuştur. Türkiye'de ise sekans analizi yapılan tek çalışmada, pozitif bulunan üç örneğin tamamı *C. parvum* olarak teşhis edilmiştir (Çelik ve ark. 2023). Bu çalışmada da genel literatürle uyumlu olarak tespit edilen üç pozitif numunenin sekans analizi sonucunda üçünün de *C. canis* olduğu anlaşılmıştır. Daha önceden NCBI genbanka

kayıt edilmiş *C. canis* izolatları (MG888049, AB210854, KR999987, KY483980, MF589918, MW255532, OM780299, OQ194023, MG516774) ile %93.93-%100 oranında benzerlik bulunmuştur.

Cryptosporidiosisın meydana gelmesinde yaşı etkisinin önemli olmadığını savunan çalışmalar olduğu gibi, genç köpeklerde daha sık rastlandığına dair araştırmalar da mevcuttur. Almanya’da yürütülen çalışmada köpekler yaş bakımından dört gruba (0-9 haftalık; 10 hafta-5 aylık; 6-9 aylık; 10-12 aylık) ayrılmıştır. Hastalık %20.5 oranıyla en çok 10 haftalık-5 aylık yaş grubunda gözlenmiştir. İstatistik analizinde, bu fark anlamlı olarak bulunmuş ve genç yaştaki köpeklerde cryptosporidiosis daha çok rastlandığı sonucuna varılmıştır (Murnik ve ark. 2022). Tayland’daki çalışmada, köpekler üç gruba (<1 yaş; 1-7 yaş; >7 yaş) ayrılmıştır ve bir yaşı altındaki köpeklerde istatistiksel olarak daha çok hastalığa rastlanmıştır (Tangtrongsup ve ark. 2020). Çin’deki araştırmada ise bu sefer köpekler iki gruba (<1 yaş; >1 yaş) ayrılmış ve yine bir yaşı altındaki köpeklerde cryptosporidiosis diğer gruba göre yüksek oranda saptanmıştır (Cao ve ark. 2022). Aynı gruplandırmayı yapan Mundim ve arkadaşları (2007) bir yaşı altındaki grupta daha çok hastalığa rastlasa da bunun istatistiki olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Altı aydan küçük ve bir yaştan büyük olarak köpeklerin gruplandırıldığı diğer bir çalışmada ise yine yaş bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Huber ve ark. 2005). Benzer şekilde, yapılan bir metaanaliz çalışmasında 12 aylığın altındaki köpeklerde bu parazit daha çok saptansa da bunun istatistiksel açıdan önemli olmadığı ifade edilmiştir (Taghipour ve ark. 2020). Bu çalışmada ise köpekler üç gruba (0-1 yaş; 2-4 yaş; >5 yaş) ayrılmıştır, pozitif olarak teşhis edilen üç numunenin ikisi 0-1 yaş grubunda, diğeri 2-4 yaş grubunda yer almaktadır. Cryptosporidiosisın yaş gruplarına göre görülme oranları incelendiğinde, en fazla pozitiflik genç yaş grubunda görülmüş, ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Anlamlı bir farkın bulunamayışı muhtemelen örneklem büyüklüğünün yetersiz kalması ya da pozitif numune sayısının az olması ile ilgilidir. Ancak yine de teşhis edilen üç pozitif numunenin de genç yaştaki köpeklerde görülmesi genel literatürü destekler niteliktedir.

Köpeklerin cinsiyetinin cryptosporidiosis için risk faktörü olup olmadığı konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu cinsiyetin etkisiz olduğu yönündedir (Huber ve ark. 2005, Mundim ve ark. 2007, Jian ve ark. 2014, Simonato ve ark. 2015, Tavalla ve ark. 2017, Alves ve ark. 2018, Cao ve ark. 2018, Denizhan ve Karakuş

2019, Homayouni ve ark. 2019). Buna rağmen prevalans oranının erkeklerde dişilerden daha yüksek (Mosallanejad ve ark. 2010, Chukwu ve ark. 2019, Çelik ve ark. 2023) ya da dişilerde erkeklerden daha yüksek (Olabanji ve ark. 2016, Mugala ve ark. 2018, Vitela-Mendoza ve ark. 2019) olduğunu bildiren çalışmalar da vardır. Dişi hayvanlarda erkeklerden daha yüksek prevalans değerini saptayan çalışmalar bu durumu dişilerin fizyolojik döngüsünden dolayı belli dönemlerde immun sistemlerinin baskılanması ile açıklamışlardır. Hastalığın erkek hayvanlarda dişilerden daha yüksek oranda görüldüğü sonucuna ulaşan araştırmacılar ise bunu erkek hayvanların dişisini aramak için sürekli gezmek durumunda olduğu ve bunun sonucunda hastalık etkeni ile karşılaşma riskinin erkek hayvanlar için arttığını ifade ederek açıklamışlardır. Bu çalışmada ise iki dişi, bir erkek köpekte *Cryptosporidium*'a rastlanmıştır. İstatistiksel açıdan ($p>0.05$) anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sunulan çalışmaların büyük çoğunluğunun cinsiyetin etkisiz olduğunu rapor etmesi sonucuna dayanarak, cinsiyetin cryptosporidiosis etkileyecek temel bir faktör olmadığı kanaatindeyiz.

Yerli ırk köpeklerde saf ve melez ırklara göre daha yüksek oranda cryptosporidiosis görüldüğü belirtilse de (Chukwu ve ark. 2019), hastalığa melez ırklarda, egzotik, yerli veya saf ırklardan daha fazla rastlanacağı da rapor edilmiştir (Olabanji ve ark. 2016; Tangtrongsup ve ark. 2020). Ayrıca parazitin saf ırk köpeklerde melez ırklara göre daha çok teşhis edildiğine dair araştırma da mevcuttur (Titilincu ve ark. 2010). Bunlara rağmen genel kanı köpek ırkı ile cryptosporidiosis görülme olasılığı arasında herhangi bir ilişki olmadığı yönündedir (Balassiano ve ark. 2009, Mosallanejad ve ark. 2010, Rosanowski ve ark. 2018, Homayouni ve ark. 2019). Bu çalışmada iki melez, bir av köpeğinde (English setter) cryptosporidiosis teşhis edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada, her ne kadar melez ırk köpeklerde daha sık rastlansa da, ırklara göre cryptosporidiosis görülme durumlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Mevcut çalışmada ırklara göre hastalıkla enfekte olma yönünden dağılımın, yetersiz örnekleme bağlı çarpıklığı dikkate alındığında, ileride çok daha büyük örneklemeler ile gerçekleştirilecek çalışmalar, cryptosporidiosis üzerinde ırkın potansiyel etkisini gösterebilir.

Balassiano ve ark. (2009) çalışmalarında köpekleri, evde yaşayanlar ve apartmanda yaşayanlar şeklinde gruplandırmıştır. Evde yaşayanların toprağa erişimi daha rahatken, apartmandakilerin kısıtlıdır. Cryptosporidiosis görülme olasılığı ile yaşam alanı arasındaki ilişkiye bakıldığında zaman evde ya da apartmanda yaşayan köpekler arasında herhangi bir fark bulunamamıştır. Ancak köpeklerin toprakla etkileşimi baz alındığında, toprağa erişimi fazla

olanların hastalığa yakalanma olasılığı artmıştır. Sonuç olarak toprağın hijyen durumu hastalığı etkileyen bir unsur olarak bulunmuştur. Gruplandırmanın ev içindeki köpekler ve evin dışındakiler şeklinde yapıldığı bir çalışmada gruplar arasında eşit oranda enfeksiyon teşhis edildiği için iç ya da dış mekanın cryptosporidiosis görülme olasılığı üzerine etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Homayouni ve ark. 2019). Ev ve barınak köpekleri arasında yürütülen bir araştırmada benzer şekilde eşit oranda prevalans hesaplanmış ve sonuç olarak yaşam alanının hastalık üzerinde etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir (Huber ve ark. 2005). Bir tesisteki köpeklerden örnekleme yapılan çalışmada, köpeklerin bir kısmı serbest olarak hem tesis içinde hem de dışında dolaşabilmektedir. Diğer kısmı ise tamamen kapalı olarak bulunmaktadır. Serbest olarak gezenlerde %26.1, tamamen kapalı olanlarda %14.7 oranında pozitiflik saptanmıştır. Nitekim bu oran istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Serbest gezenlerin, kapalı olanlara göre *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olma olasılığının daha yüksek olduğunu ve hatta dışarıda yaşayan kedi ve köpeklerin, iç mekandakilere göre 5 kat daha fazla enfekte oldukları ifade edilmiştir. Serbest gezenlerin çevresel kontaminasyondan hastalığı almış olabileceği, kapalı olanların ise ya kontamine su tükettikleri ya da kendilerini temizleme esnasında otoenfeksiyona yakalanmış olabilecekleri rapor edilmiştir (Chukwu ve ark. 2019). Serbest gezen köpeklerde yüksek prevalansın görüldüğü bir diğer çalışmada kontamine yiyecek ve su tüketime dikkat çekilmiştir (Mugala ve ark. 2018). Bu çalışmada köpeklerin yaşam alanları sokakta, sadece evde, hem evde hem de bahçede, sadece bahçede yaşayanlar şeklinde kayıt edilmiştir. Sokakta yaşayanların gezinme alanları sınırlı değildir. Ancak diğerlerinin yaşam koşulları evde (tuvalet ihtiyacı dışında sokağa çıkmayanlar), evde ve bahçede (sahiplerinin müstakil evi ya da aile apartmanı olup da hem evde hem de bahçede yaşamalarına izin verilenler), bahçede (sınırları belli olan bir alanda dış ortamda yaşayanlar) şeklinde sınırlıdır. Cryptosporidiosis enfeksiyonu ise sokakta yaşayan iki, bahçede yaşayan bir köpekte tespit edilmiştir. Yaşam alanı ile cryptosporidiosis arasındaki ilişki bakımından istatistik analizi yapıldığında ($p>0.05$) anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmanın sonuçları Huber ve ark. (2005), Balassiano ve ark. (2009) ve Homayouni ve ark. (2019) yaptıkları çalışmaların sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte, Mugala ve ark. (2018) ile Chukwu ve ark. (2019) yaptıkları çalışmaların sonuçlarından farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda yaşanan çevrenin cryptosporidiosis görülme olasılığı üzerindeki etkisinin istatistiksel açıdan anlamsız bulunması; yetersiz örneklem büyüklüğü ya da sınırları belli alanlarda gezen köpekler için etkenle karşılaşma olasılıklarının az olması ile, sokakta

yaşayan ancak sonrasında barınağa alınan köpeklerin ise çalışmanın yürütülmesi esnasında şebeke suyu ve mama gibi nispeten daha güvenli içecek ve yiyeceklerle beslenmeleri ile, özetlemek gerekirse çalışmadaki köpeklerin çok kötü hijyen ve sanitoryona şartlarına maruz kalmayışı ile açıklanabilir.

Cryptosporidiosis bulaşında risk faktörlerinden biri de tüketilen suyun kaynağı ya da herhangi bir ilaçlama, filtreleme sistemine tabi tutulup-tutulmadığıdır. Yapılan bir çalışmada (Chukwu ve ark. 2019) cryptosporidiosis enfeksiyonu ile köpeklere içmeleri için verilen suyun kaynağı arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemek amacıyla anket yapılmıştır. Kullanılan su kaynakları üç grupta toplanarak kuyu suyu, sondaj suyu ve musluk suyu olarak ifade edilmiştir. Çalışmaya katılan köpeklerin çoğunluğu musluk suyu kullandığı halde cryptosporidiosis en fazla kuyu suyu tüketenlerde ortaya çıkmıştır. Su kaynağına göre cryptosporidiosis prevalans oranları kuyu suyu içen köpeklerde %31.4, musluk suyu verilen köpeklerde %21.0 ve sondaj suyu tüketen köpeklerde %19.5 olarak rapor edilmiştir. Her ne kadar suyun klorlanma ya da filtrelenmesi cryptosporidiosis için yetersiz kalsa da (Griffiths 1998, Yılmaz 2015) musluk suyunda tespit edilen görece düşük prevalansın sebebi olarak verilebilir. Kuyu suyu, sondaj sularına göre kanalizasyon ve akıntı kaynaklı kirlenmelere daha çok maruz kalabilmektedir, bu durum ise kuyu suyunda yüksek prevalans saptanmasını açıklamaktadır. En nihayetinde araştırmacılar tüm su kaynaklarının potansiyel risk oluşturduğu sonucuna ulaşmıştır (Chukwu ve ark. 2019). Bu çalışmanın aksine yapılan başka bir araştırmada belediye suyu (musluk suyu) tüketen grupta (%7.4), sondaj suyu içen grupta ise (%1.9) oranında pozitiflik elde edilmiştir. Bu durum ise musluk sularının *Cryptosporidium* spp. ile daha fazla kirlendiği ve dezenfeksiyon için sıklıkla tercih edilen klorun çok etkili olmadığını göz önüne sermektedir. Araştırmada kullanılan su kaynağı ile cryptosporidiosis görülme olasılığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Mugala ve ark. 2018). Köpeklere sunulan suyun filtre sisteminden geçirilmiş ya da geçirilmemiş şeklinde sınıflandırıldığı bir çalışmada ise enfeksiyon ile su arasında bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (Balassiano ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda ise su kaynağı sadece şebeke suyu, şebeke suyu+hazır su ve sadece hazır su şeklinde üç grupta toplanmıştır. Şebeke suyu belediyelerin sunduğu musluk suyunu ifade ederken, hazır su her türlü dezenfeksiyon işleminden geçirilmiş (klorlama, filtreleme) temiz suyu ifade etmektedir. Cryptosporidiosis ile enfekte üç köpek de şebeke suyunu (%1.4) tüketmektedir. Enfeksiyon ile tüketilen su kaynağı arasında istatistiksel açıdan ($p>0.05$) anlamlı bir ilişki tespit

edilememiştir. Bu bakımdan çalışmamız Balassiano ve arkadaşlarının (2009) çalışması ile uyumlu çıkmıştır. Cryptosporidiosis sadece şebeke suyu içen köpeklerde rastlanmasının sebebi bu araştırmaya katılan köpeklerin büyük çoğunluğunun (%88.4) şebeke suyu tüketmesinden kaynaklanmış olabileceği gibi, hazır suların şebeke sularına göre enfeksiyonlar açısından daha güvenli olmasından da kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte ister şebeke suyu ister hazır su verilmiş olsun, suyun köpeklere verilmiş şekli de önem arz etmektedir. Eğer su, köpeklere bir kap içinde veriliyorsa, bahçede yaşayan köpeklerin önüne konulan su kaplarının, *Cryptosporidium* ookistleriyle enfekte diğer kedi ve köpeklerle veya mekanik vektörler vasıtasıyla kontamine edilebileceği de akılda tutulmalıdır.

Köpeklere verilen yiyecek türünün cryptosporidiosis görülme olasılığı üzerine etkisi araştırılan diğer konulardan biridir. Chukwu ve arkadaşlarının 2019 yılında yürütmüş oldukları çalışmada köpeklere kuru mama, yaş mama ya da bu ikisinin kombinasyonu verilmiştir. Çalışma sonunda ise yiyecek türü ile enfeksiyon arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir (Chukwu ve ark. 2019). Başka bir araştırmada köpeklerin çoğunluğu evde kalan yemek artıkları ile, bir bölümü ticari mama ile, diğer bir kısmı ise hem yemek artıkları hem de ticari mama ile beslenmiştir. Burada da bir önceki çalışma gibi *Cryptosporidium* spp. prevalansı ile yiyecek yönetimi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Mugala ve ark. 2018). Beslenme türünün iki gruba (ticari ya da değil, ticari ise açık/kapalı paket) ayrıldığı bir başka çalışmada uygulanan diyet ile enfeksiyon arasında bağlantı kurulamamıştır (Balassiano ve ark. 2009). *Cryptosporidium* spp. varlığı araştırılan köpeklere sunulan yiyeceklerin güvenli gıda (konserve, paketli ya da pişmiş yemekler) ve güvensiz gıda (güvenli gıda dışındakiler) şeklinde gruplandırıldığı diğer bir araştırmada da beslenme ile hastalık prevalansı arasında bir ilişki olmadığı ifade edilmiştir (Homayouni ve ark. 2019). Bu çalışmaların aksine Abere ve arkadaşları (2013) genel olarak köpekleri besleme tarzı ve gastrointestinal parazitler arasında önemli bir ilişki olduğunu vurgulamıştır. Bu araştırmada köpeklerin yiyeceklerini ev yemekleri, mamalar (kuru/yaş), ya da ev yemeği+mama şeklinde üç grupta topladık. Cryptosporidiosis tespit edilen iki köpek mama ile beslenirken, bir tanesi ev yemeği tüketiyordu. İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında ($p>0.05$) yiyecek türü ile enfeksiyon arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. Bu bağlamda elde edilen sonuç genel literatür ile uyumludur. Çalışmamızdaki köpeklerin büyük çoğunluğu (%77.2) mama ile beslenmektedir. Bu sebeple cryptosporidiosis mama tüketen köpeklerde fazla sayıda görülse de (2/1) enfeksiyon oranının düşük çıkması köpeklerin çiğ besin tüketmemeleri ile

açıklanabilir. Bununla birlikte mama yedikleri ifade edilen sahihsiz köpeklerin *Cryptosporidium* enfeksiyonunu barınağa gelmeden önce sokak ortamında yediği bir gıdadan ya da içtiği bir sudan almış olabileceği de düşünülebilir.

Paraziter enfeksiyonlar, özellikle de cryptosporidiosis, genel olarak genç ve bağışıklık sistemi tam gelişmemiş ya da bazı sebepler ile baskılanmış hayvanlarda daha çok görülürler (Scorza ve Tangtrongsup 2010, Jian ve ark. 2014). Çin’de Cui ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış oldukları çalışma bu görüşü destekler niteliktedir. Çalışmacılar *C. canis* ile enfekte olma durumunun bağışıklık sisteminin aktif olup olmamasından ne kadar etkilendiğini araştırmışlardır. Deneysel olarak enfekte edecekleri köpekleri iki gruba ayırıp birinci grubun immun sistemini dekzametazon ile baskılamışlar, ikinci gruba herhangi bir işlem uygulamamışlardır. Sonuç olarak immunsupresif köpekler *C. canis* ile enfekte olup, bunlarda dışkıda ookist varlığı tespit edilirken, immunkompetan köpeklerde enfeksiyon şekillenmemiştir (Cui ve ark. 2018). İtalya’da gastrointestinal parazitlerin varlığının araştırıldığı bir çalışmada sağlıklı köpeklerde gözlenmeyen *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonuna, lenfoma hastalığına sahip köpeklerde %13.3 oranında rastlanmıştır. (Cervone ve ark. 2019). Bu çalışmada da köpeklerin bağışıklık sistemini baskılayacak herhangi bir hastalık, fizyolojik bir durum ya da ilaç kullanımı olup olmadığı kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alınan bu özel durumlara sahip köpeklerin hiçbirinde *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Dolayısıyla enfeksiyon ile konakların immun durumları arasında istatistiksel açıdan ($p>0.05$) bir ilişki bulunmamıştır. Bu durum bağışıklık sistemi baskılanmış köpeklerin çoğunun olası cryptosporidiosis kaynaklarına (enfekte yiyecek, su, çevre) erişme imkanı olmayan sahipli köpeklerin oluşturmasıyla ve kalan az sayıdaki bağışıklığı zayıf sahihsiz köpeklerin ise yakın çevrelerinde etkenle karşılaşmamış olma ihtimalleriyle açıklanabilir.

Cryptosporidiosis en belirgin ve yaygın klinik bulgu ishaldir. Ancak köpeklerde ishalin görülmesi genellikle birlikte seyreden başka bir enfeksiyon ya da konağın immun durumuna göre değişmektedir. Hastalık köpeklerde çoğunlukla asemptomatik seyreder (Yoshiuchi ve ark. 2010, Cui ve ark. 2018, Mugala ve ark. 2018, Tangtrongsup ve ark. 2020). Dışkının kıvamı (normal/ishal) ile cryptosporidiosis görülme olasılığı arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını rapor eden çalışmalar (Yoshiuchi ve ark. 2010, Mugala ve ark. 2018, Itoh ve ark. 2019, Murnik ve ark. 2022) olduğu kadar, enfeksiyon ile diyare arasında bağlantı bulunduğunu belirten araştırmalar da (Mosallanejad ve ark. 2010, Chukwu ve ark. 2019,

Taghipour ve ark. 2020) mevcuttur. Bizim çalışmamızda *C. canis* ile enfekte bulunan köpeklerden biri klinik olarak ishal bulgusuna sahipti. Diğer ikisi normal kıvamlı defekasyon yapmaktaydı. İstatistiksel anlamda değerlendirildiğinde ishal ile enfeksiyon arasında ($p>0.05$) anlamlı bir ilişki bulunamadı. Bu bakımdan etkenin varlığı ile ishal arasında bağlantı olmadığını belirten çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızdaki ishal bulgusuna sahip cryptosporidiosis pozitif köpeğin muhtemel viral ya da bakteriyel bir enfeksiyon ile koenfekte olması veya bağışıklığının düşük olması gibi sebeplere bağlı olarak klinik belirti gösterdiğini düşünmekteyiz.

Köpeklerde cryptosporidiosis ile ilgili yapılan çalışmalarda dikkate alınan, araştırılan konulardan biri de hayvanların yaşam koşullarıdır. Genel olarak köpeklerin yaşam koşullarını kıyaslayacak çalışmalar az sayıdadır. Yapılan araştırmalarda örnekleme köpeklerin tek bir yaşam koşuluna (sokak köpeği ya da ev köpeği, kırsal kesimde ya da şehirde yaşayanlar) odaklanmıştır. Bazı araştırmacılar sadece ev köpeklerinde (sahipli köpekler) (Osman ve ark. 2015), bazıları sadece sokak köpeklerinde (sahipsiz köpekler) (Mosallanejad ve ark. 2010, Simonato ve ark. 2015, Olabanji ve ark. 2016), bir kısmı ise hem sokak hem de ev köpeklerinde (sahipsiz ve sahipli köpekler) (Huber ve ark. 2005, Mundim ve ark. 2007) çalışmalarını yürütmüşlerdir. Huber ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada dört köpekte *Cryptosporidium* spp. tespit edilmiştir. Bunlardan ikisi sahipsiz iken ikisi sahiplidir. Dolayısıyla hayvanların orijini ile (sokak ya da ev köpeği olması) enfeksiyon arasında bağlantı olmadığını bildirmişlerdir (Huber ve ark. 2005). Mundim ve arkadaşları farklı yaşam koşullarına sahip köpeklerden örnekleme yapmışlar, hastalığa sahipsiz olanlarda daha fazla rastlamalarına rağmen bu farkı istatistiksel olarak anlamsız bulmuşlardır (Mundim ve ark. 2007). Sahipsiz köpeklerin şehirdekiler ve köydekiler olarak ikiye bölündüğü araştırmada, köydekilerde (%22.46) şehirdekilerden (%14.49) daha fazla oranda hastalığa rastlanmış, köydekilerin diğer hayvanlarla (koyun, sığır) temas halinde olmaları bunun sebebi olarak gösterilmiştir (Olabanji ve ark. 2016). Aynı gruptandırmanın yapıldığı diğer bir çalışmada da kentte ya da köyde yaşayan köpekler arasında hastalığın görülmesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Mosallanejad ve ark. 2010). Bu çalışmada elde edilen dışkı numunelerinin orijini sahipsiz sokak köpekleri ve sahipli ev köpekleri olmak üzere iki grupta kategorize edildi. Enfeksiyon tespit ettiğimiz iki köpek sahipsiz iken biri sahiptiydi. Daha önce yapılan çalışmada (Mundim ve ark. 2007) olduğu gibi bu çalışmada da hastalığa sahipsiz hayvanlarda daha çok rastlanmasına rağmen

cryptosporidiosis görölme olasılığı ile köpeklerin sahipli ya da sahipsiz oluşu arasındaki ilişki istatistiksel açıdan ($p>0.05$) önemsiz bulundu.

Dünya genelinde köpeklerde insanları da enfekte edebilen çeşitli helmintler (*A. caninum*, *T. canis*, *T. vulpis*) ile *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. gibi protozoonlara bağlı gastrointestinal parazitlerin yaygınlıkları ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Bu parazitler köpeklerde tek başına bulunabildiği gibi bazen miks enfeksiyonlar şeklinde de görülebilirler. Bağırsaklarda diğer intestinal parazitlerin varlığı ile cryptosporidiosis arasında genellikle pozitif bir ilişki görülmüştür. Gastrointestinal parazitlerden biri ya da birkaçı *Cryptosporidium* spp. ile koenfeksiyon oluşturduğunda, köpeklerde strese ve bazen de immun sistemin baskılanmasına neden olabilmektedir. Böyle durumlarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun inaktif evrelerinin yeniden aktifleşmesi ve dışkıda ookist çıkışının başlaması ile hastalığın yaygınlığı değişebilmektedir (Balassiano ve ark. 2009). *Cryptosporidium* spp. ile özellikle *Giardia (G.) intestinalis* ya da *Cystoisospora canis* gibi parazitlerin birlikte görülmesinin nadir bir durum olmadığı ifade edilmiştir (Piekara-Stepińska ve ark. 2021). *Trichuris* spp. (Remesar ve ark. 2022) ve *Enterocytozoon bieneusi* (Xu ve ark. 2016) köpeklerde cryptosporidiosis enfeksiyonu ile eş zamanlı görülen diğer parazitlerdir. *Giardia* spp. ile *Cryptosporidium* spp. birlikte görölme olasılığı diğer koenfeksiyonlara göre daha fazladır. Akut ve kronik ishalli, kalabalık ortamlarda yaşayan cryptosporidiosisli köpeklerin *Giardia* spp. ile enfekte olma olasılığının ve bir yaşımdan küçük *Giardia* spp. ile enfekte köpeklerin ise *Cryptosporidium* spp. için pozitif sonuç verme olasılığının yüksek olduğu rapor edilmiştir (Tangtrongsup ve ark. 2020). Köpeklerde gastrointestinal parazitlerin varlığının araştırıldığı bir çalışmada ikili ya da üçlü seyreden miks enfeksiyonlar arasında yüksek oranda (%29.3) *G. duodenalis*+*Cryptosporidium* spp. birlikteliğinin görüldüğü bildirilmiştir (Murnik ve ark. 2023). Bunun nedeni muhtemelen her iki parazitin de su kaynaklı patojenlerden olması ve vücuda aynı kaynaklardan eş zamanlı olarak alınabilmesidir. Ayrıca *Cryptosporidium* spp. ile *G. duodenalis*'in aynı enfeksiyon yolağını kullanması nedeniyle iki parazit arasında koenfeksiyonun daha olası olduğu ifade edilmiştir (Šmit ve ark. 2023). Bu tez çalışmasında ise tespit edilen üç cryptosporidiosisli köpekten bir tanesi *Giardia* spp. ile koenfekte bulunmuştur. Elde edilen sonuç yukarıdaki literatür bilgilere göre yorumlanarak koenfeksiyona bağlanabilirse de istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde birlikte seyreden herhangi bir paraziter hastalığın varlığı ($p>0.05$) açısından önemsiz bulunmuştur. Çalışmamızda *C. canis*+*Giardia* spp. ile koenfekte olan

köpek sahiplidir. Dolayısı ile genel olarak yemesi, içmesi, hastalık takibi gibi durumlarıyla özel olarak ilgilenilmektedir. Avcılık amacıyla kullanılan bu köpeğin avlanma esnasında *Giardia* spp. ve *Cryptosporidium* spp. etkenleriyle karşılaşmış olabileceği, iki enfeksiyonun birlikte seyretmesi ve immun sistemin olumsuz etkilenmesi nedeniyle bu hayvanda cryptosporidiosis rastlanmış olunabileceği düşüncesindeyiz



6. SONUÇ

Sonuç olarak bu tez çalışması ile Hatay ilinde köpeklerde *Cryptosporidium* spp. varlığı ilk kez araştırılmıştır. Bu çalışmada boyama yöntemlerinin *Cryptosporidium* ookistlerini tespit etmedeki özgüllüğü birbirleri ile kıyaslandığında benzer bulunmuştur. Ancak safranin-metilen mavisi boyama yönteminde zeminin boyanmasında güçlük çekilmesi ve Kinyoun asit fast boyama yönteminin uygulamasının diğer yöntemlere göre kolay olması gibi sebeplerden dolayı ikinci metodun daha tercih edilebilir olduğu kanaatine varılmıştır. Boyama yöntemleri ile nested PCR karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan ($p>0.05$) anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Fakat nested PCR ile pozitif olarak saptanan ancak boyama yöntemlerinde negatif sonuç veren numuneler olduğundan, az sayıda ookist olduğunda boyama yöntemleri ile yanlış negatif sonuç elde edilebileceği moleküler yöntemin bu durumu ekarte edebileceği, eğer imkan varsa teşhis metotlarının kombine kullanılması, olanak yok ise moleküler yöntemin tercih edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Bu çalışmada *C.canis* teşhisi yapılan köpeklerden ikisi asemptomatik, bir tanesi ise semptomatiktir. Asemptomatik olanların *Cryptosporidium* ookistlerini çevreye saçıyor olması diğer canlılar açısından da risk oluşturduğu için özellikle klinik bulgu göstermeyen köpeklerde erken teşhis, tedavi ve kontrol çalışmalarının yapılması gerekliliği ortaya konmuştur.

Köpeklerde *Cryptosporidium* türlerinin varlığı üzerine yapılan bu çalışmanın sonuçları, benzer çalışmalarda (Huber ve ark. 2005) vurgulandığı gibi prevalansın coğrafi bölgeye göre değiştiğini, ancak enfeksiyon ile yaş, cinsiyet, ırk, yaşam koşulları ve tüketilen yiyecek-içecek kaynağı arasında ciddi bir ilişki olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Türkiye’de daha önceki bir çalışmada (Çelik ve ark. 2023) köpeklerde *C. parvum* varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ise sekans analiziyle *C.canis* ilk kez rapor edilmiştir. Her ne kadar zoonoz tür *C. parvum* olarak bilinse de, *C. canis* de insanlardan bildirilen türler arasındadır. Mevcut araştırmada çok yüksek oranda prevalans tespit edilmediğinden bulaşma açısından pek fazla risk oluşturmayacağı ancak yine de bu türün zoonoz potansiyeli ile ilgili çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Bununla birlikte zoonotik potansiyele sahip böyle bir parazitin yayılmaması açısından hayvan sahiplerinin çevre temizliğine, su ve gıda hijyenine riayet etmeleri ve Veteriner Hekimler tarafından bilgilendirilmeleri büyük önem taşımaktadır. Yine yapılan çok sayıda çalışmada vurgulandığı gibi ilaçların ve dezenfektanların hastalığı önlemede ve ortadan kaldırmada yeterli olmadığı, bu hastalıktan korunmanın ancak bağışıklığın yüksek tutulması, bakım ve besleme şartlarının iyileştirilmesi sayesinde sağlıklı mikrobiyotanın sağlanması sonucunda mümkün olabileceği kanaatine ulaşılmıştır.



KAYNAKLAR

1. **Abere T, Bogale B, Melaku A.** Gastrointestinal helminth parasites of pet and stray dogs as a potential risk for human health in Bahir Dar town, north-western Ethiopia. *Vet World*, **2013**, s. 6: 388-392.
2. **Ahmed SA, Karanis P.** Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. *Int. J Hyg Environ Health*, **2018**, s. 221 (5):743-763.
3. **Allen AV, Ridley DS.** Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol*, **1970**, s. 23 (6): 545-546.
4. **Alvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A.** *Cryptosporidium molnari* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol*, **2002**, s. 32 (8): 1007-1021.
5. **Alves MEM, Martins FDC, Bräunig P, Pivoto FL, Sangioni LA, ve ark.** Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. and the occurrence of intestinal parasites in fecal samples of naturally infected dogs and cats. *Parasitol Res*, **2018**, s. 117: 3033-3038.
6. **Aslan Çelik BA, Yilmaz R, Çiftçi T, Çelik Ö, Ayan A, ve ark.** A survey of the prevalence and genotypes of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in shelter dogs in Batman, Turkey. *Bulg J Vet Med*, **2023**, ISSN: 1311-1477
7. **Ayan A, Oruç Kılıç Ö.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic dogs in Van province. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, **2020**, s. 11 (2): 64-68.
8. **Aydın Y, Güvenç T, Beyaz L, Sancak AA.** Intestinal cryptosporidiosis associated with distemper in a dog. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **2004**, s. 51: 233-235.
9. **Ayinmode AB, Obebe OO, Falohun OO.** Molecular detection of *Cryptosporidium* species in street-sampled dog faeces in Ibadan, Nigeria. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, **2018**, s. 14: 54-58.
10. **Aynur ZE.** *Trichomonas vaginalis* ve *Cryptosporidium parvum* parazitlerinde bulunan sistein proteaz genlerinin klonlanması ve rekombinant olarak üretilmesi, Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, **2020**.
11. **Balassiano BCC, Campos MR, Pereira MJS.** Factors associated with gastrointestinal parasite infection in dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Prev Vet Med*, **2009**, s. 91 (2-4): 234-240.
12. **Barlık F.** Ağrı yöresinde insan ve buzağılardan elde edilen dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin mikroskopi ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Doktora tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, **2023**.
13. **Bartleson C, Goldoft M, Kobayashi J.** Foodborne outbreak of cryptosporidiosis-Spokane, Washington, 1907. *JAMA*, **1998**, s. 280 (7): 595-596.
14. **Besser-Wiek JW, Forfang J, Hedberg CW, Korlath JA, Osterholm MT, ve ark.** Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*-Minnesota, 1995. *Morb Mortal Wkly Rep*, **1996**, s. 45 (36): 783-784.
15. **Bolland SJ, Zahedi A, Oskam C, Murphy B, Ryan U.** *Cryptosporidium bollandi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from angelfish (*Pterophyllum scalare*) and Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Exp Parasitol*, **2020**, s. 217: 107956.
16. **Bouazid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM.** *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*, **2013**, s. 26 (1): 115-134.
17. **Cacciò SM, Chalmers R.** Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infec*, **2016**, s. 22 (6): 471-480.
18. **Cama VA, Bern C, Sulaiman IM, Gilman RH, Ticona E, ve ark.** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J Eukaryot Microbiol*, **2003**, s. 50: 531-533.
19. **Cao Y, Fang C, Deng J, Yu F, Ma D, ve ark.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in pet dogs in Xinjiang, China. *Parasitol Res*, **2022**, s. 121 (5): 1429-1435.
20. **Casemore DP.** Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol*, **1991**, s. 44 (6): 445-451.
21. **Ceber K, Aslan G, Otağ F, Delhaloğlu N, Oztürk C, ve ark.** Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. *Türkiye Parazitol Derg*, **2005**, s. 29 (4): 224-228.
22. **Cervone M, Gavazza A, Zbriger A, Mancianti F, Perrucci, S.** Intestinal parasite infections in dogs affected by multicentric lymphoma and undergoing chemotherapy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **2019**, s. 63: 81-86.

23. **Chalmers RM, Sturdee AP, Mellors P, Nicholson V, Lawlor F, ve ark.** *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: A preliminary report. *Lett Appl Microbiol*, **1997**, s. 25 (5): 380-384.
24. **Chalmers RM.** *Cryptosporidium*. In: Microbiology of Waterborne Diseases microbiological aspects and risks. 2nd ed. Elsevier Ltd, USA, **2014**.
25. **Chalmers RM.** Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann Ist Super Sanita*, **2012**, s. 48 (4): 429-446.
26. **Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, ve ark.** *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg*, **2006**, s. 75 (5): 851.
27. **Chukwu VE, Daniels OO, Olorunfemi JC, Opara MN.** *Cryptosporidium* oocysts: prevalence in dogs in Abuja, Federal Capital Territory, Nigeria. *Ann Parasitol*, **2019**, s. 65 (4): 321-327.
28. **Cirak VY, Bauer C.** Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **2004**, s. 117(9-10): 410-413.
29. **Clark DP.** New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, **1999**, s. 12: 554-563.
30. **Čondlová Š, Horčíčková M, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, ve ark.** *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *Eur J Protistol*, **2018**, s. 63: 1-12.
31. **Cui Z, Dong H, Wang R, Jian F, Zhang S, ve ark.** A canine model of experimental infection with *Cryptosporidium canis*. *Exp Parasitol*, **2018**, s. 195: 19-23.
32. **Current WL, Navin TR.** *Cryptosporidium*: its biology and potential for environmental transmission. *Crit Rev Environ Sci Technol*, **1986**, s. 17 (1): 21-51.
33. **Current WL, Upton SJ, Haynes TB.** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n.sp.(Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool*, **1986**, s. 33(2): 289-296.
34. **Çelik ÖY, Koçhan A, Çelik BA, Ayan A, Akyildiz G, ve ark.** *Cryptosporidium* spp. in dogs- prevalence and genotype distribution. *Acta Sci Vet*, **2023**, s. 51: 1916.
35. **Çınar TZ.** Neonatal buzağlarda cryptosporidium'un yaygınlığı ve çiftlik yönetimi ile ilişkisi, Doktora tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, **2023**.
36. **D'Antonio RG, Winn RE, Taylor JP, Gustafson TL, Current WL, ve ark.** A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Intern Med*, **1985**, s. 103: 886-888.
37. **Denizhan V, Karakuş A.** Van ilindeki sokak köpeklerinde gastrointestinal protozoonların prevalansı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, **2019**, s. 12 (1): 25-29.
38. **Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect*, **2002**, s. 4(10): 1059-1066.
39. **Dinç H, Aslan Ö.** İshalli köpeklerde *Cryptosporidium parvum*'un varlığının araştırılması. *J Vetbio Sci Tech*, **2023**, s. 8(1): 22-29.
40. **Dubey JP, Speer CA, Fayer R.** Cryptosporidiosis of man and Animal. In: General biology of cryptosporidium, 1st ed. CRC Press, Boca Raton, **1990**, s. 1-31.
41. **DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, ve ark.** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Eng J Med*, **1995**, s. 332(13): 855-859.
42. **Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM.** *Cryptosporidium viatorum* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. *Int J Parasitol*, **2012**, s. 42(7): 675-682.
43. **Faraj AA, Majeed SA, Feidhel SR.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in feces of 160 domestic dogs in Baghdad, Iraq. *Online J Vet Res*, **2018**, s. 22(7): 563-567.
44. **Fayer R, Lewis EJ, Trout JM, Graczyk TK, Jenkins MC, ve ark.** *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg Infect Dis*, **1999**, s. 5(5): 706-710.
45. **Fayer R, Morgan U, Upton SJ.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, **2000**, 30(12-13): 1305-1322.
46. **Fayer R, Nerad T.** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, s. 62: 1431-1433
47. **Fayer R, Santín M, Macarisin D.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol*, **2010**, s. 172(1-2): 23-32.
48. **Fayer R, Santín M, Trout JM.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol*, **2008**, s. 156(3-4): 191-198.
49. **Fayer R, Santín M, Xiao L.** *Cryptosporidium bovis* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol*, **2005**, s. 91(3): 624-629.

50. **Fayer R, Santín M.** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovis aries). *Vet Parasitol*, **2009**, s. 164(2-4): 192-200.
51. **Fayer R, Trout JM, Jenkins MC.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol*, **1998**, s. 1165-1169.
52. **Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lal AA, ve ark.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol*, **2001**, s. 87(6): 1415-1422.
53. **Fayer R.** Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. In: General Biology. CRC Press, Boca Raton, **2007**, s. 1–42.
54. **Gelletlie R, Stuart J, Soltanpoor N, Armstrong R, Nichols G.** Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*, **1997**, s. 350(9083): 1005-1006.
55. **Ghoshal U, Jain V, Dey A, Ranjan P.** Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay for stool antigen detection for the diagnosis of cryptosporidiosis among HIV negative immunocompromised patients in a tertiary care hospital of northern India. *J Infect Public Heal*, **2018**, s. 11(1): 115-119.
56. **Gomez-Bautista M, Ortega-Mora L, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E.** Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol*, **2000**, s. 66: 1866-1870.
57. **Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R, Anderson MS.** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Appl Environ Microbiol*, **1996**, s. 62(9): 3234-3237.
58. **Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R, Bixler H.** House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg*, **1999a**, s. 61(3): 500-504.
59. **Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R, Trout J, Goodale HJ.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory water-fowl species (Canada goose, *Branta canadensis*). *Trop Med Int Health*, **1997**, s. 2(4): 341-347.
60. **Graczyk TK, Fayer R, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA.** Cryptosporidium oocysts in Bent Mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res*, **1999b**, s. 85: 518-520.
61. **Graczyk TK, Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Farley CA, ve ark.** *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl Environ Microbiol*, **1998**, s. 64(7): 2736-2738.
62. **Griffiths JK.** Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol*, **1998**, s. 40: 37-85.
63. **Hayes EB, Matte TD, O'Brien TR, McKinley TW, Logsdon GS, ve ark.** Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N England J Med*, **1989**, s. 320(21): 1372-1376.
64. **Hijjawi N.** In vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture. In: *Cryptosporidium: From molecules to disease*. 1st ed, Elsevier, Amsterdam, **2003**, s. 233-253.
65. **Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'Anzo M, Ryan UM, Olson ME, ve ark.** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol*, **2004**, s. 34(7): 769-777.
66. **Holubová N, Sak B, Horčíčková M, Hlásková L, Květoňová D, ve ark.** *Cryptosporidium avium* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol Res*, **2016**, s. 115: 2243-2251.
67. **Holubová N, Tůmová L, Sak B, Hejzlarová A, Konečný R, ve ark.** Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasit Vectors*, **2020**, s. 13: 1-17.
68. **Holubová N, Zikmundová V, Limpouchová Z, Sak B, Konečný R, ve ark.** *Cryptosporidium proventriculi* sp. n.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *Eur J Protistol*, **2019**, s. 69: 70-87.
69. **Homayouni MM, Razavi SM, Asadpour M.** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in household dogs and cats from Shiraz, Southwestern Iran. *Vet Ital*, **2019**, s. 55(4): 311-318.
70. **Horčíčková M, Čondlová Š, Holubová N, Sak B, Květoňová D, ve ark.** Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitol*, **2019**, s. 146(2): 220-233.
71. **Huang J, Chen M, He Y, Chen H, Huang M, ve ark.** *Cryptosporidium equi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae): biological and genetic characterisations. *Int J Parasitol*, **2023**, s. 53(10): 545-554.
72. **Huber F, Bomfim TCB, Gomes RS.** Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Vet Parasitol*, **2005**, s. 130(1-2): 69-72.

73. **Inman LR, Takeuchi A.** Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet Pathol*, **1979**, s. 16(1): 89-95.
74. **Iseki M.** *Cryptosporidium felis* sp. n.(Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol*, **1979**, s. 28: 285-307.
75. **Itoh N, Oohashi Y, Ichikawa-Seki M, Itagaki T, Ito Y, ve ark.** Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* species in household dogs, pet shop puppies, and dogs kept in a school of veterinary nursing in Japan. *Vet Parasitol*, **2014**, s. 200(3-4): 284-288.
76. **Itoh N, Tanaka H, Iijima Y, Kameshima S, Kimura Y.** Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in breeding kennel dogs. *Korean J Parasitol*, **2019**, s. 57(2): 197-200.
77. **Jaiswal V, Brar APS, Sandhu BS, Singla LD, Narang D, ve ark.** Comparative evaluation of various diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium* infection from the faecal samples of diarrhoeic bovine calves. *Iran J Vet Res*, **2022**, s. 23(3), 247.
78. **Ježková J, Horčíčková M, Hlášková L, Sak B, Květoňová D, ve ark.** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitol*, **2016**, s. 63: 035.
79. **Ježková J, Limpouchová Z, Prediger J, Holubová N, Sak B, ve ark.** *Cryptosporidium myocastoris* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species adapted to the Nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms*, **2021a**, s. 9(4): 813.
80. **Ježková J, Prediger J, Holubová N, Sak B, Konečný R, ve ark.** *Cryptosporidium rattii* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitol*, **2021b**, s. 148(1): 84-97.
81. **Jian F, Qi M, He X, Wang R, Zhang S, ve ark.** Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. *BMC Vet Res*, **2014**, s. 10(1): 1-4.
82. **Jirku M, Valigurová A, Koudela B, Krizek J, Modrý D, ve ark.** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol*, **2008**, s. 55(2): 81-94.
83. **Khurana S, Chaudhary P.** Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Trop Parasitol*, **2018**, s. 8(1): 2-7.
84. **Khurana S, Sharma P, Sharma A, Malla N.** Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Trop Parasitol*, **2012**, s. 2(1): 20-23.
85. **Kváč M, Havrdová N, Hlaskova L, Daňková T, Kanděra J, ve ark.** *Cryptosporidium proliferans* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PloS one*, **2016**, s. 11(1): e0147090.
86. **Kváč M, Hofmannová L, Hlášková L, Květoňová D, Vítovec J, ve ark.** *Cryptosporidium erinacei* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet Parasitol*, **2014**, s. 201(1-2): 9-17.
87. **Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, ve ark.** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitol*, **2013**, s. 191(3-4): 218-227.
88. **Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, ve ark.** *Cryptosporidium occultus* sp. n.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur J Protistol*, **2018**, s. 63: 96-104.
89. **Lal A, Cornish LM, Fearnley E, Glass K, Kirk M.** Cryptosporidiosis: a disease of tropical and remote areas in Australia. *PLoS Negl Trop Dis*, **2015**, s. 9(9): e0004078.
90. **Lasser KH, Lewin KJ, Ryning FW.** Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum Pathol*, **1979**, s. 10(2): 234-240.
91. **Levine ND.** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol*, **1980**, s. 830-834.
92. **Li W, Li Y, Song M, Lu Y, Yang J, ve ark.** Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. *Vet Parasitol*, **2015b**, s. 208(3-4): 125-134.
93. **Li X, Pereira MDGC, Larsen R, Xiao C, Phillips R, ve ark.** *Cryptosporidium rubeyi* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, **2015a**, s. 4(3): 343-350.
94. **Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, ve ark.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*, **2000**, s. 47(1): 91-95.
95. **Lucio-Forster A, Griffiths JK, Cama VA, Xiao L, Bowman DD.** Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol*, **2010**, s. 26: 174–179.

96. **Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, ve ark.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, **1994**, s. 331(3): 161-167.
97. **Mawdsley JL, Brooks AE, Merry RJ, Pain BF.** Use of a novel soil tilting table apparatus to demonstrate the horizontal and vertical movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* in soil. *Biol Fertil Soils*, **1996**, s. 23: 215-220.
98. **McDonald V.** Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol*, **2000**, s. 22: 597-604.
99. **Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **1976**, s. 70(6): 1156-1160.
100. **Mhaissen MN, Flynn PM.** *Cryptosporidium* Species. In: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5th ed. Elsevier, Philadelphia, **2017**, s. 1306-1308.
101. **Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Beckett GA, ve ark.** An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA*, **1994**, s. 272(20): 1592-1596.
102. **Monge R, Chinchilla M.** Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *J Food Prot*, **1996**, s. 59(2): 202-203.
103. **Mor SM, Tumwine JK, Ndeezi G, Srinivasan MG, Kaddu-Mulindwa DH, ve ark.** Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: potential for respiratory transmission. *Clin Infect Dis*, **2010**, s. 50(10): 1366-1372.
104. **Mosallanejad B, Hamidinejat H, Avizeh R, Ghorbanpoor Najafabadi M, Razi Jalali MH.** Antigenic detection of *Cryptosporidium parvum* in urban and rural dogs in Ahvaz district, outhwestern Iran. *Iran J Vet Res*, **2010**, s. 11(3): 273-278.
105. **Mugala L, Siwila J, Saasa N, Pandey GS.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dogs in Lusaka district of Zambia. *Vet World*, **2018**, s. 11(5): 585-589.
106. **Mundim MJS, Rosa LAG, Hortencio SM, Faria ESM, Rodrigues RM, ve ark.** Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet Parasitol*, **2007**, s. 144(3-4): 356-359.
107. **Murnik LC, Dauschies A, Delling C.** *Cryptosporidium* infection in young dogs from Germany. *Parasitol Res*, **2022**, s. 121(10): 2985-2993.
108. **Murnik LC, Dauschies A, Delling C.** Gastrointestinal parasites in young dogs and risk factors associated with infection. *Parasitol Res*, **2023**, s. 122(2): 585-596.
109. **Namazi F, Razavi SM.** Herbal-based compounds: A review on treatments of cryptosporidiosis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **2024**, s. 100521.
110. **Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **1976**, s. 70(4): 592-598.
111. **O'Hara SP, Chen XM.** The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect*, **2011**, s. 13(8-9): 721-730.
112. **Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL.** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis*, **1999**, s. 180(4): 1275-1281.
113. **Olabanji GM, Maikai BV, Otolorin GR.** Prevalence and risk factors associated with faecal shedding of *Cryptosporidium* oocysts in dogs in the Federal Capital Territory, Abuja, Nigeria. *Vet Med Int*, **2016**, s. 2016(1): 4591238.
114. **Osman M, Bories J, El Safadi D, Poirel MT, Gantois N, ve ark.** Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol*, **2015**, s. 214(1-2): 167-170.
115. **Ölmez N, Aydın N, Sarı B.** Protozoon kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde probiyotikler. In: Veteriner Bilimlerinde Probiyotiklerin Terapötik, Profilaktik ve Fonksiyonel Kullanımı. Özgür yayınları, Gaziantep, **2023**, 195-199.
116. **Öner G.** Ege bölgesindeki köpeklerde *Cryptosporidium* spp.'nin prevalansı. Yüksek lisans tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, **2019**.
117. **Painter JE, Hlavsa MC, Collier SA, Xiao L, Yoder JS, ve ark.** Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2011-2012; Giardiasis surveillance-United States, 2011-2012. *CDC MMWR*, **2015**, s. 64(3): 1-25.
118. **Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM.** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol*, **1971**, s. 8(5-6): 479-484.
119. **Pardy RD, Wallbank BA, Striepen B, Hunter CA.** Immunity to *Cryptosporidium*: insights into principles of enteric responses to infection. *Nat Rev Immunol*, **2024**, s. 24(2): 142-155.

120. **Pavlásek I, Lavickova M, Horák P, Král J, Král B.** *Cryptosporidium varanii* n. sp. Apicomplexa: Cryptosporidiidae in emerald monitor (*Varanus prasinus*) Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. *Gazella*, **1995**, s. 22: 99-108.
121. **Pavlásek I.** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia Klin Mikrobiol*, **1999**, s. 3: 290-301.
122. **Pedraza-Díaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLauchlin J.** Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* dog type' from patients in England. *J Med Microbiol*, **2001**, s. 50(3): 293-296.
123. **Peng X, Murphy T, Holden NM.** Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Appl Environ Microbiol*, **2008**, s. 74(23): 7101-7107.
124. **Piekara-Stepinska A, Piekarska J, Gorczykowski M.** *Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in Poland. *Ann Agric Environ Med*, **2021**, s. 28(2): 345-347.
125. **Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura IN, ve ark.** New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis*, **1999**, s. 5(3): 444-449.
126. **Pintar KDM, Fazil A, Pollari F, Charron DF, Waltner-Toews D, ve ark.** A risk assessment model to evaluate the role of fecal contamination in recreational water on the incidence of cryptosporidiosis at the community level in Ontario. *Risk Anal: Int J*, **2010**, s. 30(1): 49-64.
127. **Pinto DJ, Vinayak S.** *Cryptosporidium*: host-parasite interactions and pathogenesis. *Curr Clin Microbiol Rep*, **2021**, s. 8: 62-67.
128. **Plutzer J, Karanis P.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol*, **2009**, s. 165(3-4): 187-199.
129. **Power ML, Ryan UM.** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J Parasitol*, **2008**, s. 94(5): 1114-1117.
130. **Quiroz ES, Bern C, MacArthur JR, Xiao L, Fletcher M, ve ark.** An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *J Infect Dis*, **2000**, s. 181(2): 695-700.
131. **Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Moreno-Gonzalo J, Pedraza-Díaz S, Gomez-Bautista M, ve ark.** Prevalence of intestinal parasite infections in stray and farm dogs from Spain. *Rev Bras Parasitol Vet*, **2020**, s. 29: e014920.
132. **Rekha KMH, Puttalakshamma GC, D'Souza PE.** Comparison of different diagnostic techniques for the detection of cryptosporidiosis in bovines. *Vet World*, **2016**, s. 9(2): 211-215.
133. **Remesar S, García-Dios D, Calabuig N, Prieto A, Díaz-Cao JM, ve ark.** Cardiorespiratory nematodes and co-infections with gastrointestinal parasites in new arrivals at dog and cat shelters in north-western Spain. *Transbound Emerg Dis*, **2022**, s. 69(5): e3141-e3153.
134. **Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, ve ark.** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol*, **2012**, s. 130(3): 274-281.
135. **Rimhanen-Finne R, Enemark HL, Kolehmainen J, Toropainen P, Hänninen ML.** Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, **2007**, s. 145(3-4): 345-348.
136. **Rinaldi L, Maurelli MP, Musella V, Veneziano V, Carbone S, ve ark.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. *Res Vet Sci*, **2008**, s. 84(3): 413-415.
137. **Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, ve ark.** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *Int J Parasitol*, **2010**, s. 40(13): 1539-1548.
138. **Rosanowski SM, Banica M, Ellis E, Farrow E, Harwood C, ve ark.** The molecular characterisation of *Cryptosporidium* species in relinquished dogs in Great Britain: a novel zoonotic risk?. *Parasitol Res*, **2018**, s. 117: 1663-1667.
139. **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*, **2021a**, s. 51(13-14): 1099-1119.
140. **Ryan U, Lawler S, Reid S.** Limiting swimming pool outbreaks of cryptosporidiosis—the roles of regulations, staff, patrons and research. *J Water Health*, **2017**, s. 15(1): 1-16.
141. **Ryan U, Papparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Kueh S, ve ark.** *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp Parasitol*, **2015**, s. 150: 31-35.
142. **Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L.** An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals*, **2021b**, s. 11(11): 3307.

143. **Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, ve ark.** *Cryptosporidium hominis* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol*, **2002**, s. 49(6): 433-440.
144. **Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, ve ark.** *Cryptosporidium suis* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol*, **2004**, s. 90(4): 769-773.
145. **Ryan UM, Power M, Xiao L.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol*, **2008**, s. 55(1): 22-26.
146. **Ryan UM, Xiao L, Read C, Sulaiman IM, Monis P, ve ark.** A redescription of *Cryptosporidium galli* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J Parasitol*, **2003**, s. 89(4): 809-813.
147. **Sakarya Y, Kar S, Tanyuksel M, Karaer Z, Babur C, ve ark.** Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **2010**, s. 16(6): 977-980.
148. **Sanad MM, Al-Malki JS, Al-Ghabban AG.** Control of cryptosporidiosis by probiotic bacteria. In International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015), Phuket (Thailand), 7-8 Nisan **2015**, s. 49-54.
149. **Sannella AR, Suputtamongkol Y, Wongsawat E, Cacciò SM.** A retrospective molecular study of *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-infected patients from Thailand. *Parasit Vectors*, **2019**, s. 12: 1-6.
150. **Scorza AV, Lappin MR.** Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats on the Pine Ridge Reservation. *Vet Sci*, **2017**, s. 4(3): 43.
151. **Scorza AV, Tangtrongsup S.** Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats. *Top Companion Anim Med*, **2010**, s. 25(3): 163-169.
152. **Sevinç F, Dik B.** Veteriner Protozooloji. In: *Cryptosporidiidae*. 2nd ed. Medisan Yayınevi, Ankara, **2015**, s. 125-131.
153. **Sheather AL.** The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol Ther*, **1923**, s. 36: 266-275.
154. **Simonato G, Frangipane di Regalbano A, Cassini R, Traversa D, Beraldo P, ve ark.** Copromicroscopic and molecular investigations on intestinal parasites in kenneled dogs. *Parasitol Res*, **2015**, s. 114: 1963-1970.
155. **Slavin, D.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol Ther*, **1955**, s. 65: 262-266.
156. **Šmit I, Potočnjak D, Matijatko V, Torti M, Jović I, ve ark.** The influence of *Giardia duodenalis* on the occurrence of clinical signs in dogs. *Vet Sci*, **2023**, s. 10(12): 694.
157. **Smith AF, Neumann N, Banting G, Klein C, Liccioli S, ve ark.** Molecular characterization of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. from dogs and coyotes in an urban landscape suggests infrequent occurrence of zoonotic genotypes. *Vet Parasitol*, **2020**, s. 281: 109115.
158. **Smith H.** *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. In: *Diagnostics*. 2nd ed. CRC Press, USA, **2007**, s. 174-207.
159. **Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S.** The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev*, **2014**, s. 27(3): 575-586.
160. **Starling CR, Arrowood MJ.** Parasitic Protozoa. In: *Cryptosporidia*. 2nd ed. Academic Press, United Kingdom, **1993**, s. 159-224.
161. **Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, ve ark.** *Cryptosporidium* spp'nin dışkıdan Nested PCR ve carbol fuchsin boyama yöntemi ile teşhis edilmesi. *Türkiye Parazit Derg*, **2008**, s. 32(4): 305-308.
162. **Taghipour A, Olfatifar M, Bahadory S, Godfrey SS, Abdoli A, ve ark.** The global prevalence of *Cryptosporidium* infection in dogs: a systematic review and meta analysis. *Vet Parasitol*, **2020**, s. 281: 109093.
163. **Tamer GS, Gülenç S.** Dışkıda *Cryptosporidium* spp. antijenlerinin ELISA ile araştırılması. *Türkiye Parazit Derg*, **2008**, s. 32(3): 198-201.
164. **Tangtrongsup S, Scorza AV, Reif JS, Ballweber LR, Lappin MR, ve ark.** Seasonal distributions and other risk factors for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats in Chiang Mai, Thailand. *Prev Vet Med*, **2020**, s. 174: 104820.
165. **Tavalla M, Kord E, Abdizadeh R, Asgarian F.** Molecular study of *Cryptosporidium* spp. in dogs from southwest of Iran. *Jundishapur J Microbiol*, **2017**, s. 10(4): e43412.
166. **Thompson RA, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, ve ark.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*, **2005**, s. 59: 77-158.

167. **Titilincu A, Mircean V, Achelaritei D, Cozma V.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic dogs by ELISA and risk factors associated with infection. *Lucrari Stiintifice Med Vet*, **2010**, s. 43(1): 7-12.
168. **Traversa D.** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit Vectors*, **2010**, s. 3: 1-4.
169. **Tyzzer E.** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Exp Biol Med*, **1907**, s. 5(1): 12-13.
170. **Tyzzer E.** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. & sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res*, **1910**, s. 18: 487-509.
171. **Tyzzer E.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd*, **1912**, s. 26: 394-412.
172. **Tzipori S, Campbell I.** Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *J Clin Microbiol*, **1981**, s. 14: 455-456
173. **URL-1.** *Cryptosporidium* spp. ookistlerine ait yaşam döngüsü. Erişim: https://cs.m.wikipedia.org/wiki/Soupor:Life_cycle_of_Cryptosporidium_Credit_Image_courtesy_of_Gino_Barzizza.png. 2024. Erişim tarihi: 08.11.2024
174. **URL-2.** Hatay siyasi haritası. Erişim: http://cografyaharita.com/turkiye_mulki_idare_haritalari3.html. 2023. Erişim tarihi: 20.07.2023
175. **Ünal GG, Gokpinar S.** Prevalence of intestinal parasites in dogs and its importance in terms of public health. *IJVAR*, **2020**, s. 3(3): 64-68.
176. **Vanathy K, Parija SC, Mandal J, Hamide A, Krishnamurthy S.** Cryptosporidiosis: A mini review. *Trop Parasitol*, **2017**, s. 7(2): 72-80.
177. **Vetterling JM, Jervis HR, Merrill TG, Sprinz H.** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J Protozool*, **1971**, s. 18(2): 243-247.
178. **Vitela-Mendoza I, Padilla Díaz K, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos-Parra M.** *Cryptosporidium* infection frequency in dogs on dairy farms and in urban areas of the state of Aguascalientes, Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*, **2019**, s. 10(1): 1-13.
179. **Wang A, Ruch-Gallie R, Scorza V, Lin P, Lappin MR.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Vet Parasitol*, **2012**, s. 184: 335-340.
180. **Weisburger WR, Hutcheon DF, Yardley JH, Roche JC, Hillis WD, ve ark.** Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *Am J Clin Pathol*, **1979**, s. 72(3): 473-478.
181. **Widmer G, Orbach EA, Tzipori S.** β -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol*, **1999**, s. 65(4): 1584-1588.
182. **Wilson RB, Holscher MA, Lyle SJ.** Cryptosporidiosis in a pup. *J Am Vet Med Assoc*, **1983**, s. 183: 1005-1006.
183. **Xiao L, Cama VA, Cabrera L, Ortega Y, Pearson J, ve ark.** Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J Clin Microbiol*, **2007**, s. 45(6): 2014-2016.
184. **Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, ve ark.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl Environ Microbiol*, **2001**, s. 67: 1097-1101.
185. **Xu H, Jin Y, Wu W, Li P, Wang L, ve ark.** Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. *Parasit Vectors*, **2016**, s. 9: 1-9.
186. **Yılmaz A.** İshalli immünsüpresif ve immünkompetan olgularda makroskobik, serolojik ve moleküler yöntemlerle *Cryptosporidium* spp.'nin araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2015**.
187. **Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, ve ark.** Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet Parasitol*, **2010**, s. 174: 313-316.
188. **Zahedi A, Bolland SJ, Oskam CL, Ryan U.** *Cryptosporidium abrahamseni* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporididae) from red-eye tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*). *Exp Parasitol*, **2021**, s. 223: 108089.
189. **Zahedi A, Durmic Z, Gofton AW, Kueh S, Austen J, ve ark.** *Cryptosporidium homai* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporididae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Vet Parasitol*, **2017**, s. 245: 92-101.

190. **Zerpa R, Huicho L.** Childhood cryptosporidial diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* sp. in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pediatr Infect Dis J*, **1994**, s. 13(6): 546-548.



EKLER

EK-1

Sahipli köpeklere ait izole DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek No	Konsantrasyon	A260/280	A260/230
1	35.35	1.88	0.67
2	57.63	1.76	0.56
3	103.04	1.76	0.85
4	113.37	1.84	1.11
5	328.35	1.93	1.69
6	248.91	1.92	1.70
7	115.13	1.91	1.86
8	241.38	1.94	1.78
9	36.14	1.71	0.69
10	60.52	1.86	1.56
11	411.62	1.94	2.05
12	87.67	2.03	1.93
13	180.17	1.97	1.69
14	129.98	1.89	1.43
15	169.95	1.97	1.30
16	75.75	1.90	1.89
17	342.50	2.13	2.02
18	94.23	1.85	1.29
19	147.25	1.98	1.73
20	384.77	2.11	2.04
21	180.43	2.03	1.69
22	82.91	1.86	1.27
23	110.36	1.94	1.52
24	142.19	1.91	1.53
25	140.35	1.93	1.85
26	62.78	1.78	1.26
27	300.04	1.98	1.71
28	119.91	1.96	1.37
29	35.21	1.60	0.71
30	89.43	1.77	1.01
31	89.04	1.90	1.28
32	40.81	2.05	1.03
33	212.27	1.92	1.26
34	18.31	1.80	1.35
35	230.28	1.88	1.41
36	44.23	1.64	0.43
37	135.52	1.63	0.74
38	44.73	1.78	1.47
39	13.66	1.41	1.40
40	197.04	1.90	1.90
41	102.93	1.82	1.25
42	16.42	1.27	0.52
43	172.19	2.10	1.57
44	109.11	1.95	1.42
45	80.96	1.93	1.30

46	26.31	1.37	0.55
47	189.31	1.86	1.19
48	30.25	1.71	0.30
49	18.56	1.42	0.59
50	21.30	1.59	0.65
51	87.58	1.74	0.99
52	30.42	1.39	0.38
53	65.74	1.87	1.10
54	123.00	1.90	1.22
55	135.87	1.75	0.90
56	50.24	1.90	0.98
57	94.06	1.91	1.21
58	132.39	1.76	1.00
59	153.30	1.87	1.10
60	78.03	1.64	0.68
61	62.86	1.49	0.30
62	60.32	1.69	0.75
63	187.61	2.09	1.87
64	249.40	1.98	1.46
65	22.82	1.97	1.27
66	66.73	1.54	0.83
67	156.12	1.72	1.04
68	283.64	1.95	1.98
69	438.38	2.07	1.89
70	137.94	1.83	1.15
71	66.96	1.87	1.36
72	22.66	1.63	0.56
73	51.36	1.42	0.43
74	141.29	1.87	1.25
75	218.20	2.00	1.71
76	85.38	1.69	0.65
77	67.02	1.86	0.88
78	69.47	1.68	0.85
79	80.34	1.68	0.85
80	72.36	1.76	0.85
81	395.37	2.06	1.67
82	178.15	1.72	1.06
83	84.71	1.86	1.29
84	99.88	1.93	1.27
85	64.19	1.27	0.40
86	34.48	1.93	1.23
87	82.08	2.00	1.67
88	48.73	1.88	1.17
89	98.02	1.81	0.96
90	117.96	1.70	0.86
91	99.10	1.80	0.97
92	219.56	1.93	1.51
93	52.30	1.85	1.31
94	88.23	1.88	0.96
95	111.88	1.95	1.79
96	26.14	1.82	0.87
97	260.16	1.95	1.46
98	532.24	2.00	1.66
99	79.74	1.68	0.71
100	57.59	1.78	0.79
101	42.02	1.86	1.08
102	269.35	1.93	1.59

103	84.66	1.69	0.76
104	82.20	1.74	0.76
105	91.36	1.85	1.14
106	187.10	2.01	1.81
107	58.35	1.71	0.93
108	45.09	1.59	1.02
109	37.56	1.66	0.89
110	39.51	1.88	1.38
111	84.12	1.87	1.00
112	90.65	1.89	1.31
113	279.36	1.96	2.15
114	95.25	1.89	1.40
115	399.40	2.03	1.75
116	34.69	1.66	0.83
117	61.01	1.89	0.87
118	39.28	1.77	1.08
119	252.43	2.18	1.56
120	420.43	1.98	1.83
121	393.43	2.04	2.05
122	439.41	2.14	2.06
123	110.04	1.93	1.85
124	61.94	1.80	1.15
125	155.05	2.06	1.93

Sahipsiz köpeklere ait izole DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek No	Konsantrasyon	A260/280	A260/230
1	124.06	1.97	1.40
2	87.24	1.86	1.58
3	64.59	1.82	1.26
4	143.21	2.06	1.87
5	60.40	1.77	1.11
6	62.25	1.81	1.26
7	15.65	1.44	1.13
8	95.89	1.74	0.80
9	37.93	1.71	1.16
10	133.05	1.95	1.67
11	385.40	1.96	1.96
12	19.39	1.62	0.76
13	419.07	1.96	1.76
14	25.81	1.63	0.79
15	82.53	1.81	0.96
16	43.51	1.72	0.56
17	36.03	1.76	1.18
18	144.98	1.86	1.66
19	66.09	1.84	1.52
20	29.13	1.70	1.90
21	61.60	1.81	1.28
22	47.32	1.77	1.32
23	53.38	1.77	1.30
24	44.48	1.76	1.44
25	144.93	1.89	1.81
26	96.57	1.81	1.36

27	110.45	1.82	1.31
28	35.88	1.66	0.92
29	91.54	1.82	1.34
30	232.98	2.04	1.93
31	502.15	2.09	1.97
32	132.39	1.99	1.80
33	600.97	2.10	1.96
34	465.01	2.17	2.12
35	80.22	1.92	1.47
36	96.50	1.88	1.55
37	115.53	1.82	1.26
38	28.04	1.54	0.62
39	175.32	1.89	1.38
40	37.42	1.80	1.38
41	51.15	1.80	1.04
42	121.91	1.84	1.27
43	104.32	1.81	1.08
44	52.07	2.03	1.40
45	22.04	1.78	1.00
46	34.26	1.83	1.20
47	64.01	1.75	1.00
48	38.18	1.64	0.82
49	23.73	1.78	0.97
50	22.38	1.75	0.96
51	208.98	2.15	2.09
52	126.56	1.77	1.06
53	176.34	1.86	1.13
54	174.88	1.85	1.12
55	37.86	1.67	0.71
56	53.48	1.78	1.39
57	242.41	2.15	1.95
58	25.65	1.69	0.68
59	127.14	1.94	1.35
60	117.82	1.93	1.58
61	144.62	1.89	1.31
62	12.10	1.62	0.88
63	141.11	2.05	1.46
64	62.29	1.98	2.19
65	89.13	1.92	1.82
66	9.18	1.77	0.80
67	43.91	1.92	1.47
68	59.12	1.56	0.68
69	17.81	1.76	0.90
70	52.09	2.03	0.62
71	223.54	2.02	1.58
72	107.38	1.99	1.49
73	51.87	1.76	0.88
74	63.35	1.94	1.39
75	193.01	2.08	1.67
76	79.59	1.87	1.24
77	196.07	2.05	1.69
78	195.42	1.92	1.21
79	109.59	1.88	1.14
80	71.87	1.94	1.32
81	69.34	1.88	1.12
82	30.66	1.80	0.68
83	43.01	1.85	1.18

84	71.94	1.85	1.33
85	93.97	1.87	1.04
86	32.00	1.80	1.61
87	73.96	1.93	0.98
88	260.23	1.96	1.73
89	81.60	1.93	1.14
90	24.32	1.82	1.10
91	25.90	1.80	0.54
92	119.37	2.03	1.46
93	46.46	1.79	1.29
94	3.87	1.28	0.32
95	222.10	2.13	2.17
96	533.15	2.00	2.09
97	193.44	1.99	1.72
98	185.61	1.99	1.31
99	158.05	1.96	1.48
100	496.93	2.02	1.76
101	159.54	2.00	1.65
102	108.31	2.03	1.78
103	78.72	1.89	1.37
104	33.85	1.65	0.72

105	49.56	1.92	1.79
106	391.75	2.11	2.24
107	191.35	2.02	1.89
108	209.27	2.17	2.20
109	116.53	2.09	2.07
110	127.76	2.04	1.88
111	143.80	1.95	1.41
112	178.29	2.03	1.68
113	178.12	1.99	1.80
114	304.69	2.03	1.75
115	245.05	1.96	2.19
116	440.80	2.09	2.07
117	327.94	2.02	1.87
118	149.13	2.05	1.90
119	3.15	1.21	0.26
120	251.76	2.01	1.54
121	12.85	1.87	0.75
122	382.71	1.98	1.84
123	109.94	2.05	1.70
124	64.03	1.90	1.33
125	109.50	1.88	1.27

EK-2**Hastalara ait anamnez bilgileri alınırken kullanılan şablon**

Hastanın;	1	2	3	4
• Adı (varsa)				
• Yaşı				
• Cinsiyeti				
• Irkı				
• Nereden geldiği (şehir/ilçe)				
• Yaşam koşulları (sokakta, evde, evde+bahçede, bahçede)				
• İçtikleri suyun kaynağı (şebeke suyu, hazır su, şebeke suyu+hazır su)				
• Yiyeceklerinin neler olduğu (ev yemekleri, kuru mama, yaş mama, hem kuru hem de yaş mama vb)				
• Bağışıklık sistemini baskılayacak kronik seyirli herhangi bir hastalığın varlığı (Distemper, Parvoviral enterit vb)				
• Bağışıklık sistemini baskılayacak bir ilacın kullanılıp/kullanılmadığı (Dekzametazon gibi)				
• Klinik olarak semptom görülüp/görülmediği (varsa hangisi/hangileri) • ishal, halsizlik, iştahsızlık, dehidrasyon, kilo kaybı, kondisyon kaybı, çevreye karşı ilgisizlik, kıl örtüsünde parlaklık kaybı)				
• Birlikte seyreden herhangi bir protozoon varlığı (<i>Giardia</i> spp. vb)				
• Birlikte seyreden herhangi bir helmint varlığı (<i>Toxocara</i> spp. vb)				

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimini Mustafa Hotamışlı İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitime başladı ve 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2018 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Parazitolojisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitime başladı. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.

