

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

NEONATAL BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM*'UN
YAYGINLIĞI VE ÇİFTLİK YÖNETİMİ İLE İLİŞKİSİ

ZEYNEP TOPRAK ÇINAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

AYDIN-2023

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

**NEONATAL BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM*'UN
YAYGINLIĞI VE ÇİFTLİK YÖNETİMİ İLE İLİŞKİSİ**

ZEYNEP TOPRAK ÇINAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-21023 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Zeynep TOPRAK ÇINAR tarafından hazırlanan “Neonatal Buzağılarda *Cryptosporidium*’un Yaygınlığı ve Çiftlik Yönetimi ile İlişkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/06/2023

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Serkan BAKIRCI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Göksel ERBAŞ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Zuhâl ÖNDER	Erciyes Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Emrah ŞİMŞEK	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR'e, doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında değerli zamanını ayırarak bilgi, ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Prof. Dr. Serkan BAKIRCI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında sabırla bilgi ve tecrübelerini aktaran Dr. Öğr. Üyesi Selin HACILARLIOĞLU'na, her konuda yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Metin PEKAĞIRBAŞ, doktora öğrencisi Veteriner Hekim Hakan KANLIOĞLU ve Veteriner Hekim Heycan Berk AYDIN'a çok teşekkür ederim.

Tezin istatistik analizlerinin yapılmasına destek veren Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Fatih DEMİREL'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca sağladıkları katkı ve desteklerinden dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nın öğretim üyeleri Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Prof. Dr. Hasan EREN, Prof. Dr. Nuran AYSUL, Doç. Dr. Süleyman AYPAK ve Doç. Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ'e ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için eşime, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etken.....	3
2.1.1. Taksonomi	3
2.1.2. Morfoloji ve Biyoloji.....	7
2.2. Epidemiyoloji	12
2.3. Klinik ve Patolojik Belirtiler	15
2.4. Tanı.....	18
2.4.1. Boyama Yöntemleri.....	19
2.4.1.1. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi.....	20
2.4.1.2. Modifiye Kinyoun Asit-Fast Boyama.....	21
2.4.1.3. Modifiye Ziehl-Neelsen (mZN) Boyama Yöntemi.....	21
2.4.1.4. Karbol Fuksin Boyama Yöntemi.....	21
2.4.1.5. Auramine Phenol (AP, Auramin Fenol) Boyama Yöntemi.....	22

2.4.1.6. Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemi.....	22
2.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri.....	22
2.4.2.1. Serumda Antikor Aranmasında Kullanılan Yöntemler.....	23
2.4.2.2. Dışkıda <i>Cryptosporidium</i> spp.'ye Özgü Antijen Aranmasında Kullanılan Yöntemler.....	23
2.4.3. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	24
2.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
2.4.3.2. Nested PCR.....	27
2.4.3.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	28
2.5. Tedavi.....	28
2.6. Korunma ve Kontrol.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Dışkı Örneklerinin Toplanması	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Kinyoun'un Asit-Fast Boyama	36
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu	38
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	40
3.2.4. Nested PCR	40
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
3.2.6. İstatiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR	43
4.1. Kinyoun'un Asit-Fast Boyama Bulguları	43
4.2. PCR ve Nested PCR Bulguları	44
4.3. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin İshal ile İlişkisi	45
4.4. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin İlçelere Göre Dağılımı	45

4.5. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Sürü Boyutu ile İlişkisi.....	46
4.6. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Mevsim ile İlişkisi.....	47
4.7. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Yaş ile İlişkisi.....	47
4.8. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Irk ile İlişkisi.....	48
4.9. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Cinsiyet ile İlişkisi.....	49
4.10. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Kolostrum Kullanımı ile İlişkisi.....	49
4.11. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Yem ile İlişkisi.....	52
4.12. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Sütten Kesim Zamanı ile İlişkisi.....	52
4.13. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Hiperimmün Serum (<i>E.coli</i>) Uygulaması ile İlişkisi.....	53
4.14. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Uygulanan Tedavi/Takviye ile İlişkisi.....	54
4.15. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Mortalite ile İlişkisi.....	55
4.16. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Buzağı Sağlık Durumu ile İlişkisi.....	55
4.17. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Temizlik/Sanitasyon ile İlişkisi.....	56
4.18. <i>Cryptosporidium</i> spp.'nin Barınaklar ile İlişkisi.....	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	83
Ek 1 (ADÜ-HADYEK)	123
BİLİMSEL ETİK BEYANI	124
ÖZ GEÇMİŞ	125

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
amps	: Amper
BKI	: Bumped Kinase İnhibitor
BSA	: Bovine Serum Albümin
bp	: Base Pair (Baz Çifti)
C.	: <i>Cryptosporidium</i>
°C	: Santigrat Derece
cm	: Santimetre
COWP	: <i>Cryptosporidium</i> Ookist Wall Protein
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Nükleotit Trifosfat-PCR Nucleotide Mix
EDTA	: Etilen Diamin Tetra-Asedik Asit
ELISA	: Enzim İşaretli İmmunosorbant Testi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
g	: Gram
GLP-2	: Glukagon Benzeri Peptit-2
Gp60	: 60 kDa Glikoprotein Gen Lokusu

HSP70	: Heatschock Protein 70 kDa (70 kDa ısı şok proteinleri)
IC	: İmmünokoromografik
ICZN	: International Code of Zoological Nomenclature (Uluslararası Zoolojik Adlandırma Kodu)
IFA	: Immunoflouresans Assay
IFN	: IFN
IgA	: İmmunglobulin A
IgG	: İmmunglobulin G
KDa	: KiloDalton
ml	: Mililitre
mRNA	: mRNA
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
PBS	: Tuzlu Fosfat Solusyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR-RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR
pH	: Power of Hydrogen (Asitlik ya da bazlık derecesini tarif eden hidrojen gücü ölçüsü)
pmol/µL	: Pikomol/Mikrolitre
p (değeri)	: Ki-Kare Sonucu Değerlendirme Değeri
RCF	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm	: Revolutions per Minute (Dakikadaki dönüş sayısı)
rRNA	: Ribozomal RNA
sn	: Saniye
spp.	: Species (Cinse ait tüm türler)
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SSU-rRNA	: Small Subunit Ribozomal RNA
TAE	: Tris Asetat Etilendiamintetraasetik Asit
Taq polimeraz	: Thermus Aquaticus Bakterisinden Elde Edilen DNA Polimeraz Enzimi
TRAP-C1	:Cryptosporidium-1 Geninin Thrombospondin-Related Adhesive Proteini
TRAP-C2	: Cryptosporidium-2 Geninin Thrombospondin-Related Adhesive Proteini
USDA	: Amerika Ulusal Sağlık İzleme Sistemi
UV	: Ultraviyole Işık
WB	: Western Blot
%	: Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Cinste tanımlanan <i>Cryptosporidium</i> türleri	5
Şekil 2.	<i>Cryptosporidium</i> 'un yaşam döngüsü.....	11
Şekil 3.	<i>Cryptosporidium</i> spp.' nin yaş ile ilişkisi.....	48
Şekil 4.	Kolostrum alma yönteminin <i>Cryptosporidium</i> spp. ile ilişkisi.....	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Dışkı örneklerinin toplanması.....	36
Resim 2a.	Preparatların boyanması.....	37
Resim 2b.	Preparatların boyanması.....	38
Resim 3.	DNA ekstraksiyonu.....	39
Resim 4.	Agaroz jel elektroforezi.....	42
Resim 5a.	<i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri-1.....	43
Resim 5b.	<i>Cryptosporidium</i> spp. ookistleri-2.....	43
Resim 6.	Nested PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü.....	44

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Cryptosporidium</i> cinsinde tanımlanmış türler.....	6
Tablo 2.	<i>Cryptosporidium</i> türleri, baskın konak özellikleri ve birincil enfeksiyon bölgeleri.....	8
Tablo 3.	Kullanılan primer dizilimleri.....	40
Tablo 4.	Kullanılan primer dizilimleri.....	41
Tablo 5.	Kinyoun'un Asit-Fast Boyama Sonuçları ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	44
Tablo 6.	Dışkı kıvamı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	45
Tablo 7.	PCR + Nested PCR verilerinin ilçelere göre oranlarının dağılımı.....	45
Tablo 8.	Sürü boyutu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	46
Tablo 9.	Mevsim ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	47
Tablo 10.	Yaş ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	48
Tablo 11.	İrk ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	49
Tablo 12.	Cinsiyet ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	49
Tablo 13.	Kolostrum alma süresi ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	50
Tablo 14.	Kolostrum alım zamanı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	50
Tablo 15.	Kolostrum miktarı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı	50
Tablo 16.	Kolostrum alma yöntemi ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	51
Tablo 17.	Yem ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	52

Tablo 18.	Sütten Kesim Zamanı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	53
Tablo 19.	Hiperimmün Serum (<i>E.coli</i>) Uygulaması ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	53
Tablo 20.	Uygulanan Tedavi/Takviye ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	54
Tablo 21.	Mortalite ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	55
Tablo 22.	Buzağı sağlık durumu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	56
Tablo 23.	Temizlik/Sanitasyon ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	56
Tablo 24.	Barınak durumu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.....	57

ÖZET

NEONATAL BUZAĞILARDA *CRYPTOSPORIDIUM*' UN YAYGINLIĞI VE ÇİFTLİK YÖNETİMİ İLE İLİŞKİSİ

Toprak Çınar Z, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Parazitolojisi, Doktora Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bu çalışmada Denizli ilindeki neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp. türlerinin yaygınlığının belirlenmesinin yanında, çiftlik yönetimi ile ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Tanımlayıcı nitelikte gerçekleştirilen araştırma, Mart 2021 ve Ekim 2021 tarihleri arasında, Denizli ilindeki 26 farklı büyükbaş hayvan üretme-yetiştirme çiftliğinde bulunan 250 neonatal dönemdeki buzağıdan dışkı numunesi alınarak ve çiftliklere dair bilgiler kaydedilerek gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda alınan numuneler Kinyoun'un Asit-Fast Boyama yöntemi ile mikroskopik olarak incelenmiş, ardından PCR ve Nested PCR yöntemleri kullanılarak *Cryptosporidium* spp. türlerinin varlığı belirlenmiştir. Verilerin analizinde tanımlayıcı istatistik olarak pearson ki-kare testi kullanılmıştır.

Bulgular: Denizli ilinde neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp.'nin yaygınlığı Kinyoun'un Asit-Fast boyama sonuçlarına göre %38,8 iken PCR ve Nested PCR analizleri sonuçlarına göre %68,4 olarak belirlenmiştir. Yaş arttıkça enfeksiyonun görülme oranının azaldığı, en yüksek 1-10 günlük (%84) yaşta görüldüğü, dişi buzağılarda (%87,4) erkek buzağılara oranla daha fazla görüldüğü, doğar doğmaz hiperimmün serum (*E. coli*) kullanan buzağılarda daha az oranda (%46,2) rastlanıldığı tespit edilmiştir.

Sonuç: PCR ve Nested PCR yöntemi, Kinyoun'un Asit-Fast Boyama yöntemine göre daha duyarlıdır. Denizli ili neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp. yaygınlığı oldukça yüksektir (%68,4). Enfeksiyon ile ilişkili epidemiyolojik faktörler oldukça değişken ve çeşitli olması sebebiyle etki eden etmenleri ortaya koymak ve koruyucu hekimlik uygulamalarını doğru şekilde sürdürebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Halk sağlığını korumak adına "Tek Sağlık" stratejisi benimsenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Çiftlik yönetimi, *Cryptosporidium*, Epidemiyoloji, Neonatal buzağı, Prevalans.

ABSTRACT

PREVALENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* IN NEONATAL CALVES AND ASSOCIATED WITH FARM MANAGEMENT

Toprak Çınar Z, Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Parasitology (Veterinary Medicine), Doctorate Thesis, Aydın, 2023.

Objective: This study aimed to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Denizli province and to investigate its relationship with farm management.

Material and Methods: This descriptive study was conducted between March 2021 and October 2021 in 26 different cattle breeding farms in Denizli province, where 250 neonatal calves were sampled for fecal analysis, and information about the farms was recorded. The collected samples were examined microscopically using Kinyoun's Acid-Fast Staining method, and then the presence of *Cryptosporidium* spp. was determined using PCR and Nested PCR methods. Pearson chi-square test was used as descriptive statistics in the analysis of the data.

Results: The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Denizli province was found %38,8 according to Kinyoun's Acid-Fast staining, while it was %68,4 according to PCR and Nested PCR analysis. The infection rate was found to decrease with age, with the highest rate of infection occurring in calves aged 1-10 days (%84). The infection was found more common in female calves (%87,4) than in male calves. It was also found that the use of hyperimmune serum (*E. coli*) in newborn calves resulted in a lower rate of infection (%46,2).

Conclusion: The PCR and Nested PCR methods are more sensitive than Kinyoun's Acid-Fast Staining method. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Denizli province is quite high (%68,4). Due to the variable and diverse epidemiological factors associated with the infection, further studies are needed to identify the contributing factors and to implement appropriate preventive measures. The "One Health" strategy should be adopted to protect public health.

Keywords: *Cryptosporidium*, Epidemiology, Farm management, Neonatal calves, Prevalence.

1. GİRİŞ

Neonatal dönem, doğumu takip eden 0 ile 28. günler arasındaki buzağı yetiştiriciliğinin en kritik dönemi olarak tanımlanmakta (Mickelsen ve Evermann, 1994) ve hayvanların gelecekteki verim parametrelerini etkileyen en önemli dönem olarak kabul edilmektedir (Lorenz ve diğerleri, 2011a; Smith, 2012). Söz konusu dönemde buzağı ishalleri yaygın görülen bir semptom (Acha ve diğerleri, 2004; Khan ve Zaman, 2007; Özkan ve diğerleri, 2011) olmakla birlikte neonatal buzağı ishallerinin uzun vadeli etkilerinin önemi tam olarak açıklanamamakta; ancak bu dönemdeki ishal, özellikle yaşamın ilk altı ayında buzağuların ortalama günlük ağırlık artışını önemli ölçüde azaltabilmektedir (Donovan ve diğerleri, 1998).

Yapılan bir çalışmada ilk 15 gün ve 16-60 günlük dönemin her ikisinde ishal olan buzağuların vücut ağırlık artışının daha düşük olduğu bildirilmektedir (Topal ve Batmaz, 2020). Waltner Toews ve diğerleri (1986a), yaşamın ilk 90 gününde diyare tedavisi gören düvelerin 900 gün sonra buzağılamasının diğer düvelerden 2,9 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da, yine ishal anemnezi olan düvelerin, bu semptomları göstermeyen buzağılara kıyasla ilk buzağılama yaşının yüksek olduğu belirtilmektedir (Aghakeshmiri ve diğerleri, 2017; Rossini, 2004).

Gelişmiş ülkelerde yapılan bazı çalışmalarda buzağı mortaliteleri %2-12 arasında bulunmaktadır (Donovan ve diğerleri, 1998; Dutil ve diğerleri, 1999; Sivula ve diğerleri, 1996). Amerika Ulusal Sağlık İzleme Sistemi süt işletmelerinde 1 aylıktan küçük süttan kesilen buzağılarda ölümlerin %57'sinin ishalden kaynaklandığını bildirmektedir (USDA, 2008). ABD'de buzağı ölüm oranı ise %7 oranında sınırlı kalmaktadır (Klein ve diğerleri, 2009). Donovan ve diğerleri, 0-6 aylık buzağılarda genel mortalite oranını %11,7 olarak belirtirken, bunun %10'unun diyareden, %55,4'ünün pnömoniden, %21,9'unun septisemiden ve %11,8'inin ise diğer sebeplerden kaynaklandığını ifade etmektedir (Donovan ve diğerleri, 1998). Dutil ve diğerleri ise ishalden %29 ve pnömoniden %18 oranında ölümlerin gerçekleştiğini bildirmektedir (Dutil ve diğerleri, 1999). Buzağı ölüm oranları Türkiye'de devlet işletmelerinde %10, bireysel işletmelerde ise %50'lere kadar çıkabilmektedir (Akyüz ve diğerleri, 2017). Buzağı ishali kaynaklı buzağı ölümlerinin ekonomik kayıpları yılda 280.000 buzağı üretimi olan Norveç için yaklaşık 10 milyon dolar olarak hesaplanmaktadır (Osteras ve diğerleri, 2007). ABD'de 976 milyon dolar yıllık ekonomik kayıp bildirilmektedir

(Toombs ve diğeri, 1994). Türkiye’de ise buzağı ölümlerine bağılı kaybın en az %15 olduğu ve 2018 yılı için ortalama 3,15 milyar TL’lik bir ekonomik kayıp yaşandığı düşünölmektedir (Şahal ve diğeri, 2018).

Karmaşık etiopatogenezi olan bu sendrom, yüksek morbidite-mortalite oranları, tedavi maliyetleri ve etkilenen buzağılarda düşük büyüme oranları nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Zhu ve diğeri, 2011). Buzağı ishallerinden sorumlu olan en yaygın paraziter ajanlar *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Neoascaris vitulorum* ve *Toxocara vitulorum* gibi parazitlerdir. Paraziter ajanlara ilaveten, bakteriyel (enterotoksijenik *Escherichia coli* K99 ve *Salmonella* spp.) ve viral ajanlar (rotavirus, coronavirus), beslenme faktörleri de ishalde rol oynayan faktörler arasında sıralanmaktadır (Bartels ve diğeri, 2010; Izzo ve diğeri, 2011; Kumar ve diğeri, 2010). Cryptosporidiosis insanlara enfekte sığır, koyun, kedi ve köpeklerden fekal-oral yolla bulaşabilen zoonotik bir enfeksiyondur (Olson ve diğeri, 2004; Reif ve diğeri, 1989). Gelişmiş ölkelerde %4,3 ve az gelişmiş ölkelerde %10,4 oranında bildirilen insan enfeksiyonları *Cryptosporidium*’un, küresel olarak diyare hastalığının önde gelen bulaşıcı nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir (Robinson ve diğeri, 2022).

Ölkemizde neonatal dönemdeki buzağı kayıplarına dair halen net bir veri elde edilememesine rağmen en az %15 olduğu düşünölmektedir. Bu oran çiftliklere ve bölgelere göre değışiklik göstermekle birlikte, koruyucu hekimlik hizmetlerinin uygulandığı çiftliklerde dahi yüksek olduğu düşünölmektedir. Ancak; neonatal dönemdeki buzağılarda *Cryptosporidium*’un yaygınlığı ve çiftlik yönetimi arasındaki ilişkiye dair literatür bilgi oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla ciddi ekonomik kayıplara yol açan neonatal kayıpların temelindeki sebepler tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, koruyucu tedbirlere yönelik eylem planları da eksik kalmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp. türlerinin yaygınlığının belirlenmesinin yanında, çiftlik yönetimi ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etken

Cryptosporidium türleri, monoksen yaşam döngüsüne sahip, hücre içi, ekstrasitoplazmik protozoanlar olarak bilinmektedir. Çeşitli omurgalı türlerin gastrointestinal ve solunum epitelinin mikrovillus sınırını işgal etmekte ve çiftlik hayvanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Egyed ve diğerleri, 2003). Bağışıklığı yeterli bireylerde enfeksiyon genellikle kendi kendini sınırlar, ancak bağışıklığı baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit edici hale gelmektedir (O' Donoghue, 1995).

2.1.1. Taksonomi

Cryptosporidium cinsi, >6000 tür içeren Apicomplexa filumundaki 300'den fazla türden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Rueckert ve diğerleri, 2019). Tarihinin büyük bir bölümünde *Cryptosporidium*, diğer enterik koksidiyen parazitlerle yaşam döngüsü benzerliklerine dayalı olarak Eucoccidiidae ailesinde bir koksidiyen parazit olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Levine, 1980). *Cryptosporidium*'un "Systema Naturae 2000"e göre sınıflandırılması şu şekildedir (Taxonomicon, 2022):

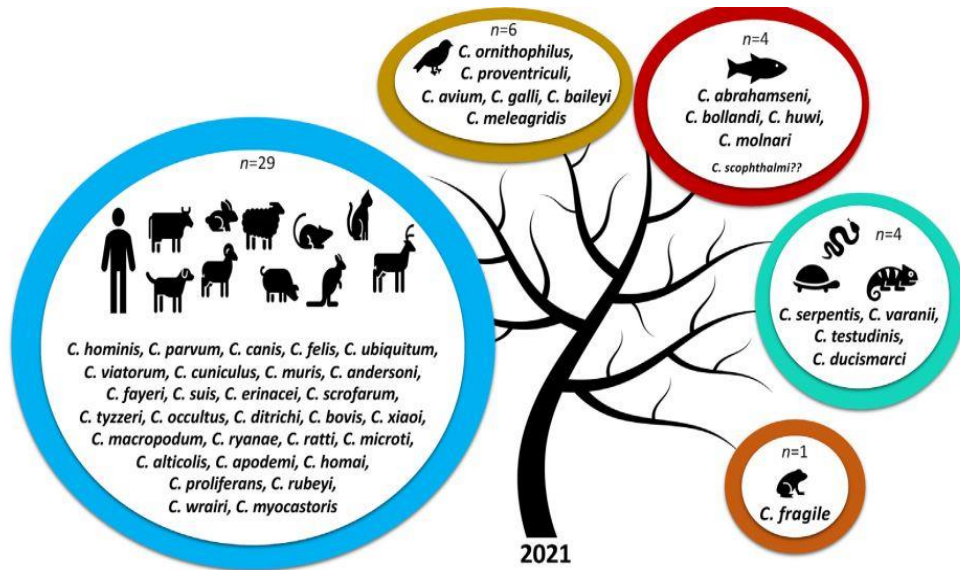
- Natura-natüre
- actualia-actual entities
- Mundus Plinius-physical World
- naturalia-natural bodies
- Biota Wagner 2004 [Wiemann, de Queiroz, Rowe, Planavsky, Anderson, Gogarten, Turner& Gauthier 2020]
- "neomura" Cavalier-Smith 1987
- Domain Eukaryota Chatton, 1925-eukaryotes
- "neokaryotes"- Cavalier- Smith 1993-mitochondrial eukaryotes

- “neozoa” Cavalier-Smith 1993
- ✓ Üstalem Corticata Lankester, 1878
- ✓ Alem Chromista Caval.-Sm. (1981)-chromists
- ✓ Altalem Harosa Cavalier-Smith, 2010
- ✓ Infraalem Halvaria Cavalier-Smith, 2010
- Üst Şube Alveolata Cavalier-Smith, 1991
- Şube Miozoa Cavalier-Smith, 1987
- Altşube Myzozoa Cavalier-Smith & Chao, 2004
- İnfraşube Apicomplexa Levine, 1970
- Üst sınıf Sporozoa Leuckart, 1879
- Sınıf Gregarinomorpha Grassé, 1953
- Alt sınıf Cryptogregaria Cavalier-Smith, 2014 [monotypic]
- Takım Cryptogregarida^T Cavalier-Smith, 2014 [monotypic]
- ❖ Aile Cryptosporidiidae Léger, 1911 [monotypic]
- ✓ Cins *Cryptosporidium*^T Tyzzer, 1907

Cryptosporidium spp. ilk olarak 1895 yılında Clarke tarafından, farelerin mide epitelinin üzerindeki spor kümeleri olarak tanımlanmış ve burada görülen sporlar; yüzen, yayılan sporlar anlamına gelen “swam spores” olarak adlandırılmıştır (Yılmaz, 2015). Akabinde Tyzzer, 1907 yılında yapmış olduğu çalışmasında, laboratuvar farelerinin mide bez epitel hücrelerine yerleşen bu canlıların yeni bir cins olduğunu ileri sürmüş ve diğer coccidian parazitlerin aksine, bu parazitlerin, ookistlerinin içinde bulunan sporozoitleri çevreleyen sporokist yapılarının bulunmaması nedeniyle “hidden sporocysts (gizli sporokistler)” olarak tanımlanan “*Cryptosporidium*” ismini vermiştir. Aynı araştırmacı 1910 yılında yaptığı bir çalışmada bulduğu bu paraziti *Cryptosporidium muris* olarak isimlendirmiş, 1912 yılında yapmış olduğu başka bir çalışmada ise laboratuvar farelerinin ince bağırsağında bulunan ve farklı bir tür olan *C. parvum*’u keşfetmekle kalmayıp, çalışmalarında bu coccidian protozoonun ekstraselüler olarak konağa yerleştiğini belirtmiştir. Tyzzer, çalışmalarında *Cryptosporidium muris*’in eşeysiz ve eşeyli üreme döngüleriyle, sporogoni-merogoni safhalarının tümünü görmüş ve parazitin ookistlerinin dışkı yolu ile konaktan atıldığını da

ifade etmiştir (Alabdeen, 2014; Çelik, 2001; Hazer, 2007; Leng ve diğerleri, 1996; Şimşir, 2006; Yu, 2010).

Cryptosporidium cinsinin birkaç türü, enfekte ettikleri konakları ile eşleştirilerek adlandırılmaktadırlar. Daha sonraki morfolojik ve çapraz bulaşma çalışmaları ise birçok türü geçersiz kılmaktadır. Tzipori ve diğerleri (1980), *Cryptosporidium*'un tek bir tür olabileceğini öne sürmektedir. 1990'larda Fayer, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. nasorum*, *C. parvum*, *C. serpentis*, *C. wrairi* olmak üzere sekiz geçerli türü adlandırılmış kabul etmekte ve birkaç isimli türün varlığını öne sürmektedir (Fayer, 2008). *Cryptosporidium*'da tür ayrımı, büyük ölçüde Xiao ve diğerleri (2004) tarafından belirlenen dört kritere dayanmaktadır. Bunlar: ookist morfolojisinin bir tanımı, doğal konak özgüllüğünün bir tanımı, genetik karakterizasyonlar ve Uluslararası Zoolojik Adlandırma Koduna uygunluktur (ICZN) (Xiao ve diğerleri, 2004a). Böylelikle günümüzde çoğu omurgalı konaklara özgü olan çok sayıda *Cryptosporidium* türü tanımlanmaktadır (Smith ve diğerleri, 2005) (Tablo 1).



Şekil 1. Cinsten tanımlanan *Cryptosporidium* türleri (Ryan ve diğerleri, 2021).

Şu anda en az 44 onaylanmış *Cryptosporidium* türü bulunmaktadır; kuşlarda altı tür (*C. ornithophilus*, *C. proventriculi*, *C. avium*, *C. galli*, *C. baileyi* ve *C. meleagridis*); balıklarda dört tür (*C. abrahamseni*, *C. bollandi*, *C. huwi*, *C. molnari*); bir amfibi türü (*C. fragile*); sürüngenlerde dört tür (*C. serpentis*, *C. varanii*, *C. testudines* ve *C. ducismarci*) ve memelilerde ise 29 tür (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*,

C. cuniculus, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. fayeri*, *C. suis*, *C. erinacei*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. occultus*, *C. ditrichi*, *C. bovis*, *C. xiaoi*, *C. alticolis*, *C. apodemi*, *C. homai*, *C. proliferans*, *C. rubeyi*, *C. wrairi*, *C. myocastoris*) tanımlanmaktadır (Ryan ve diğerleri, 2021) (Şekil 1).

Tablo 1. *Cryptosporidium* cinsinde tanımlanmış türler.

Türler	Konak	Kaynak
<i>C. hominis</i>	İnsan	Morgan-Ryan ve diğerleri, 2002
<i>C. parvum</i>	Sığır, İnsan	Gomez-Bautista ve diğerleri, 2000
<i>C. andersoni</i>	Sığır	Lindsay ve diğerleri, 2000
<i>C. muris</i>	Kemirgen	Pavlassek ve Ryan, 2007
<i>C. suis</i>	Domuz	Gherasim ve diğerleri, 2012; Ryan ve diğerleri, 2004
<i>C. felis</i>	Kedi	Morgan ve diğerleri, 2000
<i>C. canis</i>	Köpek	Fayer ve diğerleri, 2001
<i>C. wrairi</i>	Gine domuzu	Vetterling ve diğerleri, 1971
<i>C. baileyi</i>	Kümes hayvanları	Current ve diğerleri, 1986
<i>C. meleagridis</i>	Hindi, İnsan, Hayvanat bahçesi kuşları	Baroudi ve diğerleri, 2013; Morgan ve diğerleri, 2000; Rohela ve diğerleri, 2005; Xiao ve diğerleri, 2001
<i>C. bovis</i>	Sığır, Koyun	Fayer ve diğerleri, 2005
<i>C. galli</i>	İspinoz, Tavuk	Ryan ve diğerleri, 2003
<i>C. serpentis</i>	Sürüngen	Pedraza-Diaz ve diğerleri, 2009
<i>C. saurophilum</i>	Kertenkele, Yılan	Pavlassek ve Ryan, 2008; Xiao ve diğerleri, 2004a
<i>C. molnari</i>	Balık	Alvarez-Pellitero ve Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. scopthalmi</i>	Balık	Alvarez-Pellitero ve diğerleri, 2004
<i>C. xiaoi</i>	Koyun, Yak, Keçi	Fayer ve Santin, 2009

Tablo 1. *Cryptosporidium* cinsinde tanımlanmış türler (devam).

Türler	Konak	Kaynak
<i>C. fragile</i>	Kurbağa	Jirku ve diğerleri, 2008
<i>C. ryanae</i>	Sığır	Fayer ve diğerleri, 2008
<i>C. marcopodum</i>	Kurbağa	Power ve Ryan, 2008
<i>C. fayeri</i>	Kurbağa	Ryan ve diğerleri, 2008
<i>C. ubiquitum</i>	Sığır	Fayer ve diğerleri, 2010

44 türe ek olarak, muhtemelen çoğu gelecekte resmi tür olarak tanımlanacak 120'den fazla genotip rapor edilmektedir (Ryan ve diğerleri, 2021)

Küçük alt birim (SSU) rRNA geninin dizi analizi, farklı *Cryptosporidium* türleri arasında nükleotid farklılıkları göstermektedir. Bu dizilere dayanan filogenetik ağaçlar *Cryptosporidium*'un mide parazitleri (*C. muris* ve *C. serpentis*) ve bağırsak parazitleri (*C. parvum*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. saurophilum* ve *C. baileyi*), olarak iki gruba ayrılabilirliğini ve mide parazitlerinin daha büyük ookistlere sahip olduğunu bildirmektedir (Delling ve diğerleri, 2022).

2.1.2. Morfoloji ve Biyoloji

Cryptosporidium türleri mide bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarında, hücre içi ekstrasitoplazmik alanda yer almakta ve apicoplast bulundurmama gibi özellikleri ile diğer intrasellüler protozoonlardan ayırt edilmektedir (Current ve Garcia, 1991; Fayer, 2004; Sears ve Kirckpatrick, 2001).

Boyutları türler arasında (Tablo 2) ve çoğalma aşamalarında farklılıklar göstermektedir (O'Donoghue, 1995). *Cryptosporidium* türlerinin ookistleri küresel şekilde olup, *C. ryanae* 3,7x3 µm, *C. xiaoi* 3,9x3,4 µm, *C. suis* 4,4x5,1 µm, *C. bovis* 4,5x5,3 µm, *C. parvum* 4,5x5,5 µm ve *C. andersoni* 7,4x5,6 µm ebatlarında bildirilmektedir (Fayer ve Santin, 2009). Sığırların ince bağırsağın distal bölümünü enfekte eden *C. parvum* ve abomazumu enfekte eden *C. muris* ookistlerin boyut ve şekillerindeki farklılıklara göre mikroskopik incelemede

kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. *C. parvum* 4,5-5,0 mm boyutta ve küresel şekilde, *C. muris* ise 5,6-7,4 mm boyutta ve oval şekilde görülmektedir. Ayrıca *C. parvum* sadece yenidoğan ishalleri ile ilişkilendirilirken, *C. muris* yetişkin sığırlarda süt veriminde azalma ve kilo kaybıyla ilişkilendirilmektedir (De Graaf ve diğerleri, 1999).

Tablo 2. *Cryptosporidium* türleri, baskın konak özellikleri ve birincil enfeksiyon bölgeleri (Carey ve Trevors, 2004).

<i>Cryptosporidium</i> spp.	Baskın Konak	Ookist Uzunluğu (µm)	Ookist Genişliği (µm)	Enfeksiyonun birincil yerleşim yeri
<i>C. andersoni</i>	Sığır	6,6–8,1	5,0–6,5	Abomasum
<i>C. baileyi</i>	Kuş	6,0–7,5	4,8–5,7	Bursa fabricius, kloaka
<i>C. felis</i>	Kedi	3,2–5,1	3,0–4,0	İnce bağırsak
<i>C. hominis</i>	İnsan	4,4–5,4	4,4–5,9	İnce bağırsak
<i>C. meleagridis</i>	Kuş	4,5–6,9	4,2–5,3	İnce bağırsak
<i>C. muris</i>	Fare	6,5–8,7	4,6–6,3	Mide
<i>C. nasorum</i>	Balık	3,5–4,7	4,2–5,0	Mide, ince bağırsak
<i>C. parvum</i>	152 Memeli Türü	4,5–5,4	4,2–5,2	İnce bağırsak
<i>C. saurophilum</i>	Sinek, Kertenkele	4,4–5,6	4,2–5,2	Mide, ince bağırsak
<i>C. serpentis</i>	Birçok sürüngen türü	5,6–6,6	4,8–5,6	Mide
<i>C. wrairi</i>	Gine domuzu	4,8–5,6	4,0–5,0	İnce bağırsak

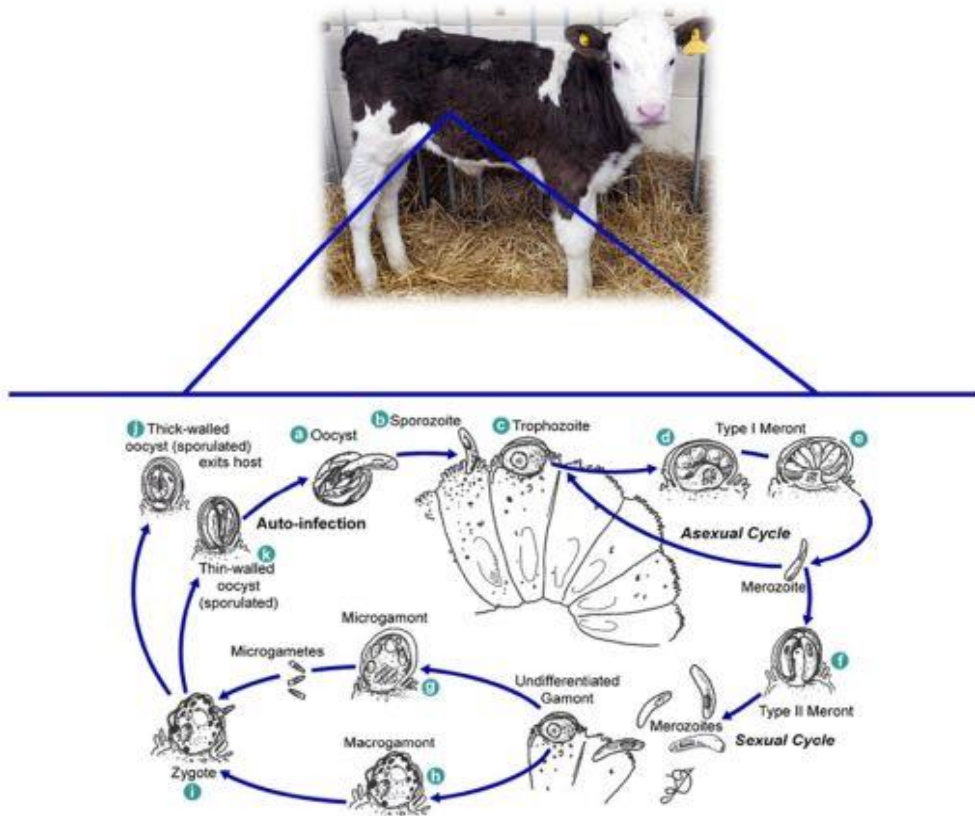
Cryptosporidium türlerinin biyolojik gelişmesinde konak dışı (ekzojen) ve konak içi (endojen) olmak üzere iki temel gelişme dönemi görülmektedir (Fayer, 2008). Konak dışında enfektif ookist formları bulunurken, konak içinde aseksüel çoğalma (merogoni) ve seksüel çoğalma (gametogoni) ile sporogoni dönemleri görülmektedir (Fayer, 2008). Söz konusu döngü, oocystin alınmasını takiben sırasıyla şekillenen kistin açılması, merogoni, gametogoni,

fertilizasyon, oocystin oluşumu ve sporogoni aşamalarından oluşmaktadır (Starling ve Arrowood, 1993).

Dışkı ile ortalama 5 µm büyüklüğünde 4 adet birbirine paralel çıplak sporozoit içeren küresel ookistler atılmaktadır. Bu ookistler enfektif olup, fekal oral bulaşma ile hızlıca yayılmaktadır (Tzipori ve Ward, 2002). Dış ortamda çevre şartlarına oldukça dayanıklı olan ookistlerin dış ve iç cidarı protein, lipid ve karbonhidrattan oluşan bir koruyucu kompleks bariyere sahiptir (O'Hara ve Chen, 2011). Dışkı, mukus gibi yollarla dış ortama atılan sporlanmış ookistler 2-6 µm çapında kalın duvarlı yapıya sahip olup, içlerinde 4 adet sporozoit bulundurmaktadır. Diğer coccidian parazitlerden farklı olarak ookistlerin içerisindeki sporozoitleri çevreleyen sporokistler bulunmamaktadır (Fayer, 2008). Sporozoitler 5,2 x 1,2 µm çapında virgül şeklinde, ince cidarlı ve hareketli yapılardan oluşmaktadır (Fayer, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Sindirim yolu ile alınan oocystler normal şartlarda ince bağırsakta açılmasına "ekskistasyon" denilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Sindirim yolu ile alınan ookistler midede pankreatik enzimler, ince bağırsakta safra tuzları, ısı, pH ve asitlerin etkisiyle ekskiste olmakta ve sporozoitler serbest hale geçmektedir (Tzipori ve Ward, 2002; O'Hara ve Chen, 2011). Araştırmacılar, genel olarak oocystlerin açılabilmesi ve açılan oocystlerden çıkan sporozoitlerin etkinliği için en uygun pH aralığının 6,8-7,4 olduğunu ifade etmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Sindirim sisteminde serbest kalan sporozoitler, hızlı bir şekilde ince bağırsak epitel hücrelerini işgal etmekte ve burada yaşam döngüsünün konak içindeki safhasını (endojen safha) başlatmaktadır (Current ve Reese, 1986; Thompson ve diğerleri, 2005). *C. parvum* sporozoitleri esas olarak ileumun bağırsak epitel hücrelerini enfekte eder; bununla birlikte, abomazumdan kolona kadar herhangi bir yerde gastrointestinal sistemi enfekte edebilmektedir (Foster ve Smith, 2009). Ayrıca, etkenler sindirim kanalının yanında ikincil olarak safra kanalı, pankreatik kanalları ve solunum sistemini de istila edebilmektedir ki buralarda da sporozoitlerin yerleşme yeri yine yüzlek mukozanın lumene bakan yüzünde yer alan mikrovillusların arasında bulunmaktadır (Fayer ve diğerleri, 1990; Sears ve Kirkpatrick, 2001). *C. hominis*'in esas yerleşim yeri ince bağırsaklar olmakla birlikte, *C. muris*, *C. andersoni* ve *C. serpentis* türleri gastrik mukozaya yerleşmektedir. Bazı *Cryptosporidium* türlerine ekstraintestinal olarak konjunktiva, solunum sistemi, safra kesesi, lenf nodülleri, testis, ovaryum, uterus ve vajinada da rastlanabilmektedir (Fayer 2010; Thompson ve diğerleri, 2005). Sporozoitler apikal kompleks yapıları ile konak bağırsak hücrelerinin apikal yüzlerindeki hücrelere tutunarak parazitofor vakuol oluşturmaktadır (O'Hara ve Chen, 2011;

Tzipori ve Ward, 2002). Parazit önce konak hücre membranı ile temas kurmakta, roptriler uzayarak sporozoitin konak hücre ile temasını sağlamakta ve daha sonra mikronemler ve yoğun granüller gibi apikal organeller harekete geçmektedir. Parazitin konak hücresi ile temasında sporozoit ya da merozoitlerin sahip olduğu glikoproteinler önem kazanmaktadır. Mucin benzeri bu glikoprotein sayesinde konak hücre ile parazitin teması oluşur ve bir parazitofor vakuol şekillenmektedir. Bu parazitofor vakuol içindeki sporozoitler intrasellüler olup, konak-hücre sitoplazması ile direkt teması bulunmamaktadır yani ekstrasitoplazmiktir. Parazitofor vakuol içinde parazitler konoid, roptri ve mikronem gibi organelleri ile konak hücre arasında bir bağ oluşturmaktadır. Oluşturulan bu bağ konak hücre ile direkt teması sağlamaktadır (Fayer, 2008; O'Hara ve Chen, 2011; Tzipori ve Ward, 2002). Sporozoitlerin dokuları istilasında hem konağa hem de parazite ait birçok faktör etkili olmaktadır. Bu faktörler ookist yüzeyinde reseptörlerin eksprese edilmesi, sporozoitlerin kistten çıkması için sinyali verecek olan ookist duvarının tripsine maruz kalması, sporozoitlerin kistten çıkması için parazitlerin gerekli enzimleri (serin proteaz, sistein proteaz, arjinin aminopeptitaz) salgılaması olarak sıralanabilmektedir. Parazitin konak hücreye yapışmasını apikal yüzeyden eksprese edilen sporozoit reseptörleri başlatmaktadır. Parazit ve konak arasındaki tutunmada etkili olduğu düşünülen GP900, GP40/15, Trap-C1, P23, Cpa135, CPS-500, CSL, CP12 ve CP2 reseptörleridir (Borowski ve diğerleri, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Sporozoitler dairesel şekil alarak tek çekirdekli trofozoit yapısına dönüşmektedir. Trofozoitler 2-2,5 µm çapında yuvarlak veya oval yapı göstermekte olup; sporozoit ve merozoit arasında bir geçiş formu olarak karşımıza çıkmaktadır (Thompson ve diğerleri, 2005). Parazitin konak hücre ile temas kurduktan sonra oluşan ilk formu olan oval şekilli merkezinde çekirdek olan trofozoitlerin (2,7x2,7 µm) merogoni ile çoğalması ile Tip I merontlar (6-8 çekirdekli) oluşmaktadır (Fayer, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Cryptosporidiosiste, özellikle de immunsüpresif hastalarda, tip I şizont (meront) oluşumunun sürekli tekrarı söz konusu olabilmektedir ve persistensliğin temelinde bu durum olduğu bildirilmektedir (Starling ve Arrowood, 1993). Tip I merozoit yapıları oval veya yarım ay şeklinde yaklaşık 1,5 µm çapında görülmektedir. Tip I merontların parçalanması ile serbest kalan hareketli Tip I merozoitler yeni hücreleri enfekte ederek ve merogoni ile çoğalarak Tip II merontları (4 çekirdek) oluşturmaktadır (Fayer, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Tip II merontlar 4 adet, 2-3,5 µm sivri şekilli ya da 1,5-1,6 µm pleomorfik şekilli Tip II merozoitleri oluşturmaktadır (Thompson ve diğerleri, 2005). Tip II merontlardan serbest kalan merozoitler, Tip I merontlardan serbest kalan merozoitler gibi yeni bir merogoni döngüsü başlamasına neden olmaz, farklı konak hücrelerinin içine girdikten sonra makro ve mikrogamontlara

dönüşmektedir (Fayer, 2008; O’Hara ve Chen 2011; Tzipori ve Ward, 2002; Thompson ve diğerleri, 2005). Mikrogamontların her birinden 14-16 kamçısız, 1,6-2,2 µm çapında hareketli sperm hücreleri mikrogamet, makrogamontların her birinden yalnızca bir adet 4-6 µm büyüklüğünde makrogamet oluşmakta ve mikrogametle makrogametle birleşmesiyle ise zigot oluşmaktadır (Current ve Reese, 1986; Fayer, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Zigotun etrafı, üç katlı ookist cidarıyla çevrili bulunmaktadır. Döllenen makrogametlerden olgunlaşmamış ookistler oluşmaktadır. Ookistlerin sporogoni döneminde sporlanmasıyla içlerinde dört adet çıplak sporozoit şekillenmekte ve dışkı ile dışarı atılmaktadır (Şekil 2). Sindirim sistemindeki ookistler dışkı ile dışarı atılırken, solunum sistemindeki ookistler solunum ve nazal akıntılarla konağı terk etmektedir (Fayer, 2008; O’Hara ve Chen, 2011; Tzipori ve Ward, 2002).



Şekil 2. *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü (Thomson ve diğerleri, 2017).

Ağız yoluyla alınan sporlanmış ookistler (a), gastrointestinal sistemin (ya da solunum sistemi) epitel hücrelerini istila eder (b, c) istila eder. Eşeysiz çoğalma (şizogoni veya merogoni) (d, e, f) ve ardından eşeyli çoğalma (gametogoni) ile mikro (g) ve makro gametler (h) oluşur. Zigot (i) kalın duvarlı ve ince duvarlı olmak üzere iki tip ookist meydana getirir. İnce çeperli ookistler (j) epitel hücrelerde otoenfeksiyona yol açarken kalın çeperli ookistler (k) dışkı ile atılır (Thomson ve diğerleri, 2017).

Cryptosporidium türlerinde iki tip ookist şekillenmekte olup, kalın cidarlı ookistler (%80'i) dışkı ile çevreye atılarak oral alımıyla parazitin bir konaktan diğerine aktarımını sağlamakta (Delling ve Dauschies, 2022), ince cidarlı ookistler ise (%20'si) konak içinde açılarak otoenfeksiyona neden olmaktadır (Marshall ve diğerleri 1997; O'Hara ve Chen, 2011; Tzipori ve Ward, 2002). Otoenfeksiyon, eşeyli ve eşeysiz çoğalmanın aynı konak üzerinde fekal-oral yol ve ara konak olmadan kesintisiz bir şekilde enfeksiyonun devam etmesi olarak tanımlanmaktadır (Fayer, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). Oto enfeksiyona neden olan ince duvarlı oocystlerin ve tip I merontların az sayıda etken olarak enfekte olan bireylerde şekillenen şiddetli enfeksiyonlardan sorumlu oldukları ve immun sistemi baskılanmış kişilerde, dışarıdan yeniden parazit alınmamasına rağmen gelişen, uzun süreli, ölümcül de olabilen hastalık tablolarının ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği ifade edilmektedir (Fayer ve diğerleri, 1990). Çevreye dirençli ookistler fekal-oral yolla bulaşır; ancak zoonotik enfeksiyon ve kişiden kişiye bulaşma da bilinmektedir (O'Donoghue, 1995).

2.2. Epidemiyoloji

Global olarak, *Cryptosporidium*'un prevalansının gelişmiş ülkelerde ortalama %4,3, gelişmekte olan ülkelerde %10,4 ile ~%7,6 olduğu düşünülmekte; ancak prevalansların %69,6'ya kadar çıktığı bildirilmektedir (Dong ve diğerleri, 2020). Buzağılarda, bu protozoaların neden olduğu yenidoğan ishali, dünya çapında, özellikle bir aylık veya daha küçük hayvanlarda önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak görülmektedir (Ouaklı ve diğerleri, 2018).

Dünya'da 1970'li yılların başından beri sığırlarda *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir (Pancieri ve diğerleri, 1971). *Cryptosporidium* türlerinin farklı ülkelerdeki prevalansları; İsrail'de %16,5 (Brenner ve diğerleri, 1993), Meksika'da %25 (Maldonado-Camargo ve diğerleri, 1998), Fransa'da %17,9 (Lefay ve diğerleri, 2000), İspanya'da % 47,9 (Castro-Hermida ve diğerleri, 2002), Tayland'da %9,4 (Jittapalpong ve diğerleri, 2006), Çekya'da %25,8 (Kvac ve diğerleri, 2006), Hindistan'da, ishalleri olan hayvanları da %50 ve ishalleri olmayan hayvanlarda %25,68 (Singh ve diğerleri, 2006), Kanada'da %30 (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008), Amerika'da %2,4 (Wade ve diğerleri, 2000), ve %3,2 (Starkey ve diğerleri, 2006), Arjantin'de %19,35 (Tiranti ve diğerleri, 2011) olarak bildirilmektedir.

Ülkemizde buzağılarda cryptosporidiosis ilk olarak 1984 yılında bildirilmiştir (Burgu, 1984). Sığırlarda *Cryptosporidium* türlerinin prevalansı; Karacebey Harası'nda %26,7 (Burgu, 1984), Ankara'da %63,3 (Emre ve diğerleri, 1998), Kars'ta %25,7 (Arslan ve diğerleri, 2001), Sivas'ta %70,3 (Değerli ve diğerleri, 2005), Hakkari'de %22,14 (Göz ve diğerleri, 2007), Van'da %13,19 (Gül ve diğerleri, 2008), Ankara'da %37,5 (Sakarya ve diğerleri, 2010), Konya'da akut ishelli buzağılarda %39,4 (Derinbay Ekici ve diğerleri, 2011), Erzurum'da %3,9 (Güven ve diğerleri, 2013), Kütahya'da %40 (Akalin, 2018) olarak bildirilmektedir. Real Time PCR yöntemi, ilk kez Nevşehir bölgesindeki ishelli buzağılardan alınan dışkı örneklerinde kullanılmış ve *C. parvum* %15,3, *Cryptosporidium* spp. %5,3 olarak saptanmıştır (Şimşek ve diğerleri, 2012).

Cryptosporidium enfeksiyonlarında prepatent ve patent süreler türlere göre değişiklik göstermektedir. *C. parvum* enfeksiyonlarında prepatent süre 2-7 gün, patent süre 1-12 gün, *C. bovis*'te prepatent süre 10-12 gün, patent süre 18 gün, *C. ryanae*'de ise prepatent süre 11 gün, patent süre 15-17 gün arasında değişmektedir (Fayer, 2008).

C. parvum, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* türleri sığırlarda sıklıkla tespit edilmekle birlikte, bu türlerin yaygınlığı yaşa bağlı olarak değişmektedir (Santin ve diğerleri, 2004). Enfeksiyonun yaş arttıkça daha az görüldüğü bildirilmektedir (Arslan, 2012). Hastalık üç günlüğe kadar olan ruminantlarda görüldüğü halde en yaygın olarak görüldüğü yaş grubu 1-3 haftalık yaşlardır (Fayer, 2008; Nichols, 2008). Enfeksiyona bir aylık üzerindeki hayvanlarda nadiren rastlanmaktadır. Ancak hastalığın yayılışında etkili risk faktörlerin uygun olması ve salgınların ortaya çıkması durumunda bu yaş grubunun dışında da görülebilmektedir (Fayer, 2008; Nichols, 2008). Sığırlarda yaygın olarak görülen ve tek zoonotik tür olan *C. parvum*, süttten kesilmemiş buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yaklaşık %85'inden, süttten kesilmiş buzağı ve düvelerin ise %1'inden sorumlu tutulmaktadır. Süttten kesilmiş buzağılar ve 1-2 yaşındaki düveler çoğunlukla *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. deer-like* genotipleri ile enfekte olmaktadır (Feng ve diğerleri, 2007). *Cryptosporidium andersoni*, genç ve yetişkin sığırlarda abomazumu enfekte etmekte ve başka hiçbir klinik belirti olmaksızın süt üretiminde azalamaya neden olduğu bildirilmektedir (Fayer ve diğerleri, 2006). Süttten kesilmiş buzağılarda da *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* bulunmakta ancak, sadece *C. parvum* neonatal ishalden sorumlu tutulmaktadır (Fayer ve diğerleri, 2006; Holzhausen ve diğerleri, 2019). *C. hominis*'in son zamanlarda buzağılarda rapor edilmesi hayvanlardaki varlığının hafife alındığını düşündürmektedir. Hayvanlarda *C. hominis* enfeksiyonunun görülmesi, hayvanlar tarafından

kontamine insan dışkılarının yutulması ile meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir (Razakandrainibe ve diğerleri, 2018).

Buzağılarda 2 aylık yaş öncesi ve sütçü işletmelerde, zoonotik olan *C. parvum* türünün daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Thompson ve diğerleri, 2007). Yine neonatal buzağılarda *C. parvum* enfeksiyonları etçi buzağılara göre sütçü buzağılarda daha yaygın olarak görülmektedir (Thompson ve diğerleri, 2005). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da prevelansın dünya genelindeki yapılan çalışmalara paralellik gösterdiği belirtilmektedir (Aştı ve diğerleri, 2012). Benzer çalışmalarda, etçi sürülerde görülme oranının %3-25, sütçü sürülerde ise %100'e yakın olduğu bildirilmektedir (Gow ve Waldner, 2006; Jager ve diğerleri, 2005).

İshalli buzağılarda ookist atılımının ve ookist yoğunluğunun yüksek olduğu belirtilmektedir (Singh ve diğerleri, 2006). *Cryptosporidium* enfeksiyonları kendi kendini sınırlayan özellikte olup, ookist atılımı 1-2 hafta kadar devam etmektedir. Enfeksiyonları takiben immunité gelişmekte ve daha sonraki enfeksiyonlara karşı hayvanlar dirençli hale gelmektedir. Yani ilk enfeksiyonlarda ookist atılımı daha fazla olmakta ve yaşla beraber azalmaya başlamaktadır. İlk enfeksiyonlar özellikle neonatal dönemde şiddetli seyretmekte, klinik cryptosporidiosis oluşmakta ve hatta tedavi edilmezse ölümler şekillenmektedir. Cryptosporidiosis'in klinik hal almasında ve patojenitesinde alınan ookist sayısı oldukça etkilidir. *Cryptosporidium parvum*'da minimum enfektif doz 30 ookist olarak kabul edilmektedir (Fayer, 2008; Nichols, 2008). Hastalığın oluşması veya oluşturulması için alınması gereken ookist sayısı, bireysel duyarlılık ve konak direncine bağılı olarak oldukça farklılık göstermektedir. Duyarlı ya da immunsupresif hayvanlar düşük ookist dozlarında (10 ookist) bile enfeksiyona yakalanabilmektedir (O'Hara ve Chen, 2011; Van Metre ve diğerleri, 2008). Enfektif bir hayvanın 1 gram dışkı ile milyonlarca ookist saçması enfeksiyonun hızla yayılıp bir sürü problemi haline gelmesini kolaylaştıran bir faktördür (De Graaf ve diğerleri, 1999; Hammes ve diğerleri, 2006; Van Metre ve diğerleri, 2008).

İlk insan cryptosporidiosis vakası, sığırlarla bir çiftlikte yaşayan 3,5 yaşındaki bir kız çocuğunda bildirilmiştir (Nime ve diğerleri, 1976). Amerika Birleşik Devletleri'nde yürütülen vaka kontrol çalışmaları, insanların sığırlarla temasının cryptosporidiosis için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Roy ve diğerleri, 2004). Zoonotik bulaşmasına ilişkin ilk rapor, buzağılarda *Cryptosporidium* araştırmasını başlattıktan 3 hafta sonra cryptosporidiosis'e yakalanan araştırma personelinin içermektedir. Başka bir rapor, cryptosporidiosisli iki buzağıya destekleyici bakım sağlayan bir veteriner fakültesi öğrencisinde cryptosporidiosis'i

tanımlamaktadır (Ryan ve diğerleri, 2021). Bağışıklığı yeterli 12 kişide (altı öğrenci, üç hayvan bakıcısı, bir veteriner hekim ve iki araştırmacı) buzağılarla temastan kaynaklanan bir zoonotik cryptosporidiosis salgını, cryptosporidiosis epidemiyolojisinde zoonotik enfeksiyonların rolünü doğrulamaktadır (Current ve diğerleri, 1983). Neonatal buzağılarda mortalitenin %100 olması ve dışkı ile ookist saçılımının çok yüksek olması sebebiyle *C. parvum* insanlara daha fazla bulaşmaktadır (Thompson ve diğerleri, 2007). Yine sığırların, dünya çapındaki çeşitli insan cryptosporidiosis salgınlarında potansiyel kaynaklar olduğu başka çalışmalarda da ifade edilmiştir (Alsmark ve diğerleri 2018; Zhang ve diğerleri, 2021).

Dışkı ile dışarı atılan kalın cidarlı enfektif bu ookistler su, gıda ya da yakın temasla oral yolla alınarak konakların enfekte olmasına neden olmaktadır. Buzağılarda yaygın olarak görülen *C. parvum* türünde genellikle su kaynaklı bulaşma söz konusudur. Buzağuların dışkıları ile kirlenen suların içilmesi ile hayvanlara ve zoonotik olarak da insanlara enfeksiyon bulaşmaktadır (Fayer, 2008; Nichols, 2008). Bilinen ilk su kaynaklı cryptosporidiosis salgını 1984'te, kontamine içme suyuyla bağlantılı olarak Teksas, ABD'de bildirilmiştir (D'Antonio ve diğerleri, 1985). Carrollton, Georgia, ABD'deki 1987 salgınında 13.000 kişinin etkilendiği düşünülmektedir (Hayes ve diğerleri, 1989). Suların standart klorlanması ookistlerin yok olmasını sağlamamakta, bu nedenle içme suları ile bulaşma insan ve hayvanlar için önem taşımaktadır (Betancourt ve Rose, 2004; Olson ve diğerleri, 2004; Ramirez ve diğerleri, 2004). İlk eğlence amaçlı su ile ilişkili salgın 1988 yazında Birleşik Krallık'ta bir yüzme havuzunda meydana geldiği bildirilmiştir (Joce ve diğerleri, 1991). *Cryptosporidium* şu anda sürekli olarak kontamine içme ve eğlence suları nedeniyle su kaynaklı protozoan enfeksiyon salgınlarının önde gelen küresel nedeni (>%60) olarak bilinmektedir (Ryan ve diğerleri, 2021).

İlk belgelenmiş büyük gıda kaynaklı salgın, bir sığır çiftliğinde yetiştirilen elmalardan yapılan taze sıkılmış elma şarabı tüketimi ile ilişkilendirilmektedir (Millard ve diğerleri, 1994). *Cryptosporidium*, küresel olarak gıda kaynaklı en önemli beşinci parazit olarak gösterilmektedir (Ryan ve diğerleri, 2021).

2.3. Klinik ve Patolojik Belirtiler

Cryptosporidium türleri, çok çeşitli konakçıların sindirim ve solunum yollarının lümen yüzeylerini kaplayan epitel hücrelerini enfekte eden (Arrowood, 2002), genellikle genç

buzagalarda ishale yol açan zorunlu, hücre içi parazitler olarak bilinmektedir (Coklin ve diğerleri, 2007).

Cryptosporidium öncelikle yeni doğan buzağuları etkilemektedir (de Graaf ve diğerleri, 1999). Enfeksiyonun bağışıklığı yeterli konakçılarda kendi kendini sınırladığı, ancak genç ve bağışıklığı baskılanmış hayvanlarda yaşamı tehdit eden akut ve kronik ishale neden olduğu bildirilmektedir (Snelling ve diğerleri, 2007). Enfeksiyonun klinik görünümü asemptomatikten ölümcüle kadar değişmektedir (Santin, 2013). Başlıca klinik belirtiler: halsizlik (Fayer, 2010), depresyon (O'Donoghue, 1995; Olson ve diğerleri, 2004), ateş (Brar ve diğerleri 2017; Foster ve Smith, 2009; Li ve diğerleri, 2019; O'Donoghue, 1995; Santin, 2013), karın ağrısı (de Graaf, 1999; Fayer, 2010; Olson ve diğerleri, 2004), iştahsızlık (O'Donoghue, 1995; Olson ve diğerleri, 2004), anoreksi (Fayer ve diğerleri, 2006; Fayer, 2010; Foster ve Smith, 2009; de Graaf, 1999; Klein ve diğerleri, 2008; Rieux ve diğerleri, 2013; Santin ve diğerleri, 2004; Santin, 2013) emilim bozukluğu (Naciri ve diğerleri, 1999; Savioli ve diğerleri, 2006; Wegayehu ve diğerleri, 2017), ishal (Brar ve diğerleri, 2017; Cho ve Yoon, 2014; de Graaf ve diğerleri, 1999; Fayer, 2010; Klein ve diğerleri, 2008; Li ve diğerleri, 2019; Lombardelli ve diğerleri, 2019; Nydam ve diğerleri, 2001; O'Donoghue, 1995; Silverlas ve diğerleri, 2010a; Snelling ve diğerleri, 2007; Santin, 2013; Thomson ve diğerleri, 2017), dehidrasyon (Brar ve diğerleri, 2017; de Graaf, 1999; Fayer, 2010; Li ve diğerleri, 2019; Naciri ve diğerleri, 1999; Sanford ve Josephson, 1982; Silverlas ve diğerleri, 2010a), metabolik asidoz ve elektrolit dengesizlikleri (Kasari, 1999), akut veya kronik gastrointestinal rahatsızlıklar (Brook ve diğerleri, 2008; Chalmers and Katzer, 2013; Featherstone ve diğerleri, 2010; Hofstra ve diğerleri, 2013; Santin, 2013; Smith ve diğerleri, 2006; Shirley ve diğerleri, 2012), büyüme geriliği (Savioli ve diğerleri, 2006; Silverlas ve diğerleri, 2010a; Wegayehu ve diğerleri, 2017), kilo kaybı (Brook ve diğerleri, 2008; Smith ve diğerleri, 2006), süt üretiminde azalma (Brook ve diğerleri, 2008; Smith ve diğerleri, 2006), verim kaybı (Thomson ve diğerleri, 2017), kardiyovasküler kollaps, (Foster ve Smith, 2009; Santin, 2013) ve ölümdür (Brar ve diğerleri, 2017; Brook ve diğerleri, 2008; de Graaf ve diğerleri, 1999; Fayer, 2010; Foster ve Smith, 2009; Li ve diğerleri 2019; Naciri ve diğerleri 1999; Sanford ve Josephson 1982; Santin, 2013; Silverlas ve diğerleri, 2010a; Smith ve diğerleri, 2006; Thomson ve diğerleri, 2017).

Cryptosporidiosis'in kuluçka süresi ortalama olarak 5 ila 7 gün arasında değişmekte; ancak semptomlar enfeksiyondan 2 gün sonra başlayabilmektedir (Abeywardena ve diğerleri, 2015). Enfekte buzağular tipik olarak yaklaşık 2 hafta boyunca dışkıyla ookist atmaktadırlar

(Fayer ve diğeri, 1998). Deneysel koşullar altında, dışkındaki *Cryptosporidium* ookist sayısı ishalin başlamasından bir gün önce yükselmekte, zirve yapmakta ve ishalin Şiddeti azalmadan 2 gün önce düşmektedir (Operario ve diğeri, 2015). Daha nceki longitüdinal çalışmalarda, en yüksek sayıda *Cryptosporidium* ookisti buzağıların yaşamlarının ikinci veya üçüncü haftasında bulunmuştur (Coklin ve diğeri, 2010; Santin ve diğeri, 2008). Bazı deneysel enfeksiyonlarda ise enfekte hayvanların, hastalığın klinik belirtilerini göstermeksizin ookist attığı ifade edilmiştir (Thompson ve diğeri, 2008).

Klinik cryptosporidiosis 7-30 günlük buzağılarda görülmekte (Foster ve Smith, 2009; Santin, 2013), belirtiler enfeksiyondan 3-5 gün sonra ortaya çıkmakta ve 4-17 gün devam etmektedir (Delafosse ve diğeri, 2015). Hastalıkta, değişken morbidite ve düşük mortalite oranı bildirilmektedir (Foster ve Smith, 2009; Santin, 2013).

Buzağıların, enfeksiyona nasıl tepki verdikleri ve enfeksiyondan nasıl kurtuldukları konusunda bireyler arasında büyük farklılıklar olmasına rağmen, çoğunlukla 1-2 hafta içinde kendiliğinden iyileştiği görülmektedir. Hastalığın diğer enterik patojenlerle birlikte seyretmesi halinde, klinik belirtilerinin daha da Őiddetlenebildiđi ve enfeksiyona maruziyet süresinin uzayabildiği bilinmektedir (O'Donoghue, 1995). Diğer bir deyişle, hastalığın Şiddeti diğer patojenlere ve koenfeksiyonlara bağlı olarak değişmektedir (Foster ve Smith, 2009; Santin, 2013).

Patojenin doğrudan bir yaşam döngüsü bulunmaktadır. Enfekte hayvanların gastrointestinal epitel hücrelerinde gelişebilmekte ve çoğalabilmektedir (Chen ve diğeri, 2003). *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonu, jejunum, ileum ve kolon dahil olmak üzere bağırsağın birçok yerinde lokalize olmaktadır (Tomas-Lopez ve diğeri, 2020). Enfeksiyonun ana bölgesi ince bağırsaktır, ancak enfeksiyon gastrointestinal sistem boyunca ve akciğer gibi ekstra bölgelerde de karşımıza çıkmaktadır (Sponseller ve diğeri, 2014) Gastrointestinal ve solunum yollarının epitel yüzeyinin mikrovilluslarına yerleşerek önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (Kotloff ve diğeri, 2013).

Cryptosporidium türleri gastrointestinal epitel hücrelerinde çeşitli patojenik değişikliklere neden olmaktadır. Parazitler önce bağırsak epitelinin apikal yüzeyinde zara bağlı bir bölmeye yerleşmektedir. Buna rağmen, hızlı mikrovillus sınır kaybı, villus kısalması, kripta uzaması ile villus füzyonu, submukozal dem ve lamina propriada inflamatuvar mononükleer hücre infiltrasyonu dahil olmak üzere bağırsakta akut rahatsızlığa yol açan bağırsak epitelinde önemli anormalliklere neden olmaktadır (Chalmers ve Davies, 2010). Ağır

enfeksiyonlarda konak epitel hücrelerinin dejenerasyonu, mikrovillusların kaybı ve villus atrofi sıklıkla görülmektedir (Scorza ve Tangtrongsup, 2010). Ayrıca bağırsak kript iltihabı ve malasimilasyon (de Graaf ve diğerleri, 1999; Paraud and Chartier, 2012) sonucu bağırsak geçirgenliğinin artması (Wyatt ve diğerleri, 2010), emilim kapasitesinin azalması (de Graaf ve diğerleri, 1999; Klein ve diğerleri, 2008), sıvı, elektrolit ve minerallerin salınımının artmasına neden olarak yetersiz beslenme görülmektedir (Rossle ve Latif, 2013). Sonuç olarak, bu patolojiler ishale ve buzağılarda ölüm riskinin artmasına neden olmaktadır (Delafosse ve diğerleri, 2015).

2.4. Tanı

Cryptosporidiosis'in tanısında, rutin parazitolojik teknikler (Flotasyon, boyama teknikleri), koproantijen arayan serolojik yöntemler (IFA, ELISA, rapid testler), flow sitometri, moleküler teknikler (PCR) sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak dışkıda ookist atılımının aralıklı olması nedeniyle dışkı örneklerinin değişik zamanlarda alınarak incelenmesi gerekmektedir (Smith, 2008). Klinik olarak etkilenmiş hayvanlarda; atılan ookistlerin sayısının yüksek olması nedeniyle dışkıda kolaylıkla ookistler belirlenebilmektedir (Tzipori ve Ward, 2002). Ayrıca *Cryptosporidium* ookistlerinin çok küçük olması nedeniyle mikroskopik incelemenin uzman ve tecrübeli kişilerce incelenmesi, ookistlerin dışkı örneğinde bulunabilecek diğer ookist, kist ve mayalarla karıştırılmaması için mikroskopik incelemenin boyanmış preparatlarda yapılması avantaj sağlamaktadır (Smith, 2008).

Parazitin identifikasyonunda immunolojik metotlar da kullanılmaktadır. Bu metotlar; Poliklonal Floresan Antikor Testi, Latex Aglutinasyon Reaksiyonu, Monoklonal Antikorlu Immun Florasan, Enzim Linked İmmunosorbent Antikor Testi (ELISA), Reverse Pasif Haemaglutinasyon, İmmunokromatografidir (Fayer ve diğerleri, 2000). Hayvan modellerinin enfeksiyonlarında intestinal ksenograft yöntemi de kullanılabilir (Laurent ve diğerleri, 1999).

Serolojik yöntemler; flow sitometri, moleküler teknikler, direkt dışkı incelemeleri ve boyama yöntemlerine göre daha duyarlı olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan, serolojik ve moleküler yöntemlerin zaman alması, pahalı olması ve deneyimli personele ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Smith, 2008; Xiao ve Ryan, 2008). Kısacası, İmmunofloresans, ELISA ve PCR yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip tanı teknikleridir;

ancak diğer yöntemlere göre nadir olarak kullanılmaktadır. Rutin tanıda temel olarak mikroskopik incelemeden yararlanılmaktadır (Van Metre ve diğerleri, 2008).

Cryptosporidium türlerine bağlı enfeksiyonların teşhisi genellikle dışkıda etkenin görülmesi temeline dayanmaktadır (Rossle ve Latif, 2013). Teşhis amacı ile endoskopi, mukoza biyopsisi, ince bağırsak aspiratı, bronkoalveolar lavaj gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Ancak, bu tekniklerin tek başına kullanılması etkeni kesin olarak bulmada bazen yetersiz kalmaktadır. Dışkı ile atılan ookist miktarı değişkenlik gösterebildiğinden dolayı, cryptosporidiosis enfeksiyonu araştırılırken farklı günlerde en az üç ayrı gaita örneğinin incelenmesi gerekmektedir (Rossle ve Latif, 2013).

ABD ve Avrupa'da, referans laboratuvarları genellikle immünofloresan mikroskopiyi altın standart olarak kabul etmektedir. Enzim immün testi veya immünokromatografik yöntemler gibi diğer antijen saptama yöntemleri daha yüksek verime sahiptir, tanı için giderek daha fazla kullanılmaktadır ve ticari olarak da mevcuttur. Bazı hızlı testler, *C. parvum* veya *C. hominis* dışındaki türler için spesifikliğı ve duyarlılığı azaltmıştır ve pozitif reaksiyonların doğrulanması gerekmektedir (Checkley ve diğerleri, 2015).

Ookistlerin floresan izotiyosiyanat konjuge anti *Cryptosporidium* monoklonal antikoru (FITC-C-mAb) ile immünofloresan boyamasının özellikle spesifik (%96-100) ve hassas (%98,5-100) olduğu bildirilmektedir. Öte yandan, *Cryptosporidium* koproantijen, ookistlerin atılımı başlamadan önce bile dışkı örneklerinde tespit edilebilmektedir. Koproantijene özgü farklı ELISA'lar ve immünokromatografik (IC) testler hakkında, bildirilen %97 ila %100 arasında bir özgüllük ve duyarlılığına sahip çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu koproantijen saptama tahlillerinin bir başka avantajı, çok sayıda numuneyi hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde test etmek için kullanılabilmesidir. Ancak, daha detaylı epidemiyolojik çalışmalar için testler, mevcut *Cryptosporidium*'un türü veya genotipi hakkında herhangi bir bilgi sağlamadığından uygun bulunmamaktadır (Ezzaty Mirhashemi ve diğerleri, 2015).

2.4.1. Boyama Yöntemleri

Cryptosporidium ookistlerinin tanısında yaygın olarak kullanılan boyama yöntemleri: safranin-metilen mavisi, iodine, nigrosin, giemsa, kinyoun asit fast, modifiye ziehl-neelsen, asit fast, modifiye asit fast yanında auramine rhodamine ve auramine fenol gibi floresan boyama teknikleridir (Smith, 2008).

Ziehl-neelsen tekniği, safranin-methylene blue boyaması, kinyoun boyaması, dimetil sülfoksit karbol fuchsin boyamaları ookistlerin çevrelerinin parlak kırmızı renk almasını sağlamaktadır. Bu uygulamalar oldukça yararlı olmakla birlikte uzun zaman gerektirmektedir (Fayer ve diğerleri, 2000). Ookistler oval, 4-5 µm boyutunda, interiorunda bulunan 2-4 sporozoid nükleusu içeren yapılar olarak görölmektedir. Bu şekilleriyle dışkı partiküllerinden ve diğer mikroorganizmalardan kolaylıkla ayrılmaktadır (O'Handley ve Olson, 2006; Tzipori ve Ward, 2002). Boyama yöntemlerine göre immünolojik metotların tanıda daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Geurden ve diğerleri, 2008; Smith, 2008).

Buzağılarda ishalleri dışkı örnekleri, genellikle tanı için yeterli miktarda ookist içerdüğinden, etkenlerde dengesiz dağılım ve orta şiddette atılım olsa bile natif ve çeşitli boyama metodlarıyla tanı kolaylıkla konulabilmektedir. Fakat epidemiyolojik çalışmalarda, kronik hastalıklarda ve insanlarda çok az sayıda ookist atılımı durumlarında dışkı örneklerinin konsantrasyonu önem kazanmaktadır (Carey ve diğerleri, 2004). Mikroskopik inceleme öncesi ookist konsantrasyonunun artırılması için doymuş şeker çözeltisinin kullanılması yaygın bir methodtur. Diğer kullanılan metot ise çinko klorür-sodyum klorür solüsyonu ya da diğer tuzlarla flotasyon yöntemidir (O'Handley ve Olson, 2006; Thompson ve diğerleri, 2008).

Modifiye asit fast boyama, immünofloresan antikor boyaları ile karşılaştırıldığında %70 daha duyarlı olduğu; ancak moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında vakaların %50'sinin teşhis edilebildiği bildirilmektedir. Floresan mikroskopundaki teknik iyileştirmeler ve maliyet düşüşleri, geleneksel modifiye asit fast boyamadan daha hassas olan auramin-rodamin gibi floresan boyalarla test yapılmasına olanak tanımaktadır (Checkley ve diğerleri, 2015).

2.4.1.1. Safranin-Metilen Mavisi Boyama Yöntemi

Safranin metilen mavisi ile boyanan ookistler turuncu kırmızı renkte etrafı şeffaf bir halka ile çevrili olarak görölmektedir; ancak ookistin iç yapısı pek fark edilememektedir. Dışkı kalıntıları ise mavi renkte görölmektedir. Bu yöntemde dışkı süspansiyonundan ince bir froti hazırlanarak boyama aşamasına geçilmektedir. Boyama sonunda ookistler kolaylıkla ayırt edilmektedir (Fayer ve diğerleri, 2000).

Nigrosin ile negatif boyamada, ookistler haricindeki tüm arka plan açık yeşil merbromide ve malaşit yeşile boyanarak ookistlerin tanınması sağlanabilmektedir; ancak çok güvenilir bulunmamaktadır (Fayer ve diğerleri, 2000).

Bazı örneklerin boyanmasında canlı boyalar (propidium iodide ve 4,6, diamino- 2'-phenylindole) kullanılmaktadır. Yaşama gücü FISH yöntemi ile test edilebilir ve hücre kültürü real time-PCR tarafından takip edilmektedir (Fayer ve diğerleri, 2000).

2.4.1.2. Modifiye Kinyoun Asit-Fast Boyama

En sık kullanılan tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Taze dışkı örneklerinden veya zenginleştirilmiş örneklerden hazırlanan yayma preparatlar bu teknikle boyanmaktadır. Karbol fuksinle boyanan ve aside dirençli *Cryptosporidium* ookistleri metilen mavisi ile boyanmış zemin üzerinde genelde pembe, koyu pembe, mor renkte yuvarlak/oval olarak gözükmemektedir. 100x objektif ile immersiyon yağı yardımı ile incelemektedir. Olgun ookistlerde 4 adet sporozoit gözlenmektedir. Bazı ookistler ise boya almayabilmekte ya da kısmen boya almaktadır. Bu ookistlere hayalet ookist adı verilmektedir (Doğruman-Al, 2011). Bu yöntemin hasasiyet oranının %70, spesifitesinin %78 oranında olduğu belirtilmektedir (Ezzaty Mirhashemi ve diğerleri, 2015).

2.4.1.3. Modifiye Ziehl-Neelsen (mZN) Boyama Yöntemi

Dışkıda *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı yönünden yapılan bir boyama yöntemidir. Ookistler 20'lik objektifte gözlenmektedir. Ookistler solgun yeşil zemin üzerinde kırmızı yapılarda görülmektedir. Boyanmış preparatlardaki ookistler daha sonra DNA ekstraksiyonu için kullanılabilir (Smith, 2008).

2.4.1.4. Karbol Fuksin Boyama Yöntemi

Bu yöntemde eter-alkol karışımında temizlenmiş dışkı örneği lam üzerine bir baget yardımı ile bir damla kadar alınmaktadır. Aynı miktar karbol-fuksin dışkı örneğinin

yanına konularak bir lamelin köşesi yardımı ile karıştırıldıktan sonra ince bir dışkı frotisi hazırlanmaktadır. Hazırlanan froti 1-2 dakika kuruması için bekletilmektedir. Kuruyan froti üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılmakta ve lamelle kapatılarak 40x10 büyütmede incelenmektedir. Mikroskobun bu büyütmesinde 20 sahadaki ookist sayılarak ortalaması alınır. Boyama sonunda ookistler kırmızı zemin üzerinde şiddetli ışık kırıcı özellikte, şeffaf, parlak, düzgün duvarlı ve oval yapıda gözlenmektedir. Karbol fuksin boyama yönteminde x40'lık objektifte mikrometre ile ayar yapılarak ookistler içinde sporozoitler görülebilmektedir (Burgu, 1984).

2.4.1.5. Auramine Phenol (AP, Auramin Fenol) Boyama Yöntemi

Cryptosporidium ookistlerinin saptanmasında kullanılan bir boyama yöntemidir. Hazırlanan dışkı yaymaları *Cryptosporidium* ookistleri yönünden floresans mikroskopta incelenmektedir. Oldukça hızlı bir teknik olarak bilinmektedir. *Cryptosporidium* ookistleri siyah zemin üzerinde parlak yeşil floresans veren, yuvarlak, 3-7 mikron büyüklüğünde görülmektedir. Auramine phenol ile boyanmış preparatlardaki ookistler daha sonra DNA ekstraksiyonu için kullanılabilir (Smith, 2008).

2.4.1.6. Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemi

Auramine-Rhodamine (AR) boyası hücre duvarındaki mikolitik asite afinite gösteren flokrom boyadır. Zıt boya olarak potasyum permanganat kullanılmaktadır. Immunfloresan mikroskop ile 40'lık büyütmede kırmızı zemin üzerinde parlak sarı renkteki oluşumlar *Cryptosporidium* ookistleri olarak değerlendirilmektedir. Boyanın karakteristik rengini alan ookistlerin mantar ve mayalarla karıştırılması çok zordur (Sears ve Kirkpatrick, 2001).

2.4.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Parazit hastalıklarının teşhisinde, immunolojik tanı yöntemleri yaklaşık 30 yıl önce kullanılmaya başlanmıştır (Carey ve diğerleri, 2004). İndirekt yöntemler kullanılarak

Cryptosporidium ookistlerine duyarlı antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bu yöntemler arasında ELISA, IFA ve Western blot (WB) bulunmaktadır (Doğruman-Al, 2011).

2.4.2.1. Serumda Antikor Aranmasında Kullanılan Yöntemler

Monoklonal antikorlarla yapılan IFA'nın duyarlılığının %100 olduğu ve boyama yöntemlerinden 20 kat daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Doğruman-Al, 2011). IFA yönteminde ookistlerin antijenik yapıları floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlara bağlanarak ookistler siyah zemin üzerinde yeşil renkte görülmektedir. IFA tekniği ile az sayıda ookist içeren dışkı örnekleri bile saptanabilmektedir. Bu da hastalığa erken dönemde tanı konulmasını ve asemptomatik taşıyıcıların belirlenmesini sağlamaktadır (Carey ve diğerleri, 2004). Ayrıca serumda *Cryptosporidium* türlerine spesifik antikorların saptanmasında kullanılan IFA'nın, dışkıda ookist saptama yöntemleri ile kombine edilmesi durumunda cryptosporidiosis prevalansının daha doğru olarak belirlenebileceği bildirilmektedir. Fakat genel anlamda antijen antikor oluşumunun ortaya konulması prensibine dayanan testlerde mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verme riski bulunmakta olup, bu da yanlış teşhise sebep olabilmektedir (Doğruman-Al, 2011). Pahalı bir teknik olması ve uygulama için floresan mikroskoba ihtiyaç duyulması testin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Carey ve diğerleri, 2004).

Serolojik ve kültür yöntemlerinden farklı olarak, aranan organizmanın sadece nükleik asitlerinin varlığını ortaya koymaya yönelik yöntemleri içeren nükleik asidlere dayalı teknolojiler, yüksek ekonomik maliyetlerine rağmen parazitoloji alanında da yaygın olarak kullanım görmektedir (Jex ve diğerleri, 2008; Trotz-Williams ve diğerleri, 2005a)

2.4.2.2. Dışkıda *Cryptosporidium* spp.'ye Özgü Antijen Aranmasında Kullanılan Yöntemler

Dışkı örneklerinden *Cryptosporidium* ookistlerinin tanımlanmasında kullanılan diğer bir immunolojik yöntem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)'dır (Laurent ve diğerleri, 1999). Kopraantijen temelli ELISA kitleri cryptosporidiosis tanısında daha

spesifik ve duyarlıdır; ancak insan hekimliğinde daha fazla kullanım olanağı bulunmaktadır (Garcia ve Shimizu, 1997; Thompson ve diğerleri, 2008).

Monoklonal antikorların kullanıldığı immünofloresan ve ELISA yöntemleri gaitada *Cryptosporidium* türlerinin teşhisinde kullanılan oldukça duyarlı yöntemlerdir. Buna rağmen ELISA'da çapraz reaksiyon sonucu yalancı pozitiflikler de görülebilmektedir. Ayrıca dışkıda *Cryptosporidium* türlerinin antijenlerinin aranmasına yönelik immünokromatografik yöntemler ile kombine antijen taraması da yapılabilmektedir. Ookist miktarının az olduğu ve boyama yöntemlerinde etkenin gözden kaçabildiği durumlarda bu yöntem oldukça kullanışlıdır. İmmünokromatografik yöntemlerin en büyük avantajı test süresinin kısa olması ve deneyimli personel olmaması halinde bile güvenilir bir sonuç alınabilmesidir (Doğruman-Al, 2011).

Cryptosporidium için serolojik testler, hem semptomatik hem de asemptomatik enfeksiyondan sonra spesifik antikor yanıtları geliştiği için epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir araçtır. IgA yanıtları genellikle kısa ömürlü iken, IgG yanıtları birkaç ay sürebilmektedir. Cp23'e karşı oluşan antikor, uzak enfeksiyonla korele gibi görünürken, Cp17'ye (gp15 olarak da adlandırılır) verilen yanıtlar yakın zamandaki enfeksiyonu düşündürür ve P2'ye verilen yanıtlar, tekrarlanan enfeksiyonla ilişkilendirilmektedir (Checkley ve diğerleri, 2015).

2.4.3. Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle parazitoloji alanında tanı koyma ve parazitlerin alt türlerinin belirlenmesi amacıyla moleküler çalışmalar kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya, 2004). Moleküler teknikler daha çok epidemiyolojik araştırmalar, tür, genotip ve subtiplerin belirlenmesi, salgınlarda, su kaynaklarında teşhis amacıyla kullanılmaktadır (Smith, 2008; Xiao ve Ryan, 2008). İnsan ve diğer memelileri enfekte eden *Cryptosporidium* türlerinin taksonomisi yapılırken alt türlerinin belirlenmesi, genetik farklılıkların ortaya konulması gibi etken hakkında daha ayrıntılı bilgiler, moleküler çalışmalar ile elde edilebilmektedir. Özellikle de salgınlarda etkili olan türlerin belirlenerek etkenin kaynağı hakkında daha fazla bilgi edinmeye olanak sağladığı için moleküler çalışmalar ile tiplendirilmesi önem taşımaktadır (Sarıkaya, 2004). Salgın araştırmaları veya epidemiyolojik sürveyans için

Cryptosporidium parvum'un alt tiplendirilmesi genellikle 60 KDa'lık bir glikoproteini (gp60) kodlayan bir genin DNA dizi analizine dayanmaktadır (Robinson ve diğeri, 2022).

Ayrıca diğeri klasik yöntemlerle kesin tanının yapılamadığı durumlarda, moleküler tanının hassasiyetinden dolayı bu çalışmalar günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerin duyarlılığı, dışkıının mikroskopik olarak değerlendirilmesine göre oldukça yüksektir. Dışkıda ookist sayısının çok az olması durumunda veya çevresel kaynaklardan etkeni izole etmek amacıyla da yaygın olarak moleküler yöntemlere başvurulmaktadır (Sarıkaya, 2004). PCR ile gram dışkıda 20 ookist varlığında pozitiflik verirken, mikroskopik incelemelerde gram dışkıda 100-500 bin ookist bulunması gerekmektedir (Smith, 2008; Xiao ve Ryan, 2008).

Günümüzde *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanması için kullanılan birçok moleküler tiplendirme yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan; plasmid DNA analizi, genomik DNA restriksiyon analizi, prob hibridizasyon teknikleri, gen sekans analizleri, PCR'ye dayalı tiplendirmeler (PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-REP, PCR-AFLP vb.) ve ribotiplendirme başlıca kullanılan yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır (Sarıkaya, 2004).

2.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu işlem ile DNA polimeraz, deoksiriboz nükleotidleri (dNTP'ler), ve hedefe özgü spesifik komplementer oligonükleotidler yani primerler kullanılarak in vitro ortamda DNA hedef dizileri çoğaltılmaktadır (Bişkin ve diğeri, 2011).

PCR yüksek sensiviteye sahip, güvenli ve hızlı uygulanan bir metoddur; ancak çevresel faktörlerden (kontaminasyon) etkilenerek yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir (Fayer ve diğeri, 2000).

PCR ile *C. parvum*'un saptanmasını tanımlayan ilk raporun üzerinden yirmi yıldan fazla zaman geçtiği ve *Cryptosporidium* türlerini, tür/genotip ve alt tip düzeyinde tespit etmek ve ayırt etmek için geliştirildiği bildirilmektedir (Ezzaty Mirhashemi ve diğeri, 2015).

PCR, araştırma laboratuvarlarında *Cryptosporidium* ve diğeri enterik patojenlerin tespiti için giderek daha fazla kullanılmaktadır ve mükemmel hassasiyet sağlamaktadır. 18S rRNA'yı kodlayan *Cryptosporidium* geninin amplifikasyonu bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak diğeri genler de hedeflenmektedir. Moleküler analiz, *Cryptosporidium*

türlerini ayırt etmek için gereklidir. 18S rRNA'yı kodlayan genin yaklaşık 800 baz çifti fragmanının dizilimi ile PCR, türleşme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra daha küçük parçalara dayalı gerçek zamanlı testler tanımlanmaktadır. *C. hominis* ve *C. parvum*, DNA dizi seviyesinde benzer olduklarından (>%96), gp60 geninin dizilimi, türler içinde alt tiplene için kullanılmaktadır. DNA ekstraksiyonundan önce ookistlerin boncuk-dövme, donma-çözülme, kaynatma veya kimyasal lizis yoluyla bozulması gerekmektedir. Ancak, basitleştirilmiş ekstraksiyon yöntemlerini kullanabilen bakım noktası moleküler testleri geliştirme aşamasındadır. Enteropatojenler için çok sayıda moleküler tanı, hem ishali bireylerde hem de sağlıklı kontrol bireylerinde, kaynakları kısıtlı ortamlarda çoklu enfeksiyonların yaygın olduğunu göstermektedir. Bazı veriler, *Cryptosporidium*'un kantitatif yükünün artan hastalık şiddeti ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir, bu nedenle kantitatif testler gelecekteki çalışmalar ve ilaç rejimlerinin değerlendirilmesi için önemli olacağı düşünülmektedir (Checkley ve diğerleri, 2015).

Cryptosporidium türlerinin moleküler tanısı ve genotiplendirme çalışmalarında; 70-kDa ısı şok proteini geni (hsp 70mRNA), *Cryptosporidium-1* geninin Thrombospondin-related adhesive proteini (TRAP-C1), *Cryptosporidium-2* geninin Thrombospondin-related adhesive proteini (TRAP-C2) geni, methionin aminopeptidaz, P tübülün kodlayan mRNA geni, amiloglikozidaz enzimini kodlayan mRNA geni, *Cryptosporidium* ookist duvar protein (COWP) geni PCR yöntemi ile yapılan araştırmalarda başlıca kullanılan gen bölgeleridir. Sekans analizi ve PCR-RFLP analizi gibi yöntemlerde COWP, Ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) bölgeleri, dihidrofolat redüktaz-timidilat sentaz (dhfr-ts), TRAP-C1, TRAP-C2 ve HSP70 *Cryptosporidium* türlerinin ayırımında en sık kullanılan gen bölgeleridir (Xiao ve Ryan, 2008).

Değişik PCR tipleri ve sekanslama ile tür düzeyinde teşhisler yapılmaktadır. *Cryptosporidium* türlerinin tanı, moleküler epidemiyoloji, genotip ve subgenotiplerinin sınıflandırılmasında SSU rRNA, HSP70, actin, COWP, ITS-2, TRAP, ML1, ML2 ve GP60 yaygın olarak kullanılan genetik markerlardır. Bunlardan SSU rRNA genin PCR-RFLP ile analizi ve elektroforeze tabi tutulması ile PCR ürününün büyüklüğü (bp) dikkate alınarak tür teşhisleri yapılmaktadır. Bu tip tür identifikasyonlarında sekans analizi ile konfirmasyon yapılması önerilmektedir. *Cryptosporidium parvum* veya *C. hominis* gibi insan ve hayvanlarda önemli olan türlerin subtip familyalarının ve bu familyalara bağlı subtiplerinin belirlenmesinde ise GP60 gen analizi PCR ile yapılmakta ve elde edilen PCR ürününe dizi

analizi yapılarak, Gen Bankası'ndaki mevcut dizilimler ile karşılaştırılarak subtipler belirlenmektedir (Jex ve diğeri, 2008; Trotz-Williams ve diğeri, 2005a).

2.4.3.2. Nested PCR

Dışkıda çok farklı etkenler bulunduğundan dolayı klasik PCR yöntemleriyle çoğaltılmak istenen etkene ait hedef dizinin spesifik bir şekilde amplifikasyonu bazen mümkün olmamaktadır. Çoğaltma yapılmaya çalışılan bölgede non-spesifik bölgelerin amplifiye olmasıyla hatalı sonuçlar alınabilmektedir. Bundan kaçınmak için Nested PCR yöntemi en çok tercih edilen metotlardandır. Başka bir ifadeyle Nested PCR, PCR tekniğinin özgünlüğü ve hassasiyetini arttırmak için geliştirilen yöntemlerdendir (Sevindik ve Abacı, 2013).

Nested PCR reaksiyonlarında iki primer seti ve ardışık iki polimeraz zincir reaksiyonu bulunmaktadır. Başlangıç aşaması için kullanılacak primeler hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü dizayn edilen birinci set primerler ile uzun bir bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktadır. İlk PCR setinden elde edilen ampliconlar ikinci bir primer seti ile ikinci bir amplifikasyon aşaması için şablon olarak kullanılmaktadır. İkinci amplifikasyon aşamasında 1. aşamada amplifiye edilen dizilerin iç bölgesi çoğaltılmaktadır. Bu teknikle DNA amplifikasyonunun özgünlüğü ve hassasiyetinin 10^4 kat kadar arttığı düşünülmektedir. İkinci aşamadan sonra ortamda istenilmeyen DNA dizisi kalmadığı belirtilmektedir. İkinci PCR aşamasında kullanılan primerlerin 3' ucunda bulunan iki veya üç nükleotitlik dizi yöntemin hassasiyetini belirlemektedir. Bahsi geçen 3 dizisi hedef DNA dizisinin tamamlayıcısı değilse amplifikasyon gerçekleşmemektedir. Böylece hedef olmayan dizilerin çoğaltılmasının önüne geçilmiş olur. Bununla birlikte reaksiyonun kontaminasyon potansiyeli amplicon ürünlerinin ek manipülasyonu nedeniyle artmaktadır. Kontaminasyon riskini en aza indirmek için işlemin farklı aşamaları fiziksel olarak, tercihen farklı odalarda yapılarak birbirinden ayrı tutmak gerekmektedir (Sevindik ve Abacı, 2013).

2.4.3.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Enfeksiyon etkeninin türü, canlılığı ve enfektivitesinin belirlenmesi için geliştirilmiş farklı PCR yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılan; genomun uygun bir bölgesinin PCR ile çoğaltılarak uygun enzimlerle muamele edilmesi sonucu kesim yapılması ve sonrasında jelde yürütülerek kesim yerlerine göre etkenin genetik analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan PCR-RFLP yönteminin uygulanmasıdır (Xiao ve diğerleri, 2004b).

Cryptosporidium dış duvar proteini (COWP) geninin PCR restriksiyon fragmanı uzunluğu polimorfizmi analizi (RFLP) ile ayırt edilebilmektedir. COWP geni için aynı PCR/RFLP tekniği ile aynı zamanda *C. parvum*'un iki genotipini de ayırt edebilmektedir (Patel ve diğerleri, 1999). Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda da, *Cryptosporidium* spp. genotiplendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Ono ve diğerleri, 2001; Xiao, 2010).

2.5. Tedavi

Cryptosporidiosis tedavisinde etkili antiparaziter tedavi zor olduğundan, tedavide rasyonel antisekretuar farmakolojik stratejiler tasarlamak için bu enfeksiyonun patofizyolojisini açık bir biçimde ortaya koymaya ihtiyaç duyulmaktadır (Sears ve Guerrant, 1994). Kullanımda olan ilaçların sekonder etkileri ve enfeksiyonun kendini sınırlandırması özelliği nedeniyle, cryptosporidiosis olgularında temel olarak nonspesifik ve destekleyici sağaltım tercih edilmektedir (Tzipori ve Ward, 2002).

Yapılan çalışmalar apicomplexa kök altında yer alan parazit türlerinde bulunan apicoplastın, bu gruptaki parazitlerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için hayati olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ilaç tedavisindeki tüm çalışmalarda hedef, plastid apicoplasta yönelik olmaktadır (Ralph ve diğerleri, 2004). *Cryptosporidium parvum* ekstrasitoplazmik parazitövor vakuol içinde bulunduğundan ilaçların etkilemesi oldukça zordur. Uygulanan ilaçların ya hücrelere penetre olmadan bağırsak lümeninden geçtiği ya da hücrenin sitoplazmasında biriktiği görülmektedir. Sağaltımda kullanılan ilacın sadece hücrenin sitoplazmasına ve parazitövor vakuole penetre olduğunda veya etkilenen hücrenin

yıkımlanmasının tamamlanmasında başarılı olabileceği belirtilmektedir (Tzipori ve Ward, 2002).

Birçok ilaç ve aşı, cryptosporidiosis için potansiyel terapötik veya profilaktik ajan olarak değerlendirilmektedir; ancak çok az başarı sağlanmaktadır (Santin ve Trout, 2008). Buzağı ve kuzularda klinik cryptosporidiosis olgularında β -cyclodextrin, nitazoxanide, decoquinate, toltrazuril, azitromisin, halofuginon ve paromomisin etken maddeli ilaçlar kullanılmaktadır (Thompson ve diğerleri, 2005).

Halofuginon laktat, *C. parvum*'un sporozoit ve merozoit aşamalarında kriptosporidostatik aktiviteye sahip sentetik bir kinazolinon olup (Jarvie ve diğerleri, 2005); yeni doğan buzağılarda hastalığın önlenmesi ve tedavisi için mevcut tek lisanslı ilaçtır (De Waele ve diğerleri, 2010; Jarvie ve diğerleri, 2005). Plasebo tedavisi gören buzağılardan alınan 73 örnekten 31'i (% 42,5) *C. parvum* pozitif iken, halofuginone laktat tedavisi gören 67 örnekten 15'inin (%22,4) pozitif sonuç verdiği, halofuginone laktat ile tedavi edilen buzağılarda ishal insidansında 3,1 günlük önemli bir gecikme olduğu bildirilmektedir (Jarvie ve diğerleri, 2005).

Halofuginon sağaltımının sonuçları üzerine raporlar tartışmalı kabul edilmektedir. Bazı çalışmalarda, buzağılarda ookist atılımını ve ishali önemli ölçüde azalttığı (Joachim ve diğerleri, 2003) ve mortalitenin düştüğü (Naciri ve diğerleri, 1993) bildirilirken, diğer çalışmalarda halofuginon'un ishal veya dehidrasyon düzeyleri üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Lallemand ve diğerleri, 2006). Bir başka çalışmada ise buzağıları doğumdan hemen sonra halofuginone laktat ile tedavi etmenin, kontamine bir ortamda *C. parvum* kaynaklı cryptosporidiosis'in önlenmesine yardımcı olduğunu ve cryptosporidiosis'i kontrol etmek için başka etkili yöntemin olmamasının halofuginon laktatı özellikle değerli kıldığını savunmaktadır (Lefay ve diğerleri, 2001). Halofuginone laktatın ishali başlatmasını geciktirmediği ve yüksek derecede kontamine bir ortamda birlikte yetiştirilen buzağılar arasında enfeksiyon riskini azaltmadığı, 7-13 günlük buzağılarda cryptosporidiosis riskini azaltmak için temiz, bireysel padoklarda hayvan yetiştirmek gibi iyi hijyen önlemleriyle birlikte halofuginon laktat kullanımının en etkili yöntem olduğu belirtilmektedir. Bir başka deyişle, parazitin kontrolünün halofuginone laktat gibi etkili koruyucu ilaçların kullanılması ve iyi hayvancılık prosedürlerinin kombinasyonu ile sağlanabileceği sonucuna varılmaktadır (De Waele ve diğerleri, 2010).

Nitazoksanid köpek, kedi, koyun ve keçilerde antiparaziter sağaltım için uygulanmış antimikrobiyel bir maddedir. Nitazoksanid, çocuklar ve yetişkinlerde cryptosporidiosis ve giardiasis sağaltımı için FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylıdır. İn vitro çalışmalarda ve fare modellerinde cryptosporidiosis’de etkili bulunmaktadır. Hayvan modellerinde parazit sayısını azaltmakta; ancak tedavi dozu sağlanamamaktadır. İshalli buzağılarda profilaktik ve terapötik olarak kullanılan nitazoksanid’in ne ookist atılımını ne de hastalığın klinik şiddetini azaltması üzerine pozitif bir etkisinin olmadığı gösterilmektedir (Schnyder ve diğerleri, 2009). Günde 2 kez nitazoxanide (1,5 g) beş gün boyunca uygulanması ile buzağuların % 85’inde ookist döküntüleri kesilmişken, plasebo grubundakilerde bu oran %15 olarak bildirilmektedir. Tedavi gören buzağılarda dışkı kıvamının iyileştiği, ookist saçılım süresinin azaldığı görülmektedir (Ollivett ve diğerleri, 2009). Ancak, başka bir çalışmada ishalli buzağılarda kullanılan nitozoxanide’in tedavi ve koruyucu amaçla kullanımı ookist atılımına ve hastalığın klinik şiddetinin azalması üzerine etkisi olmadığı saptanmaktadır (Schnyder ve diğerleri, 2009).

Saha koşullarında azitromisin, co-trimaxozole ve kalanji'nin (çörek otu) *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonlarına karşı tedavi sonrası 21. gündeki etkileri, sırasıyla % 88,2, % 45 ve % 27,8 olarak sıralanmaktadır (Nasir ve diğerleri, 2013).

Deneysel enfekte buzağılarda paromomisinin profilaktik uygulamasının ookist atılımını inhibe ettiği, ishalin süresini azalttığı bildirilmektedir (Fayer ve Ellis, 1993).

Düşük seviyeli *C. parvum* maruziyetlerinde Glukagon benzeri peptit 2(GLP-2) ve sucram tedavilerinin intestinal bütünlüğe, morfolojiye ve yangı cevabına katkısı olabileceği bildirilmektedir (Connor ve diğerleri, 2017).

Bumped Kinase İnhibitor (BKI)’lerin daha önce buzağılarda klinik skorları iyileştirdiği, ookist sayılarını ve ishal şiddetini önemli ölçüde azalttığı; ancak ishali veya diğer klinik belirtileri tamamen hafifletmede başarısız olduğu ortaya konulmaktadır (Schaefer ve diğerleri, 2016). BKI 1369'un ise in vitro olarak *C. hominis* ve üç farklı *C. parvum* suşuna karşı nitazoksanid’ten daha güçlü olduğu, yeni doğan buzağılarda ishal ve ilişkili dehidratasyon dahil tüm klinik belirtileri önemli ölçüde iyileştirdiği, parazit atılımını azalttığı bildirilmektedir (Hulverson ve diğerleri, 2017).

Ayrıca yapılan çalışmalarda neonatal buzağılarda görülen ishal vakalarında yemlere ilave edilen probiyotikler (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* ve *Bacillus* spp.)

ve prebiyotiklerin (Mannan oligosakkarit) hastalığın insidensini azalttığı ileri sürülmektedir (Kocaoğlu Güçlü ve Kara, 2009).

Nekka-rich (10gr) içeren süt ikame yeminin 8 hafta aralıkla 4 gün üst üste buzağılarda kullanılmasıyla 24 saat sonra düzelme görüldüğü, 48 saat sonra dışkı örneklerinde ookist tespit edilmediği ileri sürülmektedir. Dolayısıyla yeni doğan buzağılarda, Nekka-rich'in cryptosporidiosis tedavisinde etkili olabileceği bildirilmektedir (Watarai ve diğerleri, 2008).

Konak-patojen etkileşiminin tam olarak anlaşılabilmesi, cryptosporidiosis için bir aşının olmaması ve hastalıkta kullanılan ilaçların ve etkinliklerinin sınırlı olması nedeniyle günümüzde hastalığın tedavisine dair arayışlar devam etmektedir (de Graaf ve diğerleri, 1999; Innes ve diğerleri, 2020; Thomson ve diğerleri, 2017). Çeşitli anti-paraziter ilaçlara karşı olumsuz etkiler ve direnç göz önüne alındığında, araştırmacılar, potansiyel yeni tedavi kaynağı olarak bitki özlerine odaklanmaktadır (Gaafar, 2012). *Allium sativum* (sarımsak özütü) ile hazırlanan ekstraktın cryptosporidiosis ile enfekte farelere, iki hafta boyunca günde 50 mg/kg dozunda uygulandığında tedavi edildiği bildirilmektedir (Farid ve diğerleri, 2022). Enfekte farelerin 14 gün boyunca, içme suyuna 250 mg/L'lik bir günlük dozda Aloe vera jelinin oral yoldan verilmesi ile bağışıklığı yeterli farelerde %100 ve bağışıklığı baskılanmış farelerde %99,67 oranında azalma gözlemlendiği, IFN- γ , IL-4, -6 ve -17 seviyelerini azaltmak için bir anti-inflamatuar ajan olarak görev yaptığı bildirilmektedir (Farid ve diğerleri, 2021). Bir başka çalışmada sunulan sonuçlar, konsantre nar ekstraktının diyetle kullanımının bağırsak morbiditesini hafiflettiğini göstermektedir. Böylece, yüksek insidansa sahip sürüler için olumsuz ekonomik sonuçların en aza indirilmesinde ve organik tarımda önemli bir yere sahip olabileceği öngörülmektedir (Weyl-Feinstein ve diğerleri, 2014). Zencefil (*Zingiber officinale*), ginseng (*Panax ginseng*) ve adaçayı (*Salvia officinalis*) metanolik ekstraktlarının deney farelerinde cryptosporidiosis'in ilerlemesi üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, Anti-cryptosporidial (*C. parvum*) aktiviteye sahip olan zencefil, ginseng ve adaçayının metanolik ekstraktlarının ookistlerin dökülmesini azalttığı, bağırsak epitelini *C. parvum*'un zararlı etkilerinden koruduğu ve sağlıklı hayvanları enfeksiyondan koruyabileceği sonucuna varılmaktadır (Aboelsoued ve diğerleri, 2020).

2.6. Korunma ve Kontrol

Hayvan refahı, insan sağlığına yönelik riskleri azaltmak ve etkilenen endüstrilerdeki ekonomik kayıpları sınırlandırmak için *C. parvum*'un kontrolüne daha fazla önem verilmektedir (Brainard ve diğerleri, 2020a). Cryptosporidiosis ookistlerin birçok dezenfektana karşı dirençli olması (Chalmers ve Giles, 2010), tedavi seçeneklerinin sınırlı ve mevcut bir aşının olmaması sebebiyle kontrolü zor; ancak zorunlu bir hastalık olarak görülmektedir (Meganck ve diğerleri, 2014).

Cryptosporidiosis, bağışıklığı yeterli bireylerde kendini sınırlamaktadır (Gerace ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, Cryptosporidiosis'den korunmada en önemli faktör, buzağuların yaşamlarının ilk birkaç haftasında yeterli miktar ve kalitede kolostrum almaları sonucu vücut direncinin desteklenmesidir (Innes ve diğerleri, 2020). Kolostrum yönetimi, buzağı sağlığını ve hayatta kalmasını belirlemedeki en önemli etmen olarak kabul edilmektedir (Falkenberg ve diğerleri, 2022).

Buzağular agamaglobulinemik doğduklarından, yaşamlarının ilk haftalarında hayatta kalmaları ve enfeksiyonlara karşı dirençleri büyük ölçüde yemlerden elde edilen immünoglobulinlere bağlı olarak sağlanmaktadır (Vildu ve Mötus, 2022). İmmünoglobulinler ve immünoglobulin olmayan proteinler içeren sığır kolostrumunun, farklı immünolojik süreçlerdeki rolleri nedeniyle bağışıklık sistemi üzerinde etkili olduğu ileri sürülmektedir (Godden, 2008; Hernandez-Castellano ve diğerleri, 2014). Ağızdan alınan kolostral antikorlar sayesinde buzağular enfeksiyonlara karşı korunmaktadır. Kolostral antikor alamayan buzağuların, alan buzağulara kıyasla 2-4 kat daha fazla ölüm ve hastalık riski taşıdıkları belirtilmektedir. Doğumdan 16 saat sonra hem annenin hem de yavrunun antikorları reabsorbe etme yeteneği azalmakta, tam koruma sağlanamamaktadır (Sevinç, 2004). Laktojenik (kolostral) bağışıklık, patojene özgü antikorların bağırsak lümeninde sürekli olarak yüksek miktarlarda bulunmasını ve patojeni hızla nötralize edebilmesini sağlamaktadır (Crouch ve diğerleri, 2001; Durel ve diğerleri, 2017). Maternal antikorların yeni doğan buzağulara pasif transferi, *C. parvum*'un neden olduğu neonatal ishali azalttığı (Furman-Fratczak ve diğerleri, 2011), düşük dozda *C. parvum* enfeksiyonuna karşı kısmi koruma sağladığı bildirilmektedir (Jenkins ve diğerleri, 1998). Bu nedenle buzağuların doğumdan hemen sonra mümkün olan en kısa sürede (en geç 12-24 saat) kolostrum alması gerekmektedir (Pakkanen ve Aalto, 1997; Robertson ve diğerleri, 2014). Hatta İsveç'te buzağulara doğumdan sonraki 6 saat içinde

kolostrum verilmesinin yasal bir zorunluluk haline getirildiği bildirilmektedir (Björkman ve diğerleri, 2015). Buzağuların ilk beslemede vücut ağırlıklarının (BW) %10 ila %12'si kadar kolostrumla beslenmesi önerilmektedir (Holstein buzağı için 3–4 L) (Falkenberg ve diğerleri, 2022). Bunun yanı sıra buzağuların annelerinden erken ayrılmasının ve doğumdan sonraki 6 saat içinde artan miktarda kolostrum ile beslenmesinin, pasif transfer başarısızlığı riskini önemli ölçüde azalttığı ve böylece gelişmiş bir bağışıklık sistemi oluşturulduğu önerilmektedir (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008). Hastalıklardan ve ölümden korunmaya ek olarak, uzun süreli kolostrum ve TM (geçiş sütü) besleme, yaşamın sonraki dönemlerinde yapılacak aşılar için hücresel bağışıklık tepkilerini güçlendirmekte ve genç buzağuların kilo alımı ve bağırsak villuslarının gelişimini artırabilmektedir (Bühler ve diğerleri, 1998; Langel ve diğerleri, 2016).

Ookistler çevre koşullarına oldukça dayanıklı olup, birkaç ay canlılıklarını devam ettirebilmektedir (Jenkins ve diğerleri, 2003; Robertson ve diğerleri, 1992). Pastörizasyona maruz bırakmanın (15 sn için 72°C), su veya süt içinde süspanse edilen ookistleri öldürdüğü (Harp ve diğerleri, 1996), aşırı sıcaklıklara (-20 °C'ye kadar ve 60 °C'ye kadar) ve kurumaya duyarlı oldukları bildirilmektedir (Robertson ve diğerleri, 1992). Bununla birlikte, ookistlerin 1 hafta boyunca -10°C'de hayatta kaldıkları gösterilmektedir (Fayer ve Nerad, 1996). Bunun yanı sıra ookistler yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara karşı oldukça dirençlidir, bu da onları yok etmeyi zorlaştırmaktadır (Carpenter ve diğerleri, 1999; Weir ve diğerleri, 2002). Ticari dezenfektanlar, önerilen konsantrasyonlarda kullanıldıklarında genellikle *C. parvum*'a karşı etkili olmamaktadır. *C. parvum*'u öldürmeye yeterli konsantrasyon ya da maruz kalma süresinde kullanım ise, insanlar ve çiftlik hayvanları için kabul edilemez bir tehlike arz etmektedir (O'Donoghue, 1995).

Enfeksiyondan korunmada çiftlik yönetimi, sanitasyon ve hijyen kurallarına titizlikle uyulması, barınakların temiz ve kuru olması, yeni doğan ünitelerinin temiz ve birbirinden ayrı padoklar şeklinde tasarlanması ve hastaların sağlıklı hayvanlardan izolasyonunun sağlanması (İnci, 2016), bakıcıların bu ünitelerde ayrı çizme ve tulum kullanması, tedavi süreci sonlandırıldığında padokların temizlik ve dezenfeksiyonunun sağlanması önemli görülmektedir (O'Donoghue, 1995). Buzağılama alanlarından ve buzağı padoklarından dışkı ve kontamine yatakların sık sık çıkarılması, buharla temizleme ve hidrojen peroksit bazlı dezenfektanların kullanımı ile dezenfeksiyonlarının gerçekleştirilmesi, çevresel birikimin azalmasına katkı sağlamaktadır (Thomson ve diğerleri, 2017).

Deneyisel koşullar altında, kısmen başarılı olan aşı geliştirme girişimleri bulunmaktadır. Örneğin, öldürülen (γ -ışınlanmış veya liyofilize) *C. parvum* ookistleri ile bağışıklık kazandırılan buzağılarda, bağışıklanmamış buzağılara kıyasla daha az ookist dökülmesi ve ishal görüldüğü (Harp ve Goff, 1995), ancak aşı saha koşullarında test edildiğinde etkili olmadığı görülmektedir (Thomson ve diğerleri, 2017). Buzağılarda *C. parvum* ile deneyisel mücadeleye karşı koruma sağlayan oral bir aşı da geliştirilmiştir; ancak sahada ağır endemik *C. parvum* enfeksiyonu olan büyük bir süt işletmesi üzerinde test edildiğinde, aşının koruma sağlamada başarısız olduğu bildirilmektedir (Harp ve Goff, 1998)

Cryptosporidium ile enfeksiyon genellikle yaşamın ilk haftasında meydana gelmektedir. Bu nedenle, enfeksiyondan önce önemli bir bağışıklık tepkisi oluşması için yeterli zaman bulunmadığından, yeni doğan buzağıları aşılayarak etkili bir aşı geliştirilme olasılığının düşük olduğu düşünülmektedir (Innes ve diğerleri, 2011). Bu sorunu çözmek için, gebe inekleri aşılayarak *Cryptosporidium*'a karşı antikor üretmeleri ve kolostrum yoluyla buzağılara koruyuculuk sağlanması seçeneği değerlendirilmektedir. Bu şekilde rekombinant olarak *C. parvum* ile aşılanmış ineklerden kolostrum alan buzağılar, aşılanmamış ineklerden kolostrum alan buzağılara kıyasla ishale karşı korunduğu ve ayrıca ookist dökülmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak; rekombinant *C. parvum*'un etkinliği saha koşullarında henüz tespit edilmemekle birlikte şimdiye kadar geliştirilen ticari bir aşı bulunmamaktadır (Thomson ve diğerleri, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Gerçekleştirilen çalışma tanımlayıcı nitelikte bir araştırma türü olup; Denizli ilinde büyükbaş hayvan üretme-yetiştirme çiftliklerinde bulunan neonatal dönemdeki 250 adet buzağıdan alınan dışkı örnekleri kullanılmıştır.

2021 yılı istatistik verilerine göre Denizli ili büyükbaş hayvan varlığı 295.800'dür. Bu çalışmada örneklem büyüklüğü ilgili literatür (Martin ve diğerleri, 1987) kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Epidemiyolojik formül; $n = 4 \times P \times Q / L^2$ olarak tanımlanmaktadır (P= daha önceki yıllarda çalışma alanında ilgili etkenin prevalansı [Denizli ilinde insanlarda 4,67 (Özkan, 2021), tarımsal sularda ise 58,33 (Sağlam, 2018) oranında tespit edilmiştir ve ikisinin aritmetik ortalaması alındığında %31,5 oranında tahmini bir prevalans değeri elde edilmektedir]; Q= 1-P; L= doğruluk payı tahmini (%95) olan 0,05). Bu formülü uygularsak; $\{n = 4 \times 0,315 \times 0,685 / 0,0025\}$ n sayımız 345 olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, gerek maddi olanaklar, gerekse yapılabirlik noktasında aksaklık yaşanmaması amacıyla 250 adet örnek ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Dışkı Örneklerinin Toplanması

Denizli ilinin farklı ilçelerindeki 26 ayrı çiftlikte bulunan 0-28 gün yaş arasındaki buzağılar çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler 25 Mart 2021 ve 16 Ekim 2021 tarihleri arasında toplanmıştır. Çalışma kapsamında örneklerin toplanacağı çiftlikler, toplam hayvan sayısı, çiftlik yönetimi, buzağı barınak durumu gibi kriterler göz önünde bulundurularak bir ön değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Belirlenen uygun çiftliklerde neonatal dönemdeki buzağılardan rektal irkiltme yöntemiyle dışkı örnekleri toplanmıştır (Resim 1). Ayrıca buzağılara ait yaş, cinsiyet, ırk, sağlık durumu, kolostrum alma süresi ve zamanı, beslenme programı, barınak durumu, ilaç ya da aşı uygulama bilgileri, çiftliklerdeki toplam hayvan

sayısı, toplam buzağı sayısı, uygulanan rutin aşılar, barınakların durumu, temizlik ve dezenfeksiyon uygulamalarına ait bilgiler kaydedilmiştir.



Resim 1. Dışkı rneklerinin toplanması (Orijinal)

3.2. Yöntem

Bu alışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı III. Oturum 64583101/2021/040 sayılı karara uygun olarak yrtlmştir (Ek 1). Tez alışması kapsamında 250 dışkı numunesinin her birinden yayma preparat hazırlanarak havada kurutulmuş, ardından metil alkol ile tespit edilmiştir. Dışkı numunelerinin geri kalanları -20 C'de saklanmıştır. Boyama aşamasında sıcaklık gereksinimi olmaması ve daha pratik olması nedeniyle Modifiye Asit-Fast Boyama yerine Kinyoun'un Asit-Fast Boyama tercih edilmiştir. Kinyoun'un Asit-Fast boyama yöntemiyle tüm numuneler boyanıp, mikroskopik olarak incelemeye alınmıştır.

Boyalı mikroskopik incelemeyi takiben tüm numunelere PCR ve Nested PCR analizleri uygulanmış, ardından agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

3.2.1. Kinyoun'un Asit-Fast Boyama

Kinyoun karbol fuksin yapılışı:

- 4 g bazik fuksin, 20 ml %95'lik etanol içerisinde eritilmiştir.

- 8 g fenol kristali 100 ml distile su içerisinde eritilmiştir.
- Hazırlanan bu iki solüsyon karıştırılarak 2 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Karışım kullanımdan önce gazlı bez yardımıyla filtre edilmiştir (Turgay, 2011).

%1 sülfirik asit yapılışı:

- 99 ml distile suya 1 ml konsantre sülfirik asit ilave edilerek hazırlanmıştır (Turgay, 2011).

Loeffler' in alkali metilen mavisi yapılışı:

- 0,3 g metilen mavisi 30 ml %95'lik etanol içerisinde çözdürülmüştür.
- Bu karışıma %0,01'lik potasyum hidroksidden 100 ml eklenerek hazırlanmıştır (Turgay, 2011).

Preparatların Boyanması:

- Sahada dışkı numunesi alınır alınmaz hazırlanıp, metil alkol ile tespit edilmiş halde laboratuvara getirilen frotiler, boya köprüsü üzerine alınmıştır. Kinyoun karbol fuksin ile preparatların üzeri kaplanarak 5 dakika bekletilmiştir (Resim 2a). Ardından boyanın fazlası dökülmüştür.



Resim 2a. Preparatların boyanması (Orijinal)

- Lamlar %50 etanol içeren şalede 3-5 saniye çalkalanmıştır ve beklemeden çeşme suyu ile yıkanmıştır.
- Tekrar boya köprüsü üzerine alınan lamaların üzeri %1'lik sülfirik asit ile kaplanarak 2 dakika dekolorize edilmiştir.
- Sürenin sonunda musluk suyu ile yıkanmıştır.

• Son aşamada lamalar %0,01'lik Loeffler'in alkali metilen mavisi ile kaplanarak (Resim 2b), 1 dakika bekletildikten sonra musluk suyunda yıkanmıştır ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.



Resim 2b. Preparatların boyanması (Orijinal)

• Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 model mikroskopta bir damla immersiyon yağı damlatılarak X100'lük büyütmede incelenmiş ve yine Olympus marka, DP 70 model kamerayla fotoğraflanmıştır.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Dışkı örnekleri -20°C 'den çıkartılarak çözülmeye bırakılmıştır. Erime sonrası 2 ml'lik eppendorflara her biri 0,2 g dışkı örneği içerecek şekilde tüm numuneler porsiyonlanmış ve her bir eppendorf numaralandırılmıştır (Resim 3). DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce ön hazırlık olarak NW Buffer solüsyonuna 24 ml ethanol eklenerek toplam hacmi 30 ml'ye çıkarılmıştır. Ayrıca FL Buffer solüsyonu, oluşan çökelmeleri gidermek için 56°C 'de su banyosunda bekletilmiştir.

Ön hazırlıkların tamamlanmasının ardından numuneler, "Exgene™ Stool DNA" ticari kit içerisinde belirtilen protokol işlemlerine tabi tutularak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Söz konusu protokol basamakları şu şekilde uygulanmıştır:

- Eppendorfa 1000 μl PBS eklenerek, yaklaşık 1 dk, dışkı tamamen homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir.
- Karışım oda sıcaklığında 30 sn bekletilmiştir.
- Karışım 2 dk 14.000 rpm hızda santrifüj edilmiş ve süpernant kısmı atılmıştır.

- 1300 µl FL Buffer eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 12.000 RCF'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernant EzPass filter'e (650-700 µl) aktarılarak 12.000 RCF'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Dipte kalan sıvı boşaltılıp filtre geri takılmıştır.
- Örneğin geri kalan kısmı kullanılarak son iki basamak tekrar edilmiştir.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra filtre yeni bir 1,5 ml'lik eppendorfa takılmıştır.
- EzPass filtresine 100 µl EB Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir.
- 12.000 RCF'de 1 dk santrifüj edilmiş ve filtre atılmıştır.
- Eppendorfa 500 µl PB Buffer eklenerek pipetaj yapılmış ve oluşan karışım kolon G'ye aktarılmıştır.
- 12.000 RCF'de 1 dk santrifüj edilmiş, kolon'dan geçen sıvı kısım atılarak mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Mini kolona 500 µl NW Buffer eklenerek 12.000 RCF'de 1 dk santrifüj edilmiş ve geçen sıvı kısım atılarak tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- 1 dk 14.000 rpm'de santrifüj işleminin ardından mini kolon yeni bir 1,5 ml'lik eppendorfa takılmıştır.
- Kolon'un membran merkezine 50 µl EB Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir.
- 12.000 RCF'de 1 dk santrifüj edilmiş ve genomik DNA elde edilmiştir. Tüm DNA örnekleri etiketlenerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Resim 3. DNA ekstraksiyonu (Orijinal)

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Buzağı dışkılarından izole edilen genomik DNA'ların, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan *Cryptosporidium* pozitif dışkıdan elde edilen genomik DNA pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril dH₂O) kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR uygulamalarında SSU-rRNA bölgesinin 1325 bp'lik bir bölgesini hedef alan Crypto F1 ve Crypto R1 primer setleri tercih edilmiştir (Xiao ve diğerleri, 1999) (Tablo 3). Uygulanan 30 µl son hacimli reaksiyon karışımı; 15 µl Dream Taq Miks, 0,55 µl Crypto F1 (10 pmol/µl), 0,55 µl Crypto R1 (10 pmol/µl), 9,6 µl steril (nükleaz-free) distile su, 1,3 µl BSA (30 µg/ml) ve 3 µl genomik DNA içermektedir. PCR protokolü; ön denatürasyon (açılma) 94°C'de 3 dakika; denatürasyon 94°C'de 45 saniye; annealing (bağlanma-tutunma) 58°C'de 45 saniye; extension (uzama) 72°C'de 60 saniye 30 siklus ve son uzama 72°C'de 7 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. Amplikonlar hazırlandıktan sonra "SimpliAmp Thermal Cycler" cihazında PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan primer dizilimleri (Xiao ve diğerleri, 1999).

Crypto F1 (PCR Forward Primeri): 5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
Crypto R1 (PCR Reverse Primeri): 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'

3.2.4. Nested PCR

Nested PCR, PCR ile elde edilen 1325 bp büyüklüğündeki DNA dizilerinden daha kısa ve daha spesifik DNA dizilerinin elde edilmesi amacıyla (826-864 bp) 2. set primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer dizilimleri (Crypto F2 ve Crypto R2) Tablo 4'te verilmiştir. Uygulanan 30 µl son hacimli Nested PCR reaksiyon karışımı; 15 µl Dream Taq Miks, 0,55 µl Crypto F2 (10 pmol/µl), 0,55 µl Crypto R2 (10 pmol/µl), 10,9 µl steril (nükleaz-free) distile su ve 3 µl PCR ürünü DNA dizileri içermektedir. Nested PCR protokolü; ön denatürasyon (açılma) 94°C'de 3 dakika; denatürasyon 94°C'de 45 saniye; annealing (bağlanma-tutunma) 58°C'de 45 saniye; extension (uzama) 72°C'de 60 saniye 25

siklus ve son uzama 72°C’de 7 dakika olacak şekilde ‘‘SimpliAmp Thermal Cycler’’ cihazında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

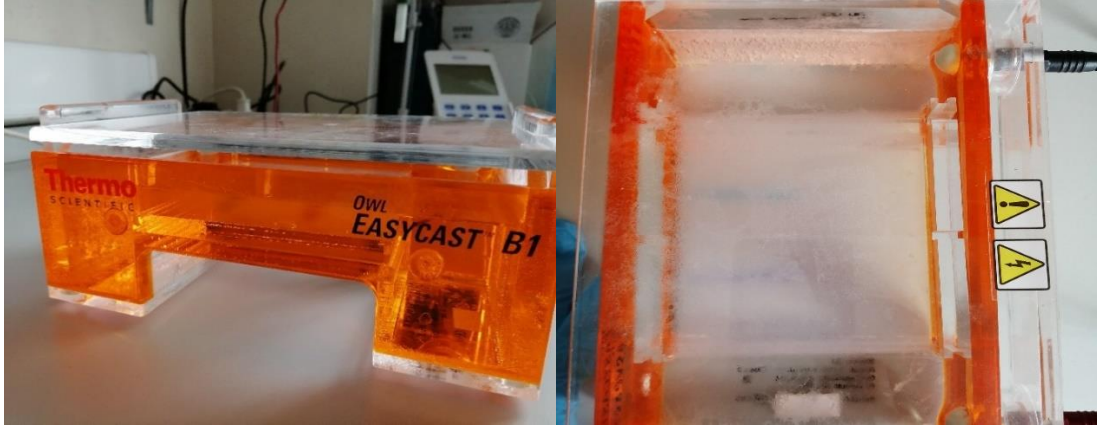
Tablo 4. Kullanılan primer dizilimleri (Xiao ve diğerleri, 1999).

Crypto F2 (Nested PCR Forward Primeri): 5’ GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3’
Crypto R2 (Nested PCR Reverse Primeri): 5’-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3’

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Nested PCR’dan elde edilen ürünlere, dizilerin tespiti amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulanmış ve UV ışık altında görselleştirilmiştir. %1’lik 100 ml agaroz jel şu şekilde hazırlanmıştır:

- 100 ml 1X Tris-Asetat EDTA (TAE) solüsyonu 250 ml hacimli bir erlen içerisine konulup 1 g agaroz eklenmiştir.
- Mikrodalga içerisine yerleştirerek, kaynama noktasına getirmeden, ara sıra karıştırılarak agarozun erimesi sağlanmıştır.
- Jel ılık bir ısıya geldiğinde 6,5 l Safe View™ eklenmiş ve erlen hafifçe sallanarak karışması sağlanmıştır.
- Elektroforez tankının içerisindeki kalıba görüntülenmek istenen örnek sayısına göre tarak yerleştirilmiş ve hazırlanan jel dökülmüştür.
- Jel donduktan sonra tarak çıkarılmış ve 1 X TAE solüsyonu jelin üzerini 1 cm kadar geçecek şekilde tank doldurulmuştur.
- İlk ve son kuyucuğa 5 l Loading Dye (GENESTA™ 100 bp DNA Ladder), diğer kuyucuklara ise parafin kağıdın üzerinde 1 l Loading Dye ile 10 l Nested PCR ürünü pipetaj yapılarak aktarılmıştır.
- ‘‘Thermo Scientific Owl EasyCast™ B1’’ elektroforez tankının güç kaynağı 250 amps, 110 volt’a ayarlanarak yaklaşık 1 saat koşturulmuştur (Resim 4).
- Jel görüntüleme UV ışık altında ‘‘UVP EC3 Chemi HR410 Imaging System’’ cihazında yapılmıştır.



Resim 4. Agaroz jel elektroforezi (Orijinal)

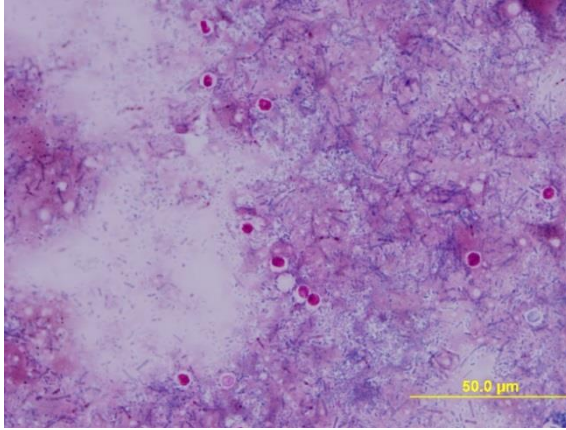
3.2.6. İstatiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme, SPSS (IBM SPSS for Windows, versiyon 25) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki kategorik değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Alınan örneklerde dışkı boyama yöntemine göre elde edilen sonuçlar ile moleküler analizler sonucunda elde edilen verilerin oranlarının dağılımlarının farklılıkları Pearson Ki-kare testi ile belirlenmiştir. Bunun yanında araştırılması hedeflenen *Cryptosporidium* spp.'nin çiftlik yönetimi ile ilişkisi belirlenerek, epidemiyolojik faktörlere ve morbidite/mortalite oranlarına etkisinin ortaya konulması sınamak amacıyla Pearson Ki-kare testi analizi kullanılmıştır. Analiz sonuçları %95 güven aralığında test edilmiş ve hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmıştır.

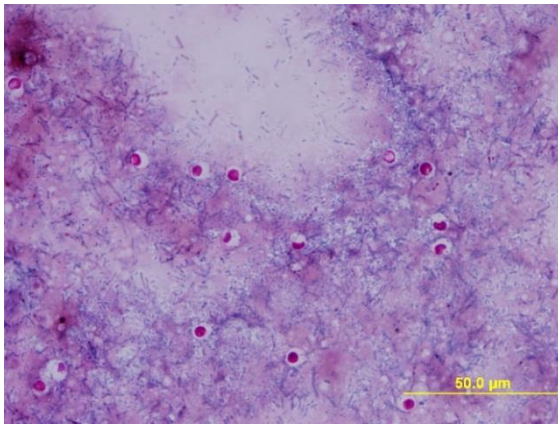
4. BULGULAR

4.1. Kinyoun'un Asit-Fast Boyama Bulguları

Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 model mikroskopta bir damla immersiyon yağı damlatılarak X100'lük büyütmede incelenmiş olup; 250 örneğin 97'sinde ookist tespit edilmiştir ve olympus marka, DP 70 model kamerayla fotoğraflanmıştır (Resim 5a, Resim 5b). Mikroskobik incelemeler yapılırken ishal görülen hayvanlardan alınan 38 örneğin 23'ü ve ishal görülmeyen 212 örneğin 74'ü cryptosporidiosis yönünden pozitif (+) olarak belirlenmiştir.



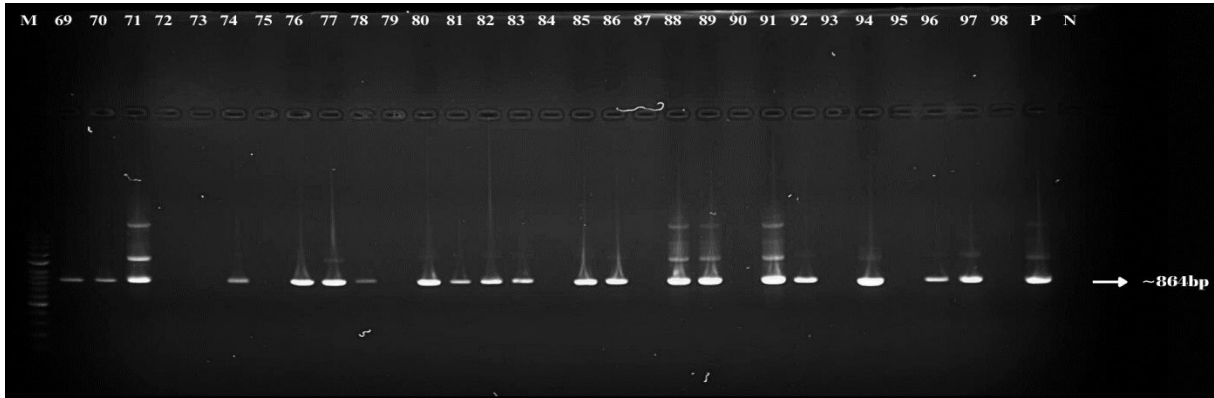
Resim 5a. *Cryptosporidium* spp. ookistleri-1 (Orijinal)



Resim 5b. *Cryptosporidium* spp. ookistleri-2 (Orijinal)

4.2. PCR ve Nested PCR Bulguları

Kinyoun'un Asit-Fast boyama yöntemiyle incelenen tüm örneklerin PCR ve Nested PCR analizleri de yapılmıştır. Nested PCR analizi sonucunda *Cryptosporidium* spp. pozitif örneklerin 826-864 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdiği saptanmıştır (Resim 6). 171 örnekte *Cryptosporidium* spp. pozitif (+) olarak belirlenirken 79 örnek negatif olarak belirlenmiştir. Boyama yöntemi ile inceleme ve moleküler yöntem ile analiz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 5). Mikroskopik inceleme sonucu pozitif olarak tespit edilen her örnek, moleküler yöntem ile de pozitif olarak tespit edilirken; mikroskopik olarak negatif belirlenen 74 örnek, moleküler yöntem ile analiz sonucu pozitif olarak belirlenmiştir. Prevalans değeri= Pozitif örnek sayısı/ Toplam örnek sayısı olarak hesaplanmış ve $(171/250= 0,684)$ %68,4 olarak tespit edilmiştir.



Resim 6. Nested PCR sonuçlarının agaroz jel görüntüsü (Orijinal).

M: Marker (100 bp), P: Bilinen pozitif, N: Bilinen negatif.

Tablo 5. Kinyoun'un Asit-Fast Boyama Sonuçları ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Mikroskopik İnceleme	PCR+Nested PCR Sonucu		Toplam	%
	Pozitif	Sonucu Negatif		
Pozitif	97	0	97	100,00
Negatif	74	79	153	48,40
Toplam	171	79	250	68,40

4.3. *Cryptosporidium* spp.'nin İshal ile İlişkisi

İshal gözlemlenen 38 örneğin 26'sında *Cryptosporidium* spp. pozitif tespit edilirken 12'sinde söz konusu etkene rastlanılmamıştır. İshalli dışkıların pozitif olma oranı %68,4, negatif olma oranı %31,6'dır. Dışkı kıvamı ile moleküler analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6. Dışkı kıvamı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Dışkının Kıvamı	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
İshal	26	12	38	68,40
Normal Kıvam	145	67	212	68,40
Toplam	171	79	250	68,40

4.4. *Cryptosporidium* spp.'nin İlçelere Göre Dağılımı

Çalışmamızda farklı ilçelerden toplanan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun yaygınlığı araştırılmış olup; moleküler analiz sonuçlarının örnek alınan ilçelere göre oranları aşağıdaki gibi elde edilmiştir (Tablo 7). Toplanan örneklerde *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun prevalansı ilçeler arasında farklılık gösterdiği görülmektedir. En yüksek prevalans oranı %90,90 ile Beyağaç ilçesinde tespit edilirken Çameli ilçesinden alınan 2 örneğinde negatif olduğu belirlenmiştir. Diğer ilçelerde ise prevalans oranları değişkenlik göstermektedir ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 7. PCR + Nested PCR verilerinin ilçelere göre oranlarının dağılımı.

Dışkı Örneğinin Alındığı İlçe	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Acıpayam	25	11	36	69,40

Tablo 7. PCR + Nested PCR verilerinin ilçelere göre oranlarının dağılımı (devam).

Dışkı Örneğinin Alındığı İlçe	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Baklan	10	6	16	62,50
Beyağaç	10	1	11	90,90
Bozkurt	6	5	11	54,50
Buldan	1	5	6	16,70
Çardak	4	1	5	80,00
Çameli	0	2	2	0,00
Çivril	2	3	5	40,00
Honaz	43	21	64	67,20
Pamukkale	26	16	42	61,90
Sarayköy	18	3	21	85,70
Tavas	26	5	31	83,90
Toplam	171	79	250	68,40

4.5. *Cryptosporidium* spp.'nin Sürü Boyutu ile İlişkisi

Sürü boyutu ile *Cryptosporidium* spp.'nin bulunması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$). En yüksek pozitif olma oranı %76,9 ile 51-100 baş arası olan sürüler iken, en düşük oran %54,5 ile 101-200 baş arası olan sürüler olarak tespit edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Sürü boyutu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Sürü Boyutu	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
1-20 baş arası	9	3	12	75,00

Tablo 8. Sürü boyutu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı (devam).

Sürü Boyutu	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
21-50 baş arası	16	12	28	57,10
51-100 baş arası	20	6	26	76,90
101-200 baş arası	12	10	22	54,50
201-500 baş arası	114	48	162	70,40
Toplam	171	79	250	68,40

4.6. *Cryptosporidium* spp.'nin Mevsim ile İlişkisi

Cryptosporidium spp.'nin mevsim ile ilişkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemekle birlikte ($p>0,05$), en fazla pozitiflik oranına sonbahar mevsiminde rastlanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Mevsim ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

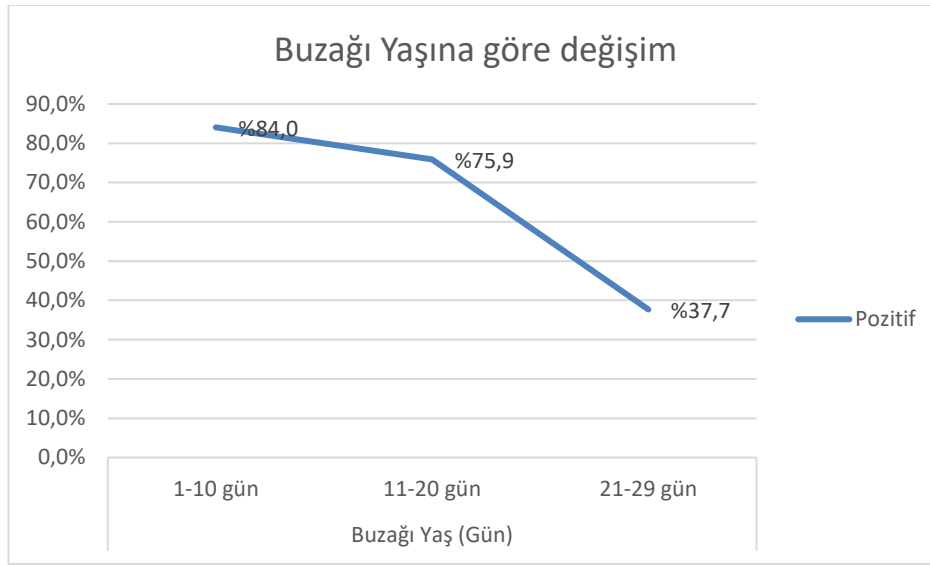
Dışkı Örneğinin Alındığı Ay	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Mart-Nisan-Mayıs	49	34	83	59,00
Haziran-Temmuz-Ağustos	86	34	120	71,70
Eylül-Ekim	36	11	47	76,60
Toplam	171	79	250	68,40

4.7. *Cryptosporidium* spp.'nin Yaş ile İlişkisi

Buzağı yaşı ile pozitif olma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buzağı yaşı (gün) arttıkça pozitiflik oranının azaldığı, en fazla pozitiflik oranına 1-10 günlük buzağılarda rastlanıldığı görülmüştür (Tablo 10) (Şekil 3).

Tablo 10. Yaş ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Buzağı Yaşı (Gün)	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
1-10	79	15	94	84,00
11-20	66	21	87	75,90
21-29	26	43	69	37,70
Toplam	171	79	250	68,40



Şekil 3. *Cryptosporidium* spp.'nin yaş ile ilişkisi.

4.8. *Cryptosporidium* spp.'nin Irk ile İlişkisi

İrklara göre pozitif olma oranı simental %66,1, holstein %69,7, danimarka kırmızısı %54,5 ve montbeliarde ırkı ise %100'dür. Irk ile moleküler analiz sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0,05$); ancak çalışmaya alınan montbeliarde ırkının tamamı pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Irk ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

İrk	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Simental	39	20	59	66,10
Holstem	124	54	178	69,70
Danimarka Kırmızısı	6	5	11	54,50
Montbeliarde	2	0	2	100
Toplam	171	79	250	100

4.9. *Cryptosporidium* spp.'nin Cinsiyet ile İlişkisi

Moleküler analiz sonucu *Cryptosporidium* spp. dişi buzağılarda %87,4 ile daha fazla oranda görülmüştür. *Cryptosporidium* spp. ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12. Cinsiyet ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Cinsiyet	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Dişi	118	17	135	87,40
Erkek	53	62	115	46,10
Toplam	171	79	250	68,40

4.10. *Cryptosporidium* spp.'nin Kolostrum Kullanımı ile İlişkisi

Kolostrum kullanım süresi, kolostrum alım zamanı, kolostrum miktarı ve alım yöntemi ile moleküler analiz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16). Her ne kadar aralarında ilişki tespit edilmemiş olsa da kova ile kolostrum alanların tamamı ve 2,5 lt + 2,5 lt günde 2 kez şeklinde kolostrum alanların tamamı pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4).

Tablo 13. Kolostrum alma süresi ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Kolostrum Kullanım Süresi/Gün	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
2 gün	73	37	110	66,40
3 gün	98	42	140	70,00
Toplam	171	79	250	68,40

Tablo 14. Kolostrum alım zamanı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Kolostrum Alım Zamanı	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Belirsiz	18	4	22	81,80
İlk 12 sa + 8' er sa arayla	86	41	127	67,70
İlk 12 sa + 12' şer saat arayla	61	29	90	67,80
Doğar doğmaz biberonla sınırsız genelde 5- 6 lt, 3 gün annenin yanında kendisi emiyor	6	5	11	54,50
Toplam	171	79	250	68,40

Tablo 15. Kolostrum miktarı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

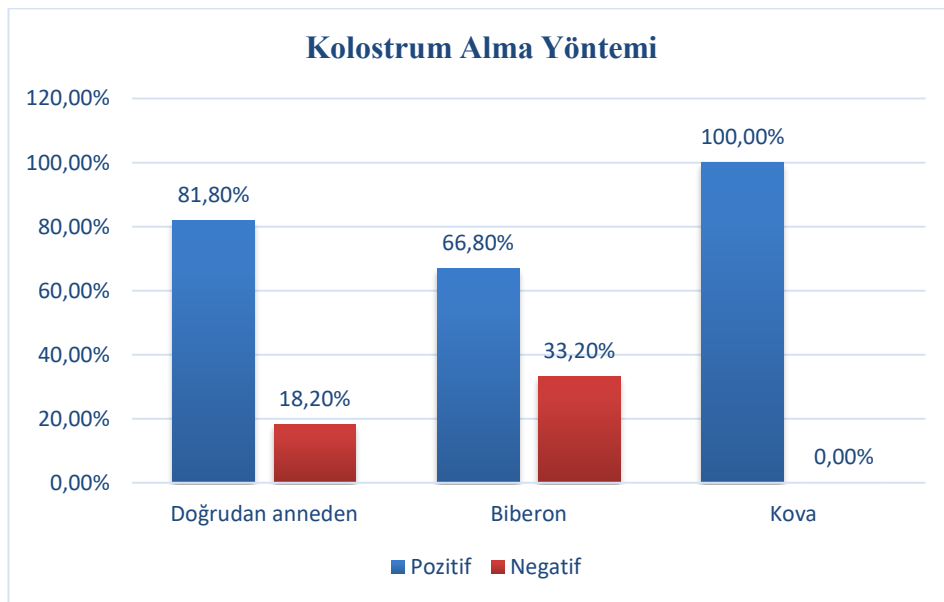
Kolostrum Miktarı	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Belirsiz	18	4	22	81,80
İlk (2-2,5 lt) + 1-1,5 lt	5	1	6	83,30
2,5 lt + 2,5 lt	2	0	2	100,00

Tablo 15. Kolostrum miktarı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı (devam).

Kolostrum Miktarı	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
İlk (4-4,5 kg) + 2-2,5 kg	8	5	13	61,50
İlk (4-4,5 kg) + 1-1,5 kg	132	64	196	67,30
İlk (İlk 5-6 lt) + Belirsiz	6	5	11	54,50
Toplam	171	79	250	68,40

Tablo 16. Kolostrum alma yöntemi ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Kolostrum Alma Yöntemi	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Doğrudan anneden	18	4	22	81,80
Biberon	151	75	226	66,80
Kova	2	0	2	100
Toplam	171	79	250	68,40



Şekil 4. Kolostrum alma yönteminin *Cryptosporidium* spp. ile ilişkisi.

4.11. *Cryptosporidium* spp.'nin Yem ile İlişkisi

Cryptosporidium spp.'nin pozitif olma durumu ile buzağılara verilen ilave yemlerin çeşidi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Tablo 17). Buzağı beslemesinde ilave yem olarak buzağı büyütme yemi ile birlikte yulaf ve buzağı büyütme yemi ile birlikte yonca ile beslenen buzağuların %100 pozitif olma oranı görülürken, %54,50 ile en düşük orana formik asitle kestirilmiş süt ile birlikte buzağı büyütme yemi ile beslenen buzağılarda görülmüştür.

Tablo 17. Yem ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Ek Gıda	Pozitif	Negatif	Toplam	%
	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı		
Buzağı Büyütme Yemi + Yulaf	2	0	2	100,00
Buzağı Büyütme Yemi + Yonca	3	0	3	100,00
Buzağı Büyütme Yemi	38	31	69	55,10
1,5 aya kadar buzağı bölmesinde formik asitle kestirilmiş süt+buzağı büyütme yemi	6	5	11	54,50
Buzağı büyütme yemi+ 7. günden sonra anne ile aynı yem	51	16	67	76,10
Buzağı büyütme yemi +Kaba Yem	45	11	56	80,40
Kesif Yem	26	16	42	61,90
Toplam	171	79	250	68,40

4.12. *Cryptosporidium* spp.'nin Sütten Kesim Zamanı ile İlişkisi

Sütten kesim zamanı ile *Cryptosporidium* spp.'nin pozitif olarak tespit edilmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemekle birlikte ($p>0,05$), anneleri ile birlikte

büyüyen ve belirli bir süttten kesim zamanı olmayan buzağuların tamamı pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Süttten Kesim Zamanı ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Süttten Kesme Zamanı/ Ay	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
1-1,5	21	14	35	60,00
1	148	65	213	69,50
Belirsiz	2	0	2	100,00
Toplam	171	79	250	68,40

4.13. *Cryptosporidium* spp.'nin Hiperimmün Serum (*E.coli*) Uygulaması ile İlişkisi

Doğar doğmaz septiserum (*E.coli*) uygulanan buzağuların pozitif olma oranı %46,2, negatif olanların oranı %53,8'dir. Söz konusu uygulama yapılmayan buzağuların pozitif olma oranı %71, negatif olma oranı ise %29'dur. Hiperimmün serum uygulaması ile *Cryptosporidium* spp. pozitif olma durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 19).

Tablo 19. Hiperimmün Serum (*E.coli*) Uygulaması ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Hiperimmün Serum (<i>E. coli</i>) Uygulaması	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Doğar doğmaz uygulama	12	14	26	46,20
Uygulama yok	159	65	224	71,00
Toplam	171	79	250	68,40

4.14. *Cryptosporidium* spp.'nin Uygulanan Tedavi/Takviye ile İlişkisi

Uygulanan tedavi/takviye ile moleküler analiz sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Tablo 20). Özisdur, amoksisilin, trimetoprim-sülfanmaid, tetrasiklin+ sıvı tedavisi, sıvı tedavisi +seftifour kullananların tamamı pozitif; enrofloksasin, sıvı tedavisi + multivitamin, sıvı tedavisi + multivit + tetrasiklin kullananların ise tamamı negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 20).

Tablo 20. Uygulanan Tedavi/Takviye ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Tedavi/Takviye	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Özisdur (İlk 3 gün)	2	0	2	100,00
Uygulama Yok	113	57	170	66,50
Amoksisilin	1	0	1	100,00
Enrofloksasin	0	2	2	0,00
1.Gün--Novostrum// 2.Gün--Zactran// 3-4-5-6-7-8.Gün-- Halofuginon laktat	6	5	11	54,50
Trimetoprim-sülfanmaid	1	0	1	100,00
Tetrasiklin+ Sıvı Tedavisi	1	0	1	100,00
Sıvı tedavisi+ multivit	0	1	1	0,00
Sıvı tedavisi+ multivit+ tetrasiklin	0	1	1	0,00
Sıvı Tedavisi +seftifour	2	0	2	100,00
Parofor likit	4	1	5	80,00
D Vit, Demir, Makrolit+Sülfamisin	6	4	10	60,00
İnjocam C	26	5	31	83,90
Yeldif	9	3	12	75,00
Toplam	171	79	250	68,40

4.15. *Cryptosporidium* spp.'nin Mortalite ile İlişkisi

Neonatal dönemde ölen 6 buzağının 4'ü *Cryptosporidium* spp. pozitif olarak belirlenmiştir. *Cryptosporidium* spp. pozitif olarak belirlenen 167 buzağının ise neonatal dönem boyunca hayatta kaldığı belirlenmiştir (Tablo 21). İstatiksel olarak *Cryptosporidium* spp. ile neonatal dönemde gözlemlenen ölüm arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 21. Mortalite ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Mortalite	Pozitif	Negatif	Toplam	%
	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı		
Neonatal dönemde ölen	4	2	6	66,70
Neonatal dönemde hayatta kalan	167	77	244	68,40
Toplam	171	79	250	68,40

4.16. *Cryptosporidium* spp.'nin Buzağı Sağlık Durumu ile İlişkisi

Genel durumu iyi ve herhangi bir klinik belirti göstermeyen buzağuların %68,4'ü, çeşitli klinik belirtiler gösteren buzağuların %80'i ve ishal görülen ancak genel durumu iyi olan buzağuların ise %64,3'ü *Cryptosporidium* spp pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 22). Ancak *Cryptosporidium* spp. ile buzağuların genel sağlık durumu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 22. Buzağı sağlık durumu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Buzağı Sağlık Durumu	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Sağlıklı/ Genel Durumu İyi	145	67	212	68,40
Hasta	8	2	10	80,00
İshal ancak; genel durumu iyi	18	10	28	64,30
Toplam	171	79	250	68,40

4.17. *Cryptosporidium* spp.'nin Temizlik/Sanitasyon ile İlişkisi

Çiftliklerde uygulanan ya da uygulanmayan temizlik/sanitasyon işlemleri ile moleküler analiz sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 23). En yüksek pozitif orana %75 ile dışkının mekanik olarak uzaklaştırılmasının ardından basınçlı su ile temizleme yapılan çiftliklerde rastlanırken, en düşük pozitif orana ise %61,90 ile 3 günde bir padoklardaki altlıkların temizlendiği çiftliklerde rastlanmıştır.

Tablo 23. Temizlik/Sanitasyon ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Temizlik- Sanitasyon	Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı	Toplam	%
Uygulama yok	111	49	160	69,40
Üç günde bir suyla temizlik, iki haftada bir virkones, Prophyl S	25	11	36	69,40
3 günde bir padoklarda altlık temizliği	26	16	42	61,90
Dışkının uzaklaştırılması, basınçlı su	9	3	12	75,00
Toplam	171	79	250	68,40

4.18. *Cryptosporidium* spp.'nin Barınaklar ile İlişkisi

Barınak tipi ve durumu ile moleküler analiz sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemese de ($p>0,05$), kapalı-ayrı buzağı bölümü olan-altlıkların durumu kötü, kapalı-ayrı buzağı bölümü yok-altlıkların durumu kötü, yarı açık-ayrı, bitişik ahşap padoklar-altlıklar kötü özellikteki barınaklardan alınan tüm örnekler pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 24).

Tablo 24. Barınak durumu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı.

Barınak Tipi	Pozitif	Negatif	Toplam	%
	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı		
Kapalı, ayrı buzağı bölümü var, altlıkların durumu kötü	2	0	2	100,00
Yarı açık, ayrı buzağı bölümü var, altlıkların durumu kötü	6	1	7	85,70
Kapalı, ayrı buzağı bölümü yok, altlıkların durumu kötü	2	0	2	100,00
Kapalı, ayrı buzağı bölümü yok, altlıklar temiz	4	1	5	80,00
Kapalı, buzağı bölümü bölme ile ayrılmış, altlıklar kötü	1	2	3	33,30
Kapalı, buzağular ayrı bölümde, birbirinden ayrı, yerden yüksek, altlıklar temiz	6	5	11	54,50
Kapalı, bölme yok, altlıklar temiz	1	1	2	50,00
Kapalı, bitişik düzen- ayrı bölmeler, altlıklar kötü	5	3	8	62,50
Yarı açık, buzağular ayrı bölümde yaş gruplarına göre ayrılmış, altlıklar kötü	2	1	3	66,70

Tablo 24. Barınak durumu ile PCR + Nested PCR verilerinin oranlarının dağılımı (devam).

Barınak Tipi	Pozitif	Negatif	Toplam	%
	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı		
Yarı açık, bölme yok, altlıklar ıslak	2	1	3	66,70
Kapalı, yan yana bölmelendirilmiş, altlıklar temiz	27	10	37	73,00
Yarı açık, bitişik, ayrı padoklar, altlıklar temiz	17	14	31	54,80
Buzağı kulübesi, bitişik, altlıklar temiz, otel, 3 günden sonra buzağı kulübelerine ayrılıyor.	25	11	36	69,40
Yarı açık, ayrı, bitişik, ahşap padoklar, altlıklar kötü	9	0	9	100,00
Kapalı, buzağılara ait tek bölme, altlıklar temiz	0	2	2	0,00
Yarı açık, yan yana beton duvarlarla ayrılmış padoklar, altlıklar kötü durumda	26	16	42	61,90
Yarı açık, buzağılar yaş gruplarına göre demir bölmelerle ayrılmış	27	8	35	77,10
Açık, bitişik düzen, ayrı padoklar, altlıklar saman+ mısır ıslak ve kötü durumda	9	3	12	75,00
Toplam	171	79	250	68,40

5. TARTIŞMA

Hayvanların özellikle neonatal döneminde görülen hastalık ve ölümlerin en önemli nedeni, agresif ve inatçı seyreden ishallerdir (Sevinç ve Dik, 2010). İshal, genellikle gastrointestinal sistemin, özellikle de incebağırsak ve kalınbağırsak bölümlerinin çeşitli nedenlerle etkilenmesi sonucunda oluşan, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan bir hastalık belirtisidir (Şimşir, 2006; Perez-Cordon ve diğerleri, 2016). Neonatal dönemde ishalden kaynaklanan bu hastalık tablosu “Neonatal Diyare Sendromu” olarak da adlandırılır. Bu sendromun etiolojisinde enteropatojenik viruslar (Rotavirus, Coronavirus), bakteriler (enterotoksijenik *Escherichia coli* K99 ve *Salmonella* spp.) ve parazitler (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Neoascaris vitulorum* ve *Toxocara vitulorum* vb.) yer alır (Kumar ve diğerleri, 2010). Bunun yanında çevresel koşullar, çiftliklerde yönetim uygulamaları, fizyolojik-immünolojik koşullar, uygun olmayan diyet veya beslenme uygulamaları veya düşük kaliteli süt yemleri gibi beslenme faktörleri de ishale sebep olan faktörler olarak sıralanmaktadır (Arslan, 2012). Neonatal Diyare Sendromu'nun en önemli etiolojik ajanı olarak kabul edilen *Cryptosporidium*; tüm omurgalı sınıflarının gastrointestinal sistemine yerleşerek sindirim sistemi bozukluklarına ve ekonomik kayıplara neden olan, medikal ve veterinerlik alanında dünya çapında öneme sahip zoonotik bir protozoon parazittir (Fayer, 2008). İnsanın da içinde bulunduğu bu geniş yelpazede etkili olan coccidian protozoon (Çiçek ve Yılmaz, 2011), zorunlu hücre içi parazittir (Hazer, 2007). Sığırlarda *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* türleri bulunmaktadır. Bunlardan *C. parvum* konak spektrumu en geniş olan tür olup, buzağılarda en yaygın olan ve ishallerde en çok belirlenen patojen etken olarak kabul edilmektedir (Fayer, 2010; Nichols, 2008; Thompson ve diğerleri, 2005). *Cryptosporidium parvum* neonatal ruminantlarda ileum ve kalın bağırsağın proksimal kısmına yerleşerek intestinal cryptosporidiosis ve neonatal diyareye neden olmaktadır (Arslan, 2012).

Cryptosporidium spp. enfeksiyonuna ait bulguların diğer gastrointestinal enfeksiyonların bulgularından farklı olmaması, ishallerde tüm dışkıların *Cryptosporidium* spp. yönünden rutin olarak test edilmemesi ve pek çok ishal vakasında, etkeni yakalama adına gelişmiş bir tanı yönteminin kullanılmaması gibi etkenler, bu patojene ait vakaların belirlenememesiyle sonuçlanmaktadır (Khalil ve diğerleri, 2016; Şimşir, 2006).

Cryptosporidiosisin teşhisinde en kolay tekniğin taze dışkıdan preparat hazırlanıp boyanmasıyla dışkı tarama olduğu bildirilmiştir (Dağ, 2010). Tanı da çeşitli dışkı boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Ookistlerin bolca lipid ihtiva etmesi *Cryptosporidium*'un aside dirençli boyalarla boyanmasını mümkün kılmıştır. En iyi yöntemlerden birinin Modifiye Asit-Fast boyama yöntemi olduğu bildirilmiştir. Pembe/kırmızı boyanan ookistlerin mavi zeminde kolayca ayırt edilebilmesi, ookist içyapısının ayrıntılı bir şekilde görülebilmesi ve kalıcı bir boyama yöntemi olması nedeniyle *Cryptosporidium* ookistlerinin teşhisinde kullanılması uygun görülmektedir. Bununla birlikte, yetişmiş insan gücüne duyulan gereksinim, protozoonun ookistlerinin bağırsaktan aralıklı olarak atılımı nedeniyle tek numuneyle tanı koymanın zorluğu ve mikroskopik incelemenin zaman geçirilmeden yapılmasının zorunlu olması gibi dezavantajlarından dolayı direkt tanıya yardımcı olabilecek daha güvenilir yöntemlere önem verilmiştir. Hastalığın tanı ve teşhisi, hasta canlıdan alınan serum analizi ve spesifik antikor tayini gibi yöntemlerle de yapılabilmektedir. Hastalığın teşhisinde IFAT (indirekt immünfloresan antikor testi), ELISA ve Western Blot, İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) gibi serolojik (Köreng, 2011) veya PCR gibi moleküler tanı teknikleri kullanılabilir (Doğruman-Al, 2011; Yılmaz, 2015).

Mikroskopik veya immünolojik yöntemlere kıyasla SSU rRNA genini hedefleyen bir PCR analizi, *Cryptosporidium* ookistlerinin saptanması için daha duyarlı ve spesifik olarak kabul edilmektedir (Ezzaty Mirhashemi ve diğerleri, 2015). Boyama yöntemi %100 özgüllük ortaya koyar; ancak PCR'a göre daha az duyarlılığa sahiptir (Bin Kabir ve diğerleri, 2020). Modifiye Ziehl - Neelsen boyama yöntemi ile mikroskopik incelemede prevalans %9,4 tespit edilirken, PCR yöntemi ile prevalans %15,8 olarak saptanmıştır (Wegayehu ve diğerleri, 2016). Çalışmamızda mikroskopik incelemede pozitif olarak tespit edilen her bir örnek, moleküler analiz sonucu da pozitif olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra 74 örnekte yalnızca moleküler olarak *Cryptosporidium* spp. tespit edilebilmiştir. Bu sonuçlar çerçevesinde PCR ve Nested PCR yönteminin duyarlılığının boyama yöntemine göre daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Ülkemizde veteriner alanda *Cryptosporidium* enfeksiyonları ile ilgili yapılan az sayıdaki çalışma ookistlerin mikroskopik incelenmesine ve ELISA yöntemiyle koproantijenlerin saptanmasına dayanmaktadır (Bin Kabir ve diğerleri, 2020). Az sayıdaki moleküler çalışmalardan birinde, Kütahya'daki 1 gün ila 4 ay arasındaki buzağılarda *Cryptosporidium* spp. prevalansı %40 bildirilirken (Akalin, 2018), bir başka çalışmada Real Time PCR yöntemi ile Nevşehir'deki 0-1 aylık ishallerde buzağılarda prevalans %19,3 olarak bildirilmektedir

(Şimşek ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızda ise Kinyoun'un Asit-Fast boyama bulguları sonucu neonatal buzağılardaki prevalans %38,8, PCR ve Nested PCR analizleri sonucu %68,4 olarak belirlenmiştir. İshalli ve ishali olmayan neonatal buzağılarda Hindistan'ın Pencap bölgesinde yapılan bir çalışmada ise prevalans %26,15 olarak tespit edilmiştir (Joute ve diğerleri, 2014).

Genel olarak, ishali dışkı örneklerinde tanımlanan en yaygın enteropatojen *Cryptosporidium* spp.'dir (Geurden ve diğerleri, 2007; Langkjaer ve diğerleri, 2007; Xiao ve diğerleri, 2007). Özellikle de *C. parvum* 1 aylıktan küçük hem ishal olan buzağılarda hem de ishal görülmeyen buzağılarda baskın tür olarak bildirilmiş (Broglia ve diğerleri, 2008; Brook ve diğerleri, 2009; Feng ve diğerleri, 2007; Kvac ve diğerleri, 2006; Plutzer ve Karanis, 2007; Thompson ve diğerleri, 2007) ve enfeksiyon, yenidoğan buzağılarda sulu ishalin varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2021). Özellikle yaşamlarının ilk haftasında görülen ve yenidoğan ishali olarak bilinen semptomun en önemli etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (De graaf ve diğerleri, 1999; Radostits ve diğerleri, 2007). *Cryptosporidium*, 2 haftadan küçük buzağılarda ishal ile önemli ölçüde ilişkilendirilirken (Diaz ve diğerleri, 2018; Duranti ve diğerleri, 2009; Garro ve diğerleri, 2016; Kvac ve diğerleri, 2006), *C. parvum* ≤ 20 günlük buzağılarda ishal ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Delafosse ve diğerleri, 2015; Garro ve diğerleri, 2016; Jang ve diğerleri, 2021; Trotz-Williams ve diğerleri, 2005b). Daha önceki çalışmalarda *Cryptosporidium* spp.'ye ishal gözlemlenen buzağılarda normal dışkı gözlemlenen buzağılara göre daha yüksek oranda rastlandığı bildirilmektedir (Constable ve diğerleri, 2017; Delafosse ve diğerleri, 2015; Ranjbar ve Fattahi, 2017; Zhang ve diğerleri, 2022). Hatta bazı çalışmalarda bu oran üç kat fazla olarak tespit edilmiştir (Ayele ve diğerleri, 2018; Hailu ve diğerleri, 2020). Lichtmannsperger ve diğerleri (2020) de diğer çalışmalarla benzer doğrultuda, ishal gözlemlenen hayvanlarda normal dışkı hayvanlara kıyasla önemli ölçüde daha fazla *C. parvum* tespit etmişlerdir. Bu durum *Cryptosporidium* ookist dökülmesi ile buzağı ishali arasında güçlü bir ilişki olduğunu düşündürmekte (Causape ve diğerleri, 2002; El Khodery ve Osman, 2008; Lise ve diğerleri, 2007; Onrat ve diğerleri, 2009; Tong ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2015) ve ishal, *Cryptosporidium* enfeksiyonunun bir bulgusu olarak kabul edilmektedir (Hailu ve diğerleri, 2020).

Bunun yanı sıra diyare ile enfeksiyonun ilişkilendirilemediği çalışmalar da bulunmaktadır (Abebe ve diğerleri, 2008; Manyazewal ve diğerleri, 2018). *C. parvum* sağlıklı ya da ishal sorunu olmayan buzağılarda da yaygın olarak tanımlanmaktadır (Bendali ve diğerleri, 1999; Jager ve diğerleri, 2005). Ranjbar ve Fattahi (2017) de çalışmalarında

Cryptosporidium spp. enfeksiyonunu hem sağlıklı hem de ishallerde buzağılarda gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Kvac ve diğerleri (2011), ishallerde buzağılarda %65'inin *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olmadığını ve *Cryptosporidium* spp. ile enfekte buzağılarda sadece %52'sinde ishallerin görüldüğünü göstermiştir. Benzer şekilde ishallerde sığırlarda *Cryptosporidium* spp.'nin daha yüksek prevalansı gösterilmiş olmasına rağmen, *Cryptosporidium* ishallerde olmayan sığırlarda da tanımlanmıştır (Azami, 2007). Çalışmamızda neonatal dönemdeki ishallerde buzağılarda *Cryptosporidium* ile enfekte olma oranı %68,4 iken ishallerde olmayan buzağılarda *Cryptosporidium* ile enfekte olma oranı yine %68,4 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla ishallerde semptomu görülen ya da ishallerde semptomu görülmeyen buzağılarda eşit oranda enfeksiyon riski taşıdığı görülmektedir. Bu sonuçlar, *Cryptosporidium* spp.'nin ishallerde semptomuna neden olabilen önemli bir etken olabileceğini; öte yandan dışkı kıvamının bu etkenle ilişkili olmadığını, ishallerde semptomunun görülmesinin etkenin varlığına yönelik bir belirteç olarak kullanılamayacağını göstermektedir. Ancak; neonatal diyarelere, *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının yanı sıra rotavirüs, koronavirüs, *E. coli*, *Salmonella* ve *Eimeria* gibi diğer enteropatojenlerin de neden olabileceği göz ardı edilmemelidir (O'Handley, 2007). *Cryptosporidiosis* ile enfekte buzağılar ishallerde durduktan 1 hafta sonrasına kadar ookist dökülebileceği için bu süreçte de sağlıklı hayvanlardan ayrı olarak barındırılmalıdır (Innes ve diğerleri, 2020). Hasta buzağılar diğer buzağılardan ayrılmalı hatta ayrı bir binada barındırılmalıdır; yan yana olan barınaklar hastalığı yaymanın garantili bir yoludur (O'Donoghue, 1995).

Farklı ilçelerden toplanan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunun prevalansı ilçeler arasında farklılık göstermiştir. Bu bulgular, ilgili bölgelerde enfeksiyonun yaygınlığını ve riskli bölgeleri belirlemede, kontrol önlemlerinin alınmasında faydalı olabilir. Ancak; ilçeler arasında sıcaklık, rakım, nem, örneklem büyüklüklerinin farklı olması gibi farklı risk faktörlerinin olduğu da unutulmamalıdır. Dolayısıyla bu sonuçlar, enfeksiyonun yayılımı ve kontrol edilmesi gereken riskli bölgeleri belirlemek için yalnızca bir başlangıç noktası oluşturabileceği, farklı kontrol önlemlerinin uygulanması gerektiğini ve epidemiyolojik çalışmaların detaylandırılması gerektiğini göstermektedir.

Bir diğer risk faktörü olarak sürü büyüklüğü değerlendirilmektedir (Garber ve diğerleri, 1994). Yapılan bir çalışmada küçük ölçekli çiftliklerdeki buzağılarda, büyük ölçekli çiftliklerdeki buzağılara göre 5,3 kat daha fazla *Cryptosporidium* ookisti yayma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Hailu ve diğerleri, 2020). Benzer şekilde çalışmamızdaki en küçük sürü boyutu (1-20 baş arası)'nda oldukça yüksek bir oranda (%75) enfeksiyon tespit edilmiştir.

Silverlas ve diğeri (2009), Szonyi ve diğeri (2012), Urie ve diğeri (2018) tarafından yapılan çalışmalarda ise, daha büyük sürü boyutundaki buzağların *C. parvum* ookisti dökme riskinin yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda da 101-200 baş arası ile 201-500 baş arası büyük sürü boyutlarında sırasıyla %54,50 ile %70,40 gibi yüksek enfeksiyon oranlarıyla karşı karşıya kalınmıştır. Kuvvetle muhtemel buzağların diğer buzağlar ile temasının artması enfeksiyon riskini artırmaktadır (Brainard ve diğeri, 2020b). Daha büyük buzağı sürülerinin yüksek *C. parvum* enfeksiyonu ile ilişkili olabileceği veriler bildirilirken (Brainard ve diğeri, 2020b), büyük sürüler ile risk artışı arasında bir etki bulunamayan çalışmalar da mevcuttur (Trotz-Williams ve diğeri, 2008). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da sürü büyüklüğü ile enfeksiyon arasında net bir ilişki tespit edilememiştir. Küçük sürülerdeki hayvanların daha az stres altında olması, buldukları işletmede aynı anda az sayıda buzağı bulunması sonucu enfeksiyon riskinin daha az olması beklenirken, çalışmamızda en yüksek ikinci enfeksiyon oranına sahip olduğu görülmektedir. Bunun yanısıra çalışmamızdaki en yüksek enfeksiyon oranı %76,90 ile orta ölçekli (51-100 baş arası) sürülerde tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmaların da birbiriyle çeliştiği göz önüne alınarak, sürü boyutunun *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile ilişkili olabileceğini; ancak tek başına bir risk faktörü olarak ele alınamayacağı kanaatine varılmaktadır. Bu nedenle, sürü boyutunun enfeksiyon riski üzerine etkisi, çiftlik koşulları, yönetim uygulamaları, hayvanların beslenme ve su kaynakları, yaş ve benzeri gibi diğer faktörlerle birlikte değerlendirilmelidir.

Enfeksiyonun görülme sıklığını etkileyen risk faktörlerinden biri de mevsimdir (Garber ve diğeri, 1994). Kuzey Amerika'da kış aylarında daha yüksek buzağı ishali vakaları bildirilmektedir (Waltner-Toews ve diğeri, 1986b; Curtis ve diğeri, 1988; Frank ve Kaneene, 1993). Ranjbar ve Fattahi (2017), mevsimsel olarak en yüksek prevalansın kış aylarında (%21), ardından sonbahar (%18), ilkbahar (%14) ve en düşük yaz aylarında (%11) gözlemlendiğini bildirmiştir. Molloy ve diğeri (2009) de benzer şekilde buzağı ve sığırlarda *Cryptosporidiosis* prevalansının kış aylarında daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Buzağılarda Kanada'da yapılan bir çalışmada, kış ve ilkbahar aylarında en yüksek prevalansa rastlandığı belirtilmiştir; ancak bu çalışmada hastalığın görüldüğü mevsim ile buzağılama döneminin en fazla olduğu dönemin örtüştüğü anlaşılmaktadır (Mann ve diğeri, 1986). Szonyi ve diğeri (2010) de benzer şekilde *C. parvum*'un ilkbahar ve kış aylarında baskın olduğunu göstermiştir. Mart ve Ekim ayları arasında yapılan saha çalışmalarında yeterli sayıda örneğe ulaşıldığı için çalışmamız sonucunda kış mevsimine ait bir veri elde edilememiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nin New York eyaletinde süt sığırlarının *Cryptosporidium* tarafından kışın yaz mevsimine göre enfekte olma olasılığı daha yüksek olarak bulunmuştur (Mohammed ve diğerleri, 1999). Bununla birlikte, çevresel kontaminasyon seviyesinin dalgalanmalara daha az maruz kaldığı yıl boyunca buzağılama olan Amerikan süt çiftliklerinde enfeksiyon yaz aylarında daha yaygındı (Garber ve diğerleri, 1994). Benzer oranlar Çin'de de rapor edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2011). *Cryptosporidium*'un yaz aylarında kış aylarına göre daha yüksek oranda görülmesi, yaz aylarındaki yüksek sıcaklıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Lee ve diğerleri, 2016). Trotz-Williams ve diğerleri (2007), Urie ve diğerleri (2018) daha sıcak ve daha nemli aylarda doğan buzağuların *C. parvum* enfeksiyonu açısından daha yüksek risk altında olduğunu bildirmektedir. Çalışmamızın gerçekleştiği bölgede en düşük sıcaklığın ortalama 21°C, en yüksek sıcaklığın ise ortalama 36°C olarak kaydedildiği yaz mevsiminde %71,70 gibi oldukça yüksek bir oranda enfeksiyon görülmesi çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Bazı çalışmalar vaka artışlarını mevsimden ziyade yağışın fazla olması ile ilişkilendirmiştir. Brezilya ve Endonezya'da yağışın fazla görüldüğü sonbahar ve kış mevsimlerinde vaka artışları yaşanırken, Kuveyt'te Kasım ve Nisan ayları arasında yüksek prevalans bulunmuştur (Chandler ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde çalışmamızda da en yüksek enfeksiyon oranına sonbahar mevsiminde (%76,60) rastlanmıştır; ancak çalışmanın gerçekleştirildiği bölgede örneklerin alındığı Eylül ve Ekim ayları sıcaklık ortalamaları yüksek, yağışlı gün sayısı düşük olarak gözlemlenmiştir. En fazla yağış ise ilkbahar aylarında görülmüştür. Dolayısıyla mevsimler yerine yağışın enfeksiyon oranları üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olabileceği öne sürülemez. Önceki çalışmaların yapıldığı ülkelerdeki mevsimsel veriler arasında sıcaklık, yağış, nem gibi farklılıklar bulunduğu anlaşılmaktadır. Ancak; bölgemizde ilkbahar mevsiminin yağışlı ve daha düşük sıcaklıkta geçmesi dışında herhangi keskin bir ayırım gözlemlenmemiştir.

Başka bir çalışmada en yüksek prevalansa yazın (%56,8), ardından ilkbahar (%50,0), kış (%46,8) ve sonbaharda (%41,7) rastlanmıştır. Sonuç olarak yeni doğan buzağılarda yıl boyunca yaygın olarak *Cryptosporidium* görülmüş ve enfeksiyon prevalansı üzerine mevsimin etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2022). Thompson ve diğerleri (2009), Zhang ve diğerleri (2009) de mevsimin prevalans üzerine belirli bir etkisinin olmadığını açıklamıştır. Benzer şekilde bu çalışmada da mevsim ile açıkça bir ilişki kurulamamıştır. En yüksek prevalansa sırasıyla sonbahar (%76,6), yaz (%71,7) ve ilkbahar (%59) aylarında olmak üzere oldukça yaygın olarak rastlanmıştır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi yapılan pek çok çalışmada da ırk faktörü, *Cryptosporidium* enfeksiyon oranı üzerinde bir risk olarak etki göstermemiştir (Al Mawly ve diğerleri 2015; Ayele ve diğerleri, 2018; Brook ve diğerleri, 2008; Maddox-Hyttel ve diğerleri, 2006; Szonyi ve diğerleri, 2012; Urie ve diğerleri, 2018). Ancak, saf ırkların melez ırklardan daha yüksek risk altında olduğunu (Imre ve diğerleri, 2015), Holstein ırkı buzağuların *C. parvum* ile enfekte olma olasılığının daha yüksek olduğunu belirleyen çalışmalar da mevcuttur (Starkey ve diğerleri, 2007). Bu çalışmadan elde edilen oranlar şöyledir; montbeliarde %100, holstein %69,7, simental %66,1 ve danimarka kırmızısı %54,5'tür. Her ne kadar montbeliarde ırkına sahip olan buzağuların enfeksiyon oranı %100 gibi gözükse de çalışmaya dahil olan buzağuların sadece 2'si bu ırktandı. Diğer ırkların ise benzer oranlarda enfeksiyon riski taşıdığı görülmektedir.

Daha önceki çalışmalarda *Cryptosporidium* spp. atılımı ile cinsiyet arasında bir ilişki bulunmamakta ve bu sonuç farklı çalışmalarla doğrulanmaktadır (Ayele ve diğerleri, 2018; Garro ve diğerleri, 2016; Ranjbar ve diğerleri, 2017; Salmasi ve diğerleri, 2010). Bunun aksine Deak ve diğerleri (2008), Gu ve diğerleri (2007), Ibrahimet diğerleri (2016) ile Lee ve diğerleri (2016), erkek buzağularda dişi buzağulara göre daha yüksek *Cryptosporidium* prevalansı bildirmişlerdir. Elimizdeki verilere göre, daha önce yapılan çalışmalar, *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonu ile cinsiyet faktörü arasında tutarlı bir ilişki olmadığına dair farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Bazı çalışmalar, erkek buzağularda dişi buzağulara göre daha yüksek enfeksiyon gözlemlendiğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise *Cryptosporidium* spp. ile cinsiyet arasında bir ilişki tespit edilmekle birlikte %87,4 oranda dişilerde daha fazla olarak belirlenmiştir. Bu sonuç önceki çalışmalarla tutarlılık göstermemektedir. Bu farklılık, örneklem sayısı, buzağı popülasyonunun özellikleri, çalışmada kullanılan yöntemler ve enfeksiyonun yaygınlığı gibi pek çok nedene bağlı olabileceğinden konu ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Buzağularda en büyük ölüm riski, yaşamlarının ilk 21 gününde yaşanmaktadır (Waltner-Toews ve diğerleri, 1986b; USDA, 1994; Wells ve diğerleri, 1996, 1997). Sütten kesilmemiş buzağuların en yaygın protozoanı *Cryptosporidium* olarak kabul edilmektedir (Wang ve diğerleri, 2017). Özellikle 1 aylıktan küçük olanların, yaygın olarak enfekte olduğu (de Graaf ve diğerleri, 1999), %40,9 prevalans ile en yaygın enteropatojen olarak *Cryptosporidium* spp. gösterilmiştir (Abuelo ve diğerleri, 2019).

Neonatal dönemdeki mortalite oranının %1,5 ile %8 arasında değiştiği bildirilmektedir (Franck ve Kaneene 1993, Quigley ve diğerleri,1995, Schumann ve diğerleri, 1990, Sivula ve

diğerleri, 1996, Waltner-Toews ve diğerleri, 1986b, Wells ve diğerleri, 1996). Farklı ülkelerde bildirilen buzağı ölüm oranları şu şekildedir: Çin, 3-60. gün %5,5 (Zhang ve diğerleri, 2019), İsveç, 0-90 gün %2,6 (Olsson ve diğerleri, 1993), Hollanda 0-14 gün %3,3 (Santman-Berends ve diğerleri 2019), Amerika Birleşik Devletleri %7,8 (NAHMS, 2014) ve İsviçre 1-21 gün %10 (Bahler ve diğerleri, 2012). Birkaç ülkede buzağılarda sütten kesim öncesi morbidite %35 ve mortalite riskleri %7 olarak rapor edilmiştir (Abuelo ve diğerleri, 2019). Bazı ülkelerde ise morbitide %35, mortalite ise %2,1 ila 14 olarak bildirilmiştir (Mee, 2013; NAHMS, 2014; Windeyer ve diğerleri, 2014). ABD Ulusal Hayvan Sağlığı İzleme Sistemine göre, buzağı ölümlerinin %57'sinin nedeni ishaldir (ABD Tarım Bakanlığı, 2008). Tek patojen olarak *C. parvum* belirlenen buzağılarda, uzun süreli ve inatçı diyare ile birlikte yüksek ölüm oranı bildirilmiştir (Naciri ve diğerleri, 1999). Bizim çalışmamıza katılan buzağuların 6'sında neonatal dönemde ölüm gerçekleşmiştir ve bunlardan 4'ünün *Cryptosporidium* spp. ile enfekte olduğu ve şiddetli ishal görüldüğü tespit edilmiştir. Söz konusu buzağılarda sıvı kaybına bağlı olarak dehidrasyon şekillenmiş, vücuttaki ani elektrolit dengesizlik sonucu hayati organların düzgün çalışması engellenmiş ve ölüm gözlemlenmiştir.

Trotz-Williams ve diğerleri (2007) bir çalışmada *C. parvum* ookistlerinin dökülmesine karşı *E. coli* aşısının koruyucu olduğunu bildirirken; bir başka çalışmada *E. coli* aşısının hastalık riskini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (TrotzWilliams ve diğerleri, 2008). Bir başka araştırmada ise *E. coli* aşısının buzağı cryptosporidiosisi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Diaz ve diğerleri, 2018). *E. coli* aşısının enfeksiyona karşı koruyucu olup olmadığı ya da risk ile ilişkisine dair kanıtlar oldukça karışıktır (Brainard ve diğerleri, 2020b). Çalışmamızda ise doğar doğmaz *E. coli* hiperimmün serum uygulaması yapılan buzağuların daha az oranda enfeksiyona yakalandığı (%46,2) belirlenmiştir. Hiperimmün serum kullanımı direkt olarak *Cryptosporidium* enfeksiyonu ile ilişkili olmasa da *E. coli* riskinin azaltılması ya da yok edilmesiyle *Cryptosporidium* enfeksiyon riskini de azaltabilmesi olasıdır. Bir başka yönden bağışıklığın güçlü olması, bağırsak epitellerinde hasara yol açan bir başka enfeksiyonun görülmemesi ile ilişkilendirilebilir.

Tüm buzağılara proflaktik olarak vitamin takviyesi yapılması önerilmektedir (Reimus ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, sıvı diyetle E vitamini, selenyum, antibiyotikler, katkı maddeleri ve antimikrobialerin verilmesinin hastalık riskini etkilemediği görüşünde bulunmaktadır (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008; Urie ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda sıvı tedavisi, multivitamin, tetrasiklin ve setifour kullanılan buzağuların ookist yönünden negatif olduğu görülmektedir. Ayrıca vitamin C kullanılan buzağılarda %83,9 oranında, vitamin D ve

demir takviyesi yapılan buzağılarda %60, doğar doğmaz yeldif uygulananlarda ise %75 oranında pozitiflik tespit edilmiştir. Söz konusu takviyeler ile enfeksiyon ilişkisini ortaya koymak için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği görülmektedir.

Cryptosporidiosisli buzağılarda paromomisin'in etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Harp ve Goff, 1998). Profilaktik olarak yapılan uygulamalarda ookist dökülmesini engellediği ve ishalleri gün sayısını azalttığı bildirilmektedir (Fayer ve Ellis, 1993). "Parofor crypto" ardışık 7 gün boyunca 10 kg CA'na 2,5 ml, yalnızca *Cryptosporidium* tanısı doğrulanmış hayvanlara ve diyare başlamadan önce uygulanmalıdır (Hyperdrug, 2022). Ancak bizim çalışmamızda parofor kullanıldığı bildirilen 5 buzağının 4'ünde *Cryptosporidium* tanısı doğrulanmıştır. Ancak söz konusu çiftlikte uygulamaya sadece 3 gün devam edildiği, ishal semptomu kesildiğinde uygulamanın sonlandırıldığı beyan edilmiştir. Dolayısıyla etkinlik gösterip göstermediği ile ilgili bir değerlendirme yapılamamıştır.

Halofuginon laktat sentetik olarak üretilen bir bitki alkaloididir (Pines ve Nagler, 1998). Halofuginone laktat, *C. parvum*'un merozoit ve sporozoit evrelerinde etki göstererek cryptosporidiosis'in şiddetini azaltır, enfeksiyonun başlamasını geciktirir ve ookist dökülmesini azaltır ve buzağılar için terapötik ve koruyucu bir ajan olarak önerilmektedir (Jarvie ve diğerleri, 2005; Klein, 2008). Böylelikle mortaliteyi de azalttığı bildirilmiştir (Joachim ve diğerleri, 2003; Naciri ve diğerleri, 1993). Halofuginon laktat klinik belirtileri ve çevresel kontaminasyonu azaltmada etkili olmuştur (De Waele ve diğerleri, 2010). Halofuginon laktat ile tedavide buzağuların ookist saçılımında ve diyarede önemli bir azalma olduğunu bildiren pek çok çalışma mevcuttur (de Waele ve diğerleri, 2010; Joachim ve diğerleri, 2003; Keidel ve Dauschies, 2013; Klein, 2008; Lefay ve diğerleri, 2001; Trotz-Williams ve diğerleri, 2011). Aydogdu ve diğerleri (2018) cryptosporidiosisli buzağulara 7 gün boyunca 100 µg/kg/gün halofuginon laktat uyguladıkları bir çalışmada 1. günden itibaren ookist atılımında azalma gözlemlense de, istatistiksel olarak anlamlı bir azalmayı 3. günden itibaren belirlemiştir. Halofuginon veya dekokinat ile yapılan tedavilerin, diyare veya dehidrasyon seviyeleri üzerinde hiçbir etkisinin bulunmadığı; ancak halofuginonun, ookistlerin atılımını önemli ölçüde azalttığı ve dekokinatın, buzağuların ortalama günlük kilo alımını artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Lallemand ve diğerleri, 2006). Başka bir çalışmada, buzağulara ilk 7 gün boyunca halofuginon laktat verilmesi sonucu, ookist atılımının 2 hafta inhibe edildiği; ancak diyare insidansının sadece 3,1 gün ötelenildiği ve kilo alımında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (Jarvie ve diğerleri, 2005). Yine de 7-13 günlük buzağular arasında cryptosporidiosis riskini azaltmak için en etkili yöntemin, temiz ve

bireysel buzağı barınaklarında, iyi hijyen önlemleriyle birlikte halofuginon laktat kullanımının olduğunu bildirilmektedir (Cruvine ve diğerleri, 2020).

Bir başka araştırmacı tarafından hem terapötik hem de profilaktik olarak halofuginon laktat ve paromomisinin birlikte kullanımı önemli derecede tavsiye edilmektedir (Aydoğdu ve diğerleri, 2018). Aydogdu ve diğerleri (2018) alışmalarında cryptosporidiosisli buzağıların tedavisinde halofuginon laktat (7 gün 100 µg/kg/gün) ve paromomisinin (7 gün 100 mg/kg/gün) birlikte kullanımının etkili olduğunu göstermiştir.

Halofuginon tedavisinin önemli bir proflaktik etkisi de tespit edilmiştir (Díaz ve diğerleri, 2018). Bu sonuçlar, halofuginonun *Cryptosporidium* enfeksiyonlarının profilaksisi için de etkili bir ilaç olduğunu ve hem ookist dökülmesinde hem de diyarede azalmaya neden olduğunu belirten diğer araştırmalarla benzerdir (Delafosse ve diğerleri, 2015; Trotz-Williams ve diğerleri, 2011). Sürü düzeyindeki rutin uygulamalarda, rutin uygulama gerçekleştirmeyen çiftliklerin daha yüksek buzağı ölüm oranlarına sahip olduğu görülmüştür (Falkenberg ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda ise yenidoğan tüm buzağılara rutin olarak 3-4-5-6-7 ve 8. gün halofuginon laktat uygulaması yapılan bir çiftlikteki pozitiflik oranı %54,5 olarak belirlenmiştir. Bu durum halofuginon laktat kullanımının kesin çözüm olmadığını, iyi hayvancılık prosedürleri ile birlikte ve doğru süre ve dozda kullanılması gerektiğini düşündürmektedir.

Kolostrumdaki nötralize edici antikorların, parazitlerin hareketini engelleyerek, istilalarını bloke ederek ve konakçı hücrelere yapışmayı engelleyerek veya *Cryptosporidium* sporozoitlerine karşı doğrudan sitotoksik etki göstererek *Cryptosporidium*'un enfektivitesini azalttığına inanılmaktadır (House ve diğerleri, 2015; Jenkins, 2001). Genel tavsiye, buzağının doğumdan sonraki 2 saat içinde annesinden ayrılması ve ilk beslemede vücut ağırlığının en az %10'unu (40 kg'lık bir buzağı için yaklaşık 4 L) kaliteli kolostrum (IgG>50 g/L) ile doğumdan sonraki 4 saat içinde beslenmesidir (Godden, 2008; McGuirk ve Collins, 2004).

Matoock ve diğerleri (2005), bazı kolostrumların koruyucu olduğunu bildirmiştir. Yüksek titreli spesifik antikora sahip annelerden alınan kolostrumla beslenen buzağılar, enfeksiyona karşı kısmen korunmaktadır (Fayer ve diğerleri, 1989a). Perryman ve diğerleri (1999), metafilaktik kolostrum kullanan buzağılarda ishalin görülmediğini bildirmekte ya da diyare süresinin daha kısa olması bu durumu desteklemektedir (Nord ve diğerleri, 1990; Perryman ve diğerleri, 1999). Yeterli pasif transferin *Cryptosporidium* enfeksiyonunu en aza indirmeye veya ortadan kaldırmaya yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Fayer ve diğerleri,

1989b; Lopez ve diğeri, 1988; Petersen ve diğeri, 1992). Bu nedenle, yüksek kaliteli kolostrum ile beslenmesi ve pasif transferin sağlanması, protozoal enfeksiyonları en aza indirmek için önemli bir yönetim uygulamasıdır (Urie ve diğeri, 2018). Pasif transfer başarısızlığı olan buzağılarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun daha şiddetli olduğu bildirilmektedir (Constable ve diğeri, 2017; de Graaf ve diğeri, 1999; Thomson ve diğeri, 2017)

Bu durumun aksine yenidoğanda kolostral immünoglobulinlerin ve/veya aktif immün hücrelerin kayda değer pasif transferi, *Cryptosporidium* spp. enfeksiyonunu önlemede çok az role sahip olduğu da belirtilmektedir (Trotz-Williams ve diğeri, 2007; Quigley ve diğeri, 1994; Harp ve Goff, 1998). Pasif bağışıklık, buzağılarda bu parazite direnç kazandırmaz, başka bir ifadeyle kolostrumla beslenen buzağıkların ookist dökme riski daha az değildir (TrotzWilliams ve diğeri, 2007). *C. parvum*'a karşı antikor içeren kolostrum ile yoğun beslemenin bile (7 gün boyunca günde altı kez) ne ookist dökülmesi ne de diyarenin başlangıcı veya süresi açısından fark yaratmadığı bildirilmektedir (Harp ve Goff, 1998). Trotz-Williams ve diğeri (2008), kolostrumun hiçbir etkisi olmadığını bildirmektedir. Kolostrumun *C. parvum* enfeksiyonuna karşı koruyucu olabileceğine dair zayıf kanıtlar mevcuttur; ancak bir risk veya koruyucu faktör olarak kolostrum alımı hala etkili bir şekilde test edilmemiştir (Brainard ve diğeri, 2020b). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kolostrum alan buzağılarda da yüksek oranda ookist tespit edilmiş ve kolostrum alımı ile ilgili bir ilişki ortaya konulamamıştır. Kolostral antikorun buzağıklar enfeksiyondan koruyamamasının olası bir nedeni, *C. parvum*'un hücre içi bir parazit olmasıdır. Parazit, öncelikle buzağığın bağırsağını kaplayan bağırsak epitel hücreleri içini istila eder ve bu nedenle, antikorun etkilerinden büyük ölçüde korunur (Harp ve Goff, 1998).

Sterilize edilmiş veya bekletilmiş kolostrum antikor etkinliğini kaybetmektedir (Elizondo-Salazar ve diğeri, 2010); bununla birlikte kolostrumun cryptosporidiosis'e karşı etkili olmak için yeterince antikor içerdiğine dair kanıtlar sınırlıdır (Burtoni ve diğeri, 2011). Ayrıca sterilize edilmemiş kolostrum alımının da koruyucu olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır (Silverlas ve diğeri, 2009). Kolostrumun ısı işlemi, protein (yani immünoglobulin) denatürasyonunu önlemek için süt pastörizasyonuna kıyasla daha uzun bir süre (60 dakika) boyunca düşük bir sıcaklıkta (60°C) gerçekleştirilmelidir (Godden ve diğeri, 2006).

Sodyum bikarbonatlı kolostrumda daha belirgin iyileşme ve daha kısa klinik iyileşme süresi, proteomların bağırsaklarda sistemik ve lokal etkileri ile tedavide olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuştur (Kaçar ve diğerleri, 2022)

Birden fazla anneden kolostrumun toplanmasının genellikle genel kolostrum kalitesini düşürdüğü ve hastalık riskini artırdığı düşünülmektedir, böylece, daha büyük hacimlerde düşük kaliteli kolostrum ile daha küçük hacimlerde daha yüksek kaliteli kolostrumun karışmasına ve olası hastalık patojenlerinin karışmasına neden olabilmektedir (Urie ve diğerleri,2017).

Kolostrum (veya süt) için herhangi bir özel besleme dağıtım sisteminin diğerlerinden daha riskli veya koruyucu olduğuna dair tutarlı kanıt bulunmamaktadır (Brainard ve diğerleri, 2020b). Trotz-Williams ve diğerleri (2007) ve Silverlas ve diğerleri (2009), biberonla beslemenin enfeksiyon riski üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bulmuşlardır. Kontamine biberonlar veya sağım işlemi sırasında sütün kontamine olması mümkündür (Xiao ve Fayer, 2008). Ancak; bizim çalışmamızda en az (%66,8) oranda biberon ile kolostrum alanlarda enfeksiyona rastlanmıştır. Trotz-Williams ve diğerleri (2008) ise, kolostrumun özofagus tüpü ile verilmesinin riski artırmadığını bildirmiştir. Doğrudan anne ile beslenen buzağılarda ise %81,8 olarak yine oldukça yüksek bir orana rastlanılmıştır. Bu durum ookistlerle kontamine olan zemin ile sürekli temas eden meme aracılığıyla buzağının çok sayıda ookiste maruz kalmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda kullanılan buzağılardan yalnızca 2'si kova ile besleniyordu ve tamamı enfeksiyon pozitif olarak tespit edildi. Buzağıları beslemek için emziksiz kovaların kullanılması, emme ihtiyacını karşılayamadığından ookist dökülmesi riskini artırdığı düşünülmektedir (Delafosse ve diğerleri, 2015). Meme başı beslemenin, kovalardan beslenen buzağılara kıyasla çapraz emmeyi azalttığını bildirmiştir (Jensen ve Budde, 2006).

Kullanılan yem kaynağının da *Cryptosporidium* enfeksiyonu oluşumunu etkilediği bulunmuştur. Süt ve mera ile beslenme, tek başına meraya göre daha yüksek enfeksiyon oranı (%23.4) ile sonuçlanmıştır (Ayele ve diğerleri, 2018). Sütün yanı sıra başlangıç tahılları ile besleme (süt ikamelerine kıyasla), ookist dökme riskinin artmasıyla ilişkili faktörlerdir (MaldonadoCamargo ve diğerleri, 1998; Mohammed ve diğerleri, 1999). *Cryptosporidium* pozitifliği ile süt ikame yemlerinin birlikteliği, süt ikame yemlerinin hijyenik olmayan koşullarda hazırlanması veya saklanması nedeniyle ookist kontaminasyonu ile ilişkili olabilir (McGuirk 2003). Ek olarak, yetersiz beslenme aynı zamanda immünosupresyonla da ilişkili

olduğundan, düşük kaliteli süt ikamelerinin kullanılması lökosit tepkilerini ve farklı enteropatojenlere karşı direnci olumsuz etkileyebilir (Ballou ve diğerleri, 2015; Hammon ve diğerleri, 2018), dolayısıyla cryptosporidiosis'i destekleyebilir. Süt ikame yemlerinin kullanımının daha yüksek enfeksiyon riskine yol açtığı bulunmuştur (Díaz ve diğerleri, 2018; Trotz-Williams ve diğerleri, 2008). Başka çalışmalarda, süt ikame yemi kullanımının hastalık riskinde çok az fark yarattığı veya hiç fark yaratmadığı bulunmuştur (Imre ve diğerleri, 2015; TrotzWilliams ve diğerleri, 2008; Urie ve diğerleri, 2018). Süt ikamesinin ya önemli olmadığı (Urie ve diğerleri (2018) ya da riski artırdığı (Trotz-Williams ve diğerleri 2008) idi. Süt ikame yemi kullanımının riski artırdığına dair kanıtlar karışık ve sonuçsuz; ancak, bu risk faktörü oldukça değiştirilebilir olduğundan daha fazla araştırmaya değer görülmektedir (Brainard ve diğerleri, 2020b).

Fermente süt takviyesi, *C. parvum*'a karşı koruyucu bir faktör olarak görülmüştür. Fermente süt, fermente edilmemiş süttten daha fazla probiyotik (örneğin; *Lactobacillus* sp) içerir ve modifiye edici aktiviteleri sayesinde bu faydalı bakteriler patojenlerin kolonize olmasını ve çoğalmasını önleyebilir. Farelerde ve sığırcılarda *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus reuteri* ile yem takviyesi, *C. parvum* ookistlerinin dışkı ile dökülmesini azalttığı görülmüştür (Guitard ve diğerleri, 2006).

Buzağı büyümesini ve rumen gelişimini desteklemek için yaşamın ilk gününden itibaren süttten kesim öncesi dönem boyunca, yüksek kaliteli buzağı başlangıç yemi ve taze temiz su dahil olmak üzere beslenme gereksinimleri karşılanmalıdır (BAMN, 2003). Çalışmamızda ise kullanılan ilave yemler ile herhangi bir ilişki tespit edilememekle birlikte en düşük enfeksiyon oranına formik asit ile muamele edilmiş soğuk süt ve buzağı büyütme yemi kullananlarda rastlanmıştır. Ancak sadece bir çiftlikte söz konusu uygulamanın yapıyor olması, diğer pek çok değişkenin de değerlendirilmesi gerektiğinden, ilişkinin doğru bir şekilde ortaya çıkarılabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Ookistler aşırı sıcaklıklara ve kurumaya karşı hassastır. Sıcak suyla temizleme ve ardından iyice kurutma, *C. parvum*'u öldürmede etkili bir yoldur (Fayer, 2008). Dondurma, zamana ve sıcaklığa bağlı olarak ookistleri öldürebilmekle birlikte, 1 hafta boyunca -10°C 'de hayatta kaldıkları da gösterilmiştir (Fayer ve Nerad, 1996). Bu nedenle, en iyi temizleme yöntemi, ookistler 60°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda inaktive olduğu için buzağı bölümlerinin düzenli olarak buharla temizlenmesidir (Robertson ve diğerleri, 1992).

Çiftliklerde sıklıkla kullanılan dezenfektanlardan Virkon'un *Cryptosporidium* ookistlerine karşı etkili olduğu (Fayer, 2008), hidrojen peroksit içeren dezenfektanlarla yapılan dezenfeksiyonun kontamine dışkı birikimini azaltmaya yardımcı olabileceği (Thomson ve diğerleri, 2017), sönmemiş kirecin ookist sayısını azalttığı bildirilmektedir (Graczyk ve diğerleri, 2008; Zintl ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda 2 haftada bir düzenli olarak Virkon kullanılan çiftliklerden elde edilen örneklerin %69,4'ü *Cryptosporidium* pozitif olarak tespit edilmiştir.

Olası tüm dezenfektanların *C. parvum*'a karşı etkili olmadığı bilinmektedir (Brainard ve diğerleri, 2020b). Birkaç araştırma, kalın duvarlı *Cryptosporidium* ookistlerinin, hayvancılıkta en yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar da dahil olmak üzere, olumsuz dış koşullara karşı oldukça dirençli olduğunu kanıtlamıştır (Fayer, 2008). Ticari dezenfektanlar, önerilen konsantrasyonlarda kullanıldıklarında genellikle *C. parvum*'a karşı etkili değildir. *C. parvum*'u öldürmek için yeterli konsantrasyonlarda veya maruz kalma sürelerinde kullanım, insanlar ve çiftlik hayvanları için kabul edilemez bir tehlike arz eder (O'Donoghue, 1995). Rutin temizlik ve dezenfeksiyon uygulamaları protozoanın daha yüksek prevalansı ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Bu durum şaşırtıcı olsa da uygulamaların hatalı yapılması ya da kullanılan dezenfektanların etki etmediğini düşündürmektedir (Fayer, 2008). Maddox-Hyttel ve diğerleri (2006) temizleme tipinin hastalık riskini etkilemediğini ileri sürmüştür (basınçlı su ile temizleme). Çalışmamızda da hiçbir rutin temizlik uygulaması yapılmayan yerler ile birbirinden farklı da olsa rutin olarak temizlik ve dezenfeksiyon uygulaması yapan yerler arasında benzer pozitiflik oranlara rastlanılmıştır. Dezenfeksiyonun işe yaramamasının olası bir açıklaması, çiftçilerin doğru ve etkili temizlik yapmak yerine enfeksiyon riskini azaltmak için yalnızca dezenfektana güvenmeleridir. Düzgün bir temizlik yapılmadığı takdirde sadece üst tabaka dezenfekte edilir, patojenler alt kısımda gelişmeye devam edebilir ve üst tabaka bozulur bozulmaz risk tekrar açığa çıkar. *Cryptosporidium* ookistleri çoğu ticari dezenfektana karşı dirençlidir (Fayer, 2008). Genellikle ishal sorunu olan sürülerde dezenfeksiyon işlemlerinin başlatıldığı; ancak bu sürülerde hali hazırda sorun olduğu için dezenfeksiyon işe yaramıyor ya da yetersiz olarak görülebilmektedir. Ya da dezenfeksiyon rutinleri örneklemeden kısa bir süre önce başlatılmışsa, örnekleme sırasında tam etkiye ulaşılmamış olabileceği dikkate alınmalıdır (Silverlas ve diğerleri, 2010b). Díaz ve diğerleri (2018), dezenfektan kullanımının hastalık riskini güçlü bir şekilde artırdığını bulmuşlardır; ancak dezenfektanların nasıl kullanıldığını tam olarak açıklamamaktadır.

Hastalık kontrolü açısından bakıldığında, çiftlik hayvanlarında cryptosporidiosis ile mücadelede önleyici hijyen önlemleri en önemli araçlardır, amaç parazitin dış formlarını yok etmek ve hayvanlar arasında ve çevreden konakçıya bulaşmasını önlemektir (Angus, 1990). Bu nedenle, uygun yönetim ve hijyen uygulamaları yoluyla buzağı bağışıklığının artırılması ve buzağuların patojene maruz kalmasının azaltılması, buzağularda cryptosporidiosis insidansını azaltmanın anahtarıdır (Abuelo ve diğerleri, 2019). Kontamine dışkı ile teması en aza indirmek (Robertson ve diğerleri, 1992), uygun temizleme (su ile), ardından kurutma ve toz sönmemiş kireç kullanımı, derin ve temiz altlık kullanımı (yüzeyin düzenli olarak kuru, temiz altlık malzemesiyle kaplanması şartıyla), derin ve temiz saman yatağı (Robertson ve diğerleri, 1992; Silverlas ve diğerleri, 2010b), *Cryptosporidium* enfeksiyonundan korumanın iki etkili yolu olabilir (Silverlas ve diğerleri, 2010b).

Buzağı besleme kaplarını yıkarken sabun veya deterjan kullanılması, ookist dökme prevalansının azalmasıyla ilişkili olduğundan, koruyucu yönetim uygulamaları olarak ortaya çıkmıştır (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008). Trotz-Williams ve diğerleri (2008), beslenme kaplarını dezenfektanla yıkamanın (sabun veya su ile yıkama) hastalık riski üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte, sabun ve su ile yıkama (temizlik/dezenfektan kullanmama ile karşılaştırıldığında) enfeksiyon riskini azaltmıştır (Brainard ve diğerleri, 2020b).

İyi hijyeni kolaylaştıran buzağı besleme ve barınma uygulamalarının, genç süt buzağularında *C. parvum* dökülme prevalansının azaltılmasında önemli olabileceği görülmektedir (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008). Ayrıca, hijyen durumu da enfeksiyon prevalansını önemli ölçüde etkilemektedir. Hijyenik olmayan buzağularda (%34,4) hijyenik buzağulara (%15,2) göre üç kat daha fazla görülmüştür (Ayele ve diğerleri, 2018). *Cryptosporidium* enfeksiyonunun süt hayvanlarının ve çiftliklerinin hijyenik durumu ile önemli bağlantısını tanımlayan Abebe ve diğerleri (2008), bulgusu tarafından desteklenmektedir. Benzer şekilde, El-Khodery ve Osman (2008), ve Castro-Hermida ve diğerleri (2002), kötü hijyenin enfeksiyon oranını artırdığını ve *Cryptosporidium* türlerinin hayvanlarda yayılmasını sağladığını bildirmiştir. Bu durum, kirli ve çamurlu çiftliğin, muhtemelen çiftliklerde veya hayvan evlerinde *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı veya hayatta kalması için uygun bir mikro iklimsel faktörler veya koşullar oluşturabileceğine bağlanabilir. Bu, yem ve su kontaminasyonunu artırır ve bu da buzağuların *Cryptosporidium* enfeksiyonuna maruz kalmasına neden olabilir (Ayele ve diğerleri, 2018).

Bulaşıcılık, buzağılama, besleme, barındırma ve genel olarak buzağı bakımı alanlarında genel hijyen yoluyla azaltılabilmektedir (Lorenz ve diğerleri, 2011b). Yine, diğer çalışmalar ahırların sık temizlenmesinin çiftliklerde düşük ookist birikimine yol açtığını gösterdiğinden, iyi hijyen uygulamalarının bir sonucu olarak çiftliklerde genel olarak daha iyi yönetim ile ilgili olabilmektedir (Muhid ve diğerleri, 2011). Enfekte buzağuların bakımı sırasında sağlam yönetim ve hijyene dikkat edilmesi tavsiye edilse de, *C. parvum* bireysel buzağuları enfekte etmek için o kadar az ookist gerektirebilir ki bu tavsiyeler boşuna olacaktır (Moore ve diğerleri, 2003).

Buzağı barınaklarına girişlerde personel için dezenfeksiyon üniteleri bulunmalıdır (Brainard ve diğerleri, 2020b). Hasta buzağuların bakımında bakıcılar tarafından ayrı bir bot ve tulum seti kullanılmalı, hasta buzağuların bakımı bittiğinde kıyafetleri değiştirilmeli ve bakıcı iyice yıkanmalıdır. Hasta buzağuların bakım ve tedavilerinden önce daima sağlıklı buzağılara dikkat edilmelidir (Harp ve Goff, 1998). Bir üretim ortamında buzağı padokları boşaldığında yeni hayvan girişinden önce iyice temizlenmesi önemlidir.

Temizleme yöntemlerinin hastalık riskiyle ilişkisinin, ahır zemini (toprak, beton v.b.) ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Beton zeminde dışkının sıyrılma ile bertaraf edilmesi ve basınçlı su ile yıkama uygulanabilmektedir (Trotz-Williams ve diğerleri, 2008). Başka bir deyişle temizleme yöntemi ile temizleneceği zemin tipine bağlı olarak değişkenlik gösterecektir (Brainard ve diğerleri, 2020b).

Sischo ve diğerleri (2000), yılda 12 kereden fazla yatak değiştirmenin hastalık riskini artırdığını bildirmiştir. Buzağuların yataklarının değiştirilmesi ya da padokların temizlik işlemleri personel ve ekipman enfeksiyon yaymak için fomit haline gelir. Daha önceki bir çalışmada söz konusu durumun ookist dökme olasılığını arttırdığı bildirilmektedir (Maldonado-Camargo ve diğerleri, 1998). Hijyen, dezenfeksiyon rutini, yatak derinliği, hasta hayvanların ayrımı ve beslenme durumu önemli risk faktörleri olarak ortaya çıkmayan çalışmalarda bulunmaktadır (Brainard ve diğerleri, 2020b). Derin saman yataklarının hayvanları dışkıdan uzak tuttuğu düşünülmektedir. Ek olarak, yataklar mümkün olduğunca kuru tutulmalıdır (Brainard ve diğerleri, 2020b).

Cryptosporidium parvum ile ilgili önemli bir sorun, enfeksiyonu kontrol etmek ve ookistlerle çevresel kontaminasyonu azaltmak için etkili bir yolun olmamasıdır (De Waele ve diğerleri, 2010). Ookistler çevresel streslere ve birçok dezenfektana karşı oldukça dirençli olduklarından, buzağı yetiştirme tesislerinin enfeksiyon ve uzun süreli kontaminasyonunu

önlemek için hijyen önlemleri tek başına yeterli değildir (O'Donoghue, 1995). Çalışmamızda rutin olarak temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin yapılmaması ya da yapılıyorsa da kullanılan yöntem ile enfeksiyon arasında anlamlı bir ilişki ortaya koyulamamıştır.

Cryptosporidium enfeksiyonu oluşumunun hayvanların bulunduğu ortama ve barınma koşullarına bağlı olduğu doğrulanmıştır (Kvác ve Vítovec, 2003). Genç buzağular, yaşlı buzağulara göre enfeksiyona karşı daha savunmasız olduğu için buzağuların benzer yaş grupları ile birlikte barındırılması tavsiye edilmektedir (Innes ve diğerleri, 2020). Çünkü genç hayvanlar, yaşlı, asemptomatik hayvanlar tarafından saçılabilen *C. parvum* enfeksiyonuna yakalanma açısından en riskli grup olarak görülmektedir (Brainard ve diğerleri, 2020b; Silverlas ve diğerleri; 2009).

Silverlas ve diğerleri (2009), buzağuları doğumdan sonra hemen ayırmaya göre anne ile 4 güne kadar kalmanın *C. parvum* enfeksiyon riskini düşürdüğü, sonucuna ulaşmıştır. Doğum padoklarında uzun süre kalmanın enfeksiyona karşı koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Brainard ve diğerleri, 2020b; Silverlas ve diğerleri, 2009). Bunun aksine doğumdan sonra ayırmanın hiçbir etkisinin olmadığına dair çalışmalar da mevcuttur (Trotz Williams ve diğerleri, 2008). Ayrıca doğumdan sonra 1 saatten fazla anne ile aynı yerde kalmanın ishal riskini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Trotz Williams ve diğerleri, 2007). Doğumdan önce annelerin sürüden ayrılarak doğum padoklarına ayrılmasının enfeksiyon riskine bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Maddox-Hyttel ve diğerleri, 2006). Buzağılama alanlarında yoğun bir çevresel kontaminasyon bulunmakta ve buzağular enfektif ookistlere doğumdan hemen sonra maruz kalmaktadır. Dolayısıyla enfeksiyon doğumdan hemen sonra meydana gelebilmektedir (Del Coco ve diğerleri, 2008). Bizim çalışmamızda da 3 günlük yaşta pozitifliğe rastlanması bu durumu doğrular niteliktedir. Buzağının birden fazla anne ile aynı yerde tutulmasının ise hastalık riskini artırdığına dair bir kanıt bulunamamıştır (Trotz-Williams ve diğerleri, 2007; Weber ve diğerleri, 2016).

Doğumdan sonra kullanılan buzağı barınak tipinin önemli bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir (Delafosse ve diğerleri 2015). Bireysel padoklarda barındırmanın hastalık riski üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır (Brook ve diğerleri 2008; Diaz ve diğerleri, 2018; MaddoxHyttel ve diğerleri, 2006; Urie ve diğerleri, 2018). Aynı ahır paylaşan buzağular ise yüksek risk altındadır (İmre ve diğerleri, 2015). Buzağuların bireysel veya gruplar halinde barındırılmasının hastalık riski üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmektedir (Brainard ve diğerleri, 2020b). Sütten kesilme öncesi farklı koşullarda barındırılan buzağılarda ishal oluşumunda hiçbir fark olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Kvác ve diğerleri

2011). Sisco ve diğeri (2000), buzağuların bulunduğu bölümlerde hayvanların birbiriyle temasının ookist dökme riskini artırdığını gözlemlemiştir. Birbirinden ayrı şekilde tekli barınaklarda yetiştirilen buzağuların ise daha az risk taşıdığı bildirilmiştir (Cruvine ve diğeri, 2020; Waele ve diğeri, 2010).

Aşırı kalabalık ve hayvanların toplu olarak barındırıldığı durumlarda, buzağıdan buzağıya ya da enfekte buzağı dışkısı ile ineklerin kontamine olması ve meme yolu ile tekrar buzağıya geçiş döngüsü ile enfeksiyon hızla yayılabilmektedir (Angus, 1990). Hem tekli hem de çoklu emziren sığır sürülerinde (Reynolds ve diğeri, 1986) ve doğum bölümünde birden fazla inek bulunan çiftliklerde *Cryptosporidium* enfeksiyonları daha yaygın olarak görülmektedir (Garber ve diğeri, 1994). Emziren sürülerde buzağular, birbirine yakın tutulan süt buzağularına kıyasla ineklerle daha geniş bir alanda tutulur ve bu da onları daha düşük bir enfeksiyon basıncına maruz bırakır (Björkman ve diğeri, 2015). Bu durum, cryptosporidial diyare ile çiftlik tipi ve özel hijyenik koşulları arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır (de Graaf ve diğeri, 1999).

Kompost altlık sistemi benzeri toplu olarak yetiştirilen buzağılarda hastalığın ortaya eğilimi daha yüksektir (Cruvine ve diğeri 2020). Buzağı barınma alanlarında beton zemin bulunan çiftliklerde *C. parvum* dökülme prevalansı %41 daha düşüktür (Trotz-Williams ve diğeri, 2008). Matoock ve diğeri (2005), beton zeminin toprak zemine göre daha az enfeksiyon riski taşıdığını bulmuştur. Weber ve diğeri (2016) ise yaptıkları çalışmada zemin tipini önemsiz bulmuştur. Öte yandan, Trotz-Williams ve diğeri (2008) beton zemini daha düşük riskli bulurken, toprak ya da çakıl zemini hastalık ile ilişkilendirmemiştir.

Diaz ve diğeri (2018), çitallı döşeme tipini (dışkı ile teması azlattığından) *C. parvum* enfeksiyonuna karşı oldukça koruyucu olduğunu bulurken, Maddox-Hyttel ve diğeri (2006) çitallı döşemenin enfeksiyon riski ile ilişkili olmadığını bulmuştur.

Castro Hermida ve diğeri (2002), buzağı barınaklarında saman altlık kullanılmasını *C. parvum* riskiyle ilişkili bulurken; söz konusu durumla ilişkili bulunmayan pek çok çalışmada bulunmaktadır (Maddox-Hyttel ve diğeri, 2006; Silverlas ve diğeri 2009; Urie ve diğeri, 2018; Weber ve diğeri, 2016). Saman yataklarının daha fazla risk oluşturabileceğine kanıtlar yetersiz bulunurken diğer yatak tipleri hakkında önemli bir kanıt bulunmamaktadır (Brainard ve diğeri, 2020b). Szonyi ve diğeri (2012) ise saman altlıkların enfeksiyon riskini artırdığını bulmuşlardır. Derin ve kuru saman yataklarının hayvanları dışkıdan uzak tuttuğu düşünülmektedir. (Brainard ve diğeri, 2020b). Brook ve

diğerleri (2008), 11-15 cm derinliğindeki yatakların 0-5 cm derinliğindeki yatalara göre daha az hastalık riski taşıdığını bulmuştur. 6-10 cm derinliği 0-5 cm derinliğe göre koruyucu bulurken, 15 cm büyük derinlikleri 0-5 cm derinliğe kıyasla koruyucu bulmamıştır. Yani yatak derinliği ile hastalık riski arasında tutarlı bir ilişki bulunamamıştır (Brook ve diğerleri, 2008; Brainard ve diğerleri, 2020b). Bol nem ve yetersiz drene edilmiş zeminin varlığı kistlerin hayatta kalma süresini uzatabilmektedir (Barwick ve diğerleri, 2003). Önceki çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesi, bizim çalışmamızda da barınak tipi ve barınma koşulları ile hastalığa dair net bir ilişki tespit edilememiş olması diğer faktörlerle birlikte değerlendirilmesi gerektiğinin yanı sıra daha kapsamlı çalışmalarla konunun irdelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Havalandırma koşullarının hastalık riskini etkileyip etkilemediği tam olarak açığa çıkmış değildir (Brainard ve diğerleri, 2020b). İyi havalandırılmış ahırlarda yaşayan ve aynı zamanda yeterli güneş ışığı alan buzağuların daha az riske sahip olduğu bildirilmiştir (Matoock ve diğerleri, 2005). Basınçlı tüp veya çapraz havalandırma koşulları ile doğal havalandırmanın hastalık riskiyle bir bağlantısı olmadığı bildirilmektedir (Urie ve diğerleri; 2018).

Buzağuların bağlı ya da serbest halde dolaşmasının enfeksiyon ile bir ilişkisi bulunamamıştır (Brainard ve diğerleri, 2020b; Silverlas ve diğerleri, 2009; Szonyi ve diğerleri, 2012). Weber ve diğerleri (2016), açıkta barındırılmanın (çatısız) hastalık riskini büyük ölçüde artırdığını bulurken, Szonyi ve diğerleri (2012) ookistlerin dökülmesi ile barındırılma arasında hiçbir bağlantı bulamamışlardır.

Bireysel veya ortak alanlarda barındırma, kapalı veya açık alanda bulunma, sürüde cryptosporidiosis olup olmaması, cins, kolostrum, doğumdan sonra anne ile geçirilen süre, altlık veya yatak tipi, buzağuların bağlı veya serbest olup olmadığı ve besin takviyesi kullanımı olup olmadığı hastalık riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Brainard ve diğerleri, 2020b).

Sütten kesim öncesi dönemdeki buzağularda en yaygın tür olarak *C. parvum* bildirilmektedir (Fayer ve diğerleri, 2006; Fayer ve diğerleri, 2007; Garber ve diğerleri, 1994; Geurden ve diğerleri, 2007; Langkjaer ve diğerleri, 2007; Lichtmannsperger ve diğerleri, 2020; Santin ve diğerleri, 2008; Trotz-Williams ve diğerleri, 2005b; Trotz-Williams ve diğerleri, 2008; Xiao ve diğerleri, 2007; Zhang ve diğerleri, 2021; Zhang ve diğerleri 2022). Kvac ve diğerleri (2011), sütten kesim öncesi dönemde *C. parvum* prevalansını %53,3 olarak

bildirmiştir. Hatta bazı sürülerde %100'e kadar çıkan enfeksiyon oranları bildirilmektedir (Abuelo, 2016; de Graaf ve diğerleri, 1999; Olson ve diğerleri, 2004). Henüz gelişmemiş bağışıklık sisteminden dolayı *C. parvum* enfeksiyonları genellikle dört haftalıktan küçük yenidoğan buzağılarda görülmektedir (Fayer ve diğerleri, 2007; Santin ve diğerleri, 2008). En yüksek *C. parvum* prevalansına süt emen buzağılarda rastlansa da 3 günlük yaştan yetişkin sığırlara kadar değişen yaşlarda farklı oranlarda görülebilmektedir (de Graaf ve diğerleri, 1999; Quilez ve diğerleri, 1996). En yüksek *C. parvum* prevalansına 6±15 günlük yaşta (%76.7), ardından 3±4 günlük yaşta (%44.4) rastlanmıştır (Quilez ve diğerleri, 1996). 7-21 günlük buzağılarda *C. parvum* sürü içi prevalansı %0 ila %70 arasında değişmektedir (Trotz-Williams ve diğerleri, 2005b). 1 aylıktan küçük buzağılarda, %35 ila %100'lük bir sürü içi prevalansı bulunmuştur (Trotz Williams ve diğerleri, 2008). Tüm *C. parvum* enfeksiyonlarının sulu ishalin meydana geldiği 1-4 haftalık buzağılarda gözlemlendiği, ancak daha yaşlı buzağılarda görülmediği gözlemler de bildirilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2021). Bu durum yaşla birlikte bağışıklığın gelişimi sayesinde enfeksiyona karşı direncin arttığı görüşünü desteklemektedir (Kvac ve diğerleri, 2006). Bazı çalışmalar buzağılarda ookist dökülme sıklığının 20 günlük yaştan sonra azaldığını bulmuştur (Garro ve diğerleri, 2016). Bizim çalışmamızdan elde edilen bulgular da benzer doğrultudadır. Bu durumun yaşa bağlı olarak azalan duyarlılıktan veya ilk maruziyetten sonra kazanılmış bağışıklıktan kaynaklanabileceğini düşünülmektedir (Silverlas ve diğerleri, 2009). Başka bir çalışmada en genç pozitif buzağılara 1 ve 2 günlük yaşta rastlanılmıştır ve yaş ile *Cryptosporidium* enfeksiyonu arasında bir ilişki belirtilmemiştir (Björkman ve diğerleri, 2015). Garber ve diğerleri (1994), enfeksiyon sıklığını 1 ila 3 haftalık buzağılarda en yüksek olarak bulmuştur. Buzağılar en yüksek *Cryptosporidium* ookistlerini 3 haftalık yaşta dökerler ve en baskın türün *C. parvum* olduğu doğrulanmaktadır (Thomson ve diğerleri, 2019).

Cryptosporidium enfeksiyonunun prevalansı, 1 aylıktan küçük buzağılarda önemli ölçüde en yüksektir ve yaşla birlikte giderek azalmaktadır (Castro-Hermida ve diğerleri, 2006; Castro-Hermida ve diğerleri, 2011; Diaz ve diğerleri, 2021; Langkjaer ve diğerleri, 2007; Mendonça ve diğerleri, 2007; Santin ve diğerleri, 2004; Santin ve diğerleri, 2008; Smith ve diğerleri, 2014; Thomson ve diğerleri, 2017). Sischo ve diğerleri (2000), Garber ve diğerleri (1994), 3 haftanın altındaki buzağılarda sırasıyla %15 ve %48 *Cryptosporidium* prevalansı bildirmiştir. 0-3 aylık buzağılarda, önceki gözlemlerle tutarlı olarak, diğer herhangi bir yaş grubundan daha yüksek prevalansa rastlanmaktadır (Ayele ve diğerleri, 2018; Delafosse ve diğerleri, 2015; Manyazewal ve diğerleri, 2018; Venu ve diğerleri, 2013). *Cryptosporidium*

pozitif dışkı sonucu alma riski 2 haftalıkken en yüksek orandadır (Ranjbar ve Fattahi, 2017; Santin ve diğerleri, 2008; Urie ve diğerleri, 2018). *Cryptosporidium*'un yaşam döngüsü göz önüne alındığında, buzağuların doğum zamanına yakın doğrudan kontaminasyon yoluyla enfekte olması muhtemeldir ve bu nedenle, ookistlerin dışkıda en yüksek düzeyde dökülmesi yaklaşık 2 haftalıkken görülür (Olson ve diğerleri, 2004). Enfeksiyon çoğunlukla bir yenidoğan problemidir (Naciri ve diğerleri, 1993; Quilez ve diğerleri, 1996; Xiao ve Herd, 1994). İshal ve ookist dökülmesi 4 günlükken ortaya çıkabilir ve 8-10 günlükken en yüksek seviyeye ulaşır ve buzağuların %90 ila %95'i enfekte olur (Xiao ve Herd, 1994). Yenidoğan buzağularda yapılan bir çalışmada, *Cryptosporidium* prevalansının salgın sırasında (%80,3) salgın sonrasına (%22,7) göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve *Cryptosporidium* prevalansının 3 haftalıktan küçük buzağularda daha yüksek olduğunu öne sürülmektedir (Li ve diğerleri, 2019). *Cryptosporidium*'un en yüksek prevalansına şiddetli ishalin 2 ila 3 haftalık buzağularda görüldüğü çalışmalar da bulunmaktadır (Cui ve diğerleri, 2014). En yüksek prevalansın 1 ila 3 hafta arasında değiştiği çalışmalar da bulunmaktadır (Zhang ve diğerleri 2022). Ookistlerin atılımı ≤ 7 günlük yaş gruplarında daha yüksek oranlarda bildirilirken, >21 günlük yaş gruplarında ise daha düşük oranlarda bulunmuştur (Sari ve diğerleri, 2009). Bizim çalışmamızda ise en yüksek orana %84 ile 1-10 günlük yaşta rastlanmıştır ve 21-29 günlük yaşta bu oran %37,7'ye inmiştir.

Genç buzağularda prevalansın daha yüksek görülmesi ve büyük çiftliklerde bu yaşlardaki buzağuların daha fazla bulunması, nispeten daha sık ookist dökülmesi ile çevresel kontaminasyona daha fazla katkı sağlamaktadır (Hailu ve diğerleri, 2020). Kontaminasyon daha sonra ilk yeni doğan buzağuların enfeksiyonu ile güçlenmektedir (Naciri ve diğerleri, 1999).

Yetişkin sığırlarda da *C. parvum* enfeksiyonuna rastlanmaktadır (Lorenzo-Lorenzo ve diğerleri, 1993; Mann ve diğerleri, 1986; Naciri ve diğerleri, 1999; Thomson ve diğerleri, 2019; Villacorta ve diğerleri, 1991; Wells ve diğerleri, 2015). Görünüşte sağlıklı olan inekler günde 750.000 ila 720 milyon ookist salgılayabilir, böylece yeni doğan buzağının çevresini kontamine eder (Naciri ve diğerleri, 1999). Buzağular için olası bir enfeksiyon kaynağı, doğumda annelerinden bulaşmadır (Thomson ve diğerleri, 2019). Genç buzağular doğumdan çok kısa bir süre sonra *C. parvum* ile enfekte olabilmektedir (Santin ve diğerleri, 2008; Silverlas ve diğerleri, 2010b; Silverlas ve Blanco-Penedo, 2013; Rieux ve diğerleri, 2013). Buzağular, annelerini emerek veya kontamine altlıklarla temas ederek kolayca enfekte olabilir (Naciri ve diğerleri, 1999). Yapılan moleküler çalışmalarda 1 günlük buzağuların dışkısında *C.*

parvum DNA'sı tespit edilmiştir. Oysa *C. parvum*'un prepatent süresi 2-7 gün olarak bilinmektedir, dolayısıyla bu hayvanın parazitle aktif olarak enfekte olması olası değildir (Tzipori ve diğerleri, 1983); bununla birlikte, bununla birlikte, buzağuların paraziti yaşamın çok erken dönemlerinde alabildiğini göstermektedir (Thomson ve diğerleri, 2019). Yine 3 günlük yaştaki buzağularda *Cryptosporidium* ookistleri tespit edilen bir çalışmada doğumdan hemen sonra enfekte olabileceği gösterilmektedir (Avendano ve diğerleri, 2018; Garro ve diğerleri, 2016). Bizim çalışmamızda da en erken 3 günlük yaşta pozitifliğe rastlanılmıştır. Bu gözlem, parazitin yaklaşık 4 gün olduğu tahmin edilen yaşam döngüsünün süresi ile tutarlıdır (Naciri ve diğerleri, 1993) ve ayrıca buzağılama alanında yoğun çevresel kontaminasyon olduğunu düşündürmektedir (Santin ve Trout, 2008). Bu sonuç, *Cryptosporidium* spp. ile enfeksiyonun, bildirilen minimum prepatent süresinin 2 (Silverlas ve diğerleri, 2009) ile 3 gün arasında (Fayer ve diğerleri, 1998) olması nedeniyle doğumdan sonraki ilk saatlerde meydana geldiğini göstermektedir (Naciri ve diğerleri, 1999).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; Denizli ilinde neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp.'nin yaygınlığı %68,4 olarak belirlenmiştir. Yaş arttıkça enfeksiyonun görülme oranının azaldığı, dişi buzağılarda erkek buzağılara oranla daha fazla görüldüğü, doğar doğmaz hiperimmün serum (*E. coli*) kullanan buzağılarda daha az oranda rastlanıldığı tespit edilmiştir.

Neonatal buzağılarda *Cryptosporidium* spp. ishal sendromundan sorumlu olan yaygın bir patojendir ve hem buzağı kayıpları hem de tedavi masrafları neticesinde dünya genelinde hayvancılık sektörü için büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yetersiz ahır şartları, kötü çiftlik yönetimi, uygun olmayan bakım ve besleme koşulları proflaktik amaçlı ilaçları bile yetersiz kılmaktadır. Aynı zamanda sürdürülebilir ve ekonomik olmamakla birlikte uzun vadede olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir. Yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmesi önemli ekonomik kayıplara yol açmasının yanında, gıda güvenliği ve arzını tehdit etmekte, ihracaat kayıplarına yol açmaktadır. Diğer yandan bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımını artırmakta mikrobiyal dirençte artışa yol açmaktadır.

Cryptosporidium parvum, sığırlarda tanımlanmış zoonotik öneme sahip tek türdür. İnsanlarda *C. parvum* salgınlarına pek çok ülkede rastlanmakta ve bu durum çoğunlukla buzağılarla ilişkilendirilmektedir. Özellikle ookistlerin hem yeraltı hem de yüzey sularına karışması sonucu su kaynaklı küresel salgınlar görülebilmektedir. Bu durum çocuklarda, HIV ve AIDS gibi immun sistemi baskılayan hastalıklara sahip insanlarda önemli derecede yüksek bir risk faktörüdür. Çevresel ookist yükünü azaltmak, su kaynaklı salgınları önlemek için doğru çiftlik yönetimi uygulamasının önemi vurgulanmalıdır. Bu noktada halk sağlığı ve hayvan sağlığı bir bütün olarak görülmeli, “Tek Sağlık” stratejisi benimsenmelidir.

Çalışmamız kısıtlı bir alanda, sınırlı sayıda örnek ile gerçekleştirilmiş olsa da elde edilen epidemiyolojik verilerin etkenin bulaş yollarını anlama ve koruyucu tedbirleri değerlendirme noktasında katkı sağladığına inanıyoruz. İnsan ve hayvan sağlığını korumak, ekonomik kayıpları azaltarak ülkemizdeki hayvancılığın sürdürülebilir olmasını sağlamak adına, enfeksiyonun epidemiyolojik faktörlerle ilişkisini inceleyen daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Cryptosporidium teşhisinde Kinyoun Asit- Fast boyama yöntemi güçlü bir tanı yöntemi olarak kabul edilse de çalışmamız moleküler yöntemin duyarlılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla moleküler yöntemler yardımıyla teşhisin gerçekleştirilmesi, türlerin ve alt tiplerin belirlenmesi gerektiği hatta son yıllarda geliştirilen nano PCR yönteminin saha koşullarında kullanımının artırılması gerektiği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abebe, R., Wossene, A., Kumsa, B. (2008). An epidemiological study of *Cryptosporidium* infection in dairy calves on selected dairy farms of central Ethiopia. *Revue Medecine Veterinaire*, 159(2), 107-111.
- Abeywardena, H., Jex, A.R., Gasser, R.B. (2015). A perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings. *Advances in Parasitology*, 88, 243-301. doi: 10.1016/bs.apar.2015.02.001
- Aboelsoued, D., Shaapan, R.M., Ekhteeb, R.M.M., ElNattat, W.S., Fayed, A.H.M., Hammam, A.M.M. (2020). Therapeutic efficacy of ginger (*zingiber officinale*), ginseng (*panax ginseng*) and sage (*salvia officinalis*) against *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mice. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 51(2), 241-251. doi: 10.21608/ejvs.2020.24183.1152
- Abuelo, A. (2016). Investigation of an outbreak of neonatal calf diarrhoea in a dairy herd. *Veterinary Record Case Reports*, 4(2), e000372. doi: 10.1136/vetreccr-2016-000372
- Abuelo, A., Havrlant, P., Wood, N., Hernandez-Jover, M. (2019). An investigation of dairy calf management practices, colostrum quality, failure of transfer of passive immunity, and occurrence of enteropathogens among Australian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 102, 8352-8366. doi:10.3168/jds.2019-16578
- Acha, S.J., Kühn, I., Jonsson, P., Mbazima, G., Katouli, M., Möllby, R. (2004). Studies on calf diarrhoea in Mozambique: Prevalence of bacterial pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45, 27-36.
- Aghakeshmiri, F., Azizzadeh, M., Farzaneh, N., Gorjidoz, M. (2017). Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves. *Veterinary Research Communications*, 41, 107-112.
- Akalın, B. (2018). *Kütahya ili çevresinde buzağılarda Cryptosporidium (Tyzzer,1907) türlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.

- Akyüz, E., Naseri, A., Erkıılıç, E.E., Makav, M., Uzlu, E., Kırmızıgül, A.H., Gökce, G. (2017). Neonatal buzağı ishalleri ve sepsis. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 181-191.
- Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J., Marshall, J., French, N. (2015). Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Veterinary Journal*, 203(2), 155-160.
- Alabdeen, A.Z. (2014). *İshalli Hastalarda Cryptosporidium spp.'in Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi, ELISA ve İmmunokromatografik Yöntem ile Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Alsmark, C., Nolskog, P., Angervall, A.L., Toepfer, M., Winiğcka-Krusnell, J., Bouwmeester, J., Bjelkmar, P., Troell, K., Lahti, E., Beser, J. (2018). Two outbreaks of cryptosporidiosis associated with cattle spring pasture events. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, 71-74. doi:10.1016/j.vprsr.2018.09.003
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1007-1021.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitja-Bobadilla, A., Rodondo, M.J., Palenzuela, O., Padros, F., Vazquez, S., Nieto, J.M. (2004). *Cryptosporidium scoththalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Disease of Aquatic Organisms*, 62, 133-145.
- Angus, K.W. (1990). Cryptosporidiosis in ruminants. In J.P. Dubey, C.A. Speer, R. Fayer (Eds.), *Cryptosporidiosis of man and animals* (pp. 83-103). Boca Raton: CRC Press.
- Arrowood, M.J. (2002). Vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 215(3), 390-400.
- Arslan, M.Ö., Gıcık, Y., Erdoğan, H.M., Sarı, B. (2001). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in diarrhoeic calves in Kars province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 25, 161-164.
- Arslan, M.Ö. (2012). Sığır ve koyunlarda cryptosporidiosis. *Türkiye Klinikleri*, 3(2), 9-15.

- Aştı, C., Özbakiş, G., Azrug, A.F., Orkun, Ö., Nalbantoğlu, S., Çakmak, A., Burgu, A. (2012). Farklı illere ait buzağı dışkı bakışı sonuçları. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, A209-A214. doi:10.9775/kvfd.2012.6350
- Avendano, C., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Sanchez-Acedo, C., Quilez, J. (2018). Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. *Parasitology Research*, 117(5), 1317-1323. doi: 10.1007/s00436-018-5818-6
- Aydogdu, U., Isik, N., Deribay Ekici, O., Yildiz, R., Sen, İ., Coskun, A. (2018). Comparison of the effectiveness of halofuginone lactate and paromomycin in the treatment of calves naturally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Research Article*, 46, 1524.
- Ayele, A., Seyoum, Z., Leta, S. (2018). *Cryptosporidium* infection in bovine calves: prevalence and potential risk factors in northwest Ethiopia. *Biomed Central Veterinary Research*, 11, 105. doi: doi.org/10.1186/s13104-018-3219-7
- Azami, M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle in Isfahan, Iran. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54, 100-102.
- Bahler, C., Steiner, A., Luginbühl, A., Ewy, A., Posthaus, H., Strabel, D., Kaufmann, T., Regula, G. (2012). Risk factors for death and unwanted early slaughter in Swiss veal calves kept at a specific animal welfare standard. *Research in Veterinary Science*, 92, 162-168.
- Ballou, M.A., Hanson, D.L., Cobb, C.J., Obeidat, B.S., Sellers, M.D., PepperYowell, A.R., Carroll, J.A., Earleywine, T.J., Lawhon, S.D. (2015). Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte responses, and resistance to an oral *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* challenge in Jersey calves. *Journal Dairy Science*, 98, 1972-1982. doi: 10.3168/jds.2014-8783
- Baroudi, D., Khelel, D., Goucem, R., Adjou, K.T., Adamu, H., Zhang, H., Xiao, L. (2013). Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology*, 196, 334-340.
- Bartels, C.J., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W.A.J.M., Lam, T.J.G.M. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 162-169.
- Barwick, R., Mohammed, H., White, M., Bryant, R. (2003). Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in South-Eastern New York state. *Preventive*

Veterinary Medicine, 59, 1-11.

- Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F., Sanaa, M. (1999). Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Veterinary Research*, 30, 61-74.
- Betancourt, W.Q., Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, 126(1), 219-234. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.002
- Bin Kabir, M.H., Ceylan, O., Ceylan, C., Shehata, A.A., Bando, H., Essa, M.I., Xuan, X., Sevinc, F., Kato, K. (2020). Molecular detection of genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* infection in diarrheic calves, lambs, and goat kids from Turkey. *Parasitology International*, 79, 102163.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A., Düzlü, Ö. (2011). Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(1), 43-51.
- Björkman, C., Lindström, L., Oweson, C., Ahola, H., Troell, K., Axen, C. (2015). *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology*, 142, 1108-1114.
- Borowski, H., Clode, P.L., Thompson, R.C. (2008). Active invasion and/or encapsulation? A Reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 24(11), 507-16.
- Bovine Alliance on Management and Nutrition (BAMN). (2003). A guide to dairy calf feeding and management. https://www.aphis.usda.gov/animal-health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN03_GuideFeeding.pdf adresinden erişildi.
- Brainard, J., Hooper, L., McFarlane, S., Hammer, C.C., Hunter, P.R., Tyler, K. (2020a). Systematic review of modifiable risk factors shows little evidential support for most current practices in *Cryptosporidium* management in bovine calves. *Springer*, 119, 3571-3584. doi: 10.1007/s00436-020-06890-2
- Brainard, J., Hooper, L., McFarlane, S., Hammer, C.C., Hunter, P.R., Tyler, K. (2020b). Systematic review of modifiable risk factors shows little evidential support for most current practices in *Cryptosporidium* management in bovine calves. *Springer*, 119, 3571-3584. doi: 10.1007/s00436-020-06890-2
- Brar, A.P.S., Sood, N.K., Kaur, P., Singla, L.D., Sandhu, B.S., Gupta, K., Narang, D., Singh, C.K., Chandra, M. (2017) Periurban outbreaks of bovine calf scours in Northern India

caused by *Cryptosporidium* in association with other enteropathogens. *Epidemiology Infection*, 145, 2717-2726. doi: 10.1017/S0950268817001224

Brenner, J., Elad, D., Markovics, A., Grinberg, A., Trainin, Z. (1993). Epidemiological study of neonatal calf diarrhoea in Israel- A one- year survey of faecal samples. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 48, 113-116.

Brogli, A., Reckinger, S., Caccio, S.M., Nöckler, K. (2008). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, 154, 8-13.

Brook, E., Hart, C.A., French, N., Christley, R. (2008). Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, 152, 46-52. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.003

Brook, E.J., Anthony Hart, C., French, N.P., Christley, R.M. (2009). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *The Veterinary Journal*, 179, 378-382.

Burgu, A. (1984). Türkiye’de Buzağlarda *Cryptosporidim*’ların bulunuşu ile ilgili ilk çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 31(3), 573-585.

Burtoni, A.J., Nydam, D.V, Jones, G., Zambriski, J.A., Linden, T.C., Cox, G., Davis, R., Brown, A., Bowman, D.D. (2011). Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), 178-181. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.013

Bühler, C., Hammon, H., Rossi, G.L., Blum, J.W. (1998). Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for diferent durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone. *Journal of Animal Science*, 76, 758. doi:10.2527/1998.763758x

Carey, C.M., Lee, H., Trevors, J.T. (2004). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38, 818-862. doi:10.1016/j.watres.2003.10.012

Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J., Beach, M.J. (1999). Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 579-584.

Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., Gonzalez-Warleta, M., Mezo, M. (2006). Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine*, 53, 244-246.

- Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Losada, Y.A., Ares-Mazas, E. (2002). Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 106(1), 1-10. doi:10.1016/s0304-4017(02)00036-5
- Castro-Hermida, J.A., Garcia-Prebedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M., Mezo, M. (2011). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Science of The Total Environment*, 409, 2451-2459.
- Causape, A.C., Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Lopez-Bernad, F. (2002). Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 104, 287-298.
- Chalmers, R.M., Davies, A.P. (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124, 138-146. doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003
- Chalmers, R.M., Giles, M. (2010). Zoonotic cryptosporidiosis in the UK-challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1487-1497. doi: 10.1111/j.13652672.2010.04764.x
- Chalmers, R.M., Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29, 237-251.
- Chandler, A.L., Hobbs, C.A., Mosley, B.S., Berry, R.J., Canfield, M.A., Qi, Y.P., Siega-Riz, A.M., Shaw, G.M. (2012). Neural tube defects and maternal intake of micronutrients related to one-carbon metabolism or antioxidant activity. *Birth Defects Research A Clinical and Molecular Teratology*, 94(11), 864-74. doi: 10.1002/bdra.23068
- Checkley, W., White Jr, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.M., Fayer, R., Griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri Jr, W.A., Priest, J.W., Roos, D.S., Striepen, B., Thompson, R.C.A., Ward, H.D., Van Voorhis, V.A., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E.R. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. *Lancet Infectious Diseases*, 15, 85-94. doi: 10.1016/S1473 3099(14)70772-8
- Chen, W., Harp, J.A., Harmsen, A.G. (2003). *Cryptosporidium parvum* infection in gene targeted B cell-deficient mice. *Journal of Parasitology*, 89(2), 391-393.
- Cho, Y.I., Yoon, K.J. (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal Veterinary Science*, 15, 1-17.

- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B. (2007). Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 297-305.
- Coklin, T., Farber, J.M., Parrington, L.J., Coklin, Z., Ross, W.H., Dixon, B.R. (2010). Temporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in a herd of dairy calves in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 51, 841-846.
- Connor, E.E., Wall, E.H., Bravo, D.M., Evock Clover, C.M., Elsasser, T.H.E., Baldwin, R.L., Walker, M.P. (2017). Reducing gut effects from *Cryptosporidium parvum* infection in dairy calves through prophylactic glucagon-like peptide 2 therapy or feeding of an artificial sweetener. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3004-3018.
- Constable, D P., Hinchcliff, W.K., Done, H.S., Grünberg, W. (2017). *Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (11th edition). USA: St. Louis.
- Crouch, C.F., Oliver, S., Francis, M.J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*, 149, 105-108. doi: 10.1136/vr.149.4.105
- Cruvine, L.B., Ayres, H., Beltran Zapa, D.M., Nicaretta, J.E., Monteiro Couto, L.F., Heller, L. M., Azeredo Bastos, T.S., Cruz, B.C., Soares, V.E., Teixeira, W.F., de Oliveira, J.S., Fritzen, J.T., Alfieri, A.A., Freire, R.L., Zanetti Lopes, W.D. (2020). Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, *Cryptosporidium* spp. *Eimeria* spp. and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 777-791. doi: 10.1007/s11250-019-02069 9
- Cui, Z., Wang, R., Huang, J., Wang, H., Zhao, J., Luo, N., Li, J., Zhang, Z., Zhang, L. (2014). Cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA15G1 at a dairy farm in Northwestern China. *Parasites & Vectors*, 7, 529.
- Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B., Weinstein, W.M. (1983). Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *The New England Journal of Medicine*, 308, 1252-1257.

- Current, W.L., Reese, N.C. (1986). A comparison of endogeneous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology*, 33(1), 1550-7408.
- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal Protozoology*, 33, 289-296.
- Current, W.L., Garcia, L.S. (1991). Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 325-358. doi:10.1128/cmr.4.3.325
- Curtis, C.R., Erb, H.N., White, M.E. (1988). Descriptive epidemiology of calfhood morbidity and mortality in New York Holstein herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 5, 293-307.
- Çelik, T. (2001). *Malatya İli Merkezinde İshalli Olgularda Bağırsak Protozoonlarının Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Çiçek, M., Yılmaz, H. (2011). İshalli çocuklarda *Cryptosporidium* spp. ve diğer barsak parazitlerinin yaygınlığı. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1), 70-75.
- D'antonio, R.G. (1985). A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, 103, 886-888. doi:10.7326/0003-4819-103-6-886
- Dağ, A. (2010). *Şanlıurfa yöresinde immunsuprese hastalarda Cryptosporidium spp. sıklığının kinyoun asit-fast boyama ve elisa yöntemleri ile araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29, 1269-1287.
- De Waele, V., Speybroeck, N., Berkvens, D., Mulcahy, G., Murphy, T.M. (2010). Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: Use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 96, 143-151. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.06.017
- Değerli, S., Çeliksöz, A., Kalkan, K., Özçelik, S. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves in Sivas. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29, 995-999.

- Del Coco, V.F., Cordoba, M.A., Basualdo, J.A. (2008). *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 158, 31-35. doi:10.1016/j.vetpar.2008.08.018
- Delafosse, A., Chartier, C., Dupuy, M.C., Dumoulin, M., Pors, I., Paraud, C. (2015). *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 406-412. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.01.005
- Delling, C., Dauschies, A. (2022). Literature Review: Coinfection in young ruminant livestock-*Cryptosporidium* spp. and its companions. *Pathogens*, 11, 103. doi: 10.3390/pathogens11010103
- Derinbay Ekici, Ö., Sevinç, F., Coşkun, A., Işık, N., Sevinç, M. (2011). İshalli buzağılarda cryptosporidiosisin yaygınlığı. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 27(2), 123-126.
- Diaz, P., Varcasia, A., Pipia, A.P., Tamponi, C., Sanna, G., Prieto, A., Ruiu, A., Spissu, P., Diez-Banos, P., Morrondo, P., Scala, A. (2018). Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. *Parasitology Research*, 117(10), 3081-3090. doi: 10.1007/s00436-018-6000-x
- Diaz, P., Navarro, E., Remesar, S., Garcia-Dios, D., Martinez-Calabuig, N., Prieto, A., Lopez Lorenzo, G., Manuel Lopez, C., Panadero, R., Fernandez, G., Dşiez-Banos, P., Morrondo, P. (2021). The age related *Cryptosporidium* species distribution in asymptomatic cattle from North-Western Spain. *Animals*, 11, 256. doi: 10.3390/ani11020256
- Doğruman-Al, F. (2011). Cryptosporidiosis. M. Korkmaz, Ü. Ok (Ed.), *Parazitolojide Laboratuvar içinde* (23. bs., ss. 359-364). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.
- Dong, S., Yang, Y., Wang, Y., Yang, D., Yang, Y., Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen, Y., Jiang, Q., Zhou, Y. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: A systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 65(4), 882-889.
- Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M., Bennett, F.L. (1998). Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida. *Preventive Veterinary Medicine*, 34, 31-46.
- Duranti, A., Caccio, S.M., Pozio, E., Di Egidio, A., De Curtis, M., Battisti, A., Scaramozzino,

- P. (2009). Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoonoses Public Health*, 56, 176-182. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01173.x
- Durel, L., Rose, C., Bainbridge, T., Roubert, J., Dressel, K., Bennemann, J. (2017). Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: a non-inferiority study. *Livestock Science*, 204, 52-58. doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.011
- Dutil, L., Fecteau, G., Bouchard, E., Dutremblay, D., Pare, J. (1999). A questionnaire on the health, management, and performance of cow-calf herds in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*, 40, 649-656.
- Egyed, Z., Sreter, T., Szell, Z., Varga, I. (2003). Characterization of *Cryptosporidium* spp. recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111, 103-114.
- Elizondo-Salazar, J., Jayarao, B.M., Heinrichs, A.J. (2010). Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G concentration. *Journal Dairy Science*, 93(3), 961-967.
- El-Khodery, S.A., Osman, S.A. (2008). Cryptosporidiosis in buffalo calves (*Bubalus bubalis*): prevalence and potential risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, 40, 419-426.
- Emre, Z., Alabay, B.M., Fidancı, H., Düzgün, A., Çerçi, H. (1998). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection and its relation to other enteric pathogens (*Escherichia coli* K 99 and rotavirus) in cattle in Ankara, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 22(5), 453-457.
- Ezzaty Mirhashemi, M., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F.E., Mulcahy, G., De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, 151-152, 14-20. doi: 10.1016/j.exppara.2015.01.018
- Falkenberg, U., Krömker, V., Konow, M., Flor, J., Sanftleben, P., Losand, B. (2022). Management of calves in commercial dairy farms in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany and its impact on calf mortality and prevalence of rotavirus and *Cryptosporidium parvum* infections in pre-weaned calves. *Veterinary and Animal Science*, 16, 100243. doi: 10.1016/j.vas.2022.100243

- Farid, A., Tawfk, A., Elsioufy, B., Safwat, G. (2021). In vitro and in vivo anti *Cryptosporidium* and anti-inflammatory effects of aloe vera gel in dexamethasone immunosuppressed mice. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 17, 156-167. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.09.002
- Farid, A., Yousry, M., Safwat, G. (2022). Garlic (*Allium sativum* Linnaeus) improved inflammation and reduced cryptosporidiosis burden in immunocompromised mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 292, 115174.
- Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B.L.P., Blagburn, B. (1989a). Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *Journal Parasitology*, 75, 393-397. doi: 10.2307/3282595
- Fayer, R., Perryman, L.E., Riggs, M.W. (1989b). Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. *Journal Parasitology*, 75(1), 151. doi: 10.2307/3282956
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P. (1990). The general biology of *Cryptosporidium*. J.P. Dubey, C. A. Speer, R. Fayer (Ed.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals* içinde (1. bs., ss. 1-30). Boca Raton: CRC Press.
- Fayer, R., Ellis, W. (1993). Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *Journal of Parasitology*, 79(5), 771-774.
- Fayer, R., Nerad, T. (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied And Environmental Microbiology*, 62, 1431-1433.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 49-56. doi:10.1016/s0020-7519(97)00170-7
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305-1322.
- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*, 87, 1415-1422.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126, 37-56. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.004

- Fayer, R., Santin, M., Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *The Journal of Parasitology*, 91(3), 624-629.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135, 105-112. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.08.003
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, 145, 260-266. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.009
- Fayer, R. (2008). General Biology. R. Fayer, L. Xiao (Ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (2. bs., ss. 1-42). Boca Raton: CRC Press.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156, 191-198.
- Fayer, R., Santin, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164, 192-200.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124, 90-97.
- Fayer, R., Santin, M., Macarisin, D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172, 23-32.
- Featherstone, C.A., Giles, M., Marshall, J.A., Mawhinney, I.C., Holliman, A., Pritchard, G.C. (2010). *Cryptosporidium* species in calves submitted for postmortem examination in England and Wales. *Veterinary Record*, 167, 979-980. doi: 10.1136/vr.c3948
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144, 1-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.001
- Foster, D.M., Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 13-36. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.013
- Frank, N.A., Kaneene, J.B. (1993). Management risk factors associated with calf diarrhea in Michigan dairy herds. *Journal Dairy Science*, 76, 1313-1323.

- Furman-Fratczak, K., Rzasas, A., Stefaniak, T. (2011). The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. *Journal of Dairy Science*, 94, 5536-5543. doi: 10.3168/jds.2010-3253
- Gaafar, M.R., (2012). Efficacy of *Allium sativum* (garlic) against experimental cryptosporidiosis. *Alexandria Journal Medicine*, 48, 59-66.
- Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L. (1994). Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 86-91.
- Garcia, L.S., Shimizu, R.Y. (1997). Evaluation of nine immunoassay kits (Enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 35(6), 1526-1529.
- Garro, C.J., Morici, G.E., Utges, M.E., Tomazic, M.L., Schnittger, L. (2016). Prevalence and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiology and Control*, 1, 36-41. doi: 10.1016/j.parepi.2016.03.008
- Gerace, E., Di Marco Lo Presti, V., Biondo, C. (2019). *Cryptosporidium* infection: epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 9(4), 119-123. doi:10.1556/1886.2019.00019
- Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E. (2007). Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, 134, 1981-1987. doi: 10.1017/S0031182007003460
- Geurden, T., Claerebout, E., Vercruyse, J., Berkvens, D. (2008). A Bayesian evaluation of four immunological assays for the diagnosis of clinical cryptosporidiosis in calves. *The Veterinary Journal*, 176(3), 400-402. doi:10.1016/j.tvjl.2007.03.010
- Gherasim, A., Lebbad, M., Insulander, M., Decraene, V., Kling, A., Hjertqvist, M., Wallensten, A. (2012). Two geographically separated food-borne outbreaks in Sweden linked by an unusual *Cryptosporidium parvum* subtype, October 2010. *Surveillance and Outbreak Reports*, 17(46), pii: 20318.
- Godden, S., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow, J., Wells, S., Chester-Jones, H. (2006). Heattreatment of bovine colostrum. II: Effects of

heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *Journal Dairy Science*, 89, 3476-3483.

- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39. doi:10.1016/j.cvfa.2007.10.005
- Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., Costas, E. (2000). Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1866-1870.
- Gow, S., Waldner, C. (2006). An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. *Veterinary Parasitology*, 137, 50-61. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.071
- Göz, Y., Gül, A., Aydın, A. (2007). Hakkari Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium* spp.'nin Yaygınlığı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 18(2), 37-40.
- Graczyk, T.K., Kacprzak, M., Neczaj, E., Tamang, L., Graczyk, H., Lucy, F.E., Girouard, A. S. (2008). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environmental Research*, 106, 27-33.
- Gu, X., Lin, L., Zheng, X., Zhang, T., Song, X., Wang, J., Li, X., Li, P., Chen, G., Wu, J., Liu, J. (2007). High prevalence of NTDs in Shanxi Province: a combined epidemiological approach. *Birth Defects Research A Clinical and Molecular Teratology*, 79(10), 702-707. doi: 10.1002/bdra.20397. PMID: 17729293
- Guitard, J., Menotti, J., Desveaux, A., Alimardani, P., Porcher, R., Derouin, F., Kapel, N. (2006). Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. *Parasitology Research*, 99, 522-527.
- Güven, E., Avcıoğlu, H., Balkaya, İ., Hayırlı, A., Kar, S., Karaer, Z. (2013). Prevalence of Cryptosporidiosis and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in calves in Erzurum. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 19(6), 969-974. doi: 10.9775/kvfd.2013.9187

- Gül, A., Çiçek, M., Kılınç, Ö. (2008). Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van Province. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, 32(3), 202-204.
- Hailu, M., Asmare, K., Gebremedhin, E.Z., Sheferaw, D., Gizaw, D., Di Marco, V., Vitale, M. (2020). *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in dairy calves in southern Ethiopia. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00155. doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00155
- Hammon, H.M., Fritten, D., Gerbert, C., Koch, C., Dusel, G., Weikard, R., Kühn, C. (2018). Different milk diets have substantial effects on the jejunal mucosal immune system of pre-weaning calves, as demonstrated by whole transcriptome sequencing. *Scientific Reports*, 8, 1693. doi: 10.1038/s41598-018-19954-2
- Hannes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, 140(3), 204-216. doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.024
- Harp, J.A., Goff, J.P. (1995). Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*, 81, 54-57.
- Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A., Jackson, G.J. (1996). Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied And Environmental Microbiology*, 62(8), 2866-2868.
- Harp, J.A., Goff, J.P. (1998). Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *Journal Dairy Science*, 81(1), 289-294.
- Hayes, E.B., Matte, T.D., O'Brien, T.R., McKinley, T.W., Logsdon, G.S., Rose, J.B., Ungar, B.L., Word, D.M., Pinsky, P.F., Cummings, M.L., Long, E.G., Hurwitz, E.S., Juranek, D.D. (1989). Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New England Journal of Medicine*, 320(21), 1372-1376. doi:10.1056/nejm198905253202103
- Hazer, Y. (2007). *Afyonkarahisar Bölgesindeki Risk Gruplarında Cryptosporidium parvum'un Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Hernandez-Castellano, L.E., Almeida, A.M., Castro, N., Argüello, A. (2014). The colostrum proteome, ruminant nutrition and immunity: A review. *Current Protein and Peptide Science*, 15(1), 64-74. doi: 10.2174/1389203715666140221124622

- Hofstra, N., Bouwman, A.F., Beusen, A.H., Medema, G.J. (2013). Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Science Total Environment*, 442, 10-19. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.013
- Holzhausen, I., Lendner, M., Göhring, F., Steinhöfel, I., Dauschies, A. (2019). Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. *Parasitology Research*, 118, 1549-1558.
- House, J.K., Smith, G.F., McGuirk, S.M., Gunn, A.A., Izzo, M. (2015). Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. In B.P. Smith (Eds.), *Large Animal Internal Medicine* (pp. 302-338). Missouri: St. Louis.
- Hulverson, M.A., Choi, R., Arnold, S.L.M., Schaefer, D.A., Hemphill, A., McCloskey, M.C., Betzer, D.P., Müller, J., Vidadala, R.S.R., Whitman, G.R., Rivas, K.L., Barrett, L.K., Hackman, R.C., Love, M.S., McNamara, C.W., Shaughnessy, T.K., Kondratiuk, A., Kurnick, M., Banfor, P.N., Lynch, J.J., Freiberg, G.M., Kemp, D.J., Maly, D.J., Riggs, M.W., Ojo, K.K., Van Voorhis, W.C. (2017). Advances in bumped kinase inhibitors for human and animal therapy for cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology*, 47(12), 753-763. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.08.006
- Hyperdrug. (2022). <https://hyperdrug.co.uk/parofor-crypto-140-mg-ml-oral-solution/> adresinden erişildi.
- Ibrahim, M., Abdel-Ghany, A., Abdel-Latef, G., Abdel-Aziz, S., Aboelhadid, S. (2016). Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle buffaloes, and humans in Egypt. *Parasitology Research*, 115, 2439-2448.
- Imre, M., Ilie, M., Imre, K., Darabuş, G. (2015). *Risk factors associated with Cryptosporidium infection in diarrheic pre-weaned calves*. XVII International Congress on Animal Hygiene, Slovakiya.
- Innes, E.A., Bartley, P.M., Rocchi, M., Benavidas-Silvan, J., Burrells, A., Hotchkiss, E., Chianini, F., Canton, G., Katzer, F. (2011) Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Veterinary Parasitology*, 188, 155-163.
- Innes, E.A., Chalmers, R.M., Wells, B., Pawlowic, M.C. (2020). A one health approach to tackle cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 36(3), 290-303. doi: 10.1016/j.pt.2019.12.016

- Izzo, M.M., Kirkland, P.D., Mohler, V.L., Perkins, N.R., Gunn, A.A., Housea, J.K. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*, 89, 167-173.
- İnci, A. (2016). Sığırlarda Cryptosporidiosis. M.A. Özcel (Ed.), *Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları* içinde (2.bs., ss. 136-144). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını.
- Jager, M., Gauly, M., Bauer, C., Failing, K., Erhardt, G., Zahner, H. (2005). Endoparasites in calves of beef cattle herds: Management systems dependent and genetic influences. *Veterinary Parasitology*, 131(3-4), 173-191. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.014
- Jang, D.H., Cho, H.C., Shin, S.U., Kim, E.M., Park, Y.J., Hwang, S., Park, J., Cho, K.S. (2021). Prevalence and distribution pattern of *Cryptosporidium* spp. among pre weaned diarrheic calves in the Republic of Korea. *Plos One*, 16(11), e0259824. doi: 10.1371/journal.pone.0259824
- Jarvie, B.D., Trotz-Williams, L.A., McKnight, D.R., Leslie, K.E. Wallace, M.M., Todd, C.G., Sharpe, P.H., Peregrine, A.S. (2005). Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. *Journal Dairy Science*, 88(5), 1801-1806.
- Jenkins, M.C., Trout, J., Fayer, R. (1998). Development and application of an improved semiquantitative technique for detecting low-level *Cryptosporidium parvum* infections in mouse tissue using polymerase chain reaction. *Journal Parasitology*, 84, 182-186.
- Jenkins, M.C. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 101, 291-310.
- Jenkins, M., Trout, J., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R. (2003) Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research*, 89, 1-5. doi: 10.1007/s00436-002-0720-6
- Jensen, M.B., Budde, M. (2006). The effects of milk feeding method and group size on feeding behavior and cross-sucking in group-housed dairy calves. *Journal Dairy Science*, 89, 4778-4783.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E., Gasser, R.B. (2008). *Cryptosporidium*-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304-317. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.02

- Jittapalapong, S., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Siripanth, C., Stich, R.W. (2006). Prevalence of *Cryptosporidium* among dairy cows in Thailand. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1081(1), 328-335. doi:10.1196/Annals.1373.045
- Jirku, M., Valigurova, A., Koudela, B., Krí-izek, J., Modry, D., Slapeta, J. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, 55, 81-94.
- Joachim, A., Krull, T., Schwarzkopf, J., Dauschies, A. (2003). Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 112, 277-288. doi:10.1016/S0304-4017(03)00006-2
- Joce, R.E., Bruce, J., Kiely, D., Noah, N.D., Dempster, W.B., Stalker, R., Gumsley, P., Chapman, P.A., Norman, P., Watkins, J., Smith, H.V., Price, T.J., Watts, D. (1991). An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. *Epidemiology Infection*, 107, 497-508.
- Joute, J.R., Gill, J.P.S., Singh, B.B. (2014). Prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves in Punjab (India). *Journal Parasitology Disease*, 40, 745-749. doi: 10.1007/s12639-014-0571-y
- Kaçar, Y., Baykal, A.T., Aydın, L., Batmaz, H. (2022). Evaluation of the efficacy of cow colostrum in the treatment and its effect on serum proteomes in calves with cryptosporidiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 248, 110429.
- Kasari, T.R. (1999). Metabolic acidosis in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 15, 473-486.
- Keidel, J., Dauschies, A. (2013). Integration of halofuginone lactate treatment and disinfection with p-chloro-m-cresol to control natural cryptosporidiosis in calves. *Veterinary Parasitology*, 196, 321-326.
- Khalil, S., Mirdha, B. R., Paul, J., Panda, A., Makharia, G., Chaudhry, R., Bhatnagar, S. (2016). Development and evaluation of molecular methods for detection of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples. *Experimental Parasitology*, 170, 207-213. doi:10.1016/j.exppara.2016.10.001
- Khan, A., Zaman, T. (2007). Effects of rehydration solution on hematological and biochemical parameters in induced buffalo neonatal calf diarrhea. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 957-960.

- Klein, P. (2008). Preventive and therapeutic efficacy of halofuginone-lactate against *Cryptosporidium parvum* in spontaneously infected calves: A centralised, randomised, double blind, placebo-controlled study. *The Veterinary Journal*, 177(3), 429-431.
- Klein, P., Kleinova, T., Volek, Z., Simunek, J. (2008). Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 152(1), 53-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.11.020
- Klein, D., Kern, A., Lapan, G., Benetka, V., Möstl, K., Hassl, A., Baumgartner, W. (2009). Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in faecal samples of calves. *The Veterinary Journal*, 182, 484-486.
- Kocaoğlu Güçlü, B., Kara, K. (2009). Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. Probiyotik, prebiyotik ve enzim. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 65-75.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382, 209-222.
- Köreng, B. (2011). *Entamoeba histolytica/entamoeba dispar, Giardia lamblia ve Cryptosporidium spp. tanısında mikroskopi, triage ve elisa yöntemlerinin karşılaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kumar, B., Shekhar, P., Kumar, N.A. (2010). Clinical study on neonatal calf diarrhea. *Intas Polivet*, 11, 233-235.
- Kvac, M., Vitovec, J. (2003). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine*, 50, 451-457.
- Kvac, M., Kouba, M., Vitovec, J. (2006). Age-related and housing dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 137, 202-209. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.027
- Kvac, M., Hromadova, N., Kvetonova, D., Rost, M., Sak, B. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech

Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, 177, 378-382. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.048

- Lallemand, M., Villeneuve, A., Belda, J., Dubreuil, P. (2006). Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinatate in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. *Veterinary Record*, 159, 672-676.
- Langel, S.N., Wark, W.A., Garst, S.N., James, R.E., McGilliard, M.L., Petersson-Wolfe, C.S. (2016). Effect of feeding whole compared with cell-free colostrum on calf immune status: vaccination response. *Journal of Dairy Science*, 99, 3979-3394. doi: 10.3168/jds.2015-9892
- Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C. (2007). Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, 134, 339-350. doi.org/10.1017/S0031182006001533
- Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., Kagnoff, M.F. (1999). Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, 2, 141-148.
- Lee, S.H., VanBik, D., Kim, H.Y., Lee, Y.R., Kim, J.W., Chae, M., Oh, S.I., Goo, Y.K., Kwon, O.D., Kwak, D. (2016). Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. in young calves with diarrhea in Korea. *Veterinary Parasitology*, 229, 81-89. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.019
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R. (2000). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Veterinary Parasitology*, 89(1), 1-9. doi:10.1016/s0304 4017(99)00230-7
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R. (2001). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Veterinary Record*, 148, 108-112.
- Leng, X., Mosier, D.A., Oberst, R.D. (1996). Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 62(1-2), 1-7.
- Levine, N.D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, 66, 830-834.
- Li, N., Wang, R., Cai, M., Jiang, W., Feng, Y., Xiao, L. (2019). Outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA19G1 in neonatal calves on a dairy farm in

China. *International Journal for Parasitology*, 49, 569-577.
doi:10.1016/j.ijpara.2019.02.006

- Lichtmannsperger, K., Harl, J., Freudenthaler, K., Hinney, B., Wittek, T., Joachim, A. (2020). *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium ryanae*, and *Cryptosporidium bovis* in samples from calves in Austria. *Parasitology Research*, 119, 4291-4295. doi: 10.1007/s00436-020-06928-5
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 91-95.
- Lise, A., Trotz-Williams, S., Wayne, M., Leslie, K.E., Dufeld, T., Nydam, D.V., Peregrine, S. (2007). Calf level risk factors for neonatal diarrhoea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82, 12-28.
- Lombardelli, J.A., Tomazic, M.L., Schnittger, L., Tiranti, K.I. (2019). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in Central Argentina. *Parasitology Research*, 118, 2079-2086.
- Lopez, J.W., Allen, S.D., Mitchell, J., Quinn, M. (1988). Rotavirus and *Cryptosporidium* shedding in dairy calf feces and its relationship to colostrum immune transfer. *Journal of Dairy Science*, 71, 1288-1294. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79685-X
- Lorenz, I., Mee, J.F., Earley, B., More, S.J. (2011a). Calf health from birth to weaning I. General aspects of disease prevention. *Irish Veterinary Journal*, 64(10), 1-8.
- Lorenz, I., Fagan, J., More, S.J. (2011b). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal*, 64, 9.
- Lorenzo-Lorenzo, M.J., Ares-Mazas, E., Villacorta Martinez de Maturana, I. (1993). Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, 47, 9-15.
- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L., Vigre, H. (2006). *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 48-59. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.032
- Maldonado-Camargo, S., Atwill, E., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Herrera-Alonso, L.C. (1998). Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in

- Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 36(2), 95-107. doi:10.1016/s0167-5877(98)00084-1
- Mann, E.D., Sekla, L.H., Nayar, G.P.S., Koschik, C. (1986). Infection with *Cryptosporidium* spp. in human and cattle in Manitoba. *Canadian Journal Veterinary Research*, 50, 174-178.
- Manyazewal, A., Francesca, S., Pal, M., Gezahegn, M., Tesfaye, M., Lucy, M., Teklu, W., Getachew, T. (2018). Prevalence, risk factors and molecular characterization of *Cryptosporidium* infection in cattle in Addis Ababa and its environs, Ethiopia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 13, 79-84.
- Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y., Sterling, C.R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), 67-85. doi:10.1128/cmr.10.1.67
- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P. (1987). *Veterinary epidemiology principles and methods*. U.S: Iowa State University Press.
- Matoock, M.Y., El-Bably, M.A., El-Bahy, M.M. (2005). Management practices for minimizing environmental risk factors associated with *Cryptosporidium* in dairy calves. *Veterinary Medical Journal Giza*, 53(2), 565-576.
- McGuirk, S.M. (2003, September 15-17). *Solving calf morbidity and mortality problems*. 36th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners, Columbus.
- McGuirk, S.M., Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 593-603. doi: 10.1016/j.cvfa.2004.06.005
- Mee, J.F. (2013). Why do so many calves die on modern dairy farms and what can we do about calf welfare in the future? *Animals (Basel)*, 3, 1036-1057. doi: 10.3390/ani3041036
- Meganck, V., Hofack, G., Opsomer, G. (2014). Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 75.
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J.M., Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 147, 47-50.

- Mickelsen, W.D., Evermann, J.F. (1994). In utero infection responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows. *The Veterinary Clinics of North America- Food Animal Practice*, 10(1), 1-14.
- Millard, P.S., Gensheimer, K.F., Addiss, D.G., Sosin, D.M., Beckett, G.A., HouckJankoski, A., Hudson, A. (1994). An outbreak of cryptosporidiosis from freshpressed apple cider. *The Journal of the American Medical Association*, 272, 1592-1596.
- Mohammed, H.O., Wade, S.E., Schaaf, S. (1999). Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 83, 1-13.
- Molloy, A.M., Kirke, P.N., Troendle, J.F., Burke, H., Sutton, M., Brody, L.C., Scott, C.M., Mills, J.L. (2009). Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification. *Pediatrics*, 123(3), 917-23. doi: 10.1542/peds.2008-1173
- Moore, D.A., Atwill, E.C., Kirk, J.H., Brahmhatt, D., Alonso, L.H., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D. (2003). Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 223(6), 839-845.
- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R.C., Ndiritu W, Lal, A., Moore, A., Deplazes, P. (2000). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1180-1183.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A., Xiao, L. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 433-440.
- Muhid, A., Robertson, I., Ng, J., Ryan, U. (2011). Prevalence of and management factor contributing to *Cryptosporidium* spp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Experimental Parasitology*, 127, 534-538. doi: 10.1016/j.exppara.2010.10.015
- Naciri, M., Mancassola, R., Yvorb, P., Peeters, J.E. (1993). The effect of halofuginone lactate

- on experimental *Cryptosporidium parvum* in calves. *Veterinary Parasitology*, 45, 199-207.
- Naciri, M., Paul Lefay, M., Mancassola, R., Poirier, P., Chermette, R. (1999). Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Veterinary Parasitology*, 85, 245-257.
- NAHMS (National Animal Health Monitoring Service). (2014). *Dairy 2014. Part 1: Reference of Dairy Health and Management in the United States*. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy17/morb-mort-us-prewean-dairy-heifer-nahms-2014.pdf adresinden erişildi.
- Nasir, A., Avais, M., Khan, M.S., Khan, J.A., Hameed, S., Reichel, M.P. (2013). Treating *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *The Journal of parasitology*, 99(4), 715-717.
- Nichols, G. (2008). Epidemiology. R. Fayer, L. Xiao (Ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* içinde (2. bs., ss. 79-118). Boca Raton: CRC Press.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4), 592-598. doi:10.1016/s0016-5085(76)80503-3
- Nord, J., Ma, P., DiJohn, D., Tzipori, S., Tacket, C.O. (1990). Treatment with bovine hyperimmune colostrum of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients. *AIDS, (London, England)*, 4(6), 581-584. doi: 10.1097/00002030-199006000-00015
- Nydam, D.V., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Mohammed, H.O. (2001). Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 1612-1615.
- O'Donoghue, P.J. (1995). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2), 139-195.
- O'Handley, R.M., Olson, M.E.(2006). Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 22, 623-643.
- O'Handley, R.M. (2007). *Cryptosporidium parvum* infection in cattle: are current perceptions accurate? *Trends In Parasitology*, 23(10), 477- 480. doi: 10.1016/j.pt.2007.08.005

- O'Hara, S.P., Chen, X.M. (2011). The cell biology of *cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13(8-9), 721-730. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.008
- Ollivett, T.L., Nydam, D.V., Bowman, D.D., Zambriski, J.A., Bellosa, M.L., Linden, T.C., Divers, T.J. (2009). Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1643-1648.
- Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20(4), 185-191.
- Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.K., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T., Uga, S. (2001). Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(9), 3832-3836.
- Onrat, S.T., Seyman, H., Konuk, M. (2009). Incidence of neural tube defects in Afyonkarahisar, Western Turkey. *Genetics Molecular Research*, 8(1), 154-161.
- Operario, D.J., Bristol, L.S., Liotta, J., Nydam, D.V., Houpt, E.R. (2015). Correlation between diarrhea severity and oocyst count via quantitative PCR or fluorescence microscopy in experimental cryptosporidiosis in calves. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 45- 49. doi: 10.4269/ajtmh.14-0488
- Osteras, O., Gjestvang, M.S., Vatn, S., Solverod, L. (2007). Perinatal death in production animals in the Nordic countries-incidence and costs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 14-21.
- Ouakli, N., Belkhir, A., De Lucio, A., Köster, P.C., Djoudi, M., Dadda, A., Carmena, D. (2018). *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports*, 12(1), 78-84. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.02.005
- Özkan, C., Altuğ, N., Yüksek, N., Kaya, A., Akgül, Y. (2011). Assessment of electrocardiographic findings, serum nitric oxide, cardiac troponins and some enzymes in calves with hyperkalemia related to neonatal diarrhoea. *Revue Medecine Veterinaire*, 162, 171-176.
- Özkan, F. (2021). *İshalli insan dışkılarında Cryptosporidium spp. (Tyzzer, 1907) türlerinin moleküler teşhisi ve tiplendirilmesi*. Doktora Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kütahya.

- Pakkanen, R., Aalto, J. (1997). Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.
- Pancieria, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M. (1971). Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology*, 8, 479-484.
- Paraud, C., Chartier, C. (2012). Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 103(1), 93-97. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.10.023
- Patel, S., Diaz-Pedraza, S., McLauchlin, J. (1999). The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer Wall protein (COWP) gene. *International Journal for Parasitology*, 29, 1241-1247.
- Pavlassek, I., Ryan, U. (2007). The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology*, 144, 349-352.
- Pavlassek, I., Ryan, U. (2008). *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Experimental Parasitology*, 118(3), 434-437.
- Pedraza-Diaz, S., Ortega-Mora, L.M., Carrion, B.A., Navarro, V., Gomez-Bautista, M. (2009). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*, 160, 204-210.
- Perez-Cordon, G., Robinson, G., Nader, J., Chalmers, R. M. (2016). Discovery of new variable number tandem repeat loci in multiple *Cryptosporidium parvum* genomes for the surveillance and investigation of outbreaks of cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 169, 119-128. doi:10.1016/j.exppara.2016.08.003
- Perryman, L.E., Kapil, S J., Jones, M.L., Hunt, E.L. (1999). Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 17(17), 2142-2149. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00477-0
- Petersen, C., Gut, J., Doyle, P.S., Crabb, J.H., Nelson, R.G., Leech, J.H. (1992). Characterization of a > 900,000-M(r) *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. *Infection Immunity*, 60, 5132- 5138.
- Pines, M., Nagler, A. (1998). Halofuginone: A novel antifibrotic therapy. *General Pharmacology*, 30(4), 445-450.

- Plutzer, J., Karanis, P. (2007). Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 146, 357-362.
- Power, M.L., Ryan, U.M. (2008). A New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *The Journal of Parasitology*, 94(5), 1114-1117.
- Quigley, J.D., Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgieter, L.N.D., Reinemeyer, C.R., Rohrbach, B. W., Dowlen, H.H., Lamar, K.C. (1994). Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 3124-3131. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(94)77255-6
- Quigley, J.D., Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgieter, L.N.D., Reinemerger, C.R., Rohrbach, B. W., Dowlen, H.H., Lamnr, K.C. (1995). Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 78, 893-901.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C. (1996). Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 66, 139-146.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses* (10th ed.). London: Saunders Elsevier.
- Ralph, S.A., Van Dooren, G.C., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S., McFadden, G.I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 203-216.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S. (2004). A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6(8), 773-785. doi:10.1016/j.micinf.2004.02.021
- Ranjbar, R., Fattahi, R. (2017). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in calves under one year old in Ilam county (Iran), from March 2014 to February 2015. *Electronic Physician*, 9(6), 4631-4635. doi: 10.19082/4631
- Razakandrainibe, R., Diawara, E.H.I., Costa, D., Le Goff, L., Lemeteil, D., Ballet, J.J., Favennec, L. (2018). Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic

and symptomatic calves in France. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), e0006355. doi: 10.1371/journal.pntd.0006355

- Reif, J.S., Wimmer, L., Simith, J.A., Dargatz, D.A., Cheney, J.M. (1989). Human cryptosporidiosis with an epizootic in calves. *American Journal of Public Health*, 79, 1528-1530.
- Reimus, K., Alvasen, K., Emanuelson, U., Viltrop, A., Motus, K. (2020). Herd-level risk factors for cow and calf on-farm mortality in Estonian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62, 15.
- Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K. J. (1986). Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Veterinary Record*, 119, 34-39.
- Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Veterinary Parasitology*, 197, 7- 12. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.001
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V. (1992). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied And Environmental Microbiology*, 58(11), 3494-3500.
- Robertson, L.J., Björkman, C., Axen, C., Fayer, R. (2014). Cryptosporidiosis in farmed animals. S.M., Caccio, G. Widmer (Ed.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease* içinde (ss. 149-235). Wien: Springer-Verlag.
- Robinson, G., P´erez-Cordon, G., Hamilton, C., Katzer, F., Connelly, L., Alexander, C.L., Chalmers, R.M. (2022). Validation of a multilocus genotyping scheme for subtyping *Cryptosporidium parvum* for epidemiological purposes. *Food and Waterborne Parasitology*, 27, e00151. doi: 10.1016/j.fawpar.2022.e00151
- Rohela, M., Lim, Y.A., Jamaiah, I., Khadijah, P.Y., Laang, S.T., Mohd Nazri, M.H., Nurulhuda, Z. (2005). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in Wrinkled Hornbill and other birds in the Kuala Lumpur National Zoo. *The Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 36, 34-40.
- Rossini, K.L. (2004). *Effects of calfhood respiratory and digestive disease on calfhood morbidity and first lactation production and survival rates*. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.

- Rossle, N.F., Latif, B. (2013). Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11), 916-924. doi:10.1016/s2221-1691(13)60179-3
- Roy, S.L., DeLong, S.M., Stenzel, S.A., Shiferaw, B., Roberts, J.M., Khalakdina, A., Beach, M.J. (2004). Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 2944-2951. doi: 10.1128/JCM.42.7.2944-2951.2004
- Rueckert, S., Betts, E.L., Tsaousis, A.D. (2019). The symbiotic spectrum: where do the gregarines fit? *Trends Parasitology*, 35(9), 687-694.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlasek, I. (2003). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4302-4307.
- Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C.A., Xiao, L. (2004). *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *The Journal of Parasitology*, 90, 769-773.
- Ryan, U.M., Power, M., Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55, 22-26.
- Ryan, U.M., Feng, Y., Fayer, R., Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*, 51, 1099-1119. doi: 10.1016/j.ijpara.2021.08.007
- Sağlam, T. (2018). *Denizli il merkezi'nde tarımsal sulama ve içme suyu kaynaklarında bulunan bazı tek hücreli (protozoa) parazitler üzerine bir araştırma*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Sakarya, Y., Kar, S., Tanyuksel, M., Karaer, Z., Babur, C., Vatansever, Z. (2010). Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through Nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(6), 977-980. doi: 10.9775/kvfd.2010.2140
- Salmasi, G., Grady, R., Jones, J., McDonald, S.D. (2010). Environmental tobacco smoke exposure and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analyses. *Acta*

Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 89(4), 423-441. doi: 10.3109/00016340903505748

- Sanford, S.E., Josephson, G.K. (1982). Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 23, 343-347.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122, 103-117.
- Santin, M., Trout, J.M. (2008). Livestock. R. Fayer, L. Xiao (Ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* içinde (2. bs., ss. 451-483). Boca Raton: CRC Press.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155, 15-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.018
- Santin, M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61, 1-10. doi: 10.1080/00480169.2012.731681
- Santman-Berends, I.M.G.A., Schukken, Y.H., van Schaik, G. (2019). Quantifying calf mortality on dairy farms: Challenges and solutions. *Journal of Dairy Science*, 102, 6404-6417. doi: 10.3168/jds.2019-16381
- Sarıkaya, R. (2004). *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında yeni bir yaklaşım: Ribotiplendirme. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi*, 5(2), 13-26.
- Sari, B., Arslan, M.O., Gıcık, Y., Kara, M., Taşçı, G.T. (2009). The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 819-826.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the neglected diseases initiative. *Trends Parasitology*, 22, 203-208.
- Schaefer, D.A., Betzer, D.P., Smith, K.D., Millman, Z.G., Michalski, H.C., Menchaca, S.E., Zambriski, J.A., Ojo, K.K., Hulverson, M.A., Arnold, S.L., Rivas, K.L., Vidadala, R.S., Huang, W., Barrett, L.K., Maly, D.J., Fan, E., Van Voorhis, W.C., Riggs, M.W. (2016). Novel bumped kinase inhibitors are safe and effective therapeutics in the calf clinical model for cryptosporidiosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 214, 1856-1864.

- Schnyder, M., Kohler, L., Hemphill, A., Deplazes, P. (2009). Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Veterinary parasitology*, 160(1), 149-154.
- Schumann, F.J., Townsco, H.G.G., Naylor, J.M. (1990). Risk factors for mortality from diarrhoea in beef calves in Alberta. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54, 336-372.
- Scorza, V., Tangtrongsup, S. (2010). Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 163-169.
- Sears, C.L., Guerrant, R.L. (1994). Cryptosporidiosis: the complexity of intestinal pathophysiology. *Gastroenterology*, 106(1), 252-254.
- Sears, C.L., Kirkpatrick, B.D. (2001). Cryptosporidiosis and Isosporiasis. S.H. Gillespie, R.D. Pearson (Ed.), *Principles and Practice of Clinical Parasitology* içinde (1.bs., ss. 139-164). New York: John Wiley & Sons.
- Sevinç, F. (2004). Ruminantlarda cryptosporidiosis. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 20(4), 79-84.
- Sevinç, F., Dik, B. (2010). Cryptosporidiidae. N. Dumanlı, Z. Karaer (Ed.), *Veteriner Protozooloji* içinde (1. Bs., ss. 155-161). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Sevindik, E., Abacı, Z.T. (2013). Nested PCR ve Kullanım Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 22-26.
- Shirley, D.A., Moonah, S.N., Kotloff, K.L. (2012). Burden of disease from cryptosporidiosis. *Current Opinion Infectious Diseases*, 25(5), 555-563. doi:10.1097/QCO.0b013e328357e569
- Sivula, N.J., Ames, T.R., Marsh, W.E., Werdin, R.E. (1996). Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 27, 155-171.
- Silverlas, C., Emanuel, U., de Verdier, K., Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 90(3-4), 242-253. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.04.006

- Silverlas, C., Naslund, K., Björkman, C., Mattsson, J.G. (2010a). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Veterinary Parasitology*, 169, 289-295.
- Silverlas, C., de Verdier, K., Emanuelson, U., Mattsson, J.G., Björkman, C. (2010b). *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitology Research*, 107, 1435-1444. doi: 10.1007/s00436-010-2020-x
- Silverlas, C., Blanco-Penedo, I. (2013). *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiology and Infection*, 141, 529-539. doi: 10.1017/S0950268812000830
- Singh, B.B., Sharma, R., Kumar, H., Banga, H.S., Aulakh, R.S., Gill, J.P.S., Sharma, J.K. (2006). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 140(1), 162-165. doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.029
- Sischo, W.M., Atwill, E.R., Lanyon, L.E., George, J. (2000). Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 43(4), 253-267. doi: 10.1016/S0167 5877%2899%2900107-5
- Sivula, N.J., Ames, T.R., Marsh, W.E., Werdin, R.E. (1996). Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 27, 155-171.
- Smith, D.R. (2012). Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(3), 465-481.
- Smith, H. (2008). Diagnostics. R. Fayer, L. Xiao (Ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* içinde (2. bs., ss.173-208). Boca Raton: CRC Press.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., Grimason, A.M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21, 133-142.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Tait, A., McLauchlin, J., Thompson, R.C. (2006). Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infection in humans. *Trends Parasitology*, 22, 160-167.
- Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Cheney, T., Giles, M. (2014). Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of

- potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, 204, 111-119.
- Snelling, W.J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G., Lowery, C.J., Moore, J.E., Rao, J.R., Smyth, S., Millar, B.C., Rooney, P.J., Matsuda, M., Kenny, F., Xu, J., Dooley, J.S. (2007). Cryptosporidiosis in developing countries. *Journal Infect Developing Countries*, 1(3), 242-256.
- Sponseller, J.K., Griffiths, J.K., Tzipori, S. (2014). The evolution of respiratory cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 575-586.
- Starkey, S.R., Kimber, K.R., Wade, S.E., Schaaf, S.L., White, M.E., Mohammed, H.O. (2006). Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection on dairy farms in a new york state watershed. *Journal Dairy Science*, 89, 4229-4236.
- Starkey, S.R., Zeigler, P.E., Wade, S.E., Schaaf, S.L., Mohammed, H.O. (2007). Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York State. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229, 1623-1626.
- Starling, C.R., Arrowood, M.J. (1993). *Cryptosporidia*. J.P. Kreier (Ed.), *Parasitic Protozoa* içinde, (2. bs., ss. 159-224). United Kingdom: Academic Press.
- Szonyi, B., Bordonaro, R., Wade, S.E., Mohammed, H.O. (2010). Seasonal variation in the prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* infection in dairy cattle in the New York City Watershed. *Parasitology Research*, 107, 317-325.
- Szonyi, B., Chang, Y.F., Wade, S.E., Mohammed, H.O. (2012). Evaluation of factors associated with the risk of infection with *Cryptosporidium parvum* in dairy calves. *American Journal of Veterinary Research*, 73(1), 76-85. doi: 10.2460/ajvr.73.1.76
- Şahal, M., Terzi, O.S., Ceylan, E., Kara, E. (2018). Buzağı İshalleri ve Korunma Yöntemleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58, 41-49.
- Şimşek, A.T., İnci, A., Yıldırım, A., Çiloğlu, A., Bişkin, Z., Düzlü, Ö. (2012). Nevşehir yöresindeki yeni doğan ishalleri buzağılarda cryptosporidiosis'in real time PCR ve Nested PCR yöntemleri ile saptanması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(2), 79-87.

- Şimşir, H. (2006). *Cryptosporidium parvum* Genotiplerinin İshalli Çocuklarda Çeşitli Yöntemlerle Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Taxonomicon. (2022). <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=660&src=0>, 2022 adresinden erişildi.
- Thomas-Lopez, D., Müller, L., Vestergaard, L.S., Christoffersen, M., Andersen, A.M., Jokelainen, P., Agerholm, J.S., Stensvold, C.R. (2020). Veterinary students have a higher risk of contracting cryptosporidiosis when calves with high fecal *cryptosporidium* loads are used for fetotomy exercises. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19), e01250. doi: /10.1128/AEM.01250-20
- Thompson, H.P., Dooley, J.S.G., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C.J., Moore, J.E., Xiao, L. (2007). Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, 100(3), 619-624. doi:10.1007/s00436-006 0305-x
- Thompson, M.D., Cole, D.E., Ray, J.G. (2009). Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(2), 697S-701S. doi: 10.3945/ajcn.2008.26947B
- Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijjawi, N.S. (2005). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59, 77-158. doi: 10.1016/S0065-308X(05)59002-X
- Thompson, R.C.A., Palmer, C.S., O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 177(1), 18-25. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.022
- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott, N.A., Morrison, L.J., Innes, E.A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: Impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48(1), 42. doi: 10.1186/s13567-017-0447-0
- Thomson, S., Innes, E.A., Jonsson, N.N., Katzer, F. (2019). Shedding of *Cryptosporidium* in calves and dams: evidence of re-infection and shedding of different gp60 subtypes. *Parasitology*, 1-10. doi: 10.1017/S0031182019000829.
- Tiranti, K., Larriestra, A., Vissio, C., Picco, N., Alustiza, F., Degioanni, A., Vivas, A. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of

shedding in dairy calves from Cordoba, Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 20(2), 140-147.

- Tong, V.T., Dietz, P.M, Rolle, I.V, Kennedy, S.M., Thomas, W., England, L.J. (2015). Clinical interventions to reduce secondhand smoke exposure among pregnant women: a systematic review. *Tobacco Control*, 24(3), 217-223. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2013-051200
- Toombs, R.E., Wikse, S.E., Kasari, T.R. (1994). The incidence, causes, and financial impact of perinatal mortality in north american beef herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(1), 137-146. doi:10.1016/s0749-0720(15)30594-6
- Topal, B., Batmaz, H. (2020). Buzağılarda farklı pasif transfer durumlarının sütten kesim öncesi ishal durumları ile vücut ağırlıkları arasındaki ilişki. *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 39(2), 93-100. doi: 10.30782/jrv.m.753404
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Martin, D., Duffield, T., Leslie, K.E., Nydam, D.V., Jamieson, F., Peregrine, A.S. (2005a). Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Veterinary Parasitology*, 134, 15-23. doi:10.1016/j.vetpar.2005.06.023
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E., Peregrine, A.S. (2005b). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Canadian Veterinary Journal*, 46, 349-351.
- Trotz-Williams, L.A., Wayne Martin, S., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82(1-2), 12-28. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.05.003
- Trotz-Williams, L.A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. (2008). Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Preventive Veterinary Medicine*, 83(1), 11-23. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.03.001
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T., Leslie, K.E. (2011). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 168, 509. doi: 10.1136/vr.d1492

- Turgay, N. (2011). Özel Boyama Yöntemleri. M. Korkmaz, Ü. Z. Ok (Ed.), *Parazitolojide Laboratuvar içinde* (23. bs., ss. 37-40). İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği.
- Tyzzer, E.E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Experimental Biology and Medicine*, 5(1), 12-13.
- Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I., Gray, E.W. (1980). *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infection Immunity*, 30(3), 884-886.
- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D., Campbell, I. (1983) Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record*, 112, 116-120.
- Tzipori, S., Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4, 1047-1058.
- United States Department of Agriculture. (1994). *Dairy heifer morbidity, mortality, and health management focusing on preweaned heifers*. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/ndhep/NDHEP_dr_Report.pdf adresinden erişildi.
- United States Department of Agriculture. (2008). Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991-2007 (N481.0308). USDA.
- Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Koprak, C.A., Adams, A.E., Earleywine, T.J., Olson, J.D., Garry, F.B. (2017). Preweaned heifer management on US dairy operations: Part I. Descriptive characteristics of preweaned heifer raising practices. *Journal Dairy Science*, 101, 1-17. doi: 10.3168/jds.2017-14010
- Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Adams, A.E., Koprak, C.A., Santin, M. (2018). Preweaned heifer management on US dairy operations: part III. Factors associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* in preweaned dairy heifer calves. *Journal Dairy Science*, 101(10), 9199- 9213. doi: 10.3168/jds.2017-14060
- USDA (United States Department of Agriculture). (2008). *Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry, 1991- 2007*. USA: USDA-APHIS-VS, CEAH, Fort Collins, 57-61.
- Van Metre, D.C., Tennant, B.C, Whitlock, R.H. (2008). Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. T.J. Divers, S.F. Peek (Ed.), *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle içinde* (2. bs., ss. 217-219). Missouri: St. Louis.

- Venu, R., Latha, B.R., Abdul Basith, S., Sreekumar, C., Dhinakar Raj, G., Raman, M. (2013). Factors influencing the prevalence of *Cryptosporidium* infection in south Indian dairy calves. *Journal Parasitic Diseases*, 37(2), 168-172.
- Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H. (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *Journal Protozoology*, 18, 243-247.
- Vildu, D.A., Mötus, K. (2022). Implementation of a pre-calving vaccination programme against rotavirus, coronavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (F5) and association with dairy calf survival. *Biomed Central*, 18, 59. doi: 10.1186/s12917-022-03154-2
- Villacorta, I., Ares-Mazas, E., Lorenzo, M.J. (1991). *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary Parasitology*, 38, 249-252.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L. (2000). Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*)'in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Veterinary Parasitology*, 93, 1-11.
- Waltner-Toews, D., Martin, S., Meek, A. (1986a). The effect of early calthood health status on survivorship and age at first calving. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50, 314.
- Waltner-Toews, D., Martin, S.W., Meek, A.H. (1986b). Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. II. Age and seasonal patterns. *Preventive Veterinary Medicine*, 4, 125-135.
- Wang, M., Wang, Z.P., Gao, L.J., Yang, H., Zhao, Z.T. (2015). Maternal consumption of non staple food in the first trimester and risk of neural tube defects in offspring. *Nutrients*, 7(5), 3067-3077. doi: 10.3390/nu7053067
- Wang, R., Wang, H., Sun, Y., Zhang, L., Jian, F., Qi, M., Ning, C. (2011). Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 1077-1082.
- Wang, R., Zhao, G., Gong, Y., Zhang, L. (2017). Advances and perspectives on the epidemiology of bovine *Cryptosporidium* in China in the Past 30 years. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1823. doi: 10.3389/fmicb.2017.01823

- Watarai, S., Koiwa, T., Koiwa, M. (2008). Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. *Journay Dairy Science*, 91, 1458-1463. doi:10.3168/jds.2007-0406
- Weber, S.E., Lippuner, C., Corti, S., Deplazes, P., Hassig, M. (2016). Clinical epidemiology of cryptosporidiosis in calves. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 158(5), 341-350 doi: 10.17236/ sat00062
- Wegayehu, T., Karim, R., Anberber, M., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G. (2016). Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species in dairy calves in Central Ethiopia. *Plos One*, 11(5), e0154647. doi:10.1371/journal.pone.0154647
- Wegayehu, T., Karim, M.R., Li, J., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G. (2017). Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* in lambs in Oromia special zone, central Ethiopia. *BioMed Central Veterinary Research*, 13, 22.
- Weir, S.C., Pokorny, N.J., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H. (2002). Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2576-2579.
- Wells, B., Shaw, H., Hotchkiss, E., Gilray, J., Ayton, R., Green, J., Katzer, F., Wells, A., Innes, E. (2015). Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. *Parasites and Vectors*, 8, 66. doi: 10.1186%2Fs13071-015-0684-x
- Wells, S.J., Dargatz, D.A., Ott, S.L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29, 9-19.
- Wells, S.J., Garber, L.P., Hill, G.W. (1997). Health status of preweaned dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29, 185-199.
- Weyl-Feinstein, S., Markovics, A., Eitam, H., Orlov, A., Yishay, M., Agmon, R., Miron, J., Izhaki, I., Shabtay, A. (2014). Short communication: Effect of pomegranate-residue supplement on *Cryptosporidium parvum* oocyst shedding in neonatal calves. *American Dairy Science Association*, 97, 5800-5805.
- Windeyer, M.C., Leslie, K.L., Godden, S.M., Hodgins, D.C., Lissemore, K.D., LeBlanc, S.J. (2014). Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves

up to 3 months of age. *Preventive Veterinary Medicine*, 113, 231-240. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.10.019

Wyatt, C.R., Riggs, M.W., Fayer, R. (2010). Cryptosporidiosis in neonatal calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26, 89-103. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.001

Xiao, L., Herd, R.P. (1994). Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, 55, 257-262.

Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C.A., Fayer, R., and Lal, A.A. (1999). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3386-3391.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H., Lal, A.A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183, 492-497.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. (2004a). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 72-97.

Xiao, L., Lal, A.A., Jiang, J. (2004b). Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. *Public Health Microbiology*, 163-176. doi: 10.1385/159259-766-1:163

Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R. (2007). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research*, 100, 701-706. doi: 10.1007/s00436-006-0337-2

Xiao, L., Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38, 1239-1255.

Xiao, L., Ryan, U.M. (2008). Molecular Epidemiology. R. Fayer, L. Xiao (Ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* içinde (2. bs., ss.119-172). Boca Raton: CRC Press.

Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80-89. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.018

- Yılmaz, A. (2015). *İshalli İmmünsupresif ve İmmünkompetan Olgularda Mikroskopik, Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Cryptosporidium spp.'nin Araştırılması*. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yu, J.R. (2010). Cryptosporidiosis. *Hanyang Medical Review*, 30(3), 187-195.
- Zhang, T., Xin, R., Gu, X., Wang, F., Pei, L., Lin, L., Chen, G., Wu, J. (2009). Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high risk area of China. *Public Health Nutrition*, 12(05), 680-686. doi: 10.1017/S1368980008002735
- Zhang, H., Wang, H., Chang, Y., Luo, H., Brito, L.F., Dong, Y., Shi, R., Wang, Y., Dong, G., Liu, L. (2019). Mortality culling rates of dairy calves and replacement heifers and its risk factors in holstein cattle. *Animals*, 9, 730.
- Zhang, Z., Su, D., Meng, X., Liang, R., Wang, W., Li, N., Guo, Y., Li, S., Zhao, Z., Xiao, L., Feng, Y. (2021). Cryptosporidiosis outbreak caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA20G1 in neonatal calves. *Transboundary and Emerging Diseases*, 00, 1-8. doi: 10.1111/tbed.13976
- Zhang, K., Wu, Y., Jing, B., Xu, C., Chen, Y., Yu, F., Wei, Z., Zhang, Y., Cui, Z., Qi, M., Zhang, L. (2022). Seasonal monitoring of *Cryptosporidium* species and their genetic diversity in neonatal calves on two large-scale farms in Xinjiang, China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69, e12878. doi: 10.1111/jeu.12878
- Zhu, W., Dong, J., Haga, T., Goto, Y., Sueyoshi, M. (2011). Rapid and sensitive detection of bovine coronavirus and group a bovine rotavirus from fecal samples by using one-step duplex RT-PCR assay. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 531-534.
- Zintl, A., Keogh, B., Ezzaty-Mirhashemi, M., De Waal, T., Scholz, D., Mulcahy, G. (2010). Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in the presence of hydrated lime. *Veterinary Record*, 166, 297-300.

EKLER

Ek 1



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 18/03/2021

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı III. Oturum
Sayı : 64583101/2021/040
Proje Başlığı : Neonatal Buzağılarda *Cryptosporidium* ' un Yaygınlığı ve Çiftlik Yönetimi ile İlişkisi.
Proje Yürütücüsü : Osman Selçuk ALDEMİR
Proje Ekibi : Zeynep Toprak ÇINAR

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fütusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fütusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması
İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. Murat SARIERLER
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Turhan DOST
Üye

Prof. Dr. İzzet SÖNMEZ
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI
Üye

Dr. Öğr. Üyesi solmaz KARAARSLAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder
ÜSTÜNDAG
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ
Sor. Vet. Hek.
Üye

Hidayet KAMAN
Serbest Vet. Hek. Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Güleç
GÜLER / Sor. Vet. Hek.
Üye

Mustafa ÇOBANOĞLU
Sivri Üye

Şenay TEKİNBAŞ
HAYTAP Üye.

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Neonatal Buzağılarda *Cryptosporidium*’ un Yaygınlığı ve Çiftlik Yönetimi ile İlişkisi” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Zeynep TOPRAK ÇINAR

... / ... / ...