



Diyarbakır Yöresinde İshalli Buzağlarda *Cryptosporidium spp.* Yaygınlığı ve Moleküler Karakterizasyonu

Duygu Neval SAYIN İPEK^{1,a,✉}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-7486-232X

Geliş Tarihi/Received
08.12.2021

Kabul Tarihi/Accepted
25.03.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Bu çalışma insan ve birçok evcil hayvanda ishale neden olan *Cryptosporidium*'un Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda yaygınlığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. *Cryptosporidiosis* yaygınlığını belirlemek için bölgede bir aylığa kadar olan ishalli 64 buzağıdan dışkı örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler ookist varlığı yönünden direkt immünfloresan antikor tekniği kullanılarak incelenmiştir. *Cryptosporidium spp.* ookistleri 64 örneğin 36 'sında (%56.25) tespit edilmiştir. Mikroskopik olarak *Cryptosporidium spp.* ookistlerinin tespit edildiği pozitif bütün örneklerden SSU rRNA lokusunun PCR ürünleri elde edilmiş ve iki *Cryptosporidium* türü tanımlanmıştır. Tanımlanan *C. parvum* (32/36, %88.9) baskın tür olarak belirlenirken, *C. ryanae* (4/36, %11.1) tanımlanan diğer türdür. Bu çalışmanın sonucunda Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda cryptosporidiosisin önemi ve yine ishalli buzağlarda potansiyel zoonotik öneme sahip olan *C. parvum* türüne yüksek oranda rastlanmasıyla buzağların diğer hayvan ve insanlar için bulaş kaynağı olabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, *Cryptosporidium*, Diyarbakır, Nested PCR, zoonoz

Prevalence and Molecular Characterization of *Cryptosporidium spp.*'in Calves with Diarrhea in Diyarbakır Province

Abstract

This study was carried out in calves with diarrhea in order to determine the prevalence and species of *Cryptosporidium*, which causes diarrhea in humans and many domestic animals, in Diyarbakır and its surroundings, located in the southeast of Turkey. Stool samples were taken from the rectums of 64 calves with diarrhea up to one month old, using sterile gloves to determine the prevalence of *Cryptosporidiosis*. The samples were examined for the presence of oocysts using direct immunofluorescence antibody technique. *Cryptosporidium spp.* oocysts were detected in 36 (56.25%) of 64 samples. PCR products of the SSU rRNA locus were obtained from all positive samples and two *Cryptosporidium* species were identified. While *C. parvum* identified 32 (88.9%) was determined as the dominant species, *C. ryanae* was the other identified 4 (11.1%) species. As a result of this study, the importance of cryptosporidiosis in diarrheal calves in Diyarbakır and its district. and the high incidence of *C. parvum* species, which has a potential zoonotic importance in diarrheal calves, have been revealed to be a source of transmission to other animals and humans.

Key Words: Calves, *Cryptosporidium*, Diyarbakır, Nested PCR, zoonosis

GİRİŞ

Cryptosporidium insan dahil birçok memelinin sindirim sistemi epitel hücrelerine hücre içi ekstrasitoplazmik olarak yerleşen paraziter bir protozoondur. Zoonoz karakterdeki bu parazitin türlerinin neden olduğu cryptosporidiosis yiyecek ve su kaynaklı bir enfeksiyon olup özellikle yeni doğan ve immun supresif hayvan ve insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır (1-4). Hayvan sayılarının artmasına bağlı olarak artan hayvansal atık miktarı ile birlikte bu parazitin taşınmasında önemli bir faktör olan su kaynaklarının *Cryptosporidium spp.* ookistleri ile kirliliği artış göstermiştir (5-6). Özellikle hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, hijyenik

koşulların yetersiz olduğu yerlerde yaşayanlar ve enfekte kişilerle yakın temas edenlerde hastalığın yaygınlığının yüksek olduğu bildirilmiştir (7).

Cryptosporidium'un 20'den fazla farklı türü tanımlanırken bulunduğu konaklardaki yaygınlığına göre *Cryptosporidium parvum* ve *C. andersoni* (memelilerde), *C. nesorum* (balıklarda), *C. serpentis* (sürüngenlerde), ve *C. meleagridis* ve *C. baileyi* (kanatlılarda) olmak üzere yaygın olan 6 temel tür belirtilmektedir (8-10). Sığırların evcil hayvanlar arasında *Cryptosporidium* türlerinin en yaygın konakçısı olduğu bilinmektedir. Dünyada yapılan çalışmalarda sığırlarda 16'dan fazla tür ve genotip bildirilmiş ve bunların arasında *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* türleri en yaygın olan ve sığırların cryptosporidiosisine neden olan etkenler olarak

kabul edilmektedir. Süt sığırlarında *Cryptosporidium* türlerinin yaşa bağlı dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, *C. parvum*'un süttten kesilmemiş buzağlarda, *C. bovis* ve *C. ryanae*'nin süttten kesilmiş buzağlarda ve gençlerde, *C. andersoni*'nin ise çoğunlukla yetişkinlerde hastalık yaptığı bildirilmiştir (11-13).

Yenidoğan buzağlarda yapılan çalışmalarda; ishalin hem büyüme hızını hem de karkas kalitesini azalttığı gibi ölüm riskini de artırdığı gösterilmiştir (14, 15). *C. parvum* buzağların yeni doğan ishallerinde primer etiyolojik ajan olarak tespit edildiği ve bu türün buzağlarda sarı sulu dışkı ile ishale, ilerleyici dehidrasyona, kilo kaybına, gecikmiş büyüme ve ara sıra ölüme neden olan bir enfeksiyon tablosu oluşturduğu bildirilmiştir (13, 16). *C. parvum* ile enfekte olmuş süttten kesilmemiş buzağlar, zoonotik bulaşma için de önemli rezervuarlar olarak kabul edilmektedir (17). Ayrıca, sığır sürülerinde, enfekte hayvanlar, özellikle ishalli buzağlar, altı haftalıktan büyük asemptomatik hayvanlar ookist çıkararak diğer çiftlik hayvanları için doğrudan enfeksiyon kaynağı olarak hareket etmektedir (13, 17-19).

Cryptosporidiosis'den kaynaklanan ishal salgınlarına, son yıllarda birçok ülkede sıkça rastlanılmaktadır, Türkiye'de de özellikle Cryptosporidiosis'den kaynaklanan neonatal buzağı ishalleri ve buna bağlı ölüm olayları büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (20-29).

Bu çalışma Diyarbakır merkez ve ilçelere bağlı köylerde, bir aylıktan küçük ishalli buzağlardan toplanan dışkı örneklerinin mikroskopik ve moleküler yöntemlerle *Cryptosporidium spp.* yaygınlığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Ocak-Aralık 2018 yılında Diyarbakır ve çevresinde yürütülmüştür. Bir aylıktan küçük ishalli 64 buzağının rektumlarından dışkı örnekleri steril eldiven ve swap kullanılarak toplanmıştır.

Mikroskopik Analiz

Dışkı örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirilerek *Cryptosporidium* ookistlerinin varlığı yönünden ticari olarak temin edilen Crypto / Giardia-Cel FITC Staining Kit (Cellabs Inc., Brookvale, Avustralya) kullanılarak floresan mikroskopunda 200 x, 400 x ve 1000 x büyütme altında incelenmiştir. Örnekler moleküler analiz yapılabildiği kadar -20°C saklanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu Gen Amplifikasyonu Sekans Analizi

Total DNA izolasyonu ZR Fecal DNA MiniPrep kiti (Zymo Research, Irvine, CA) kullanılarak yapılmıştır. Türlerin tanımlanması amacıyla, tüm DNA ekstraktları, *Cryptosporidium*'un SSU rRNA geninin 830 bp parçasını amplifiye etmek için Nested PCR protokolüne tabi tutulmuştur. PCR'ın birinci turunda 1325 bp'lik bir PCR ürünü, 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' ve 5'-CCCTAATC CTTCGAAACAGGA-3' kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR'nin ikinci turu 5'-GGAAGGGTTGTATTATTA-GATAAAG-3' ve 5'-AAGGAGTAAGGACAACCTCCA-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları, 10 x PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her primerden 20 pmol ve 2 U Taq DNA polimeraz içeren toplam 50 µL hacimde

ve 3 dk 94°C'de ilk denatürasyon 35 döngü, 45 sn 94°C'de 45 sn için 55°C ve 1 dk 72°C'de ve 7 dk için 72°C'de son uzatma koşulları altında gerçekleştirilmiştir. İkinci adım PCR karışımı ve koşulları, 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunun kullanılması dışında birincil PCR ile aynı olarak gerçekleştirilmiştir (30, 31). PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür ile boyanarak görselleştirilmiştir. İkincil PCR ürünleri, Sanger dizi analiz yöntemi ile (ABI PRISM 310 modeli; Perkin-Elmer, ABD) sekanslanmıştır.

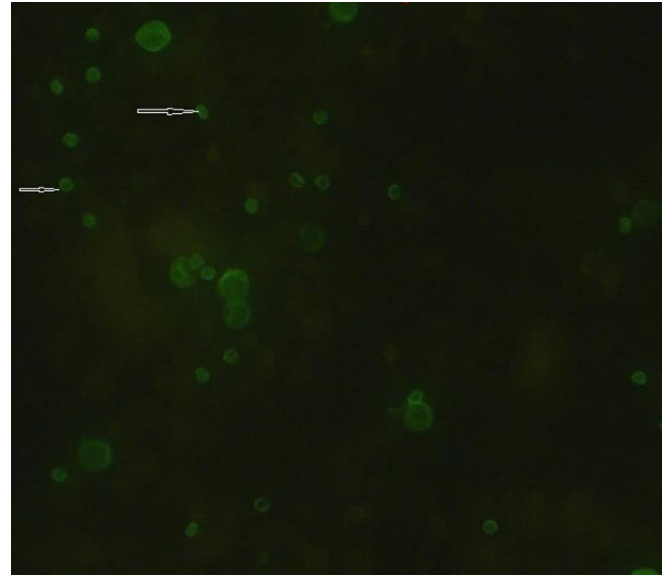
BULGULAR

Mikroskopik Analiz

Mikroskopik inceleme sonucunda bir aylığa kadar olan ishalli 64 buzağının *Cryptosporidium spp.* yaygınlığı %56.25 (36/64) olarak belirlenmiştir. (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Diyarbakır ve çevresinde ishalli buzağlarda *Cryptosporidium*'un prevalansı ve türleri

	DİFAT	%
Örnek sayısı	64	
Pozitif	36	56.25
Negatif	28	43.75
	Nested PCR	%
Örnek sayısı	36	
<i>C. parvum</i>	32	88.9
<i>C. ryanae</i>	4	11.1

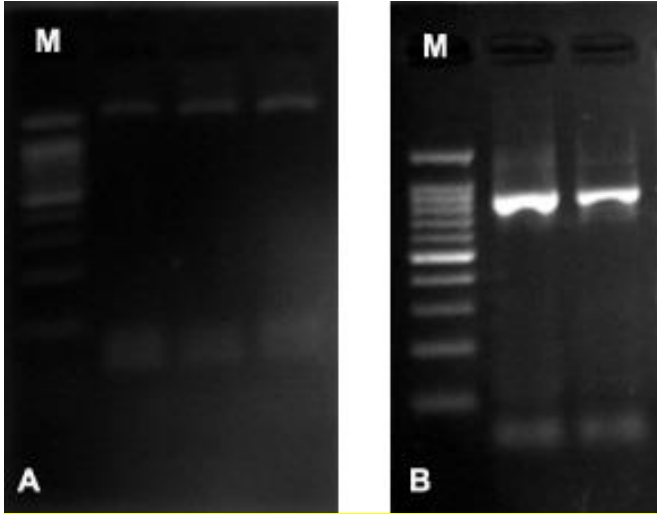


Şekil 1. Fluoresan mikroskopunda X 40 objektifte DİFAT ile pozitif belirlenen bir örneğe ait resim görüntüsü

Moleküler Analiz

Cryptosporidium oositlerinin mikroskopik olarak tanımlandığı 36 numunenin SSU rRNA lokusundan PCR ürünleri başarıyla elde edilmiş ve iki *Cryptosporidium* türü tanımlanmıştır. Tanımlanan *C. parvum* (36/32, %88.9) baskın tür olarak belirlenirken, *C. ryanae* (36/4, %11.1) tanımlanan diğer türdür. (Tablo 1, Şekil 2). Örnekler sekans analizi için ticari bir firmaya gönderilmiş ve elde ettiğimiz veriler GenBank'taki verilerle karşılaştırılmıştır. Çalışmada belirlenen *C. parvum*, MN918240.1, MN918160 Genbank numarası ile benzerlik ve

C. ryanae, MF671876.1 Genbank numarası ile benzerlik göstermiştir.



Şekil 2. A: *Cryptosporidium* spp. pozitif örneklerin SSU rRNA geninin 1325 bp %1 agaroz jel görüntüsü, B: *Cryptosporidium* spp. pozitif örneklerin SSU rRNA geninin 830 bp %1.4 agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100 bp DNA ladder)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Cryptosporidium türleri buzağlarda neonatal dönemde ishale neden olan en önemli etkenlerdendir. Son yıllarda cryptosporidiosis üzerine moleküler çalışmaların artması ile birlikte buzağlarda görülen *Cryptosporidium* türleri ve bunların zoonotik önemleri ortaya konmaya başlanmıştır (32).

Türkiye’de buzağlarda *Cryptosporidium*’un varlığı ilk olarak Burgu (33) tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde daha sonra yapılan çalışmalarda bu protozoonun yaygınlığı belirlemek için çeşitli mikroskopik tanı yöntemleri kullanılmakla birlikte günümüzde moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda artış olmuştur. Farklı illerde çeşitli mikroskopik yöntemlerle yürütülmüş çalışmalarda ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium* spp. oookistlerine Kars’ta %25.7, %37.7, %5.94 (34-36), Aydın’da %10.7 (37), Ankara’da %63.3 (38), Konya’da %39.4 (39), Sivas’ta %7 (40), Erzurum’da %30.3 (41), %13.6 (22) oranında rastlandığı bildirilmiştir. Yine ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium* spp. varlığını belirlemek üzerine yapılan moleküler çalışmalarda, Aysul ve ark. (42) Aydın’da %24.2, Şimşek ve ark. (43) Nevşehir’de %19.3, Yıldırım ve ark. (21) Burdur’da %57.5, Kayseri’de %58.2, Güven ve ark. (22) Erzurum’da %13.6, Bin Kabir ve ark. (24) Konya’da %27.4 oranında *Cryptosporidium* spp. tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dünyada farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda ishalleri buzağlarda *Cryptosporidium*’un prevanlansı Cezayir’de %40.5 (44), Tunus’ta %55.5 (45), Fransa’da %88.6 (46), Çin’de %52.6 (47) Hindistan’da % 32.3 (48), %50 (49), Kanada’da % 40.6 (50) oranlarında rapor edilmiştir. Diyarbakır ve çevresinde yapılan bu çalışmada bir aylağa kadar olan ishalleri 64 buzağda *Cryptosporidium*’un prevanlansı %56.25 olarak belirlenmiştir. Bu oran Burdur, Kayseri, Hindistan, Çin ve Tunus’ta bildirilen oranlarla benzerlik gösterirken, Ankara ve Fransa’da bildirilen oranlardan düşük diğer bildirilen oranlardan daha yüksektir (21, 22, 24, 34-50). Çalışmalar arasında

görülen bu farklılığa toplanan materyal sayısının, çiftlik koşullarının, buzağların yaşının, çiftliklerdeki hayvan sayısının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tüm dünyada sığırları enfekte ettiği bilinen başlıca *Cryptosporidium* türlerinin *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* ve *C. andersoni* olduğu rapor edilmiştir (51). Türkiye’deki *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu sonucunda, *C. parvum* (20-24, 42, 43), *C. bovis* (20, 24, 42) ve *C. ryanae* (20, 21, 23, 42) olmak üzere 3 türün varlığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ishalleri buzağlarda *C. parvum* ve *C. ryanae* olmak üzere Türkiye’de görülen iki tür tespit edilmiştir.

Dünyada ve Türkiye’de buzağlarda bildirilen bu türler arasında zoonotik bir hastalık olan cryptosporidiosis’e neden olması açısından bilinen en önemli tür *C. parvum*’dur (52-55). Dünya’da farklı ülkelerde yapılan birçok çalışmada *C. parvum* sütte kesilmemiş buzağlarda en yaygın tür olarak bildirilmiştir (56-60). Dünyada bildirilene benzer şekilde Türkiye’de de buzağlarda *C. parvum*’un baskın tür olarak görüldüğü bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (20-24, 42, 43). Aydın’da ishalleri buzağlarda PCR-RFLP sonucu *C. parvum* teşhis edilmiş olup, yaygınlığı %24.2 oranında olduğu bildirilmiştir (42). Nevşehir’de Real Time PCR ile buzağlarda *C. parvum* yaygınlığını %15.3 (23/150) olarak bildirirken, *C. ryanae* (2 /150), *C. bovis* (1/150) türleri de saptadıklarını raporlamışlardır (43). Kars yöresinde ishalleri buzağlarda PCR-RFLP ile yapılan çalışmada en yaygın türün *C. parvum* olduğu belirlenmiş olup, *C. bovis* ve *C. ryanae* türleri de bulunmuştur (20). Güven ve ark. (22) yaptıkları çalışmada ishalleri buzağlarda *C. parvum* tek tür olarak bildirilirken, Özkan ve ark. (23) *C. parvum* (27/28), *C. ryanae* (1/28) tespit ettiklerini bildirmişlerdir (22, 23). Konya’da *C. parvum* %27.1, *C. bovis* %0.3 oranında rastlandığı bildirilirken (24), Kayseri’de *C. parvum*’a %53.6, Burdur’da ise *C. parvum*’a %52.5 oranında baskın tür olarak rastlandığı bildirilmiştir (21). Bu çalışmada örneklerin SSU rRNA lokusundan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizleri sonucu Dünya’da ve Türkiye’de bildirilenlere benzer şekilde *C. parvum* (%88.9) baskın tür olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak ishalleri buzağlarda enfeksiyonun prevalansının yüksek olması neonatal buzağı ishallerinde cryptosporidiosis bölge için önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca ishalleri buzağlarda potansiyel zoonotik öneme sahip olan *C. parvum* türüne yüksek oranla rastlanması ishalleri buzağların diğer hayvan ve insanlar için bulaşma kaynağı olabileceği kanısı oluşturmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından VETERİNER.17.016 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Caccio SM, Thompson ARC, McLauchlin J, Smith HV. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* Epidemiology. Trends Parasitol. 21(9): 430–437.
2. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. (1990). Cryptosporidiosis of Man and Animals. CRC Press, USA.

3. Lee SH, Kim HY, Choi EW, Kim D. (2019). Causative Agents and Epidemiology of Diarrhea in Korean Native Calves. *J Vet Sci.* 20(6): e64.
4. Fredes F, Díaz A, Raffo E, Munoz P. (2008). *Cryptosporidium spp.* Oocysts Detected Using Acid-Fast Stain in Faeces of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica. *Antarct Sci.* 20(5): 495-496.
5. Wells B, Shaw H, Hotchkiss E, Gilray et al. (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 Vectors.* 8(1): 66
6. Wells B, Paton C, Bacchetti R, et al. (2019) *Cryptosporidium* Prevalence in Calves and Geese Co-Grazing on Four Livestock Farms Surrounding Two Reservoirs Supplying Public Water to Mainland Orkney Scotland. *Microorganisms.* 7(11): 513
7. Usluca S, Aksoy Ü. (2006). Su kaynaklı Bir Parazit: *Cryptosporidium*. *DEU Tıp Derg.* 20(1): 65-74.
8. Olson ME, O'Handley RM, Ralston, BJ, McAllister TA, Thompson RA. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends parasitol.* 20(4): 185-191.
9. Thompson RA, Palmer CS, O'handley R. (2008). The Public Health and Clinical Significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Domestic Animals. *Vet Journal.* 177(1): 18-25.
10. Muhid A, Robertson I, Ng J, Ryan U. (2011). Prevalence of and Management Factors Contributing to *Cryptosporidium sp.* Infection in Pre-weaned and Post-weaned Calves in Johor, Malaysia. *Exp Parasitol.* 127(2): 534- 538.
11. Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E. (2006). Prevalence of Species and Genotypes of *Cryptosporidium* Found in 1-2-Year-Old Dairy Cattle in the Eastern United States. *Vet Parasitol.* 135(2):105-112.
12. Fayer R, Santin M, Trout JM. (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. *Vet Parasitol.* 145(3-4): 260-266.
13. Santin M, Trout JM, Fayer R. (2008). A Longitudinal Study of Cryptosporidiosis in Dairy Cattle from Birth to 2 Years of Age. *Vet Parasitol.* 155(1-2):15-23.
14. Gulliksen SM, Lie KI, Loken T, Osteras O. (2009). Calf Mortality in Norwegian Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 92(6): 2782–2795.
15. Pardon B, Hostens M, Duchateau L, Dewulf J, De Blecker, K, Deprez P. (2013). Impact of Respiratory Disease, Diarrhea, Otitis and Arthritis on Mortality and Carcass Traits in White Veal Calves. *BMC Vet Res.* 9(1):1-14.
16. Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbuş G. (2011). Molecular Characterisation of *Cryptosporidium* Isolates from Pre-weaned Calves in Romania: Is There an Actual Risk of Zoonotic Infections? *Vet Parasitol.* 181(2-4):321-324.
17. Xiao L, Fayer R. (2008). Molecular Characterisation of Species and Genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and Assessment of Zoonotic Transmission. *Int J Parasitol.* 38(11):1239-1255.
18. Xiao L. (2010). Molecular Epidemiology of Cryptosporidiosis: An Update. *Exp Parasitol.* 124(1):80-89.
19. Díaz P, Varcasia A, Pipia AP, et al. (2018). Molecular Characterisation and Risk Factor Analysis of *Cryptosporidium spp.* in Calves from ITALY. *Parasitol Res.* 117(10):3081-3090.
20. Arslan M, Ekinci A. (2012). Determination of *Cryptosporidium parvum* Subtypes in Cattle in Kars Province of Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 18(supplA): A221- A226.
21. Yıldırım A, Adanir R, İnci A, et al. (2020). Prevalence and Genotyping of Bovine *Cryptosporidium* species in the Mediterranean and Central Anatolia Region of Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 69:101425.
22. Guven E, Avcioglu H, Balkaya I, Hayirli A, Kar S, Karaer Z. (2013). Prevalence of Cryptosporidiosis and Molecular Characterization of *Cryptosporidium spp.* in Calves in Erzurum. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 19(6): 969-974.
23. Taylan-Ozkan A, Yasa-Duru S, Usluca S, et al. (2016). *Cryptosporidium* Species and *Cryptosporidium parvum* Subtypes in Dairy Calves and Goat Kids Reared under Traditional Farming Systems in Turkey. *Exp Parasitol.* 170:16-20.
24. Kabir MHB, Ceylan O, Ceylan C, et al. (2020). Molecular Detection of Genotypes and Subtypes of *Cryptosporidium* Infection in Diarrheic Calves, Lambs, and Goat Kids from Turkey. *Parasitol Int.* 79:102163.
25. J Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. (2008). *Cryptosporidium* Species and Subtype Analysis from Dairy Calves in SPAIN. *Parasitology.* 135(14):1613-1620.
26. Kaupke A, Rzeżutka A. (2015). Emergence of Novel Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in Calves in Poland. *Parasitol Res.* 114(12):4709-4716.
27. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. (2003). Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 41(6):2744-2747.
28. Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. (2019). Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from Calves with Diarrhoea in Austria and Evaluation of Point-of-care tests. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 66:101333.
29. Mahmoudi M, Hazrati Tapeh K, Abasi E, Sayyadi H, Aminpour A. (2021). Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* in Pre-weaned Cattle in Urmia (Northwestern Iran). *J Infect Dev Ctries.* 15(3):422-427.
30. Xiao L, Morgan UM, Limor J, et al. (1999). Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 65(8):3386-3391.
31. İpek DS. (2017). Prevalence and Molecular Characterisation of *Cryptosporidium spp.* in Diarrhoeic Pre-weaned Goat Kids Reared under Traditional Farming System in Diyarbakır, Southeastern Anatolia City, Turkey. *Rev Med Vet.* 168(10-12): 229-234.
32. Hatam-Nahavandi K, Ahmadvpour E, Carmena D, Spotin A, Bangoura B, Xiao L. (2019). *Cryptosporidium* infections in Terrestrial Ungulates with Focus on Livestock: A Systematic Review and Meta-analysis. *Parasit Vectors.* 12(1):1–23.
33. Burgu A. (1984). Türkiye'de Buzağlarda *Cryptosporidium*'ların Bulunuşu ile İlgili İlk Çalışmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 31(3): 573-585.
34. Aydın F, Umur Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA. (2001). Kars Yöresindeki İshalli Buzağlardan Bakteriyel ve Paraziter Etkenlerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 7(1):7-14.
35. Arslan MÖ, Gıcık Y, Erdoğan HM, Sarı B. (2001). Prevalence of *Cryptosporidium spp.* Oocysts in Diarrhoeic calves in Kars, Province. Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 25(2):161-164.
36. Çitil M, Arslan MÖ, Güneş V, Erdoğan HM. (2004). Neonatal Buzağı İshallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria spp.* Enfeksiyonlarının Rolü. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 10(1): 59-64.
37. Özlem MB, Eren H, Kaya O. (1997). Aydın Yöresi Buzağlarda *Cryptosporidium*'ların Varlığının Araştırılması. *Bornova Vet Kont Araş Enst Derg.* 22: 15-22.

38. Emre Z, Fidancı H. (1998). Prevalence of Mix Infections of *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* K 99 and *Rotavirus* in the Faeces of Diarrhoeic and Healthy Cattle in Ankara, Turkey and in Vitro Resistance of *Escherichia coli* K 99 to Antimicrobial Agents. Turk J Vet Anim Sci. 22: 175-178.
39. Ekinci Ö, Sevinç F, Coşkun A, Işık N, Sevinç N. (2011). İshalli Buzağlarda *Cryptosporidiosis*ın Yaygınlığı. Eurasian J Vet Sci. 27(2):123-126.
40. Kuliğ CC, Coşkun A. (2019). Sivas ve İlçelerindeki Neonatal İshalli Buzağlarda *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* Prevalansı. Turkish Vet J. 1(2): 69-73.
41. Sarı B, Aktaş MS, Arslan MÖ. (2008). Erzurum Yöresinde Buzağlarda *Cryptosporidium* Türlerinin Prevalansı. Türkiye Parazitoloj Derg. 32(2): 116-119.
42. Aysel N, Ulutaş B, Ünlü H, Hoşgör M, Atasoy A, Karagenc T (2009) Aydın ilinde İshalli Buzağlarda Bulunan *Cryptosporidium* türlerinin Moleküler Karakterizasyonu. XVI. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım, Adana -Türkiye.
43. Şimşek A, İnci A, Yıldırım A, Çiloğlu A, Bişkin Z. Düzlü Ö. (2012). Nevşehir Yöresindeki Yeni Doğan İshalli Buzağlarda *Cryptosporidiosis*'in Real Time PCR ve Nested PCR Yöntemleri ile Saptanması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 9(2): 79-87.
44. Ouakli, N, Belkhiri A, de Lucio A, et al. (2018). *Cryptosporidium*-Associated Diarrhoea in Neonatal Calves in Algeria. Vet Parasitol: Reg Stud Rep. 12: 78-84.
45. Soltane R, Guyot K, Dei-Cas E, Ayadi A. (2007). *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in Calves: Results of a Longitudinal Study in a Dairy Farm in Sfax, Tunisia. Parasite. 14(4): 309-312.
46. Mammeri M, Chevillot A, Chenafi I. et al. (2019). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Diarrheal Dairy Calves in France. Vet Parasitol: Reg Stud Rep. 18:100323.
47. Wu Y, Zhang K, Zhang Y. et al. (2020). Genetic Diversity of *Cryptosporidium parvum* in Neonatal Dairy Calves in Xinjiang, China. Pathogens. 9(9):692.
48. Paul S, Chandra D, Ray DD. et al. (2008). Prevalence and Molecular Characterization of Bovine *Cryptosporidium* Isolates in India. Vet Parasitol. 153(1-2):143-146.
49. Singh BB, Sharma R, Kumar H. et al. (2006). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Punjab (India) and Its Association with Diarrhea in Neonatal Dairy Calves. Vet Parasitol. 140(1-2):162-165.
50. Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Martin SW, Leslie KE, Peregrine AS. (2005). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Southwestern Ontario and its Association with Diarrhea in Neonatal Dairy Calves. Can Vet J. 46(4):349-51.
51. Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. (2004). Prevalence and Age-related Variation of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Dairy Calves. Vet Parasitol. 122(2):103-17.
52. Gong C, Cao XF, Deng L, et al. (2017). Epidemiology of *Cryptosporidium* Infection in Cattle in China: A Review. Parasite. 24(1).
53. Xiao L, Feng, Y. (2008). Zoonotic *Cryptosporidiosis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 52(3), 309-323.
54. Guerrant RL. (1997). *Cryptosporidiosis*: an emerging, highly infectious threat. Emerg Infect Dis. 3(1):51-57.
55. Gharieb RMA, Bowman DD, Liotta JL, Xiao L.(2019). Isolation, Genotyping and Subtyping of Single *Cryptosporidium* Oocysts from Calves with Special Reference to Zoonotic Significance. Vet Parasitol. 271:80-86.
56. Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. (2008). *Cryptosporidium* Species and Subtype Analysis from Dairy Calves in Spain. Parasitology. 135(14):1613-1620.
57. Kaupke A, Rzezutka A. (2015). Emergence of Novel Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in Calves in Poland. Parasitol Res. 114(12):4709-16.
58. Soba B, ogar J. (2008). Genetic Classification of *Cryptosporidium* Isolates from Humans and Calves in Slovenia. Parasitology. 135(11):1263-70.
59. Lichtmannsperger K, Hinney B, Joachim A, Wittek T. (2019). Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from Calves with Diarrhoea in Austria and Evaluation of Point-of-care Tests. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 66:101333.
60. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal. J Clin Microbiol. 41(6):2744-2747.

✉ Sorumlu Yazar:

Duygu Neval SAYIN İPEK

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

E-posta: dnsayin@hotmail.com