



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2022; 36 (3): 224 - 228
<http://www.fusabil.org>

Sivas İlindeki Köpeklerde *Cryptosporidium* Spp.'nin Prevalansı

Zaid Tefik AĞAOĞLU^{1, a}
Onur BAŞBUĞ^{1, b}
Necati ÖZPINAR^{2, c}

¹ Sivas Cumhuriyet
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
İç Hastalıkları Ana Bilim
Dalı,
Sivas, TÜRKİYE

² Hatay Mustafa Kemal
Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Acil Yardım ve Afet Yönetimi
Ana Bilim Dalı,
Hatay, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-5707-405X

^b ORCID: 0000-0003-3136-0589

^c ORCID: 0000-0002-7317-885X

Cryptosporidium spp. zoonotik özelliğe sahip, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde hastalık oluşturan bir protozoondur. Bu çalışma, Sivas ilindeki farklı yaş aralığındaki köpeklerde, farklı metotlarla *Cryptosporidium* spp. prevalansını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş ve cinsiyetten 100 adet köpek oluşturdu. Çalışmaya dâhil edilen köpeklerin iştah durumu, vücut sıcaklığı, kalp atım sayısı, solunum sayısı, solunum tipi, kapiller dolum zamanı, dehidrasyon oranı, mukoza muayenesi ve mental durumları muayenelerinde anormal bir durum gözlenmedi. Hayvanlardan dışkı örnekleri plastik kaplara alındı. Toplanan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. ookistlerinin saptanması amacıyla direkt inceleme, asit-fast boyama ve Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) yöntemi kullanıldı. İncelenen dışkı örneklerinde pozitiflik oranı direkt incelemede %0, asit-fast boyamada %2 ve PZR testinde ise %4 olarak belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmada Sivas ilinde *Cryptosporidium* spp. pozitiflik oranı hayvan hastanesine kontrol amacıyla getirilen köpeklerde %0, barınak köpeklerinde %8 olduğu belirlendi. Ayrıca 1 yaşın altı, 1-5 yaş ile 6 yaş üstündeki barınak köpeklerinde sırası ile %13.3, %5.8 ve %5.5 oranında pozitiflik saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, köpek, prevalans, Sivas

Prevalence of *Cryptosporidium* Spp. in Dogs in Sivas City

Species of *Cryptosporidium* is a zoonotic protozoan that affects both people and animals' gastrointestinal tracts and causes illness. In this study, *Cryptosporidium* spp. was performed to determine its prevalence in which Sivas. The study included 100 dogs of various breeds, ages, and genders as its subject matter. The study's included dogs' assessments of their hunger, body temperature, heart rate, respiratory rate, respiratory type, capillary filling time, rate of dehydration, mucosal examination, and mental status revealed no abnormalities. Animal feces were collected and stored in plastic containers. Oocysts were found using direct inspection, acid-fast staining, and the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. In the studied stool samples, the positive rate was 0% for direct examination, 2% for acid-fast staining, and 4% for the PCR test. In this study, *Cryptosporidium* spp. The positive rate was 0% for dogs brought to the veterinary clinic for control and 8% for dogs from shelters. In addition, shelter dogs under 1 year, 1 to 5 years, and over 6 years old, respectively, had positive rates of 13.3%, 5.8%, and 5.5%.

Key Words: *Cryptosporidium*, dog, prevalence, Sivas

Giriş

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonlar tarafından oluşturulan, dünyada yaygın şekilde görülen ve farklı hayvan türlerini etkileyen bir hastalıktır. İnsan dâhil olmak üzere birçok hayvan türünde sindirim sistemi epitel hücrelerine lokalize olan bu parazit çoğunlukla genç ve immun sistemi baskılanmış hayvanlarda enfeksiyona sebep olabilmektedir (1). *Cryptosporidia*, Apicomplexa şubesinin Coccidia grubuna dâhil olan *Cryptosporidium* cinsi ilk kez 1895 senesinde Clarke tarafından belirlenmiş, fare mide epitelinde yer almakta olan spor kümeleri olarak tanımlanmıştır (2). Daha sonra Tyzzer tarafından sırasıyla 1907 yılında farelerin gastrik bezlerinde, 1912 yılında ince bağırsaklarında ve 1929 ise tavukların Bursa fabrisiyusunda görülmüştür (3, 4).

Cryptosporidium canis köpeklerde en sık görülen türdür. *Cryptosporidium canis* ile enfeksiyon genellikle asemptomatiktir ve gram dışkı başına birkaç ookist atılır. Buna karşılık, bağıışıklığı baskılanmış köpek ishal, uyuşukluk ve fiziksel bozulma gibi klinik belirtiler gösterebilir (5). Birçok araştırmada insanlarda *Cryptosporidium canis* tespit edilmiştir (6,7).

Bu çalışma, Sivas ilindeki farklı yaş aralığında ki köpeklerde *Cryptosporidium* spp. varlığını farklı metotlar kullanarak hastalığın prevalansını belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Sivas Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile yapılmıştır (22.02.2022 tarih ve 65202830-050.04.04-632 Nolu).

Geliş Tarihi : 03.10.2022
Kabul Tarihi : 16.10.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Zaid Tefik AĞAOĞLU
Sivas Cumhuriyet
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı,
Sivas – TÜRKİYE

zagaoglu@hotmail.com

Hayvan Materyali: Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş ve cinsiyetten 100 adet köpek (50'si Sivas İli hayvan barınağından diğer 50'si Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi hayvan hastanesine kontrol amacıyla getirilen hayvanlar) oluşturdu (Tablo 1). Tüm hayvanların genel klinik muayeneleri usulüne uygun olarak gerçekleştirildi. Köpeklerde anormal bir klinik semptom gözlenmedi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hayvanların yaş aralığı

Grup	1<yaş	1-5 yaş	6 ≥yaş	Toplam
Barınak Grubu	15	17	18	50
Hastane Grubu	16	20	14	50
Toplam	31	37	32	100

Dışkı Örneklerinin Toplanması: Çalışmaya dâhil edilen köpeklerin rektumundan usulüne uygun bir şekilde tanı konulabilecek miktarda dışkı örnekleri alındı. Örnekler su çekmeyen plastik kaplara toplandı. Örnekler hayvanlardan alındıktan sonra aynı gün Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Hastanesi laboratuvarlarında çoğaltma yöntemi, direkt inceleme ve Asit fast boyamalar için gerekli işlemler yapılırken, Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) çalışılması için her örnekten ayrı bir tüpe bölünen dışkılar Sivas İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde işlemleri gerçekleştirildi.

Direkt İnceleme: Natif-lugol ile 40 X büyütme ile direkt olarak yapıldı.

Kinyoun Asit-Fast Boyama: Kinyoun asit-fast boyama yöntemi için yayma preparatları hazırlandı ve 100x lik objektifle *Cryptosporidium* spp yönünden incelendi. Şüpheli durumlarda şeker yüzdürme yapılarak yeniden yayma ve boyama işlemi uygulandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR): Konvansiyonel PZR yöntemi uygulanmıştır. Tüm örneklerden DNA izolasyonu ticari bir DNA izolasyonu kiti (QIAGEN - QIAamp DNA Stool Mini Kit) kullanılarak yapıldı. İzolasyon öncesi örnekler -80°C'de 30 dk ve 56°C de 10 dk olmak üzere 5 kere dondurulup çözdürüldü. Kit protokolünde herhangi bir değişiklik yapılmadan uygulandı. Elde edilen DNA örnekleri PZR çalışması yapılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Cryptosporidium 18S SSU rRNA Lokusunun PZR Çoğaltılması: PZR çalışması Xiao ve ark. (8) protokolüne göre yapılmıştır. I. PZR reaksiyonunda 1 µL DNA kullanıldı. PZR reaksiyonu öncesi Thermal Cycler 30 dk açık tutularak "hot start" başlaması sağlandı. PZR koşulları Tablo 2'de belirtildiği gibi; 4°C de 4 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C de 45 sn denatürasyon, 55-58°C de 45 sn annealing, 72°C de 60 sn extension, 35 döngü, 72°C de 7dk final extension şeklinde oluşturuldu. I. PZR sonucunda beklenen ürün boyutu 1,325 bp'dir. I. PZR işlemi için kullanılan primerler Tablo 3'te verilmiştir.

I. PZR Master Mix; 4 µL 5 x FIREPol® Master Mix (12.5 mM MgCl₂), 0.5 4 µL F primer, 0.5 4 µL R primer, 1 µL DNA ve 14 µL deiyonize su eklenerek total hacim 20 µL olarak ayarlandı.

II. PZR reaksiyonunda 2 µL I. PZR ürünü kullanıldı. PZR reaksiyon koşulları (Tablo 4); 94°C de 3 dk başlangıç, 35 döngü (94°C'de 45 sn, 58°C'de 45 sn ve 72°C'de 60 sn) final fazda 72°C'de 7 dk olarak ayarlandı. Pozitif örneklerin 823 bp büyüklüğünde son ürün oluşturması beklenmektedir. II. PZR işlemi için kullanılan primerler Tablo 5'te verilmiştir PZR ürünleri -20°C de saklandı.

Tablo 2. I. PZR protokol programı

	Sıcaklık (°C)	Zaman (Saniye)	Döngü
İlk denatürasyon	94 °C	240	1
Denatürasyon	94 °C	45 sn	35
Bağlanma	55°C	45 sn	35
Uzama	72°C	60	35
Son uzama	72°C	420	1

Tablo 3. I. PZR işlemi için kullanılan primerler

F1:	5'- TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
R1:	5'- CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3'

Tablo 4. II. PZR protokol programı

	Sıcaklık (°C)	Zaman (Saniye)	Döngü
İlk denatürasyon	94	240	1
Denatürasyon	94	45	35
Bağlanma	55°-58	45	35
Uzama	72	60	35
Son uzama	72	420	1

Tablo 5. II. PZR için ikinci primerler (8)

F2:	5'- GGAAGGGTGTATTTATTAGATAAAG-3'
R2:	5'- CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'

Jel Elektrofrez ve Görüntüleme: PZR ürünleri etidyum bromürlü (EtBr) %1'lik agaroz jel hazırlanarak elektrofrezde yürütülmüştür. 100 bp'lik belirteç kullanılmıştır. Tüm PZR işlemleri tamamlandıktan sonra çalışan PZR ürünleri ve DNA'lar tek bir jelde yürütülerek SynGene GBox marka görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilmiştir.

İstatistiksel Analiz: Çalışmamızdan elde edilen veriler SPSS 22 programına yüklendi. Farklı yöntemlerle tespit edilen *Cryptosporidium* spp. oranları arasındaki önemlilik Khi-kare testi ve gruplar arasındaki fark için Fisher's exact testi kullanıldı ve önemlilik düzeyi 0.05 olarak alındı.

Bulgular

Araştırmada dâhil edilen köpeklerin klinik muayenesinde iştah durumu, vücut sıcaklığı, kalp atım sayısı, solunum sayısı, solunum tipi, kapiller tekrar

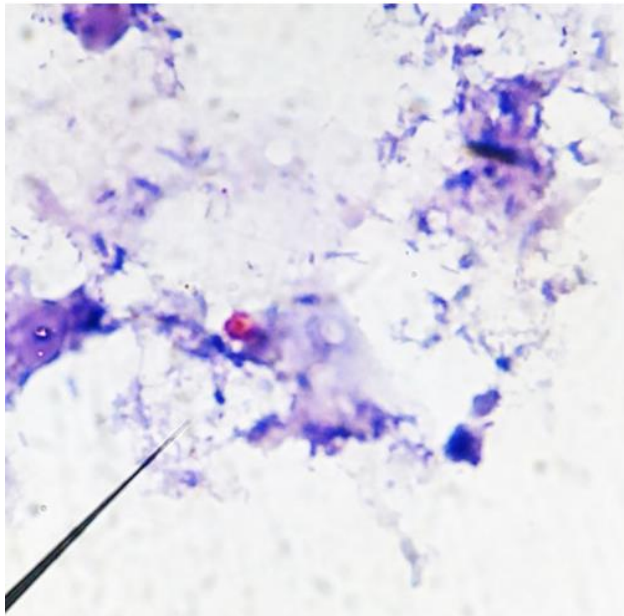
dolum zamanı, dehidrasyon oranı, mukoza muayenesi ve mental durumları muayenelerinde anormal bir durum belirlenmedi. Alınan 100 dışkı örneği *Cryptosporidium* spp. açısından değerlendirildi. Toplanan tüm numuneler ilk olarak direkt inceleme ve Kinyoun asit-fast boyamasına tabi tutuldu. Sonrasında tüm örnekler DNA izolasyonu yapılarak PZR ile pozitiflik test edildi. Çalışmamızda direkt inceleme sonucunda pozitif şüpheli örnek tespit edilemedi. Kinyoun asit-fast boyaması sonucunda barınak grubunda 2 (%4) örnekte asidofilik boyanan *Cryptosporidium*'lar mikroskop altında tespit edildi (Şekil 1), hayvan hastanesine kontrol amacıyla getirilen grupta ise pozitif 0 (%0) örnek tespit edilmedi (Tablo 6).

Alınan numunelerin tüm PZR işlemleri tamamlandıktan sonra çalışan PZR ürünleri ve DNA'lar tek bir jelde yürütülerek pozitif sonuçlar görüntülenmiştir (Şekil 2). PZR sonuçları incelendiğinde barınak grubunda 4 (%8) pozitif örnek belirlenirken hasta grubunda ise pozitif örneğe rastlanmadı (Tablo 6).

Pozitif örnekler incelendiğinde, örneklerin hepsinin barınak grubunda olduğu büyük çoğunluğunun da bir yaşın altındaki köpeklerde olduğu gözlemlendi (Tablo 7).

Tablo 6. Farklı yöntemlerle tespit edilen *Cryptosporidium* spp. sayısı

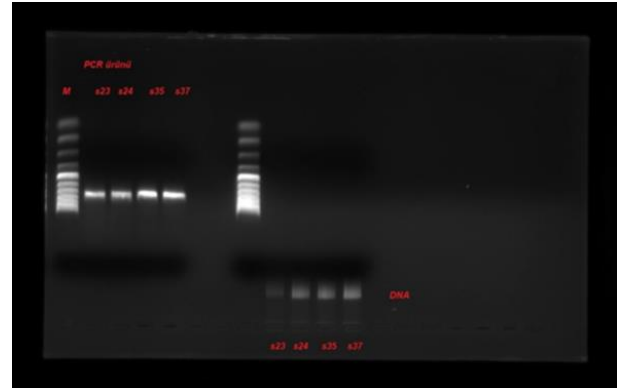
Grup	Natif	Asit-fast Boyama	PZR	Toplam
Barınak Grubu	0	2	4	4
Hastane Grubu	0	0	0	0
Toplam	0	2	4	4



Şekil 1. Kinyoun asit-fast boyaması sonucu *Cryptosporidium* spp. görünümü (100X)

Tablo 7. Farklı yöntemlerle tespit edilen *Cryptosporidium* spp. sayısı

Yaş	N	Natif %	Asit- fast Boyama %	PZR %	Toplam
1<	15	0 %0	2 %13,3	2 %13,3	2 %13,3
1-5	17	0 %0	0 %0	1 %5,8	1 %5,8
6≥	18	0 %0	0 %0	1 %5,5	1 %5,5
Toplam	50	0 %0	2 % 4	4 %8	4 %8



Şekil 2. PZR ürünleri ve DNA'ların SynGene GBox marka görüntüleme cihazında görünümü. M: Marker (100bp), s23, s24, s35, s37: Pozitif numuneler

Tartışma

Cryptosporidium türleri birçok hayvan türünde bulunan yaygın bir parazittir. *Cryptosporidium* türlerinin geniş konak aralığı nedeniyle ve zoonotik bir hastalık olarak ifade edilmesinden dolayı hem insan sağlığı hem de hayvan sağlığı açısından son derece önemlidir (9). Günümüzün en etkili hastalıklarından biri olan cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonların neden olduğu dünya üzerinde yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu parazitler genellikle genç ve immun sistemi baskılanmış insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir (1).

Köpeklerde *Cryptosporidium* enfeksiyonuna ilişkin çok az rapor vardır ve vakaların çoğu 6 aylıktan küçük yavruları içerir. Köpeklerde cryptosporidiosis'in ilk kanıtı 1981'de Tzipori ve Campbell tarafından 20 köpek Tzipori serum örneğinden 16'sında *Cryptosporidium* antikorları saptanarak rapor edilmiştir (10). Wilson ve ark. ise 1983 yılında, akut ishal şikayetli 1 haftalık bir yavru köpekte *Cryptosporidium*'un karakteristik yaşam döngüsü evreleri tanımlayarak, ilk klinik köpek cryptosporidiosis vakasını bildirmiştir (11).

Endonezya'nın Surabaya şehrinde yapılan bir çalışmada köpek dışkısında, aside dirençli boyama ve PZR ile *Cryptosporidium* pozitifliği araştırılmış ve araştırma sonucunda 50 köpeğin 40'ında *Cryptosporidium* tespit edilmiştir. Yapılan PZR analizleri

sonucunda pozitif örneklerin 4'ünün *Cryptosporidium canis*, 2'sinin ise *Cryptosporidium parvum* olduğu tespit

edilmiştir (12). Başka bir çalışmada Kalifornia eyaleti San Bernardino şehri hayvan barınağından 200 köpek dışkı aside dirençli boyama yöntemi ile incelenmiş ve 4(%2) oranında pozitiflik bulunmuştur (13). Diğer bir çalışma İspanya'da 44 sokak köpeği dışkısının aside dirençli boyama yöntemi ile 6(%7,4)'sında ookist görüldüğü rapor edilmiştir (14). Yapılan diğer bir çalışmada 30 Ekim 2019 tarihine kadar olan araştırmalarda meta analiz yapılmış ve dünyada köpeklerde *Cryptosporidium* prevalansının mikroskopik yöntemlerle %8 olduğu raporlanmıştır. Yapılan analizde moleküler analizler sonucunda köpeklerdeki *Cryptosporidium* türlerinin %3.64'ünün *Cryptosporidium canis*, %1.28'inin ise *Cryptosporidium parvum* olduğu bildirilmiştir (15).

Türkiye'de köpeklerde *Cryptosporidium* spp. yaygınlığı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada bir köpekte gençlik hastalığına ilaveden cryptosporidiosis tespiti laboratuvar, histolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik bulgularıyla tespit edilmiştir (16). Ege bölgesindeki köpeklerde *Cryptosporidium* spp. prevalansının belirlenmesini amaçlayan bir çalışmada farklı ırk, yaş ve cinsiyette sağlıklı (n=50) ve ishalleri (n=150) olmak üzere 200 köpek incelenmiş, dışkı örnekleri modifiye Ziehl-Neelsen tekniği ile boyanmış ve mikroskopta incelenmiştir. Tüm köpeklerden alınan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* spp. prevalansı %15.5, sağlıklı ve ishalleri köpeklerde ise sırasıyla %14 ve %16 olarak tespit edilmiştir (17). Kırıkkale'de yapılan başka bir araştırmada ise 200 sokak köpeği dışkı incelemesi sonucunda *Cryptosporidium* spp. prevalansı %2 olarak tespit edilmiştir (18). Bu çalışmada ise Sivas hayvan barınağından 100 köpek dışkısı direkt inceleme, boyama ve moleküler yöntemlerle test edilmiş ve boyama yöntemi sonucunda %2, PZR sonucunda ise %4 oranında *Cryptosporidium* spp. yaygınlığı tespit edilmiştir. Köpeklerde enfeksiyonun çoğunlukla asemptomatik seyredebileceği ve dışkıda ookist atılımının az olabileceği değerlendirilecek olursa prevalans çalışmalarının asemptomatik köpeklerle birlikte ve fenotipik analizlerin yanında moleküler analizlerle desteklenmesi gerektiği çalışma bulgularımıza dayanarak söylenebilmektedir.

Bu çalışma sonuçları irdelendiğinde; incelenen 100 dışkı örneğinde %4 (4 örnek) oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 7). Analiz yöntemleri baz alındığında bu oran asit-fast boyama yönteminde %2 (2 örnek), PZR

yönteminde ise %4 (4 örnek) olarak belirlenmiştir. Laboratuvarlarda boyama yöntemleri rutin olarak kullanılmakla birlikte sensitiviteyi düşüktür. Boya almayan ookistler nedeniyle özellikle az sayıda ookist içeren gaitalarda hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir (19). *Cryptosporidium* türlerini klinik olgulardan, gaita ile çok az miktarda ookist atan rezervuar konaklardan ve çevresel kaynaklardan izole etmek amacıyla moleküler tanı yöntemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış (20) hatta teşhiste kalite ve kantiteyi arttırmaya yönelik olarak Real Time PZR, çeşitli spesifik gen bölgelerini hedef alan Nested PZR gibi pek çok yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir (20, 21).

Sakarya ve ark. (2010) carbol fuchsin boyama ve nested PZR yöntemlerini kullanarak Ankara'nın farklı hastanelerine ishal şikayeti ile başvuran 98 vakadan ve yine Ankara'da bulunan çeşitli sığırcılık işletmelerindeki 32 buzağıdan sağlanan toplam 130 dışkı örneğini *Cryptosporidium* spp. yönünden taramışlardır. Örneklerin %10'unda nested PZR yöntemiyle pozitiflik saptanırken, bu oran carbol fuchsin boyama yönteminde ise 6.1'de kalmıştır. Araştırmacılar (22) özellikle az ookist atılımı olan olgularda PZR'in daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (22).

İshalleri buzağı ve çocuklarda *Cryptosporidium* spp. yönünden yapılan başka bir çalışmada (23) PZR'in boyama yöntemine göre daha hassas bir metod olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular (22, 23, 24) araştırma sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, alışımda, Sivas ilindeki köpeklerde *Cryptosporidium* spp.'nin %4'lik bir prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu oran hayvan barınaklarında %8, kontrol amacıyla getirilen köpeklerde %0 olarak tespit edilmiştir. Yaş grupları baz alındığında *Cryptosporidium* spp. en çok (%13.3) bir yaş altındaki köpeklerde olduğu gözlemlendi. Çalışma bulgularımıza dayanarak dışkı örneklerinden *Cryptosporidium* spp. tespitinde boyama metodu ile birlikte analizlerin moleküler yöntemlerle güçlendirilmesi gerektiğidir. Günümüzde, köpekler hem kırsal hem de kentsel alanlarda insanlara oldukça yakındır ve birçok zoonoz etkeni vücutlarında barındırabilir ve bu etkenleri insanlara bulaştırmada rezervuar konak görevi görebilmektedir. Bu açıdan prevalans çalışmaları oldukça önemli olup halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu bağlamda prevalans ile ilgili çalışmaların periyodik olarak yapılmasında yarar vardır.

Kaynaklar

1. Miller DL, Liggett A, Radi ZA, Branch LO. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a Puppy. *Veterinary Parasitology* 2003; 115: 199-204.
2. Current, WL, Garcia, LS. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1991; 4: 325-358.
3. Angus KW, Appleyard WT, Menzies JD, Campbell L, Sherwood O. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Vet Rec.* 1982; 110: 129-130.
4. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* 2008; 38: 1239-1255.
5. Santín M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal* 2013; 61: 1-10.
6. Lucca Pd, De Gaspari EN, Bozzoli LM, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. *Revista do*

- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2009; 51: 341-334.
7. González-Díaz M, Urrea-Quezada A, Villegas-Gómez I, et al. *Cryptosporidium canis* in two Mexican toddlers. The Pediatric Infectious Disease Journal 2016; 35: 1265-1266.
 8. Xiao L, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 1578-1583.
 9. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2008; 52: 309-323.
 10. Tzipori S, Campbell I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. Journal of Clinical Microbiology 1981; 14: 455-456.
 11. Wilson R, Holscher M, Lyle S. Cryptosporidiosis in a pup. Journal of the American Veterinary Medical Association 1983; 183: 1005-1006.
 12. Mufa RMD, Lastuti NDR, Legowo D. Detection of Cryptosporidiosis in dogs of veterinary clinics in Surabaya city using acid-fast staining and PCR. World's Veterinary Journal 2021; 11: 602-607.
 13. El-Ahraf A, Tacal Jr J, Sobih M, et al. Prevalence of cryptosporidiosis in dogs and human beings in San Bernardino County, California. Journal of the American Veterinary Medical Association 1991; 198: 631-614.
 14. Causape A, Quilez J, Sanchez-Acedo C, Del Cacho E. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. Veterinary Parasitology 1996; 67: 161-167.
 15. Taghipour A, Olfatfar M, Bahadory S, et al. The global prevalence of *Cryptosporidium* infection in dogs: A systematic review and meta-analysis. Veterinary Parasitology 2020; 281: 109093.
 16. Aydın Y, Güvenç T, Beyaz L, et al. Intestinal cryptosporidiosis associated with distemper in a dog. Ankara Univ Vet Fak Derg 2004; 51: 233-235.
 17. Öner G, Ulutaş B. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dogs in the Aegean Region. Animal Health Prod and Hyg 2022; 11: 26-31.
 18. Unal GG, Gokpinar S. Prevalence of intestinal parasites in dogs and its importance in terms of public health. Int J Veterinary and Animal Research 2020; 3: 64-68.
 19. Arrowood MJ. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15: 390-400.
 20. Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. Trop Med Health 2004; 32: 5-14.
 21. Jothikumar N, da Silva AJ, Moura I, Qvarnstrom Y, Hill VR. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual Taq Man assays. J Med Microbiol 2008; 57: 1099-1105.
 22. Sakarya Y, Kar S, Tanyuksel M. Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and Calves through Nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16: 977-980.
 23. Sungur T, Kar S, Güven E, et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. in feces with nested PCR and carbol fuchsin staining method. Türkiye Parazitolo Derg 2008; 32: 305-308.
 24. Özçelik S, Malatyalı E, Alim A, Değerli S. The investigation of *Cryptosporidium* spp. in water samples by PCR. Cumhuriyet Tıp Dergisi 2015; 37: 182-187.