

Taze ve Formaldehitile Saklanmış Dışkı Örneklerinde Cryptosporidiosisin Moleküler Tanısı

Derya DİRİM ERDOĞAN¹, Hande DAĞCI¹, Nevin TURGAY¹,
Ulus Salih AKARCA², M Ziya ALKAN¹

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Parazitoloji Anabilim Dalı, ²Gastroenteroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZET: İnsanlarda diyareye neden olabilen cryptosporidiosisin tanısında genellikle asit-fast boyama tekniği kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemle bazı *Cryptosporidium* spp. ookistleri boyanmayıp “hayalet benzeri” yapılar oluşturmakta ve değerlendirme deneyimli uzmanlarca yapılabilmektedir. Son yıllarda tanı ve genotiplendirmede yaygın olarak kullanılan PCR tekniği, yüksek sensitivitesiyle geleneksel yöntemlere alternatif oluşturmaktadır. Cryptosporidiosis tanısında taze ve formaldehitile saklanmış dışkı örneklerinde PCR yönteminin etkinliğini araştırmak amacıyla, Ağustos 2001-Ağustos 2003 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniğine başvuran ve dışkı incelemeleri sonucunda *Cryptosporidium* spp. ookistleri saptanan 22 hastaya ait toplam 33 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. 23’ü taze, 10 tanesi ise %10 formaldehit içinde saklanmış olan bu dışkı örneklerine nested-PCR yöntemi uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak, 8’i farklı parazitler içeren, 3’ü parazitolojik açıdan negatif olan toplam 11 dışkı örneği alınmıştır. Uygulanan nested-PCR yönteminin taze dışkılarıda sensitivite ve spesifitesi %100, formaldehitli dışkılarıdaki sensitivitesi ise %50 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, cryptosporidiosisin moleküler tanısında saptanan yüksek sensitivite nedeniyle taze dışkı örneklerinin tercih edilmesi gerektiği ve özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarıda PCR’in, asit-fast boyama yöntemine alternatif bir tanı yöntemi olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Cryptosporidium* spp., nested-PCR, dışkı

The Molecular Diagnosis of Cryptosporidiosis in Fresh and Formalin Preserved Fecal Samples

SUMMARY: The acid-fast staining method is widely used in the diagnosis of cryptosporidiosis, a disease causing diarrhea in humans. However in this technique, some of *Cryptosporidium* spp oocysts can not be stained and seen as formed “ghost-like bodies” and which can only be evaluated by experienced microscopists. In the recent years, PCR technique which is proven to be also highly sensitive in diagnosis and genotyping, is used as an alternative method. In our study we aimed to evaluate the efficacy of PCR in diagnosis of cryptosporidiosis. Thirty-three stool samples, belonging to 22 patients who applied to Ege University Hospital, Parasitology Clinic between August 2001 – August 2003 and microscopically diagnosed as cryptosporidiosis has been included in the study. Twenty-three of these 33 samples were processed immediately, while ten samples were stored in 10% formalin. As the control group, 11 stool samples including 8 specimens with different parasites and 3 negative samples were selected. Nested-PCR is applied to all samples. The sensitivity and specificity of the method for fresh and formalin preserved samples were found to be 100% and 50%, respectively. As a conclusion, PCR technique is found to be useful for diagnosis in cryptosporidiosis patients with especially those including few oocysts in their fresh feces.

Key Words: *Cryptosporidium* spp., nested-PCR, feces

GİRİŞ

Cryptosporidiosis tanısı sıklıkla dışkı örneklerinde aside dirençli parazitleri saptayan Kinyoun asit-fast veya Ziehl-Neelsen gibi boyama yöntemleriyle 4-6 µm çapındaki ookistlerin görülmesiyle konulmaktadır (6). *Cryptosporidium*

dışında *Isospora* ve *Cyclospora* gibi fırsatçı parazitleri saptayan bu yöntem, sadece gelişmiş laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmakta ve değerlendirilmeleri tecrübeli uzmanlarca yapılabilmektedir. Boya almayan ookistler nedeniyle özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarıda yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (1). Mikroskopik tanıdaki bu sorunlardan dolayı son yıllarda geliştirilen tanı yöntemlerinden biri olan PCR’in duyarlı bir yöntem olduğu ve boyanmada sorun yaşanan vakalarda alternatif bir teknik olabileceği bildirilmektedir (3, 6).

Çalışmamızda, cryptosporidiosis tanısında taze ve formaldehitile saklanmış dışkı örneklerinde PCR yönteminin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 17 Şubat/17 February 2009

Düzeltilme tarihi/Revision date: 02 Haziran/02 June 2009

Kabul tarihi/Accepted date: 02 Haziran/02 June 2009

Yazışma /Corresponding Author: Derya Dirim Erdoğan

Tel: (90) (232) 390 47 23 Fax: (90) (232) 388 13 47

E-mail: derya.dirim@ege.edu.tr

14. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (18-25 Eylül 2005, İzmir) sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ağustos 2001-Ağustos 2003 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Polikliniğine başvuran hastalardan, dışkı incelemeleri sonucunda *Cryptosporidium* sp. oookistleri saptanan 22 hastaya ait dışkı örnekleri çalışma grubuna seçilmiştir. Yapılan ilk incelemelerinde *Cryptosporidium* saptanan olguların tedavi sonrası elde edilebilen dışkıları çalışmaya dahil edilmiş ve her hasta için bir numara verilerek, tedavi sonrası dışkıları da A, B, C olarak etiketlenmiştir. PCR yöntemi, 23'ü taze, 10 tanesi ise %10 formaldehit içinde saklanmış olan toplam 33 pozitif dışkı örneğine uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak, dışkı incelemeleri sonucunda *Cryptosporidium* sp. oookistleri saptanmayan ancak *Giardia intestinalis* (n: 2), *Entamoeba histolytica* (n: 2), *Blastocystis hominis* kistleri (n: 2), *Isospora belli* (n: 1) ve *Cyclospora* sp. oookistleri (n: 1) saptanan dışkıları ve hiçbir parazite rastlanmayan (n: 3) örneklerden oluşan toplam 11 dışkı örneği seçilmiştir.

Tüm dışkıları, nativ-lugol yöntemi, modifiye Ritchie çöktürme yöntemiyle elde edilen sedimentten elde edilen örnek nativ-lugol ve Kinyoun asit-fast boyama yöntemleri ile incelenmiştir (7). *Cryptosporidium* sp. oookistleri saptanan dışkıları farklı hastalara ait olan 10 örnek %10 formaldehit içinde +4 °C'de saklanmıştır. Diğer pozitif dışkıları ve kontrol grubu örnekleri ise taze olarak +4 °C'de saklanmış ve 15 gün içinde DNA ekstraksiyonu uygulanmıştır.

Çalışma grubundaki dışkıları bir kısmı %10 formaldehitte saklandığından, çalışmadaki tüm dışkıları DNA'ları elde edilmesi ve amplifikasyonunda, Kostrzynska ve arkadaşlarının formaldehitli dışkıları kullandıkları DNA ekstraksiyonu ve Nested-PCR yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır (10). Yöntemin duyarlılığı, parazit yoğunluğuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Parazitin yoğunluğunu belirlemede, McLauchlin ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır (12). Kinyoun Asit-fast boyama yöntemi ile boyanan *Cryptosporidium* sp. oookistleri, 20 alanda sayılıp alan başına düşen parazit sayısı hesaplanarak, örnekler oookist sayısına göre (-) ile 3+ arasında değişen gruplara ayrılmıştır. Sayılan 20 alanda hiç oookiste rastlanmayan örneklerde ise tüm lamdaki oookistler sayılmıştır. Her alanda <1 oookiste karşılık gelen ± grubu da, 20 alanda birden az (±a) ve 20 alanda en az 1 (±b) olmak üzere iki alt gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

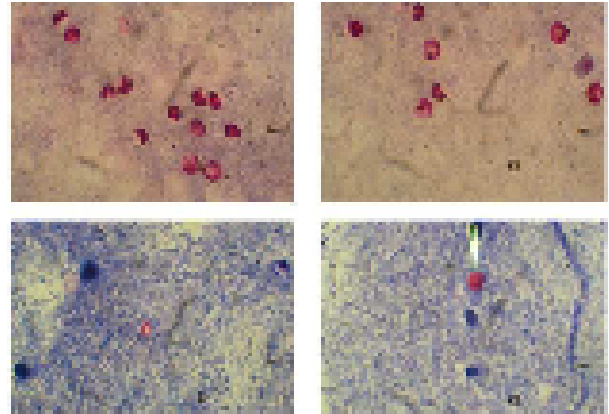
Dışkıdan DNA ekstraksiyonunda genomic DNA purification kit (Fermentas) kullanılmıştır. Kostrzynska ve arkadaşlarının önerdiği şekilde taze dışkıları bir kez, formaldehitli dışkıları ise üç defa %0.1 PBS-Tween 80 ile yıkandıktan sonra kit ile üretici firmanın önerdiği şekilde DNA ekstraksiyonu uygulanmıştır.

C. parvum'un oookist duvar proteinini kodlayan genin bir parçasını hedefleyen iki ayrı primer çifti kullanılarak nested-PCR yöntemi uygulanmıştır. Önce dış primerlerle (Forward - 5' GCC CAC CTG GAT ATA CAC TTT C3' ; Reverse - 5'

TCC CCC TCT CTA GTA CCA ACA GGA 3') hedef DNA'nın başlangıç amplifikasyonu yapılmış ve 358 base pair (bp)'lik DNA elde edilmiştir. Bu ilk PCR ürünündeki 310 bp'lik parçayı hedefleyen nested primerlerle (Forward 2 - 5' GAT CCC AAT GCG AGC AAA T 3' ; Reverse 2 - 5' CAA ACG TAT TGA AGA GC 3') de ikinci amplifikasyon yapılmıştır. Kurulan her reaksiyonda parazit yoğunluğu fazla olan bir dışkıdan elde edilen DNA pozitif kontrol, distile su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İlk amplifikasyonda 94 °C'de 1 dakika başlangıç denatürasyonu, 40 siklus 94 °C'de 15 saniye denatürasyondan sonra, annealing için 50 °C'de 1 dakika, uzatma için 72 °C'de 1 dakika bekletilmiştir. Son siklusta uzatma için ek olarak 72 °C'de 7 dakika bekletilmiştir. İkinci DNA amplifikasyonu annealing için 45 °C'de 1 dakika bekletilmesi dışında ilk amplifikasyonla aynı şartlarda uygulanmıştır. Tüm amplifikasyon ürünleri, ethidium bromide içeren %1,5'luk agaroz jele elektroforez uygulanarak, ultraviyolete transilluminatörde (312 nm) gösterilmiştir.

BULGULAR

Çalışma grubundaki 22 hastaya ait toplam 33 dışkı örneğinde Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ile *Cryptosporidium* sp. oookistleri saptanmıştır (Şekil 1).

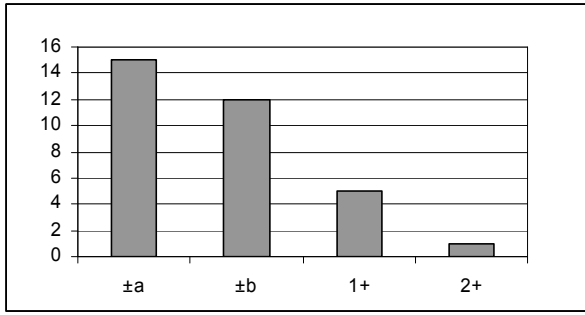


Şekil 1. Çalışma grubundaki hastaların dışkılarındaki saptanan *Cryptosporidium* sp. oookistleri

Çalışma grubundaki hastalardan ikisinin dışkısında, uygulanan diğer mikroskopik yöntemlerle *Cryptosporidium*'a ek olarak *Blastocystis hominis* kistleri, 1 tanesinde *Giardia intestinalis* trofozoitleri görülmüş, bir hastada ise *Entamoeba coli*, *Giardia intestinalis* ve *Iodamoeba bütschlii* kistleri saptanmıştır.

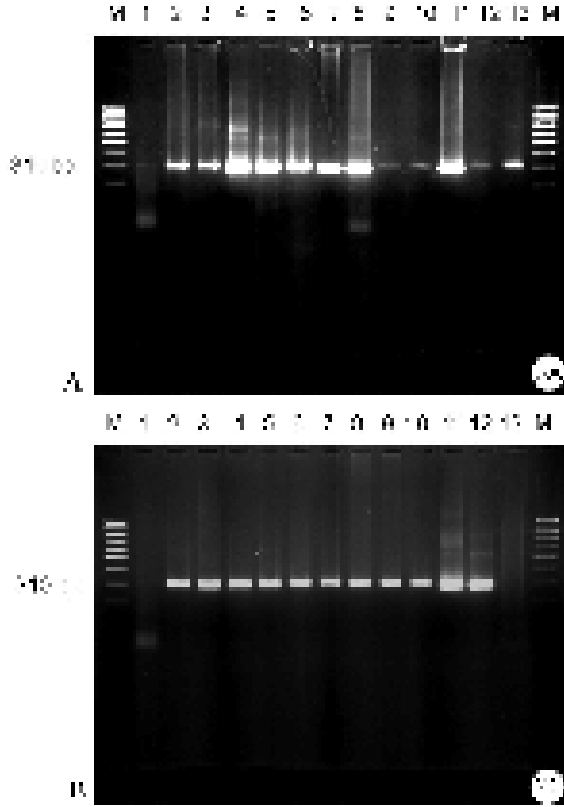
Çalışma grubundaki dışkıları sadece 6 tanesinde parazit yoğunluğunun x1000 büyütmede her alanda bir ve üstü olduğu görülmüş, 27 dışkı örneğinin 12'sinde en az 20 alanda bir, 15'inde ise 20 alanda birden az olduğu saptanmıştır (Şekil 2).

Uygulanan nested-PCR yöntemiyle, çalışma grubundaki 12 hastaya ait toplam 23 taze dışkı örneğinin hepsinde *C. parvum*'a spesifik 310 bp'lik bant elde edilerek, *C. parvum*'un varlığı gösterilmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Çalışma grubundaki dışkıların parazit yoğunluğuna göre dağılımı

Çalışma grubunda yer alan diğer 10 hastaya ait %10 formaldehit içinde saklanmış olan 10 dışkının 5'inde (13, 14, 16, 19 ve 21. hastalar) uygulanan nested-PCR yöntemiyle *C.parvum*'a spesifik 310 bp'lik bant elde edilirken, diğer 5'inde (15, 17, 18, 20 ve 22. hastalar) spesifik bant gözlenmemiştir (Şekil 4).



Şekil 3. Çalışma grubundaki 12 hastaya ait 23 taze dışkı örneğinin nested-PCR sonuçları.

(A; M: markır, 1: su, 2: 1A, 3: 1B, 4: 2A, 5: 2B, 6: 3A, 7: 4A, 8: 5A, 9: 6A, 10: 6B, 11: 6C, 12: 6D, 13: 6E ve B; M: markır, 1: su, 2: 7A, 3: 7B, 4: 8A, 5: 9A, 6: 9B, 7: 9C, 8: 9D, 9: 9E, 10: 10A, 11: 11A, 12: 12A, 13: negatif dışkı)

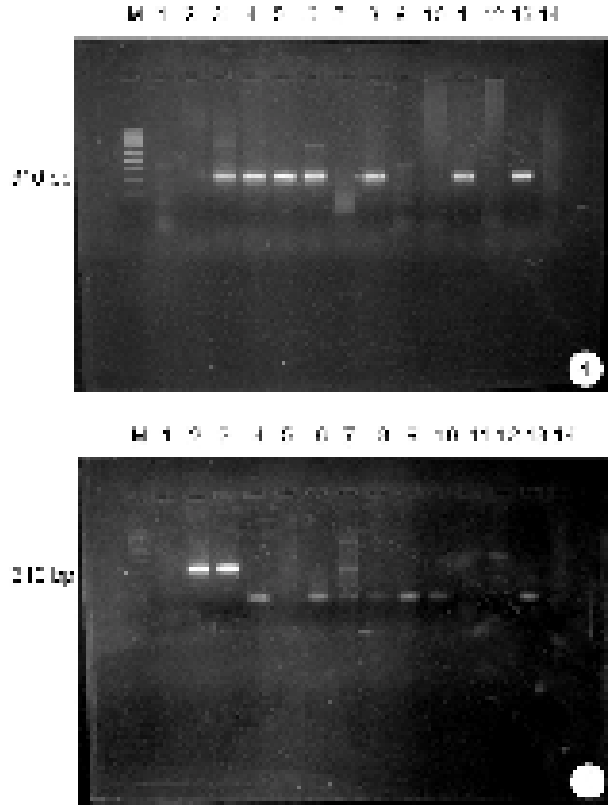
Kontrol grubundaki 11 dışkı örneğinin hiçbirinde *C.parvum*'a spesifik 310 bp'lik bant elde edilmemiştir (Şekil 5).

Çalışma ve kontrol grubundaki tüm dışkıların Kinyoun asit-fast boyama (mikroskopi) ve nested-PCR sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Çalışma grubundaki dışkılarda mikroskopik olarak saptanan parazit yoğunlukları ile Nested-PCR sonuçlarının karşılaştırılmasında formaldehitli gruptaki PCR pozitifliği ile parazit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 2). Uygulanan nested-PCR yönteminin taze dışkılarda sensitivite ve spesifitesi %100, formaldehitli dışkılardaki sensitivitesi ise %50 bulunmuştur.

TARTIŞMA

C.parvum'un immün sistemi sağlam veya baskılanmış kişilerde diyareye neden olması ve su kaynaklı salgınlara yol açması, bu parazitin tanısında farklı yöntemlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda hızlı bir artışa neden olmuştur (4).



Şekil 4. Çalışma grubundaki 10 hastaya ait %10 formaldehitte saklanmış 10 dışkı örneğinin nested-PCR sonuçları.

(M:markır, 1:su, 2:negatif dışkı, 3-4:pozitif kontrol, 5:13A, 6:14A, 7:15A, 8:16A, 9:17A, 10:18A, 11:19A, 12:20A, 13:21A, 14:22A)

Şekil 5. Kontrol grubundaki 11 hastaya ait dışkı örneklerinin nested-PCR sonuçları. (M:markır: 1:su, 2-3:pozitif kontrol, 4-5-6:negatif dışkı, 7-8:*B.hominis*, 9:*Cyclospora* sp., 10:*Isospora* sp., 11-12:*E. histolytica*, 13-14:*G. intestinalis*)

Tablo 1. Çalışma ve kontrol grubundaki tüm dışkıların Kinyoun asit-fast boyama ve nested-PCR sonuçları.

Çalışma grubu	Mikroskopi		Nested PCR	
	Neg	Poz	Neg	Poz
Taze dışkılar	0	23	0	23
Formaldehitli dışkılar	0	10	5	5
Kontrol grubu	11	0	11	0
Toplam	11	33	16	28

Tablo 2: Çalışma grubundaki tüm dışkıların nested-PCR sonuçları ile parazit yoğunluklarının karşılaştırılması.

	Parazit Yoğunluğu			
	±a	±b	+1	+2
Taze Dışkılar				
PCR (+)	10	8	5	0
PCR (-)	0	0	0	0
Formaldehitli dışkılar				
PCR (+)	2	2	0	1
PCR (-)	3	2	0	0
Toplam	15	12	5	1

Günümüzde cryptosporidiosis tanısında “altın standart” olarak kabul edilen yöntem konsantre edilmiş dışkıların Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle değerlendirilmesidir. Ancak parazitolojik tanı rutin olarak kullanılmayan bu spesifik yöntemin, zaman alıcı olduğu ve mikroskobik değerlendirme için tecrübeli kişilere ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (3, 6, 11).

Cryptosporidiosisli hastalarda dışkıdaki ookist sayısının değişken ve atılımının aralıklı olması ve cryptosporidial infeksiyonların iyileşme döneminde non asit-fast yani “hayalet” ookistlerin sayısının artması nedeniyle yanlış negatif sonuçların alınabileceği bildirilmiştir (1, 2, 5, 16). Bu nedenlerle özellikle tedavi sonrası hastalarda negatif sonuç verilmeden önce en azından beş veya altı asit-fast yaymasının incelenmesi gerekmektedir (8).

Çalışmamızda bir hastanın, tek bir asit-fast yaymasının incelenmesiyle negatif olarak değerlendirilen tedavi sonrası dışkı örneğine uygulanan nested-PCR sonucunda *C.parvum*'a spesifik bant elde edilmiş ve tekrar değerlendirilen dört yaymadan sadece birinde tek bir *Cryptosporidium* ookisti saptanmıştır. Özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarda veya tedavi sonrası kontrol amacıyla değerlendirilen örneklerde tek bir asit-fast yaymasının incelenmesinin yetersiz olabileceği ve PCR gibi daha duyarlı bir yöntemle sonucun desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Son yıllarda, cryptosporidiosis tanısında alternatif olarak kullanılan çeşitli PCR tekniklerinin, bir ookisti bile saptayabildiği ve asit-fast, karbol fuksin gibi boyama yöntemlerinden daha yüksek sensitiviteye sahip, uygulaması kolay, göreceli olarak düşük maliyetli olduğu ve aynı anda birçok örneğin değerlendirilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (3, 6, 9, 13, 15, 17).

Ancak PCR yönteminin, nükleik asitler, ölü mikroorganizmalar ve laboratuvar kontaminasyonlarına bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlar verme; dışkıda bulunan hemoglobin yıkım ürünleri, bilirubin, safra asitleri ve mineral iyonların DNA amplifikasyonunu inhibe etmesi sonucunda da yanlış negatif sonuçlara neden olma gibi bazı sınırlamalarının bulunduğu bildirilmiştir (6, 10, 17).

Dışkıda *C.parvum* tanısında Ziehl-Neelsen boyama, ELISA ve PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı 324 hastalık bir çalışmada nested-PCR yönteminin, sensitivite ve spesifitesinin bu iki yöntemden daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir (4).

Çalışmamızda, dışkıdan DNA ekstraksiyonunda kullanılan Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), taze veya donmuş insan veya hayvan kanı, hücre kültürleri, çeşitli dokular (memeli veya bitki) ile gram pozitif ve gram negatif bakterilerden çift-iplikli DNA'nın izole edilmesi için geliştirilmiştir. 20-25 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanan yöntemde, kloroformla ekstraksiyon uygulanmaktadır. Çalışmamızda bu kit, dışkıdan DNA ekstraksiyonunda ilk kez kullanılmış olup, çok iyi sonuçlar vermiştir. Çalışma grubundaki taze dışkıların hepsinden bu yöntemle DNA elde edilmiş ancak 10 formaldehitli dışkının 5 tanesinde amplifikasyon sonucunda DNA gösterilirken, diğer 5'inde spesifik bant gözlenmemiştir.

+4 °C' de saklanan taze insan ve çiftlik hayvanlarına ait dışkı örneklerinde, farklı genleri hedefleyen primerlerle çeşitli PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; COWP genini hedefleyen iki çift primerin (BCOWPF/BCOWPR ve Cry9/Cry15) kullanıldığı nested-COWP-PCR yönteminin en sensitif ve spesifik metod olduğu bildirilmiştir (14). Başka bir çalışmada, +4 °C'de 11 gün-3 ay süreyle taze olarak saklanmış 218 diyareli hastanın dışkı örneklerine, farklı genlerini hedefleyen primerlerle çeşitli PCR prosedürleri uygulanmış ve bu yöntemlerin duyarlılıkları, modifiye Ziehl-Neelsen ve immuno-fluoresan boyama teknikleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Ookist gözlenen 211 dışkıda 18S rDNA, COWP ve TRAP-C1 genlerini saptayan PCR'ların sensitivite sırasıyla, %97, %91 ve %66 olarak bildirilmiştir (12).

Çalışmamızda, 12 hastaya ait toplam 23 taze dışkı örneğinin hepsinde nested-PCR yöntemiyle *C.parvum*'a spesifik 310 bp'lik bant elde edilmiştir. Kullanılan nested-PCR yönteminin spesifitesini belirlemek amacıyla, aynı yöntemin uygulandığı kontrol grubundaki toplam 11 dışkı örneğinde ise spesifik bant elde edilmemiştir. Daha önce %10 formalin veya %2,5 potasyum dikromatta saklanan dışkı örneklerine uygulanan bu nested-PCR yöntemi (9) çalışmamızda taze dışkı örneklerinde cryptosporidiosis tanısında ilk kez kullanılmış olup, taze dışkılar için sensitivite ve spesifitesinin %100 olduğu saptanmıştır. Ayrıca Kostrzynska ve arkadaşlarının (10) yaptığı çalışmada yöntemin spesifitesi sadece *Cryptosporidium* sp. açısından negatif olan dışkılarla değerlendirilmiş, diğer parazitlerle çapraz reaksiyon araştırılmamıştır. Çalışmamızda ilk kez farklı parazitler içeren 8 dışkının, uygulanan nested-PCR yöntemiyle çapraz reaksiyon vermediği gösterilmiştir.

Dışkıların %10 formaldehitte özellikle uzun süre saklanmalarının DNA amplifikasyonunu inhibe ederek PCR'in sensitivitesini azalttığı belirtilmiştir (3). Çalışmamızda, çalışma grubundaki 10 hastaya ait %10 formaldehit içinde saklanmış 10 dışkının 5'inde *C.parvum*'un varlığı PCR ile gösterilirken, diğer 5'inde spesifik bant gözlenememiştir. Kullanılan nested-PCR yönteminin %10 formaldehitte saklanan dışkılar için sensitivitesinin %50 olduğu saptanmıştır. Formaldehitli dışkıların PCR pozitifliği ile parazit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış ($p>0,05$) ve formaldehitli dışkılardaki düşük sensitivitenin, DNA ekstraksiyonu öncesinde formaldehitin tam olarak uzaklaştırılmaması sonucunda PCR'in formaldehitle inhibisyonuna bağlı olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız nested-PCR yönteminin %10 formalin veya %2,5 potasyum dikromatta saklanan dışkı örneklerine uygulandığı çalışmada da IFA pozitif örnekler ile nested-PCR sonuçları arasındaki uyumun %47,2 olduğu belirtilmiştir (10).

Sonuç olarak; çalışmamızda cryptosporidiosisin moleküler tanısında saptanan yüksek sensitivite nedeniyle taze dışkı örneklerinin tercih edilmesi gerektiği ve özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarda PCR'in, asit-fast boyama yöntemine alternatif bir tanı yöntemi olarak kullanılabilceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Arrowood MJ**, 1997. Diagnosis. Fayer R. Ed. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. US: CRC Pres. p. 43-64.
2. **Bogaerts J, Lepage P, Rouvroy D, Vandepitte J**, 1984. *Cryptosporidium spp.*, A Frequent Cause of Diarrhea in Central Africa. *J Clin Microbiol*, 20 (5): 874-876.
3. **Clark DP**, 1999. New Insights into Human Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 12 (4): 554 -563.
4. **El-Shazly AM, Gabr A, Mahmoud MSL, Aziz SSA, Saleh WA**, 2002. The Use of Ziehl-Neelsen Stain, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Nested Polymerase Chain Reaction in Diagnosis of Cryptosporidiosis in Immunocompetent, Compromised Patients. *J Egypt Soc Parasitol*, 32(1): 155-166.
5. **Entrala E, Rueda-Rubio M, Janssen D, Mascaro C**, 1995. Influence of Hydrogen Peroxide on Acid-fast Staining of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Int Journal Parasitology*, 25 (12): 1473-1477.
6. **Fayer R, Morgan U, Upton SJ**, 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int Journal Parasitology*, 30: 1305-1322.
7. **Garcia LS, Bruckner DA**, 1993. Macroscopic and Microscopic Examination of Fecal Specimens. *Diagnostic Medical Parasitology*. Second Edition. Washington DC: American Society for Microbiology, p.501-540.
8. **Garcia LS, Bruckner DA**, 1993. Intestinal Protozoa: Coccidia and Microsporidia. *Diagnostic Medical Parasitology*, Second Edition. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 49-74.
9. **Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla N**, 2008. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Trop*, 107:1-7.
10. **Kostrzynska M, Sankey M, Haack E, Power C, Aldom JE, Chagla AH, Unger S, Palmateer G, Lee H, Trevors JT, De Grandis SA**, 1999. Three Sample Preparation Protocols for Polymerase Chain Reaction Based Detection of *Cryptosporidium parvum* in Environmental Samples. *J Microbiol Methods*, 35: 65-71.
11. **Leav BA, Mackay M, Ward HD**, 2003. *Cryptosporidium* Species: New Insights and Old Challenges. *Clin Infect Dis*, 36: 903-908.
12. **McLauchlin J, Pedraza-Díaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL**, 1999. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Strains from 218 Patients with Diarrhea Diagnosed as Having Sporadic Cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol*, 37(10): 3153-3158.
13. **Morgan UM, Thompson RCA**, 1998. PCR Detection of *Cryptosporidium*: The Way Forward? *Parasitol Today*, 14(6): 241-245.
14. **Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J**, 2001. Nested Polymerase Chain Reaction for Amplification of the *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein Gene. *Emerg Infect Dis*, 7(1): 49-56.
15. **Sungur T, Kar S, Güven E, Aktaş M, Karaer Z, Vatanserver Z**, 2008. *Cryptosporidium* spp'nin Dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi İle Teşhis Edilmesi. *Türkiye Parazit Derg*, 32(4):305-308.
16. **Ungar BLP**, 1995. *Cryptosporidium*. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Forth Edition. US: Churchill Livingstone, p.2500-2510.
17. **Ward LA, Wang Y**, 2001. Rapid Methods to Isolate *Cryptosporidium* DNA from Frozen Feces for PCR. *Diag Microbiol Infect Dis*, 41: 37-42.