

Cryptosporidium spp'nin İshalli Hastalarda Mikroskopik ve Serolojik Yöntemlerle Araştırılması

The Investigation of Cryptosporidium spp. in Patients with Diarrhea by Microscopic and ELISA Methods

¹Ahmet Yılmaz, ²Önder Akkaş, ³Meral Bayar, ⁴Hakan Uslu, ³Kemalettin Özden

¹Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Erzurum

²Iğdir Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu, Iğdir

³Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

⁴Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Özet

Cryptosporidium spp. gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ishale neden olan parazitler arasında hala önemli bir yere sahiptir. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde ölümcül ishalelere neden olabilen, zorunlu olarak hücre içi yerleşim gösteren bir protozondur. Bu çalışmada hastanemizdeki kronik ve akut ishal ön tanısı almış hastalarda etken olarak Cryptosporidium spp.'nin araştırılması, etkenin tanısında Modifiye Asit Fast boyama ve ELISA (Enzim Linked Immunosay Absorbant) yöntemini birlikte uygulayarak iki yöntemin sonuçlarını karşılaştırmak amaçlanmıştır. Kasım 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında Erzurum Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinden Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 86 ishali dışkı örneği araştırma kapsamına alınmıştır. Çalışma grubundaki dışkı örneklerine aynı gün Modifiye Asit Fast boyama yöntemi uygulanarak mikroskopta 100X objektifde incelendi. Toplanan dışkı örneklerinin bir kısmı ise hiçbir koruyucu madde ilave edilmeden ependorf'lara alınarak -20 °C'de saklandı. Saklanmış bu örnekler daha sonra Cryptosporidium antijenlerini aramaya yönelik hazırlanmış ELISA yöntemiyle çalışıldı. Kit üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Değerlendirme 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda yapıldı. Yaşları 0-83 arasında değişen 43 kız, 43 erkek bireylerden oluşan 86 kişiye ait gaita örneklerinde toplam 6 örnekte Modifiye Asit-Fast boyama ile pozitif sonuç saptanırken, ELISA yöntemiyle 8 örnekte pozitiflik saptanmıştır. ELISA yöntemiyle pozitiflik saptanan olguların 4'ü (%50) erkek, 4'ü (%50) kız idi. Modifiye Asit Fast boyama yönteminde ise pozitiflik saptanan olgular 2'si erkek (%33.3), 4'ü kız idi (%66.7). Sonuç olarak, dışkıda özgül antijen arayan ELISA'nın maliyeti, boyama yöntemine göre yüksek olmasına rağmen, uygulamada sağladığı avantaj, çok sayıda örneğe birlikte uygulama kolaylığı sağlaması ve hızlı sonuç vermesi gibi nedenlerle ELISA yönteminin Cryptosporidium tanısında tercih edilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Cryptosporidium, ishal, modifiye asit fast boyama, ELISA

*Bu çalışma 6th EACID Kongresi 24-27 Eylül 2014, Belgrad, Serbia'da poster formatında yayınlanmıştır.

Abstract

Cryptosporidium spp. has still an important place among parasites which are the main reason of diarrhea both developing and developed countries. It is an obligate intracellular protozoan that may lead fatal diarrhea in immune-suppressed persons. In this study, our aim was to investigate the presence of Cryptosporidium oocysts as an agent in pre-diagnosed patients with chronic and acute diarrhea by using both Modified Acid Fast Staining and ELISA methods. For our study, 86 diarrheal stool samples were collected which were sent from Atatürk University Medical Faculty Research and Application Hospital Clinics to Microbiology Laboratory between December 2013 and May 2014. At the same day, Modified Acid Fast Staining method was performed to stool samples and examined under the microscope (with 100X magnification). A small pieces of feces were placed in eppendorf tubes without adding any preservatives and stored at -20°C. After a while, ELISA method was performed to these stored samples for detecting Cryptosporidium antigens. Kit was performed as recommended by the manufacturer and the results was evaluated with ELISA reader at 450 nm. A total 6 of samples by Modified Acid Fast Staining and 8 samples by ELISA were detected as positive in stool samples of 86 patient (43 female and 43 male) having age range of 0-83 years. Four (50%) positive samples, which were detected by ELISA, were belong to either female or male patients. For Modified Acid Fast Staining, 2 (33.3%) of positive samples were belong to male patients, 4 (66.7%) of positive samples were belong to female patients. As a consequent; although ELISA method is costly than staining method, we suggest that ELISA method should be preferred for Cryptosporidium diagnosis because of the advantages including quick results and ease of application.

Key words: Cryptosporidium, diarrhea, modified acid fast staining, ELISA

GİRİŞ

Cryptosporidium türleri, insanları da içine alan çok geniş bir omurgalı grubunun sindirim ve solunum sistemi epitelinin mikrovillüslerine intraselüler, ekstrastoplazmik olarak yerleşim gösteren, zoonotik

öneme sahip protozoonlardır (1,2). Cryptosporidium ilk olarak 1895 yılında J.J. Clark tarafından fare mide epitelinde spor kümeleri olarak tanımlanmış (3), Cryptosporidium ile ilgili ilk insan enfeksiyonu ise 1976 yılında gastroenteriti 3 yaşında bir kız da daha sonrada

Tablo 1. Sonuçların cinsiyet, yaş ve kullanılan yöntemle göre dağılımı

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Klinik	MAF boyama	ELISA
1	E	33	Enfeksiyon Hast.	+	+
2	K	71	Enfeksiyon Hast..	+	-
3	K	75	Enfeksiyon Hast.	+	+
4	K	68	Medikal Onk.	+	+
5	E	71	Radyasyon Onk.	+	+
6	K	45	Dahiliye	+	+
7	K	2	Çocuk	-	+
8	E	1	Çocuk	-	+
9	E	9	Acil Çocuk	-	+

bağışıklığı baskılayıcı ilaç kullanan bir çiftçide bildirilmiştir (4-6). Bugün, yapılan araştırmalarla *Cryptosporidium*'un Antartika dışında dünyanın her bölgesinde görüldüğü bilinmektedir (7,8). Günümüzde 26 farklı *Cryptosporidium* türünün olduğu bildirilmektedir (9). Bu türlerden 6'sı insan cryptosporidiosis vakalarının en sık nedenidir bu türler ise sırasıyla *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* ve *C. canis*'dir.

İnsanda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun ortaya çıkması için, fekal-oral yolla bulaşan oocistlerin enfekte insan, hayvan veya kontamine yüzeylerle yakın temasta ya da su ve yiyeceklerle alınması gerekir (10). İnsanlarda *Cryptosporidium* enfeksiyonu ciddi diyareye neden olabilir, diyare immünkompetan bireylerde genellikle kendi kendini sınırlandırırken, immünsupresif bireylerde kronik ve hatta yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilir (11). *Cryptosporidiosis*'in rutin tanısı genelde dışkı taraması ve etkenin görülmesi prensibine dayanır (12), bunun yanında serum analizi ve etkene spesifik antikorun tayini ile de yapılabilmektedir (13).

Bu çalışmada, hastanemizde kronik ve akut ishal ön tanısı almış hastalarda etken olarak *Cryptosporidium* spp.'nin araştırılması, etkenin tanısında Modifiye Asit Fast boyama (MAF) ve ELISA yöntemini birlikte uygulayarak sonuçları karşılaştırmak, yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğünün araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kasım 2013 – Mayıs 2014 tarihleri arasında Erzurum Yakutiye Araştırma ve Uygulama Hastanesinde; intaniye, hematoloji, nefroloji, medikal onkoloji, çocuk, çocuk hematoloji, organ nakli, obstetrik, dahiliye gastroenteroloji, nefroloji kliniklerinden yaşları 0-83 arasında değişen kronik veya akut gastroenteritli 86 hastanın ishal örnekleri çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya alınan ishali dışkı örnekleri ilk olarak nativ-lugol yöntemi ile barsak helmintleri ve protozoonları açısından değerlendirildi. Daha sonra çalışma grubundaki dışkı örneklerine aynı gün herhangi bir çöktürme yöntemi uygulanmadan MAF boyama yöntemi (14) uygulanarak mikroskopta 100X objektifte incelendi. Toplanan dışkı örneklerinin bir kısmı ise hiçbir koruyucu madde ilave edilmeden ependorflara alınarak -20 °C'de saklandı. Saklanmış bu örnekler daha sonra *Cryptosporidium* spp. antijenlerini belirlemeye yönelik olarak *Cryptosporidium* 2. Nesil ELISA kit (Diagnostic Automation, USA,

Lot: DALN1082) kullanıldı. Kit üretici firmanın çalışma prosedürü doğrultusunda uygulandı. Değerlendirme 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda yapıldı.

Çalışma için gerekli etik onayı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alındı (Onay tarihi:26.12.2013 karar no:18).

MAF boyama sonuçları ve ELISA yönteminin sonuçları birbiriyle karşılaştırıldı. Her iki yöntemin birbirine göre ayrı ayrı duyarlılığı, özgüllüğü pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri ve doğruluk oranları hesaplandı. Yine iki yöntemin sonuçları kappa analizi yapılarak birbiriyle uyumu değerlendirildi.

BULGULAR

Yaşları 0-83 arasında değişen 43 kız, 43 erkek bireylerden oluşan 86 kişiye ait gaita örneklerinde toplam 6 örnekte MAF boyama ile pozitif sonuç saptanırken, ELISA yöntemiyle 8 örnekte pozitiflik saptanmıştır. ELISA yöntemiyle pozitiflik saptanan olguların 4'ü (%50) erkek, 4'ü (%50) kız idi. MAF boyama yönteminde ise pozitiflik saptanan olgular 2'si erkek (%33.3), 4'ü kız idi (%66.7; Tablo 1).

MAF boyama yöntemi baz alınarak ELISA yönteminin, ELISA yöntemi baz alınarak da MAF boyama yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri ve doğruluk oranı hesaplandı. Ayrıca Kappa analizi yapılarak iki yöntemin sonuçlarının birbiriyle uyumuna bakıldı (Tablo 2).

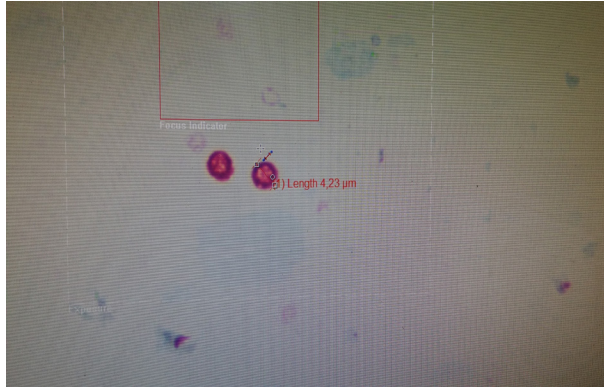
Seksen altı hastaya ait dışkı örnekleri nativ-lugol ile yöntemiyle incelendi ve bulunan parazitlerin sayı ve yüzdesi Tablo 3'de gösterilmiştir. MAF boyama sonucu görülen *Cryptosporidium* spp.'ye ait oocistler (Şekil 1) ve bu çalışmamızda ELISA plağında oluşan plak resimleri (Şekil 2) sunulmuştur.

TARTIŞMA

Kanserli olgu sayılarının günümüzde iyice artması, bağışıklığı baskılayan ilaçların kullanımının artması, nüfusun yaşlanması ve beslenme yetersizliği sonucunda parazit enfeksiyonlara duyarlılık artmıştır. *Cryptosporidiosis*'de dünyada giderek yaygınlaşan, hem immünkompetan hem de immünsupresif bireylerde sağlık problemi oluşturan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle hastane kaynaklı ishallerde üçüncü en sık patojen (%7.2) olarak yer alması

Tablo 2. ELISA ve MAF boyama yönteminin birbiriyle karşılaştırılması sonucu bulunan değerler.

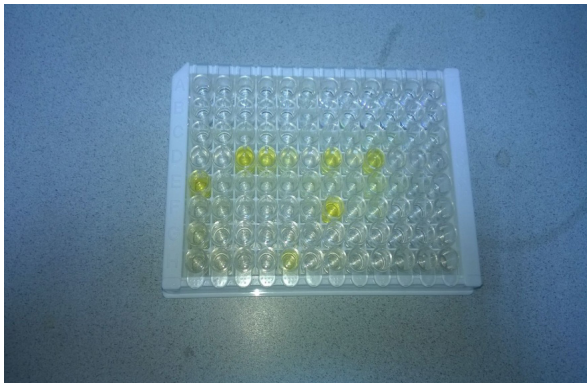
	Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif Tahmin Değeri	Negatif Tahmin Değeri	Testin Doğruluk Oranı
ELISA	%83.3	%96.3	%62.5	%93.0	%95.3
MAF Boyama	%62.5	%98.7	%83.3	%90.7	%95.3
Kappa değeri:			0.712		

Şekil 1. MAF boyama sonucu mikroskopta (X100) görülen *Cryptosporidium* spp. ookisti

Cryptosporidium'un önemini daha da arttırmaktadır (15-17). İshalli hastalarla yapılan çalışmalarda *Cryptosporidium*, Avrupa ve Kuzey Amerika'da %1-4, Afrika, Asya, Avustralya, Güney ve Orta Amerika'da ise %3-20 oranlarında olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda ise görülme sıklığının %0.4-35.5 olduğu bildirilmiştir (18). Gelişmekte olan ülkelerdeki ishallerin de %12'sinden, gelişmiş ülkelerdeki ishallerin ise %7'sinden, *Cryptosporidium* türlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (16).

Enfeksiyonun görülmesinde cinsiyetin etkisinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde cinsiyet farkı ile enfeksiyon görülme arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (19-21). Bu çalışmada az sayıda dışkı örneği incelenmiş olmasına rağmen enfeksiyonunun görülmesinde cinsiyetin etkisinin olmadığı görülmüştür.

Gelişmiş ülkelerin birçoğunda cryptosporidiosis olguları 1-4 yaşlar arasında daha fazla görülmektedir (19,21,22) Bu yaş grubunda hijyen eksikliğine bağlı bulaşın daha kolay olması ve bağışıklık sistemin yeterince gelişmemesi bu yaşta prevalansı etkilemektedir (23).Fathy ve ark.(24) Mısır'da 250 çocuğu kapsayan çalışmalarında 56 çocukta (%22.4) oranında PZR ile pozitiflik bulunurken, Hindistan da Shah ve ark. (25) yaptıkları çalışmada 175 ishal şikayeti bulunan çocuklardan 7'sinde (%4) Kinyoun's asit fast boyamaıyla, ELISA yöntemi ile de 48 çocukta (%27.4) pozitiflik bulunmuştur. Yılmaz ve ark., (26) Van'da 2000

Şekil 2. ELISA plağındaki pozitif ve negatif kuyucukların görünümü**Tablo 3.** Dışkı örneklerinde mikroskopik muayene sonucu bulunan parazitler

Görülen Türler	Sayı	Oran (%)
<i>Entamoeba dispar</i>	4	4.7
<i>Giardia intestinalis</i>	2	2.3
<i>Cyclospora sp.</i>	1	1.2
<i>Endolimax nana</i>	1	1.2

çocuğu kapsayan çalışmalarında ELISA ile 97'sinde (%4.9), boyama ile 39'unda (%1.95) *Cryptosporidium* ookisti bulmuşlardır. Eskişehir'de Doğan ve ark. (27) 0-6 yaş grubunda ishalli 607 çocuğun 22'sinde (%3.6), yine Diyarbakır'da 2011 yılında ishal şikayeti olan 5 yaş altı 178 çocuğun 8'inde (%4.49) ELISA ile pozitiflik bulunmuştur (17).

Bu çalışmada, 0-14 yaş arasında 21 çocukta ELISA yöntemi ile 3'ünde (%14.3), *Cryptosporidium* pozitifliği bulunmuş, MAF boya yöntemiyle ise bu çocukluk yaş grubunda pozitiflik bulunamamıştır. Çocuklarda görülen bu yüksekliğin bu yaş döneminde immün sistemin yeterince gelişmemiş olması ve hijyen eksikliği ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Hastaların bağışıklık sisteminin durumunun *Cryptosporidium* spp.'nin görülmesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde, bağışıklık sistemi bir şekilde baskılanmış hastalarda enfeksiyonun daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (20,28,29). Batero ve ark. (30) akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, anti-HIV pozitif ve diğer immün yetmezliği olan 111 olguda en sık rastlanan parazitin *Cryptosporidium* olduğunu bildirmişlerdir. Jayalakshmi ve ark. (31) Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada, ishalli olan 89 HIV'li hastanın dışkı örneklerini ELISA ve MAF boyama yöntemiyle araştırmışlar ve 11 (%12.4) pozitif sonuç elde etmişlerdir. Nwodo ve ark. (32) Güney Afrika'da ishalli olan ve HIV pozitif 35 hastanın dışkı örnekleri üzerinde yürüttükleri çalışmada sad-ELISA yöntemi ile 26 (%74.3) pozitiflik bulmuşlardır. Ülçay ve ark. (33) ise 2008'de yaptıkları bir çalışmada ishalli immünsüprese 36 olgunun 3'ünde (%8.6) *Cryptosporidium* saptamışlardır. Tanyüksel ve ark. (34) 116 farklı kanserli hastaların 18'inde (%17.0), Eren ve ark. (17) 2011'de 254 immün sistemi baskılanmış bireylerde, 55 immün sistemi normal kontrol grubunda; immünsüpresif bireylerin yer aldığı grupta 18 kişide (%7.08), 55 sağlıklı bireyin 2'sinde (%3.6) ELISA ile pozitiflik bulmuşlardır. Bu çalışmada, ELISA ile *Cryptosporidium* spp. saptanan olguların 8 örnekten 4'ünün (%6.3) MAF boyama ile *Cryptosporidium* spp. ookisti bulunan 5 örnekten 4'ünün immün sistemi baskılayan bir hastalığı ve buna yönelik ilaç tedavisi uygulaması olduğu saptanmıştır. Bu nedenle immün sistemi baskılanmış bireylerde ishal etkeni olarak *Cryptosporidium* spp.'nin atlanmaması gerektiği düşünülmüştür.

Cryptosporidium açısından dışkı örneklerinin incelenmesinde mikroskopik değerlendirme en sık kullanılan yöntemdir (35). Mikroskopik incelemede en sık kullanılan modifiye Kinyoun asit fast boya yöntemi kolay uygulanması, preparatların değerlendirme öncesi bekletilebilmesi, maliyetinin az olması, ookistlerin içyapısını ayrıntılı olarak gösterebilmesi ve kalıcı olması gibi nedenlerle yararlı görülmüştür. Fakat bu boya yönteminin referans bir yöntem olduğu bildirilmesine rağmen, mikroskopik değerlendirmenin zaman alıcı işlemler gerektirmesi, tecrübeli bir uzman tarafından değerlendirilmesinin gerekliliği gibi olumsuzlukları mevcuttur.

Epidemiyolojik ve prospektif araştırmalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun saptanması ve izlenmesi için ELISA kitlerinin kullanılması önerilmektedir (36). Yine *Cryptosporidiosis* üzerine yapılan kapsamlı çalışmalarda basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren ELISA'nın rutin çalışmalarda kullanılmasının faydalı olacağı bildirilmiştir (31).

Fakat genel anlamda antijen-antikor oluşumunu ortaya koyma prensibi ile çalışan testler, belli bir oranda diğer mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verme riski taşırlar (10).

Bu çalışmada, MAF boya yöntemi ile 6, ELISA ile 8, hasta örneğinde *Cryptosporidium* pozitifliği bulunmuştur. Çalışmamızda MAF boyama yöntemi altın standart kabul edildiğinde ELISA yönteminin duyarlılığı %83.3, seçiciliği %96.3, pozitif tahmin değeri %62.5, negatif tahmin değeri %93.0 doğruluk oranı ise %95.3 olarak hesaplanmıştır. ELISA yöntemi altın standart kabul edildiğinde ise MAF boyama yönteminin duyarlılığı ise %62.5, seçiciliği %98.7, pozitif tahmin değeri %83.3, negatif tahmin değeri %90.7 doğruluk oranı %95.3 olarak bulunmuştur. İki testin sonuçlarının uyumu için kappa analizi yapılmış (Kappa: 0.712) ve çıkan sonuca göre iki yöntemin sonuçlarının birbirleriyle önemli derecede uyuma sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, MAF boyama yöntemi ekonomik olmasına rağmen çok sayıda fekal örneğin incelenmesi için zamana ihtiyaç duyması ve yine mikroskopik değerlendirme için deneyimli bir uzmana gerek duymaktadır. ELISA yönteminin ise maliyeti boyama yöntemine göre yüksek olmasına rağmen, testin yapılmasında ve değerlendirilmesinde tecrübeli personele ihtiyaç duymaması, çok sayıda hasta örneğinin kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenlerle *Cryptosporidium* tanısında küçük merkezlerde boyama yönteminin kullanılmasının, özellikle büyük hastane laboratuvarlarında ise ELISA yönteminin tercih edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Teşekkür: Çalışmamızı 2013/237 BAP proje numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):72-97.
- Akşehiri Ş. Kayseri'de 0-5 grubu ishali çocuklarda *Cryptosporidium*'un araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Erciyes Üniversitesi; 1995.
- Current WL, Garcia LS. *Cryptosporidiosis*. *Clin Lab Med* 1991;11:873-97.
- Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. *Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayın No:22*; 2007. İzmir.
- Elgün G. İshalli dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* Sp. antijenin ELISA yöntemi ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Adana, Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Çukurova Üniversitesi; 2009.
- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. *Cryptosporidiosis: epidemiology and impact*. *Microbes Infect* 2002;4:1059-66.
- Usluca S. İshalli dışkılarda *Microsporidium* Spp. ve *Cryptosporidium* Spp.'nin saptanması PCR yöntemi ile tür tayininin yapılması. Doktora Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, 2009.
- Mandel GL, Bennett JE, Doli R. *Cryptosporidiosis in: Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Inc, 2005.
- Galvan AL, Magnet A, Izquierdo F, et al. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and waste water from the central area of Spain. *Sci Total Environ* 2014;468-469:368-75.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30(12-13):1305-22.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 2010;124(1):80-9.
- Sears CL, Kirckpatrick BD. *Cryptosporidiosis and isosporidiosis. Principles and practice of clinical parasitology*. John Wiley & Sons Ltd. Pres. 2001.
- Kar S. *Cryptosporidium parvum*'un hücre kültüründe üretilmesi ve üremenin farklı yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi; 2007. Ankara.
- Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı İnceleme Yöntemleri. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1997.
- Ramratnam B, Flaniğan TP. *Cryptosporidiosis in persons with HIV infection*. *Postgrad Med J* 1997;73(865):713-6.
- Koturoglu G, Bayram S, Kurugol Z, Turgay N, Mutlubas F. Akut ishali çocuklarda *Cryptosporidium* sıklığı ve risk faktörleri. *T Klin J Pediatr* 2004;13:1-19.
- Eren C. Farklı gruplardaki immün-süprese bireylerde *Cryptosporidium*'un ELISA ve modifiye asit-fast boyama yöntemi ile araştırılması, Uzmanlık Tezi. Dicle Üniversitesi; Diyarbakır, 2011.
- Börekçi G, Otag F, Emekdas G. Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevelansı. *İnfeksiyon Derg* 2005;19(1):39-46.
- Pereira MD, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SA, Garcia-Zapata MT. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(6):787-93.
- Usluca S. İshalli dışkılarda *Microsporidium* spp. ve *Cryptosporidium* spp.'nin saptanması PCR yöntemi ile tür tayininin yapılması. Doktora Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2009.
- Gate W, Wamae CN, Mbae C, et al. *Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya*. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(1):78-82.
- Xiao L, Bern C, Limor J, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001;183(3):492-7.
- Current WL, Bick PH. Immunobiology of *Cryptosporidium* spp. *Pathol Immunopathol Res* 1989;8(3-4):141-60.
- Fathy MM, Abdelrazek NM, Hassan FA, El-Badry AA. Molecular coprevalence of *Cryptosporidium* in Egyptian children and evaluation of three diagnostic methods. *Indian Pediatr* 2014;51(9):727-9.
- Bera P, Das S, Saha R, Ramachandran VG, Shah D. *Cryptosporidium* in children with diarrhea: a hospital-based study. *Indian Pediatr* 2014;51(11):906-8.
- Yılmaz H, Tas-Cengiz Z, Cicek M. Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Med J* 2008;29(4):526-9.
- Doğan N. İshalli olgularda *Cryptosporidium* oostiklerinin araştırılması. *T Parazit Derg* 1998;22(3):243-6.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):145-54.
- Wang KX, Li CP, Wang J, Pan BR. Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province China. *World J Gastroenterol* 2002;8(2):371-4.
- Botero JH, Castano A, Montoya MN, et al. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2003;45(4):197-200.
- Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. *Indian J Pathol Microbiol* 2008;51(1):137-8.
- Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. Comparative diagnostic techniques for cryptosporidium infection. *Molecules* 2014;19(2):2674-83.
- Ulçay A, Gorennek L, Coskun O, et al. Diagnosis of intestinal- protozoa in patients with immune deficiency. *Türkiye Parazit Derg* 2008;32(4):328-33.
- Tanyüksel M, Haznedaroğlu T, Gün H. Neoplastik hastalarda *Cryptosporidium* spp. araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 1995;19(1):56-63.
- Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):995-8.
- Moss DM, Bennett SN, Arrowood MJ, Wahlquist SP, Lammie PJ. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of a cryptosporidiosis outbreak on a United States Coast Guard cutter. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(1):110-8.