

# *Cryptosporidium* spp'nin Dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi ile Teşhis Edilmesi

Tolga SUNGUR<sup>1</sup>, Sırrı KAR<sup>2</sup>, Esin GÜVEN<sup>2</sup>, Metin AKTAŞ<sup>1</sup>,  
Zafer KARAER<sup>2</sup>, Zati VATANSEVER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, <sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Ankara, <sup>3</sup>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

**ÖZET:** Bu çalışma, hastanelere ishal şikayeti ile başvuran 18 çocuk ve yine ishalleri 27 buzağı dışkısı olmak üzere, toplam 45 örnek üzerinde yürütülmüştür. Toplanan örneklerin tümü carbol fuchsin boyama ve nested PCR yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp. yönünden taranmıştır. Carbol fuchsin ile yapılan incelemelerde buzağı dışkılarının 3'ünde (%11,2), insan dışkılarının ise 1'inde (%5,6) olmak üzere, 45 örnekten toplam 4'ünde (%8,9) *Cryptosporidium* spp. oookistlerine rastlanmıştır. Nested PCR ile ise, buzağı dışkılarının 8'inde (%29,7), çocuk dışkılarının 1'inde (%5,6) olmak üzere toplam 9 (%20) örnekte *Cryptosporidium* spp. spesifik amplifikasyonu gösteren bantlar elde edilmiştir. Sonuç olarak, nested PCR yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, carbol fuchsin boyama yöntemi, her ne kadar tanı açısından özgül (%100) olsa da, duyarlılık açısından (%44) yetersiz kalmıştır. Yapılan çalışma, nested PCR yönteminin kuşkuolu ishal olgularında, cryptosporidiosis etiolojisinin ortaya konması açısından, uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Cryptosporidiosis, nested PCR, carbol fuchsin, insan, buzağı

## Detection of *Cryptosporidium* spp. in Feces with Nested PCR and Carbol Fuchsin Staining Method

**SUMMARY:** This study was carried out on 45 stool specimens, consisting of 18 samples from children with diarrhea and 27 samples from diarrheic calves. Samples were screened by both carbol fuchsin staining and nested PCR for presence of *Cryptosporidium* spp. Using the carbol fuchsin staining method, we detected a total of 4 (8.9%) positive samples out of 45; of these 3 (%11,2) were from calf samples and 1 (5.6%) from a child. Nested PCR detected a total of 9 (20.0% positive samples out of 45 including 8 (29.7%) from calf samples and 1 (5.6%) from a child. Although the staining method revealed a 100% specificity, it was deficient in sensitivity (44.0%) compared to nested PCR. The study showed that nested PCR is an acceptable method for studying the etiology of doubtful diarrheal cases.

**Key Words:** Cryptosporidiosis, nested PCR, carbol fuchsin, human, calves

## GİRİŞ

Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* soyuna bağlı parazit protozoonlarca oluşturulan, zoonotik bir enfeksiyondur. Tüm dünyada yaygın olarak gözlenen hastalık, memelileri, kanatlıları, balıkları ve sürüngenleri de içine alan 200'ü aşkın hayvan türünde etkili olabilmektedir (2, 16).

Hastalığa neden olan etkenler, *Apikompleksa* kökü, *Sporozoa* sınıfında yer alan *Cryptosporidium* soyuna bağlı protozoonlardır (9). Bu soyda, hastalığa neden olduğu düşünülen çeşitli sayıda türden söz edilse de, yapılan epidemiyolojik taramalar, zoonotik önemi ile dikkat çeken ve memelilerdeki başlıca tür olan *Cryptosporidium parvum*'un dünyada oldukça yaygın olduğunu göstermiştir (17).

*Cryptosporidium* türleri, monoksen bir biyolojiye sahiptir ve bulaşmada fekal-oral yol esastır. Etkenin dışkı ile atılan formu ortalama 4-6 µm ebatlarında, yuvarlak-oval, içinde çıplak 4 sporozoit bulunan, atıldığı andan itibaren enfektif özellik taşıyan ve dış çevre faktörlerine oldukça dirençli olan oookistlerdir (17). Hastalıkta, etkilenen organa ve konağın immün sistemine bağlı olarak değişik tipte klinik tablo ile karşılaşabilmek mümkün olsa da, en yaygın bulgu bol oookist atılımı ile karakterize sulu, yoğunlukla mukus içeren, homojen fosforumsu sarı renkte ishallerdir (2).

Cryptosporidiosis'in laboratuvar tanısı dışkı muayenesine dayanmaktadır (2). Dışkının etken yönünden muayenesi amacıyla boyama yöntemleri, serolojik testler veya PCR gibi moleküler tanı teknikleri kullanılabilir. rutin laboratuvar tanısında en sık kullanılan teknik, kolay ve kısa zamanda sonuç alınabilmesinden dolayı dışkı boyamadır (16). Bununla birlikte, *Cryptosporidium* türlerini klinik olgulardan, dışkı ile çok az miktarda oookist atan rezervuar konaklardan ve çevresel kaynaklardan izole etmek amacıyla PCR da yaygın olarak

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

Geliş tarihi/Submission date: 18 Şubat/18 February 2008

Düzeltilme tarihi/Revision date: -

Kabul tarihi/Accepted date: 12 Ağustos/12 August 2008

Yazışma /Corresponding Author: Zati Vatansever

Tel: (90) (474) 424 63 82 Fax: (+90) (474) 424 63 82

E-mail: zativet@gmail.com

kullanılmaya başlanmış (14, 18), hatta teşhiste kalite ve kantiteyi arttırmaya yönelik olarak pek çok yeni PCR teknikleri ve bu tekniklerde kullanılmak üzere hazırlanmış primerler ortaya konmuştur (6, 11, 18).

Bu çalışma, cryptosporidiosisin tanısında yaygın bir kullanıma sahip olan carbol fuchsin boyama tekniğinin ve belirgin üstünlüklere sahip olduğu kaydedilen nested PCR yönteminin, hastalığın tanısındaki yerinin belirlenmesi ve karşılaştırmalı üstünlüklerinin kantitatif olarak ortaya konması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, hastanelere ishal şikayeti ile başvuran 18 çocuk ve yine ishal tablosuna sahip olan 27 buzağı dışkısı olmak üzere toplam 45 örnek üzerinde yürütülmüştür. İncelenen örneklerin seçilmesinde, cryptosporidiosis'i açısından yüksek risk taşıyan yaş grubu ve ishal tipi dikkate alınmış, böylelikle kullanılacak teşhis tekniklerini değerlendirmeyi sağlayacak düzeyde pozitif sonuçlara ulaşılması hedeflenmiştir.

**Carbol Fuchsin Boyama Yöntemi:** Steril plastik kaplara alınarak laboratuvara getirilen dışkı örnekleri aynı miktarda %2'lik potasyumdikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) solüsyonu eklenerek iyice süspanse edilmiş ve +4 °C'de işlemler süresince muhafaza edilmiştir. Örneklerin tümü, oocyst varlığını ortaya koymak amacıyla öncelikle Heine (1982)'in (5) carbol fuchsin boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Buna göre, eter-alkol karışımında temizlenerek yağı giderilmiş lam üzerine, iyice karıştırılarak homejenize edilen dışkı örneklerinden pipet yardımı ile 50 µl alınmış ve aynı miktarda carbol fuchsin eklenerek bir lamelin kenarı ile ince bir dışkı frotisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu froti havada kurutulduktan hemen sonra küçük bir damla immersiyon yağı damlatılıp üzerine lamel kapatılarak mikroskop altında X40 büyütmede *Cryptosporidium* oocystleri yönünden taranmıştır. Mikroskopik bakıda, 20 sahada bulunan oocystler sayılarak ortalamaları alınmış ve her bir sahada görülen 20'den fazla oocyst (+++), 6-20 oocyst (++), 1-5 oocyst (+), 1'den az oocyst ise (+) olarak değerlendirilmiştir.

**Nested PCR Yöntemi:** Bu aşamada, iyice homojenize edilen dışkı örneklerinin her birinden 200 µl alınmış ve QIAamp DNA Stool mini kit kullanarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza altına alınmışlardır. Nested PCR işlemi, Xiao ve ark. (20)'nin tarif ettiği yöntem ve primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Protozooloji Laboratuvarı'nda daha önce yapılan taramalarda *Cryptosporidium* yönünden pozitif olduğu ortaya konmuş numunelerden yararlanılmıştır.

PCR'ın ilk aşamasında, *Cryptosporidium* türlerinin SSU rRNA kodlayan DNA bölgesinden 1,325bp uzunluğundaki DNA parçasını amplifiye eden CryptoF 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' ve CryptoR 5'-CCCATTTCCTCGAAACAGGA-3' primerleri kullanılmış-

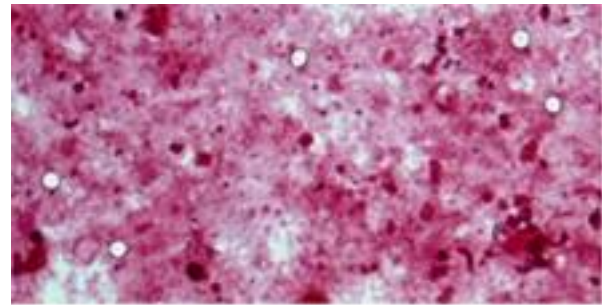
tir. Her reaksiyon, her primerden 200nM, her dNTP'den 0,2 mM, 0,025 U Taq DNA polymerase, 6 mM  $MgCl_2$ , 1x PCR buffer ve 1,5 µl örnek DNA'sı içeren 25 µl'lik hacimlerde yapılmıştır. Elde edilen reaksiyon ürünlerinin bir kısmı (1 µl) Nested PCR işlemine tabi tutulmuştur.

Nested PCR aşamasında, bir önceki üründen yaklaşık 826-864bp uzunluğunda parça çoğaltan CryptoNF 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' ve CryptoNR 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' baz dizileri kullanılmıştır. Reaksiyon bir önceki aşamada belirtilen şartlarda yapılmış, ancak örnek DNA miktarı 1 µl olarak tutulmuştur. Nested PCR işlemi sonucunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin bir kısmı (15µl) sonuçları görüntülemek amacıyla jel elektroforezde yürütülmüş ve UVP Jel Dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.

Reaksiyonlar ısıtıcı kapağı olan Biometra TGradient (Whatmann Biometra) PCR makinesinde yürütülmüştür. Gerek birinci aşama, gerekse nested PCR, her biri 94 °C'de 45 saniye, 55 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dk olmak üzere, toplam 35 döngü olarak yapılmıştır. Her iki PCR işleminde de ilave olarak birinci döngü öncesi 94°C'de 5 dk. denaturasyon, son döngüyü takiben de 72 °C'de 10 dk. ekstensiyon aşaması uygulanmıştır.

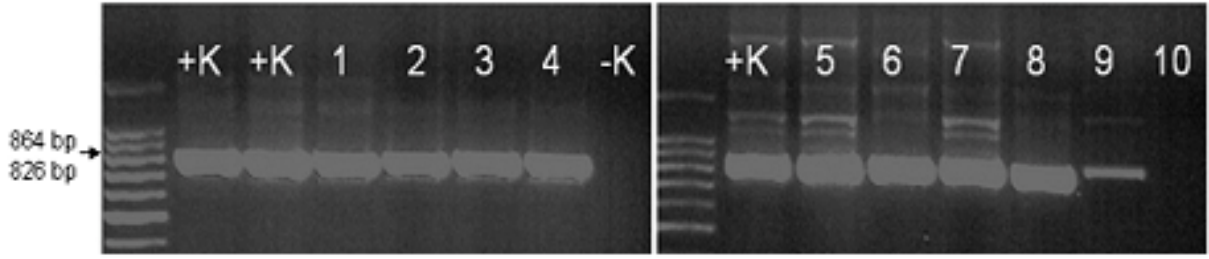
## BULGULAR

Carbol fuchsin boyama yöntemine göre taranan 27 buzağı dışkısından 3'ünde (%11,2), 18 çocuk dışkısının ise 1'inde (%5,6) olmak üzere, incelenen 45 numunenin toplam 4'ünde (%8,9) *Cryptosporidium* oocistlerine rastlanmıştır. Yapılan taramalarda *Cryptosporidium* oocistleri belli bir içyapı vermeyen, parlak küresel yapılar şeklinde görülmüştür (Şekil 1). Pozitif çıkan dışkılarda gerçekleştirilen oocist sayımı sonucunda, saha başına ortalama oocist sayısının her dört örnek için de 2-5 arasında olduğu görülmüş ve tamamı “++” olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Carbol fuchsin boyama yönteminde görülen *Cryptosporidium* spp. oocistleri (x40).

Nested PCR sonucunda, buzağı dışkılarının 8'inde (%29,7) ve çocuk dışkılarının ise 1'inde (%5,6) olmak üzere, toplam 9 (%20) numuneden *Cryptosporidium* spp spesifik amplifikasyonu gösteren bantlar elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Nested PCR sonuçlarının gösterildiği jel görüntüsü

(+K: Pozitif kontrol; -K: negatif Kontrol; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9: Pozitif buzağı dışkıları; 4: Pozitif çocuk dışkısı; 10: negatif buzağı dışkılarından biri)

Carbol fuchsin boyamada pozitif çıkan örneklerin tamamı aynı zamanda nested PCR ile de pozitif bulunmuştur. Nested PCR ile carbol fuchsin boyama sonuçları arasındaki ilişki Tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, nested PCR temel alındığında, carbol fuchsin boyama yönteminin duyarlılığının %44 (4/9) ve özgüllüğünün %100 (36/36) olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 1. Nested PCR ve carbol fuchsin yöntemlerinin ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

		Nested PCR		Toplam
		(+)	(-)	
Carbol fuchsin	(+)	4	0	4
	(-)	5	36	41
Toplam		9	36	45

## TARTIŞMA

Önemi özellikle son yıllarda anlaşılmış olan cryptosporidiosis, enfekte insan veya hayvanlarda teşhis etmek amacıyla dışkı boyama, PCR, IFAT, ELISA, enfekte dokuların biyopsisi gibi tekniklerden yararlanılabileceği bildirilmiştir (16). İlgili yöntemler için değişik materyaller kullanılabilir olsa da, yapılan çalışmalar hastalığın teşhisinde yararlanılabilecek en ideal yöntemin dışkı taraması olduğunu göstermiştir (3).

Alınan taze dışkıların laboratuvarında direk incelenebileceği gibi, uygun koşullarda uzun süre de saklanabileceği, toplanan dışkıların taze olarak veya %2,5'lik  $K_2Cr_2O_7$  gibi koruyucu solüsyonlar içerisinde, +4 °C'de uzun süre muhafaza edilebileceği ifade edilmiştir (2). Bu şartlarda tutulan ookistlerin 12 aydan uzun bir süre DNA ekstraksiyonu amacı ile kullanılabilirliği ve  $K_2Cr_2O_7$  uygulamasının boyama yöntemlerini etkilemeyeceği bildirilmiştir (10, 12). Bu çalışmada, plastik kaplara alınan dışkı örnekleri aynı miktarda %2,5'lik  $K_2Cr_2O_7$  solüsyonu ile karıştırılarak +4 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Özellikle pozitif örneklerde yapılan kontroller, ilgili uygulamanın, bildirildiği gibi boyama ve PCR yöntemi açısından herhangi bir olumsuz etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

Toplanan dışkı örneklerinin doğrudan taze preparat hazırlayarak X10, X40 objektiflerde incelenebileceği, ancak genel olarak boyasız preparatlarda tanının zor olduğu belirtilmiştir (2). Carbol fuchsin boyama ile hazırlanan preparatlarda ise zemin kırmızı gözlenirken, ookistler şiddetli ışık kırıcı özellikle,

düzgün duvarlı ve tam anlamıyla oval bir yapıda görüldükleri, elde edilen ortam renk kontrastının hızlı bir taramanın yapılabilmesi için yetersiz kalabileceği ve bu tip negatif boyama tekniklerinde, her zaman için ookistlerin sporlar ile karışma riskinin söz konusu olduğu da vurgulanmıştır (15). Carbol fuchsin ile hazırlanmış olduğumuz preparatlarda, *Cryptosporidium* ookistleri kırmızı zemin üzerinde, X10 büyütmede cidarı düzgün, iç yapısı seçilemeyen, küçük parlak, kürecikler şeklinde fark edilirken, X40 büyütmede de yine etrafı koyu bir hale ile kuşatılmış parlak kürecikler şeklinde görülmüştür. Özellikle X100 büyütmede mikrovida ile yapılan oynamalarda ookistlerin içlerinde kırmızı-pembe kontrast veren sporozoit yapıları fark edilmiş, söz konusu sporozoit kalıntılarının, carbol fuchsin boyama ile ookistleri, hiç bir şekilde iç yapı vermeyen mantar sporlarından ayırmada yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Cryptosporidiosis'in teşhisinde kullanılan pek çok etkili boyama tekniği söz konusu olsa da, ilgili tekniklerin rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmalarının yeterince pratik olmadığı bildirilmiştir (3). Bu noktada, kolay, pratik ve kısa sürede sonuç alınabilmesi ve belli bir deneyime sahip kişiler tarafından kolaylıkla tanının konulabilmesi açısından carbol fuchsin boyama tekniğinin avantaj sağlayabileceği vurgulanmış, ancak genel itibarıyla bütün mikroskopik tanı yöntemlerinde geçerli olan, dışkı ile belli sayının altında etken atan kimi hastaların ve taşıyıcı olguların tespitinde düşük duyarlılığa sahip olabileceği belirtilmiştir (4). Yapılan çalışmada carbol fuchsin boyama yapılarak taradığımız 45 dışkı örneğinden 4 (%8,9)'ünde değişik yoğunlukta etkene rastlanmıştır. Bu sonuçlar nested PCR ile karşılaştırıldığında, kullanılan boyama yönteminin %44 (4/9) oranında duyarlı olduğu görülmektedir. Her ne kadar bu oran basit bir boyama tekniği için küçümsenmeyecek bir değer gibi görünse de, pozitif olguların tamamının ortaya konması konusunda nested PCR'a göre çok yetersiz kalmıştır. Diğer taraftan, nested PCR temel alındığında, carbol fuchsin boyamanın özgüllüğünün %100 olması, bu boyama tekniğinin negatif olguları elimine etmede yeterince güvenilir olduğunu göstermektedir.

Günümüzde, değişik çevresel kaynaklarda, hastalarda ve özellikle diğer teknikler ile tespit edilmesi zor olan az ookist atılımı ile karakterize kimi hastalarda ve taşıyıcılarda etkeni tespit etmek amacı ile yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan PCR'm, cryptosporidiosisin teşhisinde kullanılabilir en etkili tekniklerden biri olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar,

dışkıda *Cryptosporidium* türlerinin tespit edilmesinde tekniği kısıtlayıcı değişik etmenlerden söz edilmiş olsa da (1), günümüzde teknolojinin gelişmesi ve spesifik kitlerin ortaya çıkması sonucunda bu tip olumsuz etkiler çok düşük seviyeye indirilebilmektedir. Bu çalışmada DNA izolasyonu amacı ile özel olarak dışkıdan izolasyon için geliştirilmiş ve bu konuda en iyi sonuçları verdiği bildirilen QIAamp stool DNA mini kit (13) kullanılmıştır. Bu sayede, maksimum miktardaki DNA'nın elde edilmesi ve dışkıdaki birçok inhibitörün ortadan kaldırılması sağlanmıştır.

Çeşitli hayvan ve insan dışkı örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin varlığını kolayca göstermek amacı ile birçok PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bunların çoğu, etkenin ya SSU rRNA'yı (11, 19), ya trombosit ile ilgili anonim proteini (TRAP) (11), ya da oocyst cidarı proteinini (*Cryptosporidium* oocyst wall protein, COWP) kodlayan gen bölgelerinin ortaya konmasına yönelik yöntemlerdir. Bu yöntemlerden en duyarlı olanının *Cryptosporidium* türlerinin SS rDNA gen bölgesini ortaya koyan yöntem olduğu bildirilmiştir (7). Bu çalışmada da, başka çalışmalarda (19, 20) duyarlılığı ve özgülüğü kanıtlanmış *Cryptosporidium* SSU rDNA bölgesine yönelik primerlerden yararlanılmıştır. Sonuç olarak, istenmeyen amplifikasyon ürünleri veya nonspesifik amplifikasyon sorunu ile karşılaşılmaştır.

*Cryptosporidium* türlerinin tespitinde PCR tekniğinin, boyama ve diğer pek çok tanı yöntemlerine göre çok daha duyarlı olduğu bilinmektedir (8). Kötü koşullarda muhafaza edilmiş örneklerde etkenin tespit edilmesi konusunda oldukça önemli düzeylerde avantajlar sağlayan PCR tekniğinin (21), ELISA yöntemine göre  $10^3$ - $10^4$  kat daha duyarlı olduğu (8) ve bu konunun aynı şekilde IFA için de geçerli sayılabileceği belirtilmiştir (14). Basit PCR ile amplifiye edilen DNA'ların, ortama yeniden eklenen daha spesifik bölgelere yönelik primerlerle tekrar amplifiye edilmesi esasına dayanan nested PCR tekniğinin, klasik tek aşamalı PCR tekniğine göre 4-5 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (7). Bu çalışmada, elde edilen carbol fuchsin boyama ve nested PCR yöntemleri karşılaştırıldığında, nested PCR'in olguları ortaya koymada çok daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile cryptosporidiosisin gerek çocuk dışkılarından gerekse de buzağı dışkılarından teşhis edilmesi amacıyla pratik olarak carbol fuchsin boyama yönteminden yararlanılabileceği, ancak nested PCR yönteminin çok daha etkili sonuçlar verebildiği ve bu yöntemin, rutin laboratuvar tanısında kullanılan bazı diğer tekniklerin hastalığın teşhisindeki yetisini belirlemek açısından kriter olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Clark DP, 1999. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 12(4): 554-563.
2. Dubey JP, Speer CA, Fayer R, 1990. *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press, USA. p.199.
3. Emre Z, Aalabay M, Düzgün A, Çerçi H, 1997. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cattle faecal specimens. *T J Vet Animal Sci*, 21: 293-296.
4. Fayer R, Morgan U, Upton SJ, 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*, 30: 1305-1322.
5. Heine J. 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zbl Vet Med B*, 29: 324-327.
6. Jenkins MC, Tout J, Abrahamsen MS, Lancto CA, Higgins J, Fayer R, 2000. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J Microbiol Methods*, 43: 97-106.
7. Kato S, Lindergard G, Mohammed HO, 2002. Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Vet Parasitol*, 2475: 1-7.
8. Leng X, Mosier DA, Oberst RD, 1996. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Appl Env Microbiol*, 62(2): 643-647.
9. Levine ND. 1985. *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press, USA. p.413.
10. Limor JR, Lal AA, Xiao L, 2002. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 40(7): 2335-2338.
11. Lindergard G, Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO, 2003. The sensitivity of PCR detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples using two DNA extraction methods. *Mol Diag*, 7(3-4): 147-53 [Abstract].
12. MacPherson DW, McQueen R, 1993. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol*, 31(2): 198-202.
13. McOrist AL, Jackson M, Bird AR, 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J Microbiol Methods*, 50: 131-139.
14. Morgan UM, Thompson RCA, 1998. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitol Today*, 14: 469.
15. Özlem MB, Eren H, Kaya O, 1997. Aydın yöresi buzağlarında *Cryptosporidium*'ların varlığının araştırılması (1). *Bornova Vet Kontr Araşt Enst Md Derg*, 22(36): 15-22.
16. Sears CL, Kirckpatrick BD, 2001. Cryptosporidiosis and isosporiosis. In: *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons Ltd. Pres. p.139-164.
17. Starling CR, Arrowood MJ, 1993. *Cryptosporidia*. In: *Parasitic Protozoa*, Vol.6. Academic Press, 65: 159-224.
18. Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y, 2004. Further evidence that genotype I and genotype II of *Cryptosporidium parvum* are distinct. *Trop Med Health*, 32(1): 5-14.
19. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA, 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1578-1583.
20. Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal AA, 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 67: 1097-1101.
21. Zerlanga DS, Trout JM, 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol*, 126: 195-217.