นิพนธ์ต้นฉบับ

เปรียบเทียบการย้อมสีคริปโตสโปริไดอัล โอโอซิสท์ในอุจจาระโดยวิธีต่าง ๆ

สมชาย จงวุฒิเวศย์*
ณัฐรส จันทชุม* ปิยาภรณ์ สืบตระกูล**

Jongwutiwes S, Chanthachume N, Suebtrakul P. Comparative study of cryptosporidial oocysts in fecal specimens by various staining techniques. Chula Med J 1988 Mar; 32(3): 219-224

Various staining techniques for cryptosporidial oocysts were studied using 11 confirmed fecal specimens preserved in 10 % formalin from the previous survey as positive controls. Thirty-five diarrheal cases were randomly selected as unknown samples. All specimens were examined by iodine wet mount after formalin ether concentration technique. The remaining sediment from each sample was stained by Giemsa's stain, Modified cold Kinyoun acid fast (MCK), Rapid dimethyl sulfoxide modified acid fast (DMSO), Modified Koster (MK), Safranin-methylene blue (S-MB) and Modified Ziehl-Neelson acid fast (MZN) techniques. Each technique was assessed for organism morphology and ease of visual recognition.

Thirty-five diarrheal stool samples were negative by all techniques while 11 confirmed positive samples demonstrated cryptosporidial oocysts which could be easily differentiated from yeast except by the iodine wet mount and Giemsa's stain. The sizes of the oocysts stained by MCK (measured 4.71 ± 0.56 μ × 3.79 + 0.41 μ) were significantly larger than by S-MB ($p<0.001$). Crude quantitation of the oocysts were classified as 0-1/HPF, up to 5/HPF, up to 10/HPF and up to 15/HPF, which gave significant correlations with the total oocysts per smear (G.M.) of 2.1 × 10, 4.4 × 10^2, 2.1 × 10^3 and 4.5 × 10^3 respectively ($p<.05$).

Based on this study, iodine wet mount is not recommended for the preliminary diaganosis of cryptosporidiosis. The S-MB, MZN, MK, DMSO and MCK all gave better results than Giemsa's stain. Internal structures of the oocysts were best demonstrated by MCK.

Reprint requests: Jongwutiwes S, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. January 12, 1988.

* ภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นับตั้งแต่มีการค้นพบโรค AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) เป็นต้นมา ทำให้การติดเชื้อประเภทฉวยโอกาส (opportunistic infection) มีบทบาทสำคัญควบคู่ไปด้วย นอกจากเชื้อไวรัส บักเตรีและเชื้อราแล้ว ปาราสิตก็มีบทบาทสำคัญ ซึ่งก่อให้เกิดโรคที่รุนแรง ได้แก่ strongyloidiasis toxoplasmosis pneumocystosis และ cryptosporidiosis

สำหรับ cryptosporidiosis นั้น เกิดจาก Cryptosporidium species ซึ่งเป็นโปรโตซัวใน phylum Apicomplexa อยู่ในกลุ่ม coccidia แม้ว่าจะถูกค้นพบและรายงาน ครั้งแรกโดย Tyzzer ในปี พ.ศ. 2450 ในกระเพาะอาหารของหนูทดลองก็ตาม แต่ความสำคัญในการทำให้เกิดโรคในคนรายงานครั้งแรกโดย Nime และคณะ[1] ในปี พ.ศ. 2519 ซึ่งวินิจฉัยโดยการตัดชิ้นเนื้อจากลำไส้ส่วนปลายสุดไปตรวจพบระยะต่าง ๆ ของโปรโตซัวดังกล่าวที่ brush border ของเยื่อบุผิวลำไส้ เนื่องจาก Cryptosporidium sp. เป็นโปรโตซัวที่มีขนาดเล็กมาก และไม่มีการลุกลามเข้าไปในไซโตปลาสซึมของเซลล์[2] (intracellular but extracytoplasmic) และมักไม่มี cellular infiltration ที่เฉพาะเจาะจง ทำให้การวินิจฉัยโดยตัดชิ้นเนื้อดังกล่าว และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเป็นการยากและไม่แน่นอน จำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ดังนั้นในระยะแรกจึงมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคนี้ไม่มากนักจนกระทั่งราวปี พ.ศ. 2523-2524 มีผู้ค้นพบวิธีตรวจอุจจาระเพื่อหา cryptosporidial oocyst ได้เป็นผลสำเร็จโดยการย้อมสี acid fast ต่อมาจึงมีรายงานการตรวจพบการติดเชื้อดังกล่าวมากขึ้น ทั้งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง[3](immunocompromised) และผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ[4] (immunocompetent) เพิ่มขึ้น นับเป็นการค้นพบจุลชีพที่สามารถก่อให้เกิดอาการท้องเสียได้รุนแรงชนิดใหม่ พร้อมทั้งการวินิจฉัยที่ไม่ยุ่งยากจากการตรวจอุจจาระ

ในปี พ.ศ. 2529 ภาควิชาปาราสิตวิทยา[5] คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการสำรวจเบื้องต้นในเด็กสถานสงเคราะห์แห่งหนึ่ง พบการติดเชื้อดังกล่าว 5.1% (12 รายในเด็ก 233 รายที่มีอาการท้องเสีย) ทำการวินิจฉัยโดยใช้วิธี Modified cold Kinyoun acid fast ภายหลังจากการตรวจอุจจาระโดยวิธีเข้มข้น (Formalin ether sedimentation technique)

เนื่องจากมีผู้รายงานวิธีการวินิจฉัยโดยการย้อมสี cryptosporidial oocyst จากอุจจาระหลายวิธี เช่น Three step stool examination[6],Giemsa,Rapid dimethyl sulfoxide modified acid fast (DMSO)[7] Modified Koster (MK)[8] Safranin-Methylene blue (S-MB)[9] Ziehl-Neelson acid-fast (MZN)[10] เป็นต้น การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีย้อมสีดังกล่าวเพื่อการวินิจฉัย cryptosporidial oocyst ที่ได้ผลดี รวดเร็ว แม่นยำ แยกได้ง่ายจาก yeast และเหมาะสมในการใช้วินิจฉัยสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบ cryptosporidial oocyst จากการสำรวจของ ภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงมีนาคม 2529 โดยเก็บไว้ใน 10% formalin ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25-30°C) จำนวน 11 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างอุจจาระเด็กท้องเสียอื่น ๆ ที่ส่งมาตรวจที่ภาควิชาปาราสิตวิทยา อีก 35 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดมาทำให้ cryptosporidial oocyst ตกตะกอนรวมตัวกันโดยวิธีเข้มข้น (Formalin ether sedimentation technique) แล้วนำไปดูด้วย iodine wet mount สำหรับตะกอนอุจจาระที่เหลือนำมาป้ายลงบนแผ่นกระจก ใช้ตัวอย่างละ 40 แผ่นกระจก (ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง รวมเป็น 1,840 แผ่น) ใช้หลอดหยดหยดตะกอนอุจจาระลงบนแผ่นกระจกละ 1 หยด ซึ่งจะได้ปริมาตรประมาณ 0.05 มล. ป้ายให้เป็นวงเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. ทิ้งให้แห้งแล้ว fix ด้วย absolute methanol 1 นาที ทิ้งให้แห้งนำไปย้อมสีตามวิธีการต่าง ๆ วิธีละ 8 แผ่น ทั้งนี้การย้อมแผ่นกระจกทั้งหมดตลอดจนการตรวจนับจำนวน oocyst ทำโดยบุคคลเดียวกันซึ่งไม่มีความชำนาญวิธีใดเป็นพิเศษ ดังนี้

1. Giemsa ใช้ Giemsa stock solution : buffer distilled water ในอัตราส่วน 3 : 20 ใช้เวลาย้อม 10 นาที

2. Modified cold Kinyoun acid fast (MCK) ย้อมด้วย carbol fuchsin 1 นาที ล้างน้ำจนไม่มีสีไหลเป็นทาง และล้างสีออกด้วย 10% sulfuric acid ล้างน้ำแล้วย้อมด้วย concentrated light green 1 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออก

3. Rapid dimethyl sulfoxide modified acid fast (DMSO) ย้อมด้วย carbol fuchsin-DMSO 5 นาที ล้างน้ำจนไม่มีสีไหลเป็นทาง ล้างสีออกและย้อมด้วย decolorizer-counterstain solution (malachite green 220 มล. 99% dye ผสมกับ 99.5% glacial acetic acid 30 มล. และ glycerol 50 มล.) ใช้เวลา 1-2 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออก

4. Modified Koster (MK) ย้อมด้วยน้ำยาย้อมสี (safranin ผสมกับ 5.6% KOH ในอัตราส่วน 2 : 5) ใช้เวลา 5 นาที ล้างน้ำ ล้างสีออก ด้วย 0.1% sulfuric acid 1 นาที ล้างน้ำ ล้างสี ด้วย 5% malachite green 15 วินาที ล้างสีที่เกินออก

5. Safranin methylene blue (S-MB) fix แผ่นกระจกอีกครั้งด้วย 3% HCL ใน absolute methanol 3-5 นาที ล้างน้ำ ย้อมด้วย 1% safranin 1 นาที ลนไฟจนมีไอขึ้น ล้างน้ำย้อมด้วย 1% methylene blue 30 วินาที ล้างสีที่เกินออก

6. Modified Ziehl-Neelson acid fast (MZN) นำแผ่นกระจกไปลนไฟอุณหภูมิ 70° C ประมาณ 10 นาที ย้อมด้วย carbol fuchsin ลนไฟ จนมีไอขึ้น ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างน้ำ ล้างสีออก ด้วย 5% sulfuric acid 30 วินาที ล้างน้ำ ย้อมด้วย methylene blue 1 นาที ล้างสีที่เกินออก

แต่ละวิธีนำมาเปรียบเทียบ ลักษณะการติดสี รูปร่าง ความยากง่ายในการวินิจฉัย ระยะเวลาที่ใช้ย้อมสี ตลอดจนขนาดของ oocyst และคำนวณเชิงปริมาณจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ผลการวิจัย

จากการศึกษาตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 46 ตัวอย่าง โดยการย้อมสี 6 วิธี พบว่าทั้ง 6 วิธี สามารถวินิจฉัย cryptosporidial oocyst ได้ทั้งหมด 11 ราย แต่ความยากง่าย และลักษณะการติดสีแตกต่างกัน สำหรับตัวอย่างอุจจาระที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างอีก 35 ราย ตรวจไม่พบ cryptosporidial oocyst ทั้ง 6 วิธี

การใช้ iodine wet mount ซึ่งถือว่าเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นอย่างรวดเร็วนั้น แต่เนื่องจาก cryptosporidial oocyst ไม่ติดสีไอโอดีน ดังนั้นจึงมองไม่เห็นโครงสร้างภายใน ส่วน yeast ติดสีน้ำตาล และอาจพบหน่อ (budding)

Table 1 Comparative staining of cryptosporidial oocyst in fecal specimens

Staining techniques	Appearance					Approximate staining time (minutes)
	Cryptosporidial Oocyst			Yeast	Background	
	Color	Morphology	Ease of visual recognition			
- Iodine	colorless	poor	0	brown	pale brown	1
- Giemsa	sky blue	good	+	deep blue	blue	10
- Modified cold Kinyoun acid fast	bright red	good	+ +	green	blue-green	4-5
- Rapid dimethyl sulfoxide acid fast	brilliant pink	good	+ +	blue-green	pale green	7-8
- Modified Koster	pale red	good	+ +	green	green	10
- Safranin-Methylene blue	vivid orange-pink	good	+ +	blue	pale blue	10
- Modified Ziehl Neelson Acid fast	red	good*	+ +	green	green	20

*Overheating may cause disruption of the oocyst leaving empty cyst (ghost cell)
0 = poor or colorless ; cannot be easily differentiated from other particles
+ = fair ; can demonstrate internal structures but cannot be easily differentiated from yeast.
+ + = good ; can demonstrate definite cyst wall and internal structures, easily differentiate from yeast.

ลักษณะการติดสีของ oocyst,yeast,background ความยากง่ายในการวินิจฉัยตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ย้อมสี แสดงในตารางที่ 1

วิธีการตรวจดังกล่าว สามารถมองเห็น oocyst ได้ด้วย หัวกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า และสามารถยืนยันได้โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า

ได้ศึกษาเปรียบเทียบขนาดของ oocyst จากการย้อมทั้ง 6 วิธี โดยนับตัวอย่างละ 30 oocysts วัดความกว้างและยาว จากตารางที่ 2 พบว่าวิธี Modified Kinyound acid fast ลักษณะ oocyst มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ $4.71 \pm 0.56\ \mu \times 3.79 \pm 0.41\ \mu$ ซึ่งมีขนาดโตกว่าวิธี S-MB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

นอกจากนี้ได้นับปริมาณ oocyst ทั้งหมด ต่อ smear (0.05 มล.) และนับจำนวนที่เห็นได้ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า จากตัวอย่างการย้อมสีทั้ง 5 วิธี (ไม่นับ Giemsa เพราะแยกจาก yeast ได้ยากจากการใช้กำลังขยาย 40 เท่า) ผลการศึกษาดังตารางที่ 3 ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table 2 Size of cryptosporidial oocyst : measured from various staining techniques in the same fecal samples.

Staining techniques	Size in microns (Mean ± SD)	Interpretation (comparing with MCK)
1. Giemsa	(4.31 ± 0.53) × (3.61 ± 0.55)	NS
2. Modified Kinyoun acid fast (MCK)	(4.71 ± 0.56) × (3.79 ± 0.41)	–
3. Rapid dimethyl sulfoxide acid fast (DMSO)	(4.34 ± 0.50) × (3.54 ± 0.55)	NS
4. Modified Koster (MK)	(4.50 ± 0.57) × (3.82 ± 0.46)	NS
5. Safranin-methylene blue (S-MB)	(4.03 ± 0.51) × (3.30 ± 0.42)	Sig. ($P < 0.001$)
6. Modified Ziehl-Neelsón (MZN) acid fast	(4.08 ± 0.46) × (3.59 ± 0.50)	NS

NS = no significant difference
Sig. = Significant difference

Table 3 Crude quantitation of cryptosporidial oocyst : correlation between approximate number per high power field (40×) and total count per smear (0.05 ml)

Approximate number of oocysts per high power field (40×)	Total count of oocysts per smear	G.M. of total count per smear	Number of oocysts per ml
0 – 1	0.7×10 – 6.5×10^2	2.1×10	414
up to 5	6.8×10 – 2.8×10^3	4.4×10^2	8,823
up to 10	6.6×10^2 – 5.2×10^3	2.1×10^3	42,318
up to 15	1.2×10^3 – 1.1×10^4	4.5×10^3	90,614

$r = 0.972$; df = 2, $r_{2(0.05)} = 0.950$

G.M. = Geometric Mean

วิจารณ์

การวินิจฉัย cryptosporidiosis จากการตรวจหา oocyst ในอุจจาระนับว่าเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและรวดเร็วตลอดจนให้ความแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ไม่รบกวนต่อผู้ป่วยเหมือนการตัดชิ้นเนื้อลำไส้ แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และอิเลคตรอน ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่า อนึ่งยังไม่เคยมีรายงานว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบ Cryptosporidium จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุลำไส้ โดยตรวจไม่พบ oocyst ในอุจจาระเลย (หลังจากที่ค้นพบวิธีการวินิจฉัยจากอุจจาระ) ในทางตรงข้าม การตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุลำไส้ดังกล่าวอาจตรวจไม่พบระยะต่าง ๆ ของ Cryptosporidium ในผู้ป่วยที่ตรวจพบ oocyst ในอุจจาระ[11] ซึ่งอาจเป็นเพราะตัดไม่ตรงตำแหน่งของลำไส้ที่มีการติดเชื้อ เพราะ Cryptosporidium สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ตั้งแต่กระเพาะอาหาร[12] จนถึงลำไส้ใหญ่[1] ขึ้นกับความรุนแรงของโรค

จากการศึกษาเปรียบเทียบการย้อมสีดังกล่าวพบว่าวิธี iodine wet mount oocyst ไม่ติดสี ทำให้การวินิจฉัยลำบาก สำหรับวิธี Giemsa สามารถแยกความแตกต่างของ cryptosporidial oocyst กับ yeast และพื้นข้างหลังได้ แต่จำเป็นต้องดูด้วยกำลังขยาย 100 เท่า จึงไม่เหมาะในการตรวจอย่างรวดเร็วเพื่อการวินิจฉัยเบื้องต้น อาจให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้ ส่วนการย้อมสีวิธีอื่น ๆ ได้แก่ Modified cold Kinyoun acid fast (MCK), Rapid dimethyl sulfoxide (DMSO), Modified Koster (MK), Safranin-methylene blue (S-MB) และ Modified Ziehl Neelson acid fast (MZN) ให้การติดสี oocyst แยกจาก yeast และพื้นข้างหลังได้ชัดเจนทัดเทียมกัน สามารถดูได้ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า แต่ขนาดของ oocyst เมื่อย้อมด้วยวิธี MCK ให้ขนาดใหญ่ที่สุด และเห็น sporozoites ชัดเจนกว่าวิธีอื่น ส่วนวิธี S-MB ให้ขนาด oocyst เล็กที่สุดซึ่งแตกต่างกับวิธี MCK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) สำหรับวิธี MZN มีข้อพึงระวังคือขณะ fix slide โดยลนไฟนั้น ถ้าใช้ความร้อนมากเกินไป อาจทำให้ oocyst แตกได้ ทำให้การวินิจฉัยลำบาก และยังเป็นวิธีที่ใช้เวลานานกว่าวิธีอื่น ๆ (รูปที่ 1)

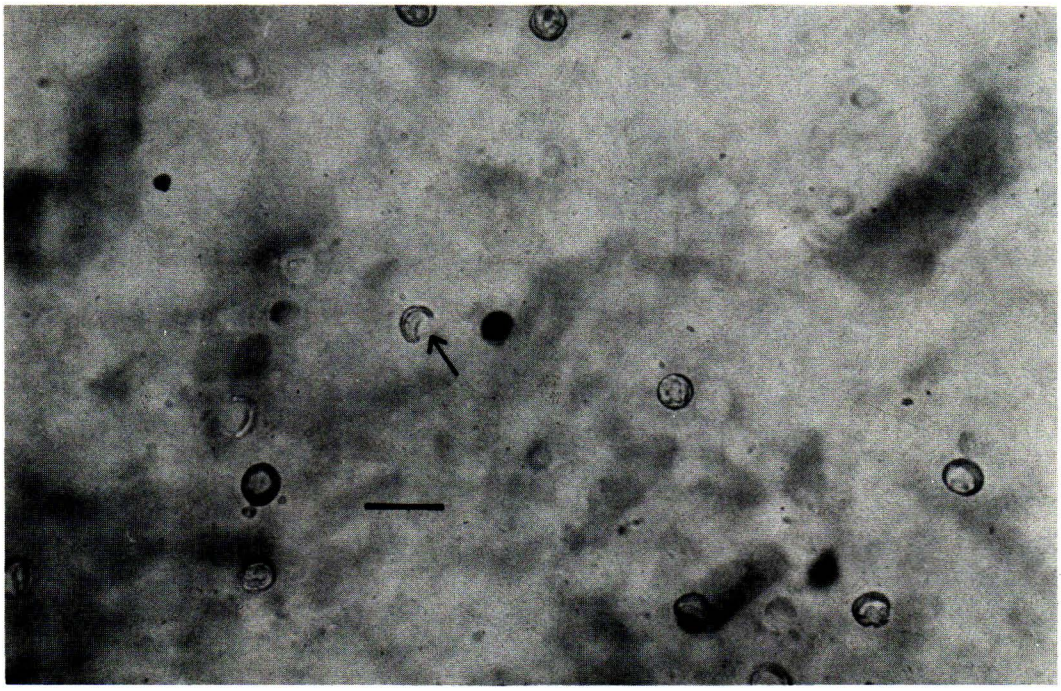

Figure 1 Cryptosporidial oocysts in fecal smear stained by MZN. Rupture of the oocyst (arrow) due to overheating. (Bar = 10 microns).

จากการศึกษาเด็กท้องเสียจาก cryptosporidiosis นั้น พบว่าปริมาณของ oocyst ที่ตรวจพบในอุจจาระมักจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ดังนั้นจึงได้พยายามหาความสัมพันธ์ของปริมาณ oocyst ที่ตรวจพบโดยการนับจาก objective 40X เปรียบเทียบกับปริมาณ oocyst ทั้งหมด 0.05 มล. พบว่าจำนวน oocyst ที่ดูด้วย objective 40X มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณ oocyst ที่นับจาก smear ทั้งแผ่น แม้จะเป็นการหาโดยการประมาณก็ตามซึ่งปริมาณ oocyst ต่อ 1 มล. อาจใช้เป็นตัวพยากรณ์โรค ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

การเก็บตัวอย่างอุจจาระในอุณหภูมิห้อง (25-30°C) โดยใช้ 10% formalin สามารถคงสภาพ cryptosporidial oocyst ไว้ใช้ศึกษาได้นานเป็นปี

สำหรับเกณฑ์ในการวินิจฉัย cryptosporidial oocyst จากการศึกษานี้พอสรุปได้คือ

1. รูปกลมหรือรี ขนาดประมาณ 3-4 ไมครอน
2. ลักษณะติดสีของ sporozoites ไม่สม่ำเสมอ อาจพบทั้งสีซีดและเข้ม สีที่เห็นจะสดใส แต่ไม่วาว
3. ไม่มีหน่อ (no budding)
4. อาจพบช่องว่างระหว่างผนังของ oocyst ที่ไม่ค่อยติดสีกับ sporozoites ที่อยู่ภายใน จำนวน sporozoites อาจจะเห็นไม่ครบ 4 ขึ้นกับการเรียงตัวของ sporozoites
5. อาจพบ Residual body ซึ่งจะติดสีเข้ม จำนวนและขนาดแตกต่างกันไป

การศึกษาเปรียบเทียบการย้อมสีอุจจาระเพื่อหา cryptosporidial oocyst พบว่าสามารถใช้ได้หลายวิธี ได้แก่ MCK DMSO MK S-MB และ MZN วิธีเหล่านี้ล้วนสามารถตรวจหา oocyst ได้ผลดี รวดเร็ว แม่นยำ และเหมาะสมในการใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และแยกได้ง่ายจาก yeast ทุกวิธีใช้เวลาในการย้อมไม่นานเกินไป ส่วนวิธี Giemsa ไม่เหมาะที่จะใช้ในการวินิจฉัยที่รวดเร็ว เพราะการติดสีของ oocyst ใกล้เคียงกับ yeast มาก

การย้อมโดยวิธี MCK ให้ขนาด yeast ใหญ่ที่สุด และสามารถเห็น sporozoites ได้ชัดเจนกว่าวิธีอื่น ๆ (รูปที่ 2)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้รายงานขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสัย กรัยวิเชียร หัวหน้าภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนและอนุญาตให้ทำการรายงานครั้งนี้

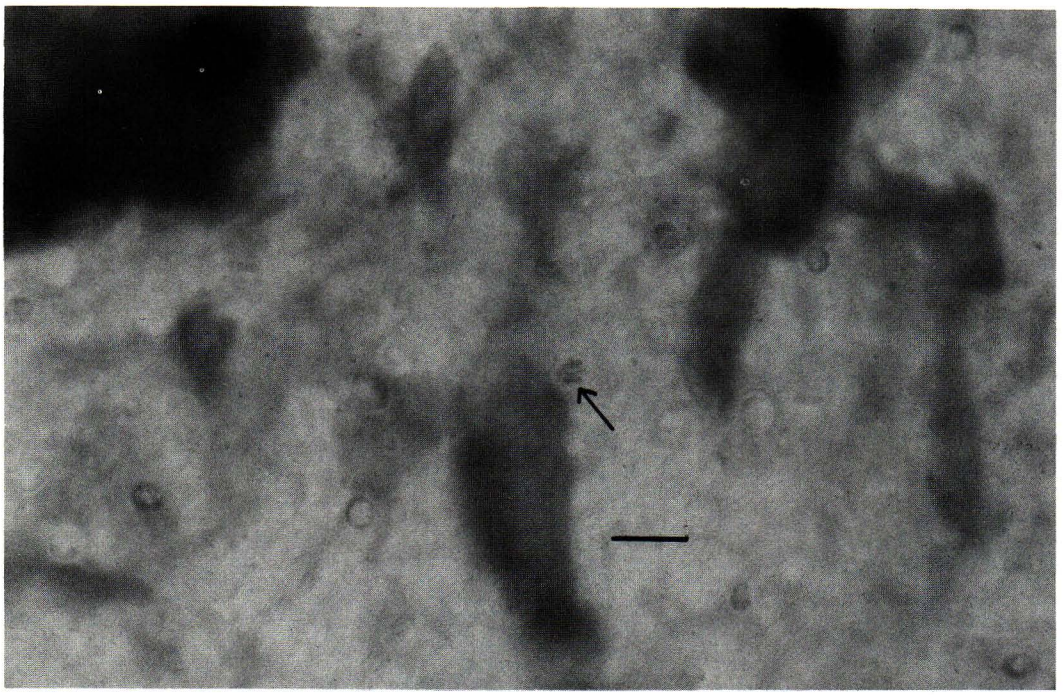

Figure 2 Cryptosporidial oocysts in fecal smear stained by MCK. Notice well-demonstrated 4 sporozoites (arrow). (Bar = 10 microns).

อ้างอิง

1. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoa Crytosporidium. Gastroenterology 1979 Apr; 70(4) : 592-598
2. Marcial MA, Madara JL. Cryptosporidium: cellular localization and structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions. Gastroenterology 1985 May; 88(5) : 1489
3. Booth CC, Slavin G, Dourmashkin RR, Donich I, Webster D, Bird RG, Bryceson A, Asherson GL. Immunodeficiency and cryptosporidiosis. Br Med J 1980 Oct 25; 281(6248) : 1123-1127
4. Holley HP, Dover C. Cryptosporidium : a common cause of parasitic diarrhea in otherwise healthy individuals. J Infact Dis 1986 Feb; 153(2) : 365-367
5. สมชาย จงวุฒิเวศย์, พิสัย กรัยวิเชียร, เมธี กุลกำม์ธร, บุษบา วิวัฒน์เวคิน, มาลี เจริญกร. การสำรวจเบื้องต้นเพื่อหา Cryptosporidial Oocyst ในอุจจาระเด็กท้องเสีย. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2529 พฤศจิกายน ; 30(11) : 1109 -1116
6. Ma P, Soave R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J Infect Dis 1983 Mar; 147(5) : 824-828
7. Bronsdon NJ. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of Cryptosridium Oocyst in stool specimens. J Clin Microbiol 1984 Jun; 19(6) : 952-953
8. Kageruka P, Brandt JPA, Taelman H, Jonas C. Modified Koster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. Ann Soc Belge Med Trop 1984 June; 64(2) : 171-175
9. Baxby D, Blundell N. Sensitive, rapid, simple for detecting Cryptosporidium in faeces. Lancet 1983 Nov12;2(8359) 1149
10. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of Cryptospordium Oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983 Jul; 18(1) : 185-190
11. Soave R, Armstrong D. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. Rev Infect Dis 1986 Nov-Dec; 8(6) :1012-1023
12. Garone MA, Winston BJ, Lewis JH. Cryptosporidiosis of the stomach. Am J Gastroenterol 1986 Jun; 81(6) : 465-469