مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، ویژه نامه ۱، زمستان ۹۲، صفحات ۴۳ تا ۴۸

Original Article

تعیین حساسیت و ویژگی روش ایمونوفلئورسنت مستقیم جهت تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال

سمیه آقاملایی[۱]، نیما صالحی[۱]، بهرام کاظمی[۲]، علیرضا ابدی[۳]، فرید تحویلدار بیدرونی[۴]

[۱] کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] استاد، گروه بیوتکنولوژی و گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] دانشیار، گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *کریپتوسپوریدیوم یکی از عوامل جهانی بیماری اسهال می‌باشد که اغلب بچه ها و بیماران دچار سرکوب ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. روش معمول تشخیص این انگل، تهیه گسترش و رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده و مشاهده اووسیست است. هدف از این مطالعه تعیین حساسیت و اختصاصیت روش ایمونوفلئورسنت مستقیم نسبت به روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده است.*

روش بررسی: *تعداد ۲۵۰۰ نمونه مدفوع کودکان مراجعه کننده به بیمارستان‌های کودکان تهران جمع آوری و از آنها گسترش تهیه شد و بعد از رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده با میکروسکوپ بررسی شدند. نمونه‌های مثبت و تعدادی از نمونه‌های منفی که به صورت تصادفی انتخاب شدند، با استفاده از روش ایمونوفلئورسانس مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *روش ذیل نلسون اصلاح شده، ۳۰ مورد مثبت و آزمایش ایمونوفلئورسانس مستقیم ۲۷ مورد از ۳۰ مورد فوق را مثبت تشخیص داد. آزمایش ایمونوفلئورسانس مستقیم بر روی ۱۱۴ نمونه که بر اساس روش‌های آماری انتخاب شدند و توسط رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده منفی اعلام شده بودند، مورد مثبتی را شناسایی نکرد. بنابراین حساسیت، اختصاصیت و قدرت پیش‌گویی مثبت و منفی آن به ترتیب ۹۰٪ ، ۱۰۰٪ ، ۱۰۰٪ و ۹۷/۵٪ بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان داد که حساسیت روش ایمونوفلئورسانس مستقیم کمتر از روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده بود، ولی اختصاصیت هر دوی آنها ۱۰۰٪ بود. در نتیجه روش ذیل نلسون اصلاح شده روش مناسبی برای تشخیص کریپتوسپوریدیوم در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تحقیقاتی می‌باشد.*

واژگان کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم، ذیل نلسون اصلاح شده، ایمونوفلئورسانس مستقیم.*

مقدمه

کریپتوسپوریدیوزیس عمدتاً در انسان به صورت یک عفونت اسهالی بوده که تمام رده‌های سنی را درگیر می‌سازد. این ارگانیسم به طور داخل سلولی و خارج سیتوپلاسمی در انتروسیت‌های مجرای معدی- روده ای تکثیر و رشد می‌یابند. این بیماری عمدتا در کودکان و افرادی که به طور مادرزادی یا اکتسابی دچار نقص ایمنی هستند، شدید و طولانی‌تر بوده و جایگاه‌های خارج روده‌ای را درگیر می‌سازد (۱). انگل کریپتوسپوریدیوم پاتوژن منتقله از طریق تماس مدفوعی- دهانی است. به این ترتیب که با مصرف مواد غذایی آلوده و نوشیدن آب آشامیدنی غیربهداشتی یا آب‌های مراکز ورزشی و گردشی، اووسیست‌ها وارد بدن می‌گردند (۲). انتقال عفونت از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دکتر فرید تحویل دار بیدرونی (**email**: faridtahvildar@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

راه تماس شخص به شخص، بیشتر در آسایشگاه سالمندان و مهد کودک‌ها امکان پذیر می‌باشد (۳). روش معمول تشخیص این انگل، تهیه اسمیر مستقیم و سپس رنگ آمیزی اسمیر با روش ذیل نلسون اصلاح شده (MZN) می‌باشد. روش مذکور ارزان و در عین حال وقت گیر بوده و نیاز به وجود تعداد بیشتر از ۵۰/۰۰۰ اووسیست در هر گرم مدفوع و مهارت کارشناسان مجرب جهت تشخیص قطعی دارد (۴). معایب این روش سبب شده تا محققان در جستجوی روش تشخیصی بهتری برای این تک یاخته باشند. برخی مطالعات نشان می‌دهند که روش تشخیصی ایمونوفلئورسنت مستقیم (DFA) به دلیل استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال نشان دار شده جهت تشخیص آنتی ژن اووسیست می‌تواند روشی با حساسیت و ویژگی بالا باشد و از تعداد منفی و مثبت کاذب بکاهد (۵). مطالعات مبنی بر استفاده از روش‌های تشخیصی ایمونوپارازیتولوژی کریپتوسپوریدیوم در کشورمان معدود است و تا به حال تحقیق جامعی جهت مقایسه این روش با روش رنگ آمیزی صورت نگرفته است. بنابراین ضروری است استفاده از روش ایمونوفلئورسنت مستقیم جهت تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم بررسی و با روش رنگ آمیزی اسید فست مقایسه و ارزیابی گردد.

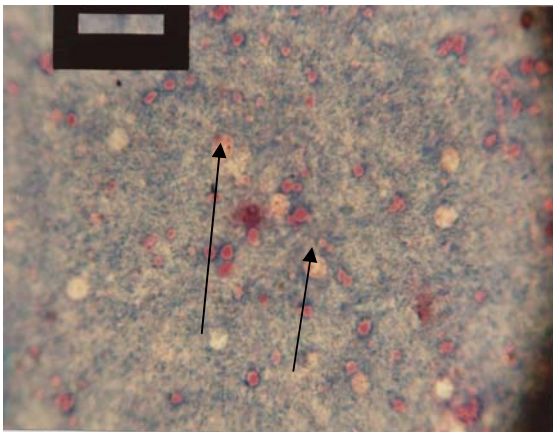
مواد و روشها

این مطالعه بر روی کودکان زیر ۱۵ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی، بیمارستان تخصصی اطفال شهید فهمیده تهران، بیمارستان فوق تخصصی کودکان مفید، بیمارستان کودکان مبتلا به سرطان محک صورت گرفت. لازم به ذکر است که در این تحقیق تعریف اسهال، دفع مدفوع شل و یا آبکی بود. پس از هماهنگی‌های لازم با مسئولین این بیمارستان‌ها تعداد ۲۵۰۰ نمونه مدفوع اسهالی از آزمایشگاه بیمارستان‌های مذکور جمع آوری و به آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شد. به منظور مقایسه حساسیت و اختصاصیت روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده با روش ایمونوفلئورسنت مستقیم با توجه به فرمول‌های آماری مربوطه، به ترتیب احتیاج به وجود ۳۰ نمونه مثبت و ۱۱۴ نمونه انتخاب شده تصادفی منفی بود. برای تهیه نمونه-های مثبت و منفی مذکور، با اعمال شیوع ۱٪، سطح اطمینان ۹۵٪ و پذیرش حداکثر خطای ۰/۰۱ تعداد نمونه ۲۵۰۰ عدد محاسبه گردید.

ابتدا نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه شماره گذاری شدند. اسمیر مستقیم از همه نمونه‌های و از رسوب حاصل از تکنیک فرمالین- اتر تهیه شد. سپس توسط روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده رنگ آمیزی شدند. روش رنگ آمیزی به این ترتیب انجام گرفت که حدود ۱۰ میکرولیتر از نمونه تغلیظ شده به منظور تهیه گسترش نازکی بر روی لام استفاده و در معرض هوا خشک شد. لام‌ها بمدت ۵ دقیقه با متانول فیکس شدند و پس از خشک شدن محلول فوشین قلیایی بر روی آنها ریخته شد و به آرامی به شکلی که نجوشند با چراغ الکلی حرارت داده شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شدند. لام‌ها با آب شیر شسته شدند و با محلول اسید سولفوریک ۲٪ به مدت ۲-۱ دقیقه رنگ‌بری شدند و دوباره با آب شیر شسته و در حرارت اتاق خشک شدند. سپس با متیلن بلو به مدت ۱ دقیقه رنگ شدند، با آب شیر شسته و پس از خشک شدن در هوای اتاق با استفاده از روغن ایمرسیون و بزرگنمایی 1000X میکروسکوپ نوری آزمایش و از نظر وجود کریپتوسپوریدیوم بررسی گردیدند. نمونه‌های مثبت توسط روش رنگ آمیزی مذکور مشخص گردیدند و به دنبال آن با استفاده از روش ایمونوفلئورسنت مستقیم تمامی نمونه‌های مثبت جهت تعیین حساسیت و تمامی ۱۱۴ نمونه منفی که به صورت تصادفی انتخاب شدند برای تعیین اختصاصیت مورد بررسی قرار گرفتند. ما در این مطالعه کیت تشخیصی مریفلور (Meridia Diagnosis Inc.Cincinnati,Ohio,USA) را به کار بردیم. در ابتدا از ۱۰ میکرولیتر نمونه تغلیظی و فرمالینه، کنترل مثبت و منفی برای تهیه گسترش بر روی چاهک های مخصوص استفاده شد. لام‌ها جهت خشک شدن در حرارت اتاق قرار گرفتند و سپس طبق دستورالعمل کیت رنگ آمیزی شدند. لام‌های رنگ آمیزی شده با عدسی ۴۰ میکروسکوپ فلئورسنت زایس (excitation filter,490 to 500 nm, barrier filter, 510 to 530 nm; Carl Zeiss, Inc., Germany) مورد بررسی قرارگرفتند. اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم به شکل گرد تا بیضوی، به اندازه تقریبا" ۷-۵ میکرون و به رنگ سبز فلئورسنت درخشان در یک زمینه تاریک مشاهده شدند.

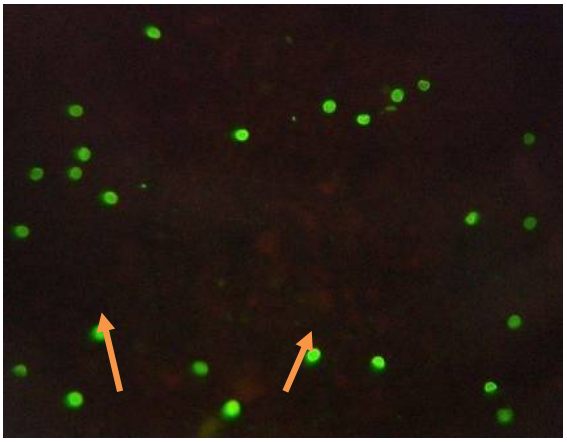
یافته‌ها

جهت تشخیص اووسیست انگل کریپتوسپوریدیوم از روش متداول رنگ‌آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی اووسیست‌ها به رنگ قرمز روشن در زمینه آبی مشاهده گردیدند (شکل ۱).



شکل ۱. نوک پیکان اووسیست کریپتوسپوریدیوم با رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده را نشان می‌دهد.

بر روی نمونه‌های مثبت شده با رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، به منظور ارزیابی حساسیت، آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲. نوک پیکان اووسیست کریپتوسپوریدیوم را با روش DFA به رنگ سبز درخشان نشان می‌دهد.

آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم بر روی ۳۰ نمونه مثبت که توسط روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده تعیین شده بودند، به عمل آمد و روش مذکور تنها ۲۷ مورد را مثبت تشخیص داد. از سوی دیگر ۱۱۴ نمونه‌ای که توسط رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، منفی اعلام شده بودند. از میان ۲۴۷۰ نمونه منفی به صورت تصادفی انتخاب و آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم برای تعیین اختصاصیت بر روی آنها انجام شد و در میان آنها نمونه مثبتی مشاهده نگردید.

با مقایسه دو روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده و آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم (جدول ۱)، تعداد مثبت‌های تشخیص داده شده توسط رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده، ۳۰ و تعداد مثبت‌های تشخیص داده شده توسط آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم، ۲۷ عدد محاسبه شد.

جدول۱. مقایسه موارد مثبت کریپتوسپوریدیوم توسط دو روش ذیل نلسون و آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم

روش آزمایش		ذیل نلسون اصلاح شده		جمع
ایمونوفلئورسنت مستقیم		موارد مثبت	موارد منفی	
	موارد مثبت	۲۷	۰	۲۷
	موارد منفی	۳	۱۱۴	۱۱۷
جمع		۳۰	۱۱۴	۱۴۴

نتایج این مطالعه ۳ نمونه منفی کاذب را برای DFA نشان داد. به منظور تأیید آزمایش ذیل نلسون اصلاح شده اووسیست‌ها را با خط کش میکرومتری اندازه‌گیری کردیم که محدوده آنها ۶-۵ میکرون بود. بنابراین احتمال خطا در تشخیص کریپتوسپوریدیوم بجای سایکلوسپورا در روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده از بین رفت و مشخص شد ۳ نمونه تشخیص داده نشده توسط آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم کریپتوسپوریدیوم بودند. آزمایش ایمونوفلئورسنت مستقیم برای این ۳ نمونه، ۲ بار تکرار شد که نتایج به دست آمده مشابه آزمایش اول بود.

پس از محاسبه نتایج جدول فوق، حساسیت، اختصاصیت، قدرت پیش گویی مثبت و قدرت پیش گویی منفی طبق فرمول‌های زیر به ترتیب ۹۰٪ ، ۱۰۰٪ ،۱۰۰٪ و ۹۷/۵٪ به دست آمد.

$$\text{تعیین حساسیت} = \frac{\text{تعداد مثبت حقیقی}}{\text{تعداد مثبت حقیقی + تعداد منفی کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{تعیین حساسیت} = \frac{۲۷}{۳+۲۷} \times ۱۰۰ = ٪\ ۹۰$$

$$\text{قدرت پیش گویی مثبت} = \frac{\text{تعداد مثبت حقیقی}}{\text{تعداد مثبت حقیقی + تعداد مثبت کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{قدرت پیش گویی مثبت} = \frac{۲۷}{۰+۲۷} \times ۱۰۰ = ٪\ ۱۰۰$$

$$\text{تعیین اختصاصیت} = \frac{\text{تعداد منفی حقیقی}}{\text{تعداد منفی حقیقی + تعداد مثبت کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{تعیین اختصاصیت} = \frac{۱۱۴}{۱۱۴+۰} \times ۱۰۰ = ۱۰۰\ ٪$$

$$\text{قدرت پیش گویی منفی} = \frac{\text{تعداد منفی حقیقی}}{\text{تعداد منفی حقیقی + تعداد منفی کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{قدرت پیش گویی منفی} = \frac{۱۱۴}{۱۱۴+۳} \times ۱۰۰ = ۹۷/۵٪$$

بحث

کریپتوسپوریدیوم به عنوان یکی از عوامل شایع در ایجاد اسهال در کودکان مطرح می‌باشد و اسهال مهم‌ترین علامت کلینیکی در تشخیص آن است (۷). در این مطالعه هدف ما تعیین حساسیت و اختصاصیت روش DFA جهت تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های کودکان مبتلا به اسهال می‌باشد. بررسی نتایج، حساسیت و اختصاصیت ۹۰٪ و ۱۰۰٪ برای آزمایش ایمونوفلئورسانس مستقیم نسبت به روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده اعلام کرد. با توجه به نتایج به دست آمده رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده روش مناسبی در تشخیص کریپتوسپوریدیوم می‌باشد، زیرا توانست در میان ۲۵۰۰ نمونه مدفوع ۳۰ نمونه واجد کریپتوسپوریدیوم را تشخیص دهد. با توجه به اینکه روش رنگ آمیزی ذیل نلسون (MZN) به عنوان گلد استاندارد تشخیص اووسیست انگل کریپتوسپوریدیوم عنوان شده است و سایر محققین نیز از آن جهت ارزیابی روش‌های مختلف استفاده کرده‌اند، به عنوان روشی قابل استناد برای مقایسه با روش DFA در نظر گرفته شده است. تاکنون مطالعات مختلفی در مورد مقایسه این دو روش صورت گرفته که از آن جمله مطالعه گارسیا و همکاران در سال ۱۹۹۲ جهت تشخیص کریپتوسپوریدیوم می‌باشد که در میان ۲۳۰ نمونه مدفوع انسان با استفاده از دو روش MZN و DFA به دنبال اووسیست انگل بودند و از ۸ نمونه‌ای که روش MZN منفی گزارش کرده بود روش DFA ۴ مورد برای کریپتوسپوریدیوم و ۴ مورد برای کیست ژیاردیا مثبت تشخیص داد و دقت روش DFA را ۱۰ برابر بیشتر از روش رنگ آمیزی عنوان کردند و حساسیت DFA را ۱۰۰٪ و MZN را ۹۲٪ گزارش نمودند (۸) که با مطالعات ما مغایر بود؛ ولی با مطالعات آلس و همکاران که در سال ۱۹۹۵ بر روی ۲۶۹۶ نمونه جمع آوری شده از دو روش ایمونوفلئورسنت مستقیم و رنگ آمیزی معمول (ذیل نلسون اصلاح شده) برای تشخیص کریپتوسپوریدیوم استفاده کردند مطابقت داشت، زیرا روش DFA، ۳۹ مورد مثبت از ۲۶۵۷ نمونه را با حساسیت ۹۳٪، اختصاصیت ۱۰۰٪، قدرت پیش گویی مثبت ۱۰۰٪ و قدرت پیش گویی منفی ۱۰۰٪ و روش MZN برای همان تعداد نمونه ۲۳ مورد مثبت با حساسیت ۵۴/۸٪ ، اختصاصیت ۱۰۰٪، قدرت پیش گویی مثبت ۱۰۰٪ و قدرت پیش گویی منفی ۹۹/۳٪ تعیین نمودند (۹). زیمرمن و همکاران نیز در سال ۱۹۹۵، ۵۱۲ نمونه مدفوع را توسط روش‌های DFA، EIA و رنگ آمیزی تری‌کروم از نظر اووسیست کریپتوسپوریدیوم مورد بررسی قرار دادند که با روش DFA، ۳۳ مورد مثبت (۱۰۰٪) و روش EIA، ۳۲ نمونه مثبت (۹۷٪) و روش رنگ آمیزی تری کروم ۲۷ مورد مثبت (۸۱/۸٪) تشخیص داده شد. در این تحقیق نیز مشابه مطالعه آلس و همکاران حساسیت روش DFA بالاتر از دو روش دیگر اعلام گردید (۱۰). همین طور گارسیا و همکاران در تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۰ از یک نوع روش کیفی آنزیم ایمونواسی برای تشخیص سه تک یاخته مهم از جمله کریپتوسپوریدیوم استفاده کردند و برای ارزیابی این آزمایش روش استاندارد MZN را به کار گرفتند و در انتها نتایج مختلف با دو روش را با روش متفاوت دیگری مثل DFA دوباره آزمایش کردند. ابتدا MZN از بین ۴۴۴ نمونه، ۵۸ مورد مثبت را شناخت و در نهایت نتایج آزمایشات با DFA به صورت ۶۰ مورد مثبت با حساسیت ۹۸/۳٪ و اختصاصیت ۹۹/۷٪ مشخص شدند (۱۱). از سوی دیگر ریزنر و همکاران در سال ۱۹۹۸ با بررسی ۱۸۶ نمونه مدفوع انسانی و با به کارگیری دو روش DFA و MZN از ۱۰ مورد مثبت ۷ مورد را توسط روش DFA و MZN شناسایی کردند، ۲ نمونه مثبت توسط MZN و ۱ مورد هم با روش DFA تشخیص داده شد (۱۲). آکیون و همکاران هم در سال ۱۹۹۹، ۲۰۰ نمونه مدفوع کودک زیر ۱۲ سال را با روش‌های MZN، گیمسا، DFA و IFA بررسی کردند. هدف از این مطالعه تعیین بهترین روش در تشخیص انگل بود که نتایج نشان داد که روش MZN روشی آسان و قابل اعتماد برای تشخیص کریپتوسپوریدیوم است و روش رنگ آمیزی DFA در صورت در دسترس بودن به منظور تأیید تشخیص می‌تواند استفاده شود که با نتایج ما همخوانی داشته است

(۱۳). همچنین آریکان و همکاران هم در سال ۱۹۹۹ با استفاده از نمونه‌های ۴۰ بیمار به عنوان نمونه‌های کنترل شیوع کریپتوسپوریدیوزیس در ۱۸ بیمار دچاراسهال و سرکوب سیستم ایمنی را با روش‌های MZN، DFA وIFA بررسی کردند. تعداد ۱۱ نمونه از ۱۸ مورد توسط حداقل یکی از روش‌ها مثبت ارزیابی شد و تعداد ۷ مورد باقیمانده در بیماران ایدزی مثبت گردید. نتایج نشان دادند که روش رنگ آمیزی اسید فست اصلاح شده روشی قابل اجرا و قابل اطمینان برای تشخیص اووسیست‌های انگل کریپتوسپوریدیوم می‌باشد و روش DFA می‌تواند به عنوان تأییدی بر نتایج روش اسید فست باشد (۱۴). همینطور ریزنر و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشابه تحقیق خودشان در سال ۱۹۹۸ را این بار با بررسی ۴۲۲ نمونه انجام دادند که با دو روش از ۱۹ مورد مثبت ۱۴ مورد، ۴ نمونه مثبت هم توسط MZN و ۱ مورد توسط روش DFA تشخیص داده شد که بیانگر حساسیت ۹۴/۷٪ برای MZN و ۷۹٪ برای DFA می‌باشد (۱۵). این تحقیقات نشان دادند که روش رنگ آمیزی MZN نسبت به DFA روش حساس‌تری در تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم می‌باشد که مطالعات مذکور مطابق با تحقیق ما بوده است. منفی کاذب روش‌های ایمونواسی می‌تواند نشان از خطای نمونه گیری باشد، اما سایر احتمالات شامل وجود موادی در نمونه تغلیظ شده که با آنتی بادی باند شده تداخل می کند و یا به علت عدم حضور آنتی بادی اختصاصی متصل به جایگاه مربوطه باشد و یا کمتر بودن تعداد اووسیست‌ها کمتر از ۱۰۰۰۰ عدد در هر میلی لیتر نمونه مدفوع باشد. همچنین در استفاده از تکنیک DFA محدودیت‌هایی از قبیل هزینه بر بودن آن و لزوم وجود میکروسکوپ فلورسنت می‌باشد که ممکن است تأمین آنها برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها امکان پذیر نباشد. به هر حال با توجه به موارد مذکور استفاده از تکنیک MZN برای آزمایشگاه‌ها می‌تواند بهترین روش در تشخیص کریپتوسپوریدیوم باشد.

REFERENCES

1. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. Cryptosporidium taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin Mic Rev2004; 17:72-97.
2. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins P. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 623–26.
3. Haghighi A, Keshavarz A, Taghipour N, (Editors). Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. 1 th ed. Tehran: Shahid Beheshti Medical University. Parasitology Division 1388. [In Persian]
4. Yegani M, Translator. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. Fayer R, Editor. 1st ed. Tehran: Noorbakhsh Press; 2001. p. 90. [In Persian]
5. Anonymous L, Cryptosporidium outbreak in British Colombia, Cryptosporidium Capsul 1, 1996; 1-3.
6. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:995-98.
7. Fayer R, Ungar BLP. Cryptosporidium spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol Rev 1986; 50:458-83.
8. Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1992; 30:3255-57.
9. Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, Mattia AR. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of Giardia and Cryptosporidium spp. in human fecal specimens. J clin microbial 1995; 1632–34.
10. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of Conventional stool concentration and preserved- smear methods with merifluor Cryptosporidium/Giardia direct immunofluorescence assay and ProSpecT Giardia EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbial 1995:1942–43.
11. Garcia LS, Shimizu RY, and Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 2000; 38:3337-40.
12. Reisner BS. Evaluation of a combined acid-fast/trichrome stain for detection of Microsporidia and Cryptosporidia. Gen Meet Am Soc Microbiol 1998; 98: 183.
13. Akyön Y, Ergüven S, Arikan S, Yurdakök K, Günalp A. *Cryptosporidium parvum* prevalence in a group of Turkish children. Turk J Pediatr 1999; 41:189-96.

14. Arikan S, Ergüven S, Akyön Y, Günalp A. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in a Turkish university hospital. Acta Microbiol Immunol Hung 1999; 46:33-40.

15. Reisner BS. Evaluation of a combined Acid-Fast–Trichrome Stain for Detection of Microsporidia and Cryptosporidium parvum. Arch Pathol Lab Med 2000; 124.