پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات ۳۵ تا ۴۰

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی قدرت *PCR* در تشخیص کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال

نیماصالحی، سمیه آقا ملایی، نیلوفر تقی پور، علی حقیقی، علیرضا ابدی، فرید تحویلدار بیدرونی*

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *روش تشخیص انگل کریپتوسپوریدیوم، تهیه گسترش از مدفوع، رنگ آمیزی ذیل نلسون و مشاهده اووسیست است. تشخیص، توسط این روش نیاز به تعداد بالای اووسیست در هر گرم مدفوع، زمان بیشتر جهت بررسی و مهارت تکنسین دارد، تا کنون در ایران مطالعه‌ای جهت ارزیابی قدرت روش PCR و رنگ آمیزی ذیل نلسون به عنوان روش استاندارد صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه، PPV و NPV روش PCR و روش رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده (MZN) در تشخیص کریپتوسپوریدیوم در کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان تعیین گردید.*

روش بررسی: *این مطالعه به روش تشخیصی انجام گرفت. تعداد ۲۵۰۰ نمونه مدفوع از کودکان مبتلا به اسهال گرفته و از آنها گسترش تهیه شد و بعد از رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده (فوشین قلیایی به همراه حرارت، رنگ بر و متیلن بلو) با میکروسکوپ بررسی شدند. بر روی نمونه‌های مثبت و تعدادی از نمونه‌های منفی، عمل استخراج DNAانجام شد و توسط روش PCR، آلودگی به کریپتوسپوریدیوم تشخیص داده شد و ارزش اخباری مثبت (PPV) و منفی (NPV) هر دو روش مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *روش ذیل نلسون اصلاح شده توانست از ۲۵۰۰ نمونه، ۳۰ مورد مثبت تشخیص دهد که همگی آنها توسط روش PCRنیز مثبت اعلام شدند و هیچ مورد مثبت کاذب توسط روش رنگ آمیزی مشاهده نشد. از موارد منفی نیز، ۲ مورد مثبت توسط PCR تشخیص داده شد که نشان دهنده منفی کاذب توسط روش رنگ آمیزی بود، PPV و NPV روش رنگ‌آمیزی به ترتیب ۹۴/۱٪ و۱۰۰٪ و PPV و NPV روش PCRنیز ۱۰۰٪ اعلام شد.*

نتیجه‌گیری: *روش PCRقدرت لازم را در تشخیص کریپتوسپوریدیوم دارد و به عنوان روش تشخیصی دقیق، به ویژه در افراد دارای نقص در سیستم ایمنی، معرفی می‌شود، اما با توجه به قدت تقریبا بالای روش MZN و در دسترس بودن آن در اکثر آزمایشگاه‌ها، استفاده از این روش جهت تشخیص در کودکان دارای ایمنی سالم، کافی و مفید به نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: *کریپتوسپوریدیوم، ذیل نلسون اصلاح شده، PCR*

مقدمه

انگل کریپتوسپوریدیوم تک یاخته‌ای است که به صورت اجباری، داخل سلول و خارج سیتوپلاسم سلول‌های اپی‌تلیال روده میزبان، قادر به تکمیل چرخه زندگی خود می‌باشد (۱). برای اولین بار ارنست ادوارد تایزر در سال ۱۹۰۷ این انگل را در اپی‌تلیوم معده موش شناسایی کرد و آن را کریپتوسپوریدیوم موریس نام گذاری نمود (۲). کشاورز و همکاران هم در سال ۱۳۸۷ با آزمایش ۱۲۶۳ نمونه مدفوع اسهالی کودکان شهرستان قزوین و تهران با یافتن ۳۱ مورد مثبت، شیوع آلودگی را ۲/۵٪ بیان نمودند (۳). همچنین طی تحقیقی که توسط صانعیان و همکاران در سال ۱۳۸۹ در شهر اصفهان بر روی ۶۰۶ نمونه مدفوع اسهالی کودکان صورت گرفت، با تشخیص ۲۸ مورد اووسیست کریپتوسپوریدیوم

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی. فرید تحویلدار بیدرونی (**e-mail faridtahvildar@yahoo.com:**)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۲/۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۵/۳

شیوع آن را ۴/۶٪ ذکر نمودند (۴). اسهال از علایم اصلی این بیماری می‌باشد که با سپری شدن سیر تکاملی انگل و تخریب سلول‌های روده میزبان حاصل می‌شود (۵). این بیماری در افراد دارای سیستم ایمنی ناکارآمد، موجب اسهال‌های شدید و مزمن شده که در صورت عدم درمان، می‌تواند موجب مرگ بیمار شود (۶،۱۰). کودکان به علت پایین بودن ایمنی‌شان در صورت آلودگی، به اسهال‌های شدیدی مبتلا می‌شوند که اغلب خود محدود شونده است، ولی با توجه به وضعیت تغذیه، بهداشت و دیگر عوامل محیطی تاثیرگذار بر ایمنی کودک، نیاز به درمان در گروهی از آنها دیده می‌شود، علاوه بر این، اپیدمی‌های متعدد این بیماری موجب اهمیت بیشتر این تک یاخته و بیماری مرتبط با آن شده است (۱۱، ۱۲). لذا تشخیص صحیح و به موقع این تک-یاخته در درمان و همچنین کنترل و پیشگیری بیماری حائز اهمیت است. روش‌های معمول تشخیص این انگل، تهیه اسمیر توسط روش مستقیم، یا روش تغلیظی و سپس رنگ‌آمیزی اسمیر با روش ذیل نلسون اصلاح شده (MZN) و مشاهده اووسیست آن می‌باشد (۱۳، ۱۴)، باتوجه به این مسئله که میکروارگانیسم‌های دیگر اسیدفست نیز در مدفوع وجود دارند که از نظر اندازه مشابه کریپتوسپوریدیوم هستند، لذا تشخیص این تک یاخته به راحتی امکان پذیر نمی‌باشد. از جمله این عوامل اسید فست می‌توان به مخمرها، گرده‌های گیاهان و سایر تک یاخته‌ها مانند سیکلوسپورا اشاره نمود (۱۳). در عین حال، روش‌های ذکر شده وقت‌گیر و خسته کننده بوده و نیاز به کارشناسان مجرب جهت تشخیص قطعی اووسیست دارند (۱۵). این معایب و نیز ضرورت وجود حداقل تعداد ۵۰۰/۰۰۰-۵۰/۰۰۰ اووسیست در هر گرم مدفوع جهت تشخیص توسط روش میکروسکوپی، سبب شده تا محققان به دنبال روش‌های تشخیصی بهتری، باشند که بتواند تعداد کمتر انگل را در نمونه تشخیص دهند (۱۶). تشخیص گونه و ژنوتیپ عامل بیماری در شناخت و قطع چرخه انتقال ضرورت دارد که روش میکروسکوپی قادر به انجام آن نیست (۱۷-۱۵). امروزه روش‌های مولکولی جهت تشخیص دقیق بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند. تحقیقات انجام شده تا به حال حساسیت و اختصاصیت بالایی برای این روش‌ها را در تشخیص میکروارگانیسم‌ها نشان داده‌اند (۲۰-۱۸). امروزه در اکثر مراکز درمانی کشور، از روش معمول MZN برای رنگ آمیزی گسترش نمونه‌های مدفوع، جهت تشخیص این تک یاخته استفاده می‌شود. مطالعات مبنی بر ارزیابی و مقایسه روش‌های تشخیص کریپتوسپوریدیوم در کشورمان معدود می‌باشد و تا به حال مطالعه جامعی جهت مقایسه دو روش رنگ آمیزی و مولکولی صورت نگرفته است. لذا به منظور تعیین قدرت تشخیصی PCR نسبت به روش MZN که تا امروز جهت تشخیص بالینی این انگل استفاده شده است، این تحقیق بر روی کودکان مبتلا به اسهال مراجعه کننده به تعدادی از بیمارستان‌های تهران از تاریخ اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ الی آبان ماه ۱۳۹۰ انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه به روش تشخیصی بر روی کودکان زیر ۱۲ سال مبتلا به اسهال مراجعه کننده به بیمارستان تخصصی اطفال شهید فهمیده تهران، بیمارستان فوق تخصصی کودکان مفید، بیمارستان کودکان مبتلا به سرطان محک و مرکز طبی کودکان صورت گرفت. تعریف اسهال، دفع مدفوع شل یا آبکی بود. پس از هماهنگی‌های لازم با مسئولین این بیمارستان‌ها، تعداد ۲۵۰۰ نمونه مدفوع اسهالی از آزمایشگاه بیمارستان‌های مذکور طی اردیبشت ماه ۱۳۸۸ لغایت آبان ماه ۱۳۸۹ جمع آوری و توسط جعبه حاوی یخ به آزمایشگاه گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شد. برای انجام مقایسه بین دو روش MZN و PCR به ترتیب نیاز به یک سری نمونه مثبت و یک سری نمونه منفی از لحاظ وجود اووسیست کریپتوسپوریدیوم داشتیم، که با توجه به راهنمایی مشاور آماری جهت بررسی ارزش اخباری مثبت (PPV)، تعداد ۳۰ نمونه مثبت و جهت بررسی ارزش اخباری منفی (NPV)، تعداد ۱۱۴ نمونه منفی لازم بود که برای به دست آوردن این نمونه‌های منفی، به صورت تصادفی از هر ۱۰ نمونه منفی ۱ نمونه انتخاب شد تا به ۱۱۴ عدد رسیدند. برای تهیه نمونه‌های مثبت و منفی مذکور، با اعمال شیوع ۱٪، سطح اطمینان ۹۵٪ و پذیرش حداکثر خطای ۰/۰۱ تعداد نمونه مورد نیاز ۲۵۰۰ عدد نمونه محاسبه گردید. برای جلوگیری از ایجاد خطا (Bias) آزمایشات رنگ آمیزی و PCR به صورت جداگانه و blind صورت گرفت.

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، تمامی نمونه‌ها شماره گذاری شدند؛ سپس از تمامی نمونه‌ها توسط روش مستقیم و نیز پس از انجام روش فرمالین اتر، گسترش تهیه شد. سپس رنگ آمیزی MZN بر روی آنها صورت گرفت. نمونه‌های مثبت شده با مشاهده اووسیست‌های قرمز رنگ در زمینه آبی، مشخص شدند. استخراج DNA و PCR بر روی نمونه‌های مثبت شده، به جهت تعیین PPV انجام شد. نمونه‌های منفی نیز با استخراج DNA و انجام روش PCR، جهت بررسی

آلودگی به انگل کریپتوسپوریدیوم و همچنین تعیین NPV مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه ما از دو روش فنل-کلروفرم و کیت QIAamp DNA stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) جهت استخراج DNA استفاده کردیم. غلظت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. از دو جفت پرایمر Xiao۲۰۰۱ جهت تکثیر قطعه 18S-rRNA و انجام Nested-PCR استفاده گردید (۲۱). پرایمرهای اولیه، قطعه 1.3kb از ژن مذکور را تکثیر کرد، سپس پرایمرهای ثانویه، قطعه ای 826-864bp از محصول PCR اول را تکثیر نمودند. واکنش PCR1 به صورت غلظت و حجم ذکر شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- غلظت و حجم در واکنش PCR1

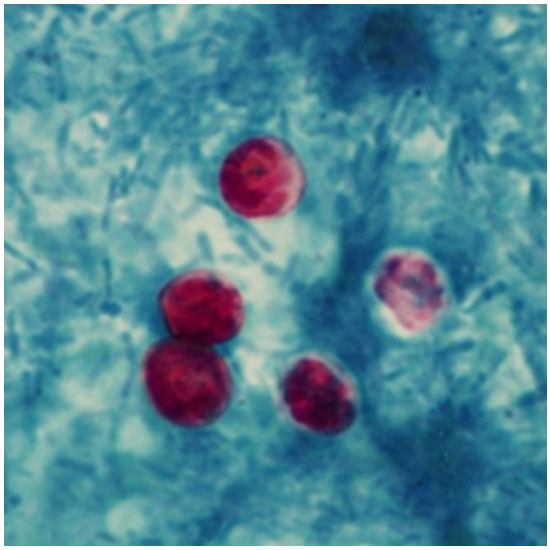
Material	Volume	Concentration
10X PCR buffer	3µL	1X
dNTP mix	1 µL	0.3 mM
Internal primer (F or R)	2 µL	20 pico mol
MgCl2 (50mM)	2 µL	1.5 mM
Taq DNA polymerase (2500 unit)	0.5 µL	1.25 U
DNA(source)	1 µL	10 ng/µl
D.W	13.5 µL	
Total volume	20 µL	

برای واکنش PCR2، مخلوط واکنش به صورت واکنش قبلی تهیه شد، به غیر از پرایمر که از پرایمر داخلی استفاده شد و DNA که از محصول PCR1 بجای DNA اولیه، استفاده شد. تکثیر DNA با تخریب اولیه آن در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه آغاز گردید. سپس با تخریب مجدد DNA درهمان دما به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و افزایش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله افزایش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید. واکنش PCR2 نیز با همین پروتکل انجام شد. تعداد سیکل‌ها برای PCR1، ۳۰ عدد و برای PCR2، ۳۵ عدد انجام شد. کنترل منفی شامل همه مواد واکنش PCR به غیر از DNA بود و برای کنترل مثبت از DNA کریپتوسپوریدیوم که قبلا با انجام سکونسینگ تایید شده بود، استفاده شد. مارکر با وزن مولکولی 100bp به همراه کنترل مثبت و کنترل منفی و نمونه‌ها برای هرمرحله استفاده شد. پس از اتمام واکنش PCR، جهت ارزیابی تکثیر قطعه مورد نظر از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید و توسط دستگاه UV duct و نرم افزار Gene Snap از ژل عکس‌برداری شد و نمونه‌های مثبت با مشاهده باند با وزن مورد نظر مشخص شدند.

پس از دست‌یابی به پروتکل مناسب جهت تکثیر DNA، تمامی نمونه‌های اشاره شده، شامل ۳۰ نمونه مثبت و ۱۱۴ نمونه منفی که توسط روش MZN مشخص شدند، جهت محاسبه موارد مثبت و منفی کاذب و حقیقی، توسط PCR مورد بررسی قرار گرفتند و در پایان PPV و NPV روش PCR نسبت به روش MZN محاسبه و گزارش شد.

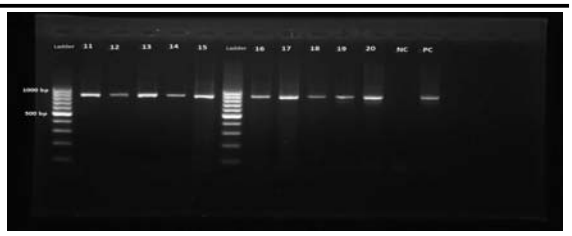
یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۲۵۰۰ کودک انجام شد که از این تعداد ۱۳۵۳ نفر (۵۴٪)، پسر و ۱۱۵۷ نفر (۴۶٪) دختر بودند. جهت تشخیص اووسیست انگل کریپتوسپوریدیوم از روش متداول رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده (MZN) استفاده شد. شکل ۱ نشان دهنده اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم است که به اندازه ۶-۴ میکرون و به رنگ قرمز روشن در زمینه‌ای آبی قابل مشاهده بودند.



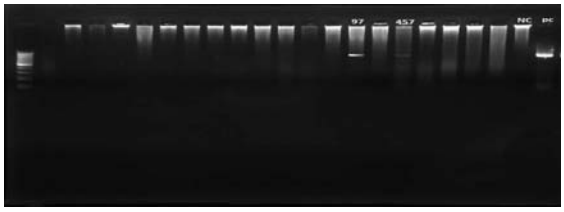
شکل ۱- اووسیست‌های رنگ آمیزی شده توسط روش MZN

بر روی نمونه‌هایی که توسط MZN نلسون مثبت شده بودند، جهت ارزیابی PPV، آزمایش PCR انجام شد. تمامی ۳۰ نمونه مثبت پس از فرآیند PCR، دارای باند با وزن مورد نظر بودند. شکل ۲ نشان دهنده باندهای ناشی از وجود DNA کریپتوسپوریدیوم در نمونه های مثبت شده توسط MZN و تایید روش رنگ آمیزی توسط PCR است.



شکل ۲- نمونه‌های مثبت شده توسط روش PCR که قبلا توسط روش رنگ آمیزی ذیل نلسون مثبت شده بودند.

از سوی دیگر ۱۱۴ نمونه که توسط MZN، منفی اعلام شده بودند به صورت تصادفی انتخاب و جهت ارزیابیNPV، فرآیند PCR برای آنها انجام شد و از میان آنها، ۲ نمونه توسط روش PCR مثبت تشخیص داده شد. شکل ۳ نشان دهنده ۲ نمونه مثبت شده توسط روش PCR است (شماره ۹۷ و ۴۵۷) که قبلا توسط روش رنگ آمیزی منفی شده بودند که به عنوان منفی کاذب توسط MZN در نظر گرفته شدند و بدین ترتیب تعداد نمونه‌های منفی حقیقی ۱۱۲ عدد محاسبه گردید.



شکل ۳- دو نمونه مثبت شده توسط روش PCR که قبلا توسط روش رنگ آمیزی منفی تلقی شده بودند.

توزیع کودکان بر حسب وجود کریپتوسپوریدیوم به تفکیک روش تشخیصی در جدول ۲ ارائه شده است. با مقایسه MZN و PCR، تعداد مثبت‌های حقیقی ۳۲، تعداد مثبت‌های تشخیص داده شده توسط MZN، ۳۰ و تعداد مثبت‌های تشخیص داده شده توسط PCR، نیز ۳۲ عدد محاسبه شد. نتایج این مطالعه نمونه مثبت کاذبی را نشان نداد.

جدول ۲- توزیع کودکان مورد بررسی بر حسب وجود کریپتوسپوریدیوم به تفکیک روش تشخیصی

	نتایج MZN		
	MZN مثبت	MZN منفی	جمع
PCR مثبت	۳۰	۲	۳۲
PCR منفی	۰	۱۱۲	۱۱۲
جمع	۳۰	۱۱۴	۱۴۴

با محاسبه نتایج جدول ۲، PPV و NPV روش PCR ۱۰۰٪ محاسبه شد؛ همچنین PPV روش MZN ۹۴/۱٪ و NPV روش MZN ۱۰۰٪ به دست آمد.

بحث

در این تحقیق روش PCR ۱۰۰ ٪ PPV و NPV و روش MZN ۹۴/۱٪ PPV و ۱۰۰٪ NPV را نشان داد. کریپتوسپوریدیوم از عوامل مهم ایجاد کننده اسهال شدید در افراد دارای ایمنی ناکارآمد و همچنین کودکان می باشد. انتشار جهانی این تک یاخته و افزایش تعداد افراد دارای ایمنی ناکارآمد مانند افراد مبتلا به ایدز و یا دریافت کنندگان داروهای سرکوبگر ایمنی، موجب افزایش ابتلا به این تک یاخته و اهمیت آن شده است. با توجه به اینکه در کنترل و پیشگیری بیماری های عفونی تشخیص نقش مهمی دارد، لذا شناسایی دقیق کریپتوسپوریدیوم در نمونه مدفوع کودکان، جهت درمان و کنترل بیماری، حائز اهمیت می باشد.

مورگان و همکاران در سال ۱۹۹۸ در استرالیا روش PCR و روش رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپیک را جهت تشخیص کریپتوسیوریدیوم پاروم در نمونه‌های مدفوع اسهالی انسان، با هم مقایسه نمودند. از ۵۱۱ نمونه مدفوع، ۳۶ نمونه توسط روش PCR مثبت اعلام شدند. این در حالی است که روش رنگ آمیزی اسیدفست و بررسی میکروسکوپیک تنها قادر به تشخیص ۲۹ نمونه بود. بدین ترتیب میزان منفی کاذب برابر با ۷ نمونه محاسبه شد. همچنین پس از انجام PCR بر روی نمونه‌های مثبت شده توسط MZN، تعداد ۵ نمونه به عنوان مثبت کاذب در نظر گرفته شدند. در نهایت، این مطالعه نشان داد روش میکروسکوپی دارای حساسیت ۸۳/۷٪ و اختصاصیت ۹۸/۹٪ می‌باشد. با توجه به توانایی PCR در تفریق و تمایز ژنوتایپ های عامل بیماری، آن را روش مفیدی در بررسی‌های علمی معرفی کردند (۱۹). نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد PPV به دست آمده برای MZN، تقریبا مشابه نتایج این محققان بوده که مبین تشخیص منفی کاذب توسط روش رنگ آمیزی می‌باشد که این موضوع به ضرورت وجود تعداد زیاد اووسیست در هر گرم مدفوع مربوط است. از سوی دیگر، نتایج مطالعه ما NPV ۱۰۰٪ را برای MZN ذیل نلسون نشان می‌دهد که با نتایج مطالعه مورگان و همکاران متفاوت است، یعنی در مطالعه ما مثبت کاذب توسط MZN وجود نداشت. در صورتی که در مطالعه مورگان و همکاران ۵ مورد مثبت کاذب مشاهده شد. این امر می تواند به تفاوت روش بررسی این دو مطالعه مربوط باشد، یعنی استفاده ما از روش

تغلیظی، رنگ آمیزی ذیل نلسون و همچنین بزرگنمایی ۱۰۰۰X که می تواند موارد مثبت کاذب را از بین ببرد و اووسیست واقعی کریپتوسپوریدیوم را دقیق‌تر تشخیص دهد. همچنین نتایج مطالعه کاوشیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هند و زیدا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در مالزی نشان دهنده بالا تر بودن PPV روش PCR نسبت به MZN است که با نتایج ما مشابه است (۲۲، ۲۳). بیالک و همکاران در سال ۲۰۰۲ در آلمان، PPV روش‌های ایمنولوژیک را جهت غربالگری نمونه های مدفوع از نظر وجود کریپتوسپوریدیوم کافی دانستند و اعلام داشتند که PCR موجب افزایش در دقت تشخیص اووسیست نشده است (۲۴). زیگلرو همکاران در سال ۲۰۰۷، افزایش حساسیت توسط روش PCR را بیان نمودند (۲۵) که موافق نتایج ما مبنی بر PPV بالاتر PCR در تشخیص اووسیست کریپتوسپوریدیوم می‌باشد. پائل و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ در هند با یک مطالعه مقایسه‌ای، PCR را حساس‌ترین روش و روش تغلیظی و رنگ آمیزی را در صورت موجود نبودن PCR در آزمایشگاه‌ها به ویژه در کشورهای در حال توسعه، را به عنوان روشی قابل اعتمادی معرفی کردند (۲۶). گروه‌های پرخطر مانند افراد مبتلا به ایدز، افرادی که پیوند دریافت کرده‌اند و داروهای سرکوبگر ایمنی مصرف می‌کنند و نسبت به آلودگی به این تک یاخته حساس می‌باشند لازم است در صورت ابتلا به کریپتوسپوریدیوم حتما درمان شوند و در صورت عدم درمان، اشکال شدید بیماری با احتمال مرگ بیمار مشاهده میشود. تشخیص این بیماری بویژه در درمانگاه‌های مراقبت و نگهداری از این افراد و بیمارستان‌های عفونی و تخصصی اطفال، جهت درمان سریع‌تر و یا ایزوله نمودن بیمار جهت قطع چرخه و جلوگیری از شیوع آن، ضروری می‌باشد لذا پیشنهاد می‌شود آزمایشگاه‌های اماکن مذکور جهت تشخیص کریپتوسپوریدیوم از روش مولکولی PCR استفاده کنند. اما با توجه به هزینه بالای روش-های مولکولی و گران بودن آزمایش PCR و در دسترس نبودن آن در آزمایشگاه‌های معمول، می‌توان از PPV کمتر روش رنگ آمیزی، نسبت به روش PCR چشم پوشی کرد. لذا انجام رنگ آمیزی ذیل نلسون اصلاح شده بر روی گسترش‌های حاصل از رسوب روش فرمالین- اتر، جهت تشخیص اووسیست‌های کریپتوسپوریدیوم در مدفوع، ضروری و مفید به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده استخراج شده است.در ابتدا از مرکز تحقیقات عفونی اطفال که هزینه این پژوهش را تامین نموده اند وسپس از مدیریت و کارکنان محترم گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین از مدیریت و کادر محترم بیمارستان‌های تخصصی اطفال شهید فهمیده، فوق تخصصی کودکان مفید، کودکان مبتلا به سرطان محک و مرکز طبی کودکان به ویژه پرسنل گرامی آزمایشگاه های بیمارستان های فوق که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

REFERENCES

1. Fayer R, Xiao L, Editors. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. New York. Clearance Center; 2007.
2. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proceeding of the Society for Experimental biology and Medicine, 1907; 5: 12-13.
3. Keshvarz A, Athari A, Haghighi A, Kazemi B, Abai A, Nazemolhoseini E, et al. Genetic characterization of Cryptosporidium spp. Among children with diarrhea in Tehran and Qazvin provinces, Iran. Iranian J Parasitol 2008; 3: 33-36.
4. Saneian H, Yaghini O, Modarresi MR. Infection rate of Cryptosporidium parvum among diarrheic children in Isfahan. Iran J Pediatr. 2010; 20: 343-47.
5. Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L, Millar BC, et al. Cryptosporidium. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 7-16.
6. Haghighi A, Keshavarz A, Taghipour N, Editors. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. 1st ed. Tehran: Shahid Beheshti Medical University, Parasitology Division; 2009. [In Persian]
7. Tizipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microb Infect 2002; 4: 1047-58.
8. Buret AG, Chin AC, Scott KGE. Infection of human and bovin epithelial cells with *C. andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junction 20-1: effect of epidermal growth factor. Jnt J Parasitol. 2003; 35: 1363-71.
9. Ramirez NE, Ward LA, Sreevastsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in human and animals. Microb Infect 2004; 6: 777-85.

10. Chen XM, Keithly, Paya CV. Cryptosporidiosis. N Engl J Med 2002; 346: 1723-31.

11. Unger BLP. Cryptosporidiosis in hunman (homo sapines). In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R. Editors. Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Rotan, FL: CRC Press; 1990.

12. Cox FEG. Cryptosporidiosis. Mc Donald V, Editor. Welcome Trust illustrated history of tropical disease. London, England: The Welcome Trust; 1996. P.256-63.

13. Neva F, Brown HW, Editors. Basic clinical parasitology. 6th ed. Norwalk, CT: Appleton and Lange; 1994.

14. Garcia LS, Brewer TC, Bruckner DA. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. Clin Microbiol J 1987; 25: 119-21.

15. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. Int J Parasitol 2000; 30: 1305-22.

16. Anonymous L. Cryptosporidium outbreak in British Colombia. Cryptosporidium Capsule 1996;1: 1-3.

17. Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of Cryptosporidium parvum using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J Parasitol 1997; 83: 825-30.

18. Morgan U, Thompson RCA. PCR Detection of Cryptosporidium. Parasitol Today 1998; 14: 241-45.

19. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, T hompson CA. Comparision of PCR and Microscopy for Detection of Cryptosporidium parvum in human fecal Specimens: Clinical Trial Microbiol 1998; 36: 995-98.

20. Wu Z, Nagana I, Matsuo A. specific PCR primers for Cryptosporidium parvum with extra high sensitivity: Mol Cell Probes 2000; 14: 33-39.

21. Xiao L, Morgan U M, Limor J, Escalamte A, Arrowood M, Shulaw W, et al. Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and related Cryptosporidium species. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3386-91.

22. Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. Parasitol Res 2008; 107: 1-7.

23. Zaidah AR, Chan YY, Siti Asma H, Shukri A, Nurhaslindawati A, Salleh M, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* in HIV-infected patients in Malaysia using a molecular approach. South ASI J Trop Med 2008; 39: 140-51.

24. Bialeka R, Bindera N, Dietzb K, Joachimc A, Knobloch J, Ulrike E, et al. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens Diagn Microbiol Inf Dis 2002; 43: 283-88.

25. Ziegler PE, Santucci F, Lindergard G, Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, et al. Evaluation of polymerase chain reaction diagnosis of Cryptosporidium spp in dairy cattle and wildlife. Vet Ther 2007; 8: 148-59.

26. Paul S, Chandra D, Tewari AK, Banerjee PS, Ray DD, Boral R. Comparative evaluation and economic assessment of coprological diagnostic methods and PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in bovines. Vet Parasitol 2009; 164: 295-91.