

Frequencies of Important Intestinal Coccidia and Microsporidium in Stool Samples

Abbas Shahbazi¹,
Shirzad Gholami²,
Nasrin Mirsamadi³,
Iran No'khahi⁴,
Ardavan Ghazanchaei⁴

¹ Tabriz Research Center of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received December 21, 2010 ; Accepted October 30, 2011)

Abstract

Background and purpose: Cryptosporidium, Cyclospora and Microsporidium are infectious agents bringing about concern about food products across the world. The current epidemiological evidence suggests that these pathogens can be of great risk to human health. Therefore, the present study was conducted to determine the frequency of the pathogens in people referred to the medical laboratories in Tabriz.

Materials and methods: A total of 1825 stool samples referred to the parasitology department of Tabriz medical laboratories were examined by direct wet file diagnoses, formalin-ether concentration, cold Kinyoun acid-fast and modified trichrome for detection of Cryptosporidium, Cyclospora and Microsporidium.

Results: No cases of the pathogens were diagnosed through direct diagnostic method, whereas using concentration method, 18 cases of infection were diagnosed among which 15 (83% of total positive cases) were Cryptosporidium and 3 (17% of total positive cases) were Microsporidium. On the other hand, among the 15 cases of Cryptosporidium, presence of parasite was confirmed by cold Kinyoun acid-fast method just in three cases. In modified trichrom method, Microsporidium was diagnosed just in one non-diarrheal sample. Overall, no case of infection with Cyclospora was observed using all the three methods.

Conclusion: Due to zoonotic nature of Cryptosporidium, the 0.16 percent frequency of this parasite in people referred to one medical diagnostic laboratory emphasizes the necessity of paying more attention to issues such as water and food health, public health education, and control of infection in cattle.

Key words: Cryptosporidium, cyclospora, microsporidium, Tabriz

فراوانی کوکسیدیاهای مهم روده ای و میکروسپورییدیوم در نمونه‌های مدفوع

عباس شهبازی^۱
شیرزاد غلامی^۲
نسرین میرصمدی^۳
ایران نوع خواهی^۴
اردوان قازانچایی^۴

چکیده

سابقه و هدف: کریپتوسپورییدیوم، سیکلوسپورا و میکروسپورییدیوم از جمله عوامل عفونی می‌باشند که بیشترین نگرانی را در فرآورده‌های غذایی در سراسر جهان ایجاد کرده‌اند. شواهد اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که این عوامل بیماری‌زا می‌توانند خطر بزرگی برای سلامت انسان باشند. به همین جهت مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی پاتوژن‌های مذکور در افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تبریز طراحی و به اجرا درآمد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۸۲۵ نمونه مدفوع از مراجعین به بخش انگل شناسی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تبریز با روش‌های مستقیم (گسترش مرطوب)، تغلیظ (فرمالین- اتر) و رنگ آمیزی اسید فست کاینون سرد و تری کروم اصلاح شده از لحاظ وجود کریپتوسپورییدیوم، سیکلوسپورا و میکروسپورییدیوم بررسی شدند.

یافته ها: با روش مشاهده مستقیم (گسترش مرطوب) هیچ موردی از آلودگی به کوکسیدیاهای روده‌ای تشخیص داده نشد. با روش تغلیظ ۱۸ مورد آلودگی تشخیص داده شد که ۱۵ مورد آن (۸۳ درصد کل موارد مثبت) کریپتوسپورییدیوم و ۳ مورد (۱۷ درصد موارد مثبت) میکروسپورییدیوم بودند. با روش اسید فست کاینون سرد برای تشخیص کریپتوسپورییدیوم تنها در سه نمونه از ۱۵ نمونه‌ای که با روش تغلیظ آلوده به کریپتوسپورییدیوم تشخیص داده شدند وجود انگل تأیید گردید. تنها در یک نمونه غیر اسهالی با روش تری کروم اصلاح شده میکروسپورییدیوم تشخیص داده شد. هیچ موردی از آلودگی به سیکلوسپورا با هر سه روش مشاهده مستقیم، تغلیظ و رنگ آمیزی مشاهده نگردید.

استنتاج: با توجه به زئونوز بودن کریپتوسپورییدیوم، فراوانی ۰/۱۶ درصدی تأیید شده به وسیله رنگ آمیزی این انگل در مراجعه کنندگان به یک آزمایشگاه تشخیص طبی مبین ضرورت توجه بیش از پیش به مقوله‌هایی همچون بهداشت آب و مواد غذایی، آموزش بهداشت عمومی و کنترل عفونت در دام است.

واژه‌های کلیدی: کریپتوسپورییدیوم، سیکلوسپورا، میکروسپورییدیوم، تبریز

مقدمه

در دهه‌های اخیر تک یاخته‌های انگلی دارای بیشترین ظرفیت ایجاد بیماری‌های منتقله از آب و غذا می‌باشند. کریپتوسپورییدیوم، سیکلوسپورا و میکروسپورییدیوم از جمله این انگل‌ها می‌باشند (۱).

مؤلف مسئول: اردوان قازانچایی- تبریز: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز E-mail: ghazanchaeia@tbzmed.ac.ir

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری تبریز، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱/۷ تاریخ تصویب: ۹۰/۸/۸

سرولوژی، روش های مولکولی مبتنی بر PCR (۱۵)، روش های رنگ آمیزی اسپور با روش های رنگ آمیزی اصلاح شده تری کروم (۲۰)، گیمسا (۲۱) و یا رنگ های فلورسنت می باشند. روش وبر یک روش رنگ آمیزی متداول در بسیاری از آزمایشگاه ها است (۲۲). سیکلوسپورا کایتانسیس^۳ تک یاخته پاتوژن انسانی است که سلول های اپیتلیال در قسمت های فوقانی روده باریک، عمدتاً ژژنوم را هدف قرار می دهد و عامل ناراحتی های گوارشی و تب خفیف است (۲۳). تعدادی اپیدمی بزرگ ناشی از مصرف غذای آلوده به این انگل گزارش شده است (۲۴). در بسیاری از کشورهای در حال توسعه انتقال این انگل با آب (۲۵)، خاک (۲۶) و سبزیجات و گیاهان نپخته (۲۷) گزارش شده است. احتمال می رود که انتقال بیشتر در مناطقی اتفاق می افتد که فاضلاب انسانی محصولات غذایی انسان را آلوده می کند (۲۸). مشاهده میکروسکوپی در نمونه تازه و رنگ آمیزی شده با رنگ کاینیون (۲۹) و مشاهده زیر اشعه ماوراء بنفش (۳۰) از جمله روش های تشخیص انگل در مدفوع می باشند. گزارشی در زمینه تأیید اپیدمی های کانونی با روش های مولکولی مبتنی بر PCR نیز منتشر شده است (۲۹).

در حال حاضر از روش های مولکولی که به مراتب هزینه بیشتری نسبت به روش های رایج مبتنی بر رنگ آمیزی دارند و انجام آن ها نیاز به تخصص، مهارت و تجهیزات بیشتری دارد به طور عمده برای بررسی های اپیدمیولوژیک و تعیین گونه های انگل ها و تنوع ژنتیکی ایزوله ها استفاده می شود (۳۱). لذا با توجه به فقدان اطلاعات دقیق و قابل تعمیم به جمعیت و اهمیت روز افزون این سه انگل در بروز بیماری های گوارشی، این مطالعه با هدف تعیین فراوانی این انگل ها با روش های تشخیصی رایج یعنی مشاهده لام مستقیم، رنگ آمیزی و روش تغلیظ طراحی و به اجرا در آمد.

کریپتوسپورییدیوم یک انگل کوکسیدیایی تک میزبان^۱ داخل سلولی و خارج سیتوپلاسمی است که یکی از مهم ترین عوامل بیماری زای منتقله از طریق آب است (۳،۲). این انگل عامل مهم اسهال آندمیک و اپیدمیک در سراسر دنیا به خصوص کودکان و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی است (۳-۵). گونه های کریپتوسپورییدیوم پاروم و کریپتوسپورییدیوم هومینیس شایع ترین گونه های هستند که انسان را آلوده می کنند. کریپتوسپورییدیوم پاروم به عنوان سومین یا چهارمین عامل شناخته شده مولد اسهال در انسان مطرح است (۶). کریپتوسپورییدیوزیس یکی از مهم ترین عفونت های فرصت طلب است (۷). روش های رایج برای تشخیص کریپتوسپورییدیوم شامل استفاده از روش های تغلیظ، رنگ آمیزی گسترش های تهیه شده از مدفوع و سرولوژی است (۸). از روش های مولکولی مبتنی بر PCR نظیر Nested PCR و PCR-RFLP نیز برای تشخیص انگل کریپتوسپورییدیوم استفاده شده است (۹-۱۳). رایج ترین روش رنگ آمیزی برای تشخیص کریپتوسپورییدیوم روش تغییر یافته کاینیون سرد است (۱۴).

میکروسپوریدها^۲ متعلق به شاخه میکروسپورا بوده جزء تک یاخته های اجباری داخل سلولی می باشند (۱۵). عفونت میکروسپوریدیا در میزبان در بیشتر موارد به صورت گوارشی است اما عامل عفونت می تواند در هر ارگانی وجود داشته باشد. به طور معمول انتقال عفونت از حیوان به انسان، انسان به انسان و از آب و غذا به انسان صورت می پذیرد (۱۶). میکروسپوریدیاها امروزه به عنوان یکی از عوامل عفونت زای فرصت طلب مطرح می باشند. انتروسایتوزون بینوزی و انسفالیتوزون اینتستینالیس موجب ایجاد اسهال های طولانی با دردهای شکمی و کاهش وزن در بیماران با نقص ایمنی می شوند (۱۷،۱۸). روش های تشخیص آزمایشگاهی این انگل شامل بیوپسی روده کوچک و رنگ آمیزی آن (۱۹)، روش های

3. Cyclospora cayetanensis

1. Monoxen
2. Microsporidia

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۱۸۲۵ نمونه مدفوع از مراجعین به بخش انگل شناسی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تبریز بررسی شدند. در مرحله نمونه‌گیری در هر روز ۴۰-۳۰ نمونه مدفوع از بین نمونه‌های دریافت شد و در یکی از یک آزمایشگاه تشخیص طبی، بلافاصله تشخیص مستقیم میکروسکوپی با محلول ید- لوگل صورت گرفت.

در مرحله تغلیظ جهت مشاهده اووسیست انگل یک گرم مدفوع در ۱۰ سی سی از محلول ۱۰ درصد فرمالین مخلوط گردید. سوسپانسیون از بین دو لایه گاز جراحی به داخل لوله سانتریفوژ عبور داده شد. ۳ سی سی اتر به لوله سانتریفوژ اضافه و تکان داده شد تا کاملاً مخلوط شوند، سپس سانتریفوژ گردید. پس از تخلیه محتویات لوله، رسوب ته لوله با لوگل مشاهده گردید (۸).

از رسوب حاصله در فرایند تغلیظ یک گسترش روی لام تهیه شد. سپس گسترش‌های تهیه شده در معرض هوا و در دمای اتاق خشک شده به روش اسید فست کاینیون سرد رنگ آمیزی شدند (۱۴). لام‌ها پس از رنگ آمیزی توسط میکروسکوپ و با عدسی روغنی بررسی شدند. در این روش زمینه لام به رنگ آبی دیده می‌شود و اووسیست‌ها به شکل اجسام مدور و به رنگ قرمز، حاوی اسپروزوئیت‌های هلالی شکل دیده می‌شوند.

برای رنگ آمیزی تری کروم اصلاح شده برای تشخیص میکروسپوریديوم از سوسپانسیون تهیه شده در فرمالین ۱۰ درصد، ۱۰ میکرولیتر بر روی لام قرار داده شد. پس از خشک شدن گسترش‌ها برای مدت ۵ دقیقه توسط متانول فیکس و خشک شدند. سپس به روش وبر رنگ آمیزی و با عدسی روغنی بررسی شدند (۳۲).

یافته ها

به‌طور کلی کوکسیدیایهای پاتوزن روده‌ای و میکروسپوریديایها امروزه به عنوان یکی از عوامل عفونت‌زای فرصت طلب هستند و به میزان بسیار کم در افراد

با ایمنی سالم مطرح می‌باشند (۳۳). آزمایش نمونه‌های مدفوع به وسیله میکروسکوپ نوری روش استاندارد برای تشخیص این میکروارگانیسم‌ها می‌باشند.

در این بررسی از مجموع ۱۸۲۵ نمونه مدفوع بررسی شده با روش مشاهده مستقیم، هیچ موردی از آلودگی به کوکسیدیایهای روده‌ای و میکروسپوریديوم تشخیص داده نشد. طی مرحله تغلیظ ۱۸ مورد مثبت تشخیص داده شد که ۱۵ مورد آن (۸۳ درصد کل موارد مثبت) کریتوسپوریديوم و ۳ مورد (۱۷ درصد موارد مثبت) میکروسپوریديوم بودند. پس از رنگ آمیزی نمونه‌ها برای تشخیص کریتوسپوریديوم تنها در سه نمونه از ۱۵ نمونه‌ای که با روش تغلیظ آلوده به کریتوسپوریديوم تشخیص داده شدند وجود انگل تأیید گردید. دو مورد از این موارد مثبت مذکور و یک مورد مؤنث بودند که همگی در گروه سنی زیر ۵ سال قرار داشتند. در ایران گزارشات متعددی مبنی بر وجود کریتوسپوریديوم در دام و انسان وجود دارد (۳۶-۳۴). در بررسی که در استان مازندران بر روی ۱۴۲ نمونه مدفوع با روش‌های گسترش مرطوب، تغلیظ و ذیل نلسون اصلاح شده انجام گردید در ۹/۴ درصد افراد HIV+ و ۲/۵ درصد افراد HIV-، انگل کریتوسپوریديوم مشاهده گردید. هیچ موردی از میکروسپوریديا و یا سیکلوسپورا در مطالعه مذکور گزارش نشد (۳۷). در بررسی دیگر، نمونه مدفوع ۳۶۲ کودک دچار معلولیت ذهنی با روش‌های مذکور آزمایش گردید که هیچ موردی از کریتوسپوریديوم مشاهده نشد (۳۸). با بررسی که بر روی نمونه مدفوع ۶۱۶ کودک کمتر از ۳ سال روستایی و شهری با یا بدون اسهال در کرمانشاه انجام شد در ۱۰/۴ درصد موارد کریتوسپوریديوم مشاهده گردید و شیوع این انگل بین کودکان روستایی حدود دو برابر کودکان شهری و در کودکان دارای اسهال حدود سه برابر موارد بدون اسهال گزارش گردید (۳۹). نتایج متفاوتی از مطالعات انجام شده در کشور در زمینه فراوانی کریتوسپوریديوم

دومین مورد نیز در یک بیمار مبتلا به اسهال به روش مشاهده گسترش مرطوب، رنگ آمیزی و کشت مدفوع در محیط دی کرومات پتاسیم گزارش شد که در هیچ کدام از این موارد تشخیص انگل با روش مولکولی تأیید نگردید (۴۶). در مطالعه دیگر در کشورمان ۴۲۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال در مدت سه سال با روش های مشاهده گسترش مرطوب و رنگ آمیزی از نظر وجود انگل سیکلوسپورا بررسی شد که هیچ موردی از این انگل شناسایی نگردید (۴۷). در بررسی حاضر نیز همچون بسیاری از مطالعات انجام شده هیچ موردی از سیکلوسپورا دیده نشد و در این زمینه فراوانی میکروسپورییدیوم و سیکلوسپورا در جامعه (نه در گروه های جمعیتی خاص همچون HIV+ و یا دریافت کنندگان عضو پیوندی با ایمنی سرکوب شده) بسیار ناچیز و در حد صفر مشاهده گردید (۳۳، ۴۲-۴۰) که البته با توجه به ماهیت این عوامل عفونی این دستاورد قابل پیش بینی بود. با توجه به زئونوز بودن کریپتوسپورییدیوم، فراوانی ۰/۱۶ درصدی این انگل در مراجعه کنندگان به آزمایشگاه های تشخیص طبی مبین ضرورت توجه بیش از پیش به مقوله هایی همچون بهداشت آب و مواد غذایی، آموزش بهداشت عمومی و کنترل عفونت در دام است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری تبریز انجام شده است.

گزارش شده است که البته جمعیت هدف در اغلب موارد گروه سنی کودکان بودند. فراوانی بسیار کمتر کریپتوسپورییدیوم و میکروسپورییدیوم در بررسی حاضر می تواند به این دلیل باشد که جمعیت هدف در مطالعه حاضر به طور اختصاصی افراد دچار نقص سیستم ایمنی و یا HIV+ نبودند. چنین وضعیتی در مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورها نیز مشاهده می شود (۴۲-۴۰).

کروموتروپ 2R از جمله روش های رایج هر چند طولانی، برای تشخیص میکروسکوپی میکروسپورییدیازیس روده ای است که به روش گیمسا ترجیح داده می شود (۴۴، ۴۳). در بررسی حاضر نیز از روش رنگ آمیزی تری کروم اصلاح شده برای تشخیص میکروسپورییدیوم استفاده شد. البته تفکیک گونه های میکروسپورییدیوم از یکدیگر با این روش امکان پذیر نیست و باید از روش های مولکولی استفاده کرد (۳۱) که این مقاصد جزء اهداف این مطالعه نبودند. با استفاده از روش های مولکولی، اتروسایتوزون بینوزی و انسفالیتوزون اینتستینالیس، به عنوان عوامل میکروسپورییدیوزیس گوارشی شناخته شده اند (۴۵).

تنها یک نمونه غیر اسهالی از مجموع ۱۸۲۵ گسترش مدفوع رنگ آمیزی شده به روش تری کروم اصلاح شده متعلق به یک دختر ۹ ساله حاوی میکروسپورییدیوم تشخیص داده شد که البته جزو سه نمونه مثبت تشخیص داده شده به روش تغلیظ نبود.

اولین مورد سیکلوسپوریازیس در ایران در سال ۱۳۷۵ در یک بیمار مبتلا به ایدز گزارش گردید و

References

1. Dawson D. Food borne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* 2005; 103(2): 207-227.
2. Mosier DA, Oberst RD. Cryptosporidiosis a global challenge. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 102-111.
3. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(3): 325-358.
4. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002; 4(10): 1047-1058.
5. Fayer R. Cryptosporidium: A water-born zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004; 126(1-2): 37-56.

6. Griffiths JK. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. *Adv Parasitol* 1998; 40: 37-85.
7. Flanigan TP, Whalen C, Turner J, Soave R, Toerner J, Havlir D, et al. Cryptosporidium infection and CD4 counts. *Ann Intern Med* 1992; 116(10): 840-842.
8. Berenji F, Zabolinezhad N, HRiradfar S, Kianifar HR, Badii Z, Banihashem SAA. Cryptosporidium infection in pediatric patients with lymphohematopoietic mphohematopoietic malignancies. *Iranian J Pediat* 2007; 17(3): 247-251.
9. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of Cryptosporidium and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43(3): 1017-1023.
10. Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, Silva JR. Detection of Cryptosporidium parvum DNA in Human Feces by Nested PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34(7): 1769-1772.
11. Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization of Cryptosporidium species from humans in Spain. *Parasitol Int* 2007; 56(3): 201-205.
12. Arauho AJ, Kanamura HY, Almeida ME, Gomes AH, Pinto TH, DA Silva AJ. Genotypic Identification of Cryptosporidium SPP. Isolated from HIV-infected patients and Immunocompetent children of SÃO Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2008; 50(3): 139-143.
13. Joan M. Shields and Betty H. Olson. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method for Detection of Cyclospora cayetanensis in Environmental Waters without Microscopic Confirmation. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(8): 4662-4669.
14. Gharagozlou M. A review of Cryptosporidiosis and its laboratory diagnoses. *Journal of Veterinary* 1997; 52(1): 1-12 (Persian).
15. Franzen C, Müller A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 243-285.
16. Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia Enterocytozoon bienersi, Encephalitozoon intestinalis, and Vittaforma corneae in water. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9): 3332-3335.
17. Chu P, West AB. Encephalitozoon (Septata) intestinalis. Cytologic, histologic, and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. *Am J Clin Pathol* 1996; 106(5): 606-614.
18. Franzen C, Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 2001; 3(5): 389-400.
19. Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann Intern Med* 1993; 119: 895-899.
20. Field AS, Hing MC, Milliken ST, Marriott DJ. Microsporidia in the small intestine of HIV-infected patients. A new diagnostic technique and a new species. *Med J Aust* 1993; 158(6): 390-394.
21. van Gool T, Hollister WS, Schattenkerk WE, Van den Bergh Weerman MA, Terpstra WJ, van Ketel RJ, et al. Diagnosis of Enterocytozoon bienersi microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet* 1990; 336(8716): 697-698.

22. Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(Issue 6): 547-554.
23. Connor BA, Reidy J, Soave R. Cyclosporiasis: clinical and histopathologic correlates. *Clin Infect Dis* 1999; 28(6): 1216-1222.
24. Herwaldt BL. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4): 1040-1057.
25. Sturbaum GD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR, Cabrera L, Klein DA. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(6): 2284-2286.
26. Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, de Mejia MA, de Merida AM, et al. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(6): 766-774.
27. Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Hyg* 1997; 57(6):683-686.
28. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect* 1999; 122(2): 305-315.
29. Mundaca CC, Torres-Slimming PA, Araujo-Castillo RV, Morán M, Bacon DJ, Ortega Y, et al. Use of PCR to improve diagnostic yield in an outbreak of cyclosporiasis in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(7): 712-717.
30. Edrisian GH, Rezaeian M, Ghorbani M, Keshavarz H, Mohebbali M. *Medical Protozoology*. 1st ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2007. p 175-176 (Persian).
31. Fotouhi Ardakani R, Fasihi Harandi M, Soleyman Banai S, Kamyabi H, Atapour M, Sharifi I. Epidemiology of *Cryptosporidium* Infection of Cattle in Kerman/Iran and Molecular Genotyping of some Isolates. *J Kerman Univ Med Sci* 2008; 15(4): 313-320.
32. Abreu-Acosta N, Lorenzo-Morales J, Leal-Guio Y, Coronado-Alvarez N, Foronda P, Alcoba-Florez J, et al. Enterocytozoon bienuesi (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(11): 848-855.
33. Zali J, Jafari Mehr A, Rezaian M, Meamar AR, Vaziri S, Mohraz M. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-Positive Individuals in Iran. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57(6): 268-270.
34. Nouri M, Mahdavi Rad S. Effect of nomadic shepherds and their sheep on the incidence of cryptosporidiosis in an adjacent town. *J Infect* 1993; 26(1): 105-106.
35. Fasihi Harandi M, Fotouhi Ardakani R. *Cryptosporidium* infection of farm animals: first identification of *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium parvum* in Iran. 11th International Congress of Parasitology; 2006 Aug 6-11, Glasgow, Scotland.
36. Meamar AR, Guyot K, Certad G, Dei-Cas E, Mohraz M, Mohebbali M, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(3): 1033-1035.
37. Daryani A, Sharif M, Meigouni M, Mahmoudi FB, Rafiei A, Gholami Sh, et al. Prevalence

- of intestinal parasites and profile of CD4+ counts in HIV+/AIDS people in north of Iran, 2007-2008. *Pak J Biol Sci* 2009; 12(18): 1277-1281.
38. Sharif M, Daryani A, Asgarian F, Nasrolahei M. Intestinal parasitic infections among intellectual disability children in rehabilitation centers of northern Iran. *Res Dev Disabil* 2010; 31(4): 924-928.
 39. Moghaddam AA. Symptomatic and asymptomatic cryptosporidiosis in young children in Iran. *Infect Dev Ctries* 2010; 4(5): 309-317.
 40. Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *Pak J Biol Sci* 2007; 10(7): 1108-1112.
 41. Gassama A, Thiaw B, Dia NM, Fall F, Camara P, Hovette P, et al. Infective etiology of diarrhea in adults with HIV infection in Dakar: a case-control study on 594 patients. *Dakar Med* 2001; 46(1): 46-50 (French).
 42. Al-Megrin WAI. Intestinal Parasites among Immunocompromised Patients in Riyadh, Saudi Arabia. *Pak J Biol Sci* 2010; 13(8): 390-394.
 43. Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. Detection of Microsporidia in Travelers with Diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1630-1632.
 44. Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes R, Weber R, Loscher T, Rinder H. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Light Microscopy for Detection of Microsporidia in Clinical Specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(1): 7-10.
 45. Orenstein JM, Benator D, Kotler DP. Microsporidia and HIV-related diarrhea. *Ann Intern Med* 1994; 120: 973-974.
 46. Rezaeian M, Houshyar H. A case report of human infection with *Cyclospora cayentanensis*. *Hakim* 2000; 3(1): 39-44.
 47. Nikmanesh B, Ourmazdi H, Akhlaghi C, Haghi C, Ashtiani MT, Ghalavand Z. An investigation in to *Cyclospora* infection in children with diarrhea referred to Tehran Children Medical Centre, 2002-2003. *J Iran Univ Med Sci* 2006; 12(49): 165-171.