مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸٤/هفته‌ی چهارم تیر ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۸

بررسی حساسیت و ویژگی روش تشخیصی Dot blot در تشخیص عفونت Cryptosporidium

فرزاد صالحی[۱]، رسول جعفری[۲]، سیده مریم شرفی[۳]، حسینعلی یوسفی[۴]، نادر پسته‌چیان[۵]، حسین یوسفی دارانی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Cryptosporidiosis یکی از علل مهم اسهال در انسان و حیوانات می‌باشد. تشخیص این بیماری، بر پایه‌ی استفاده از روش‌های میکروسکوپی با حساسیت پایین است. هدف از انجام این مطالعه، استفاده از روش Dot blot جهت شناسایی انگل بود.

روش‌ها: ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های شیرخوار جمع‌آوری شد و با استفاده از روش فرمالین اتر، روی آن‌ها تغلیظ انجام گرفت. سپس، نمونه‌ها به روش Ziehl-Neelsen اصلاح شده، رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت، کل نمونه‌ها به روش Dot blot مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: اواوسیست گونه‌های Cryptosporidium، در ۴۰ (۳۰/۵ درصد) نمونه از ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen تشخیص داده شدند، اما ۴۹ (۳۷/۴ درصد) نمونه از نمونه‌ها با استفاده از روش Dot blot از نظر آنتی‌ژن Cryptosporidium مثبت بود حساسیت روش Dot blot حدود ۸۷ درصد و ویژگی آن حدود ۸۶ درصد برآورد گردید.

نتیجه‌گیری: روش Dot blot، عملکردی به نسبت مناسب در تشخیص آلودگی Cryptosporidium دارد.

واژگان کلیدی: Cryptosporidium، Ziehl-Neelsen، Dot blot، تشخیص آنتی‌ژن، حساسیت، ویژگی

ارجاع: صالحی فرزاد، جعفری رسول، شرفی سیده مریم، یوسفی حسینعلی، پسته‌چیان نادر، یوسفی دارانی حسین. **بررسی حساسیت و ویژگی روش تشخیصی Dot blot در تشخیص عفونت Cryptosporidium.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۴): ۵۹۳-۵۸۹

مقدمه

Cryptosporidium، یک انگل کوکسیدیائی و عامل اسهال در انسان و حیوانات است. اسهال، به طور عمده خود محدود شونده است و طی روزها و هفته‌ها بهبود می‌یابد، اما در افراد با نقص ایمنی، بیماری شدید و تهدید کننده‌ی زندگی است. شیوع عفونت با این انگل در سراسر جهان گزارش شده است (۴-۱). درمان این بیماری چالش برانگیز است و داروهای مورد استفاده تا حدی بار عفونت را کاهش می‌دهند (۵). تشخیص انگل به طور معمول بر پایه‌ی روش‌های میکروسکوپی مانند روش‌های رنگ‌آمیزی و روش فلورسنت است. روش‌های مولکولار و تشخیص آنتی‌ژن در مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود. در این میان، روش‌های میکروسکوپی مهم هستند؛ چرا که مقرون به صرفه هستند و به طور گسترده برای مقاصد تشخیصی استفاده می‌شوند، اما حساسیت آن‌ها پایین است (۶، ۱). در روش رنگ‌آمیزی با Ziehl-Neelsen، ممکن است برخی از افراد آلوده، منفی گزارش شوند، اما روش‌های فلورسنت و روش‌های تشخیص آنتی‌ژن، حساسیت بالاتری دارند (۷-۶، ۱).

در حال حاضر، روش‌های تشخیصی با دقت بالاتر مانند ایمونوکروماتوگرافی، در دسترس است که حساسیت آن‌ها ۱۰۰-۷۰ درصد گزارش شده است (۱). روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) جهت تشخیص

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- مربی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: حسین یوسفی دارانی
Email: yousofidarani@gmail.com

عفونت که دقت آن قابل قبول گزارش شده است. بر اساس متون منتشر شده، روش ELISA حساسیت و اختصاصیت بالاتری در مقایسه با روش‌های میکروسکوپی معمول دارند، اما هزینه‌ی این روش‌ها بیشتر از روش‌های میکروسکوپی است (۷-۶).

در مجموع، در تشخیص آلودگی Cryptosporidium، انجام روش‌های میکروسکوپی، ضمن حساسیت پایین، به افراد ماهری نیز نیاز دارد. در مقابل، روش‌های مولکولی دارای حساسیت مناسب است، اما انجام آن وقت‌گیر و پر هزینه است. از این رو، دستیابی به روشی ساده و با حساسیت بالا برای تشخیص این آلودگی از اهمیت زیادی برخوردار است. روش Dot blot، یک روش ساده‌ی ایمنولوژیک است که می‌تواند در مناطق روستایی بدون تجهیزات خاص قابل انجام باشد. تا کنون، از روش Dot blot جهت تشخیص و شناسایی عفونت Cryptosporidium استفاده نشده است. هدف از انجام این مطالعه، تشخیص آنتی‌ژن مدفوعی با استفاده از روش Dot blot جهت تشخیص آلودگی Cryptosporidium و تعیین حساسیت و ویژگی آن در مقایسه با روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی، ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های شیرخوار از ۵ گاوداری در حومه‌ی شهر اصفهان در طول بهار و تابستان ۱۳۹۳، به طور مستقیم از رکتوم جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده، در اسرع وقت به دو بخش تقسیم شدند. یک بخش جهت فرمالین اتر و رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفت و بخش دوم، جهت انجام روش Dot blot بدون هیچ ماده‌ی نگه دارنده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شد.

روش رنگ‌آمیزی: از مواد تغلیظ شده‌ی حاصل از روش فرمالین اتر، گسترش نازک میکروسکوپی تهیه شد. پس از تثبیت با متانول مطلق، با استفاده روش Ziehl-Neelsen رنگ‌آمیزی انجام شد (۸). در روش Ziehl-Neelsen، اواوسیست‌ها به صورت اشیای کروی، مایل به قرمز مشاهده شدند. این اواوسیست‌ها، حدود ۵ میکرون قطر دارند (۸).

روش Dot blot

آماده‌سازی اواوسیست‌ها: برخی از نمونه‌های به شدت آلوده، برای تخلیص اواوسیست‌ها انتخاب شدند. برای تخلیص، از روش گرادیان سوکروز ناپیوسته استفاده شد. برای این هدف، محلول سوکروز در دو رقت با وزن مخصوص ۱/۱۰۳ و ۱/۰۶۴ آماده شد (۹). دو محلول سوکروز با وزن مخصوص مختلف لایه لایه در لوله‌ی سانتریفیوژ پلی‌پروپیلنی روی هم اضافه شدند. سپس ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی مدفوع دارای دی‌کرومات پتاسیم در بالا به آن‌ها اضافه شد. لوله‌ها با شتاب ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، مرز بالایی و میانی و پایین‌تر از لایه‌های سوکروز توسط سرنگ جدا شدند. مرزهای جدا شده برای بار دوم همانند مرتبه‌ی اول آزمایش شدند و برای حضور اواوسیست مورد بررسی قرار گرفتند. سپس، اواوسیست‌های تخلیص شده در دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد نگهداری شدند.

تهیه‌ی آنتی‌بادی ضد انگل: اواوسیست‌های خالص شده با سرم فیزیولوژی استریل شسته شد و پس از سونیکه شدن، به عنوان آنتی‌ژن خام در سالین در فریزر نگهداری شدند. به منظور بالا بردن آنتی‌سرم ضد انگل، آنتی‌ژن خام با حجم برابر از ادجوانت مخلوط گردید و به یک خرگوش به صورت زیر جلدی تزریق شد. چهار آنتی‌ژن یادآور هر دو هفته یک‌بار به حیوان تزریق شدند. ادجوانت فروند کامل برای تزریق اول و ادجوانت ناقص برای یادآور مورد استفاده قرار گرفت. یک هفته پس از یادآور چهارم، نمونه‌ی خون از خرگوش گرفته شد و سرم از نظر آنتی‌بادی ضد انگل به روش ELISA، مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). پس از اطمینان از ایجاد آنتی‌بادی، آخرین یادآور هم به خرگوش تزریق شد. پس از یک هفته، از خرگوش خون‌گیری صورت گرفت و سرم آن در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور شناسایی آنتی‌ژن مدفوع به روش Dot blot، یک قطره از آنتی‌ژن یا مدفوع مایع بر روی کاغذ نیترو سلولز (Biorad) قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، بلات به طور کامل با بافر Phosphate buffered saline (PBS) حاوی توئین بیست شستشو داده شد. سپس، از آنتی‌بادی ضد انگل ایجاد شده در خرگوش، روی آنتی‌ژن اضافه شد و برای مدت یک ساعت در حالت حرکت (روی شیکر) باقی ماند. آن گاه، بلات با بافر شستشو داده شد. پس از آن، آنتی‌بادی ثانویه، Immunoglobulin G (IgG) ضد خرگوش، اضافه شد و به مدت یک ساعت در حال حرکت (روی Shaker) باقی ماند. باز هم بلات با بافر شسته شد و در نهایت سوبسترای مناسب اضافه گردید. ظهور نقطه‌ی بنفش روی نمونه‌ها با آنتی‌ژن به عنوان نتیجه‌ی مثبت در نظر گرفته شد. در روش Dot blot برای شاهد مثبت و منفی به جای نمونه‌ی مدفوع به ترتیب از آنتی‌ژن Cryptosporidium و سرم فیزیولوژی استفاده شد.

محاسبه‌ی حساسیت و ویژگی Dot blot: روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد و از فرمول زیر برای محاسبه‌ی حساسیت و ویژگی روش Dot blot استفاده شد. حساسیت عبارت از موارد مثبت حقیقی بخش بر موارد منفی کاذب به اضافه‌ی مثبت حقیقی و ویژگی، عبارت از موارد منفی

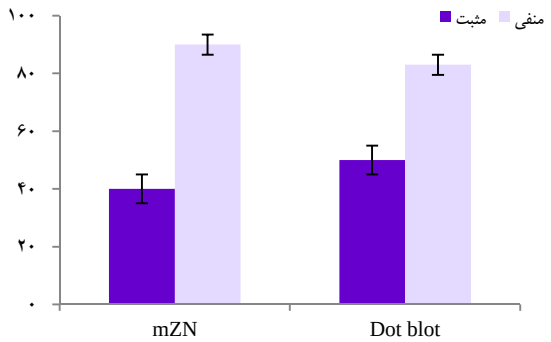
حقیقی بخش بر موارد منفی حقیقی به اضافه‌ی موارد مثبت کاذب می‌باشد.

واکاوی داده‌ها: داده‌های مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶.۲(version 16.2, SPSS Inc., Chicago, IL) از طریق آزمون Mc–Nemar انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های شیرخوار از نظر وجود اواوسیست Cryptosporidium مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی دوم، از روش تشخیص ایمنی Dot blot برای تشخیص عفونت Cryptosporidium در نمونه‌ی مدفوع استفاده شد. در نهایت هم حساسیت و ویژگی روش Dot blot محاسبه گردید.

اواوسیست گونه‌های Cryptosporidium، در ۴۰ نمونه از ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen تشخیص داده شدند، اما ۴۹ نمونه از نمونه‌ها با استفاده از روش Dot blot از نظر آنتی‌ژن Cryptosporidium مثبت بود (شکل ۱). بنا بر این، ۳۰/۵ درصد نمونه‌ها به روش Ziehl-Neelsen و ۳۷/۴ درصد آن‌ها به روش Dot blot از نظر آلودگی Cryptosporidium مثبت بودند. با استفاده از آزمون Mc–Nemar تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از دو روش استفاده شده مشاهده نشد؛ به گونه‌ای که در ۱۳۱ گوساله‌ی شیرخوار، آلودگی با Cryptosporidium با استفاده از روش Ziehl-Neelsen در ۴۰ مورد مثبت و در ۹۱ مورد منفی بود و در روش Dot blot ۴۹ مورد مثبت و ۸۲ مورد منفی بود. در مجموع، ۶ مورد منفی کاذب و ۱۵ مورد مثبت کاذب به دست آمد. حساسیت و ویژگی روش Dot blot با روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen به عنوان استاندارد طلایی، به ترتیب ۸۷ درصد و ۸۶ درصد برآورد گردید.



شکل ۱. تعداد موارد مثبت و منفی آلودگی Cryptosporidium در ۱۳۱ نمونه‌ی مدفوع گوساله‌های شهر اصفهان به دو روش رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen (mZN) و Dot blot در سال ۱۳۹۳

بحث

Cryptosporidium، یکی از علل اسهال در انسان و حیوانات در سراسر جهان است که با خوردن اواوسیست‌های رها شده در مدفوع، از افراد و یا حیوانات آلوده ایجاد می‌شود. انتقال آن از انسان به انسان، حیوان به انسان و حیوان به حیوان است و از طریق خوردن غذا، آب آلوده و تماس با سطوح آلوده صورت می‌گیرد. به دلیل این که اسهال یک بیماری خود محدود شونده است، گاهی تشخیص داده نمی‌شود (۱۱). این تک‌یاخته، دارای مقاومت بالای محیطی نسبت به مواد شیمیایی خطرناک است و تکثیر آن در آزمایشگاه مشکل است. این خصوصیات، مطالعه‌ی آن را از بین ارگانیسم‌ها محدود می‌سازد (۱۱).

هیچ درمان شیمیایی مؤثری برای درمان اسهال در افراد بالغ و حیوانات وجود ندارد (۱۱). شیوع عفونت Cryptosporidium در گوساله‌ها نسبت به انسان بالاتر است (۱۲). بنا بر این، تهیه‌ی نمونه از دام‌ها برای ارزیابی روش‌های تشخیصی جدید آسان خواهد بود. در مطالعه‌ی حاضر، نمونه‌ی مدفوع از گوساله‌های شیرخوار گاوداری‌های حومه‌ی شهرستان اصفهان جمع‌آوری شد. برای تشخیص آنتی‌ژن Cryptosporidium، از روش Dot blot در کنار روش Ziehl-Neelsen استفاده گردید و به طور کلی، این روش دارای کارایی مناسب تشخیص داده شد. با استفاده از روش میکروسکوپی میزان عفونت (۳۰/۵ درصد) برآورد گردید، اما روش Dot blot، میزان عفونت را کمی بالاتر (۳۷/۴ درصد) نشان داد. با توجه به روش میکروسکوپی به عنوان استاندارد طلایی حساسیت ۸۷ درصد و ویژگی ۸۶ درصد برای روش Dot blot برآورد گردید.

از مهم‌ترین مشکلات روش رنگ‌آمیزی سنتی نیاز به تکنسین با تجربه و رنگ‌آمیزی خوب است، اما این روش، به تجهیزات پیچیده نیاز ندارد و مقرون به صرفه است. نشان داده شده است که روش آنزیم ایمونو اسی (EIA یا Enzyme immunoassay) حساسیت بیشتری در مقایسه با روش‌های انگل‌شناسی دارد (۸).

در یک مطالعه، Rosenblatt و Sloan حساسیت ۹۳ درصد و ویژگی ۹۹ درصد را برای تشخیص عفونت در انسان با روش ELISA گزارش نمودند (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر، از روش EIA با پایه‌ی Dot blot استفاده شد که روشی آسان برای انجام و کم هزینه‌تر از ELISA است و تجهیزات مورد استفاده در آن، وسایل بسیار معمول است که در هر آزمایشگاه تشخیصی وجود دارد.

Khurana و همکاران، از روش‌های رنگ‌آمیزی Ziehl-Neelsen و اورامین فنل، ELISA و Polymerase chain reaction (PCR) برای تشخیص عفونت در انسان استفاده کردند. در این مطالعه، حساسیت و ویژگی روش ELISA به ترتیب ۹۵/۳۵ درصد و

۱۰۰ درصد گزارش گردید (۱۴). در نتایج مطالعه‌ی حاضر، اختلاف معنی‌داری بین دو روش میکروسکوپی و Dot blot مشاهده نگردید. با این حال، حساسیت و ویژگی روش Dot blot برای تشخیص انگل در گوساله‌ی مناسب برآورد گردید. در نهایت، مطالعات بیشتر در مورد روش تشخیصی Dot blot در مقایسه با استانداردهای طلایی با حساسیت و ویژگی بالاتر مانند روش PCR به منظور تعیین حساسیت دقیق مورد نیاز است و لازم است کار بیشتری برای بهبود آزمون Dot blot به عنوان روش تشخیصی برای شناسایی عفونت Cryptosporidium در نمونه‌های انسانی صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری نهایی این که عملکرد روش Dot blot، به نسبت برابر روش رنگ آمیزی Ziehl-Neelsen است و با بهبود بیشتر این روش، می‌توان از آن برای اهداف تشخیصی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد فرزاد صالحی مصوب شورای پژوهشی با شناسه‌ی ۳۹۳۳۷۰ می‌باشد که هزینه‌ی اجرای آن، توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردیده است.

References

1. Checkley W, White AC, Jr., Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. Lancet Infect Dis 2015; 15(1): 85-94.
2. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med 1994; 331(3): 161-7.
3. Ryan U, Hijjawi N. New developments in Cryptosporidium research. Int J Parasitol 2015; 45(6): 367-73.
4. Willocks L, Crampin A, Milne L, Seng C, Susman M, Gair R, et al. A large outbreak of cryptosporidiosis associated with a public water supply from a deep chalk borehole. Outbreak Investigation Team. Commun Dis Public Health 1998; 1(4): 239-43.
5. Abd-Ella OH. Diagnosis and treatment of cryptosporidiosis: an update review. J Egypt Soc Parasitol 2014; 44(2): 455-66.
6. Jafari R, Maghsood AH, Safari M, Latifi M, Fallah M. Comparison of fecal antigen detection using enzyme linked immunosorbent assay with the auramine phenol staining method for diagnosis of human cryptosporidiosis. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(2): e16470.
7. Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, Dettori G, Chezzi C. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of Cryptosporidium spp. in a low-prevalence setting. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(1): 72-7.
8. Fayer R, Xiao L. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. 2nd ed. Boca Raton, FL:CRC Press; 2007.
9. Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of Cryptosporidium oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. J Parasitol 1987; 73(2): 314-9.
10. Darani HY, Doenhoff MJ. Anomalous immunogenic properties of serine proteases. Scand J Immunol 2009; 70(4): 384-8.
11. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect 2004; 6(8): 773-85.
12. Jafari R, Maghsood AH, Fallah M. Prevalence of Cryptosporidium infection among livestock and humans in contact with livestock in Hamadan district, Iran, 2012. J Res Health Sci 2013; 13(1): 86-9.
13. Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Cryptosporidium spp. in stool specimens. J Clin Microbiol 1993; 31(6): 1468-71.
14. Khurana S, Sharma P, Sharma A, Malla N. Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. Trop Parasitol 2012; 2(1): 20-3.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 384, 4th Week, July 2016

Received: 03.04.2016

Accepted: 07.06.2016

Sensitivity and Specificity of Dot Blot Method for Diagnosis of Cryptosporidium Infection

Farzad Salehi[1], Rasool Jafari[2], Seyedeh Maryam Sharafi[3], Hoseinali Yousefi[4], Nader Pestehchian[5], Hosein Yousefi-Darani[6]

Original Article

Abstract

Background: Diagnosis of cryptosporidiosis is based on the use of the routine microscopic methods, but these methods possess poor sensitivity and also need an expert technician. The aim of the present study was to determine sensitivity and specificity of dot blot method for diagnosis of bovine cryptosporidiosis.

Methods: In this study 131 fecal samples were collected from suckling calves during summer 2014. The collected samples were concentrated using formalin ether method. The samples were then examined by modified-Ziehl-Neelsen (mZN) and finally all samples were examined by dot blot methods.

Findings: Oocysts of Cryptosporidium spp. were found in 40 (30.5%) out of 131 fecal samples using mZN staining method but 49 (37.4%) of the samples were positive for Cryptosporidium antigen using dot blot method. No significant differences were observed among the results of the two methods and the sensitivity and specificity of dot blot calculated as 87% and 86%, respectively.

Conclusion: Based on the results of the present study, dot blot method showed rather equal performance as modified-Ziehl-Neelsen method.

Keywords: Cryptosporidium, Modified-Ziehl-Neelsen, Dot blot, Antigen detection, Sensitivity, Specificity

Citation: Salehi F, Jafari R, Sharafi SM, Yousefi H, Pestehchian N, Yousefi-Darani H. **Sensitivity and Specificity of Dot Blot Method for Diagnosis of Cryptosporidium Infection.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(384): 589-93.

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Student, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Instructor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Ira
Corresponding Author: Hosein Yousefi-Darani, Email: yousofidarani@gmail.com