تحقیقی

فراوانی دی آنتامبا فراژیلیس با استفاده از دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن وNested-PCR در مراجعین به مراکز درمانی چالوس

شهره علیزاده شرق
عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی

اردوان قازانچائی
کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، گروه انگل شناسی

علی اصغر آیت الهی
عضو هیئت علمی گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

ابولفضل خندان دل
آزمایشگاه بیمارستان 5 آذر گرگان،علوم پزشکی گلستان

بهروز پوراصغری
کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه مرکز آموزشی درمانی و تحقیقاتی امام رضا(ع)، تبریز

رسول استخری
دانشیار پاتولوژی (آناتومیکال و کلینیکال)، آزمایشگاه مرکز آموزشی درمانی و تحقیقاتی امام رضا(ع)، تبریز

نویسنده مسئول: شهره علیزاده شرق

تلفن : 0191-2226601

پست الکترونیک:
shohrehshargh@gmail.com

آدرس : استان مازندران، چالوس دانشگاه علوم پزشکی چالوس، دانشکده پیراپزشکی

وصول مقاله: 90/1/30
اصلاح نهایی: 90/5/15
پذیرش مقاله:90/5/23

www.SID.ir

چکیده

زمینه و هدف: *دی آنتامبا فراژیلیس تک یاخته روده بزرگ در پاره ای از موارد سبب تظاهرات بالینی در افراد آلوده می شود که شامل درد موضعی شکم،کاهش وزن،نفخ و بی اشتهائی می باشد. تشخیص صحیح این آلودگی و افتراق آن با سایر تک یاخته های انگلی حائز اهمیت است. مطالعه حاضر به منظور تعیین فراوانی این انگل در مراجعین به آزمایشگاههای شهر چالوس در سال 1389 با استفاده از دو روش PCR و رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن انجام شده است.*

روش بررسی: *مطالعه از نوع مقطعی و نمونه گیری تصادفی روی 302 نمونه مدفوع همزمان با اخذ پرسشنامه از بیماران بوده است. نمونه ها پس از بررسی سریع لام مرطوب، در دو لوله حاوی پلی وینیل الکل (رنگ آمیزی) و الکل اتانل (آزمایشهای مولکولی) به آزمایشگاه مرجع ارسال گردید. بررسی همزمان نمونه های مدفوعی با روش استاندارد هماتوکسیلین آهن و روش مولکولی Nested-PCR و مقایسه حساسیت و ویژگی دو روش با یکدیگر انجام شد.*

یافته‌ها: *در بررسی نمونه ها با روش هماتوکسیلین آهن 6(1/99%) نمونه مثبت قطعی شناسائی شد که در آزمون با روش مولکولی 5 نمونه از آنها مثبت بود. کلیه نمونه های منفی با روش رنگ آمیزی در روش مولکولی نیز منفی بوده است. آلودگی توام دی آنتامبا فراژیلیس با آنتامبا کلی در 2 مورد و با بلاستوسیستیس هومونیس در 1 مورد مشاهده گردید. حساسیت و ویژگی PCR به نسبت روش هماتوکسیلین به ترتیب 85 % و 100 % می باشد.*

نتیجه گیری *علت تفاوت در تطابق نتایج خطاهای چشمی با روش رنگ آمیزی و عدم همزمانی در بررسی مولکولی و رنگ آمیزی می تواند باشد..*

واژه های کلیدی: *دی آنتامبا فراژیلیس، هماتوکسیلین آهن، چالوس،PCR*

Archive of SID

مقدمه

دی آنتاموبا فراژیلیس تک یاخته آمیبوئید و انگل ساکن روده بزرگ انسان است که در کریپت روده بزرگ زندگی کرده و تا کنون موردی از تهاجم این انگل به بافتها گزارش نشده است (1). این انگل برای اولین بار در سال 1907 توسط Wenyon کشف شد (2). مشخصات این ارگانیسم در سال 1918 توسط Jepps و Dobell شرح داده شد. قطر انگل از 4 تا 19 میکرون متغییر بود، و در بیشتر موارد تروفوزوئیت های آن در نمونه های مدفوع رنگ آمیزی شده به صورت دو هسته ای مشاهده می شود. ممکن است اشکال تک هسته ای و ندرتا اشکال 4 تا 5هسته ای نیز دیده شود. (3). مرحله کیستی در این انگل تاکنون گزارش نشده است(4و5).در طبقه بندی های اولیه به علت وجود اشکال دو هسته ای و فقدان مرحله کیستی این انگل یک آمیب محسوب می گردید ولی اخیرا براساس مطالعات با میکروسکوپ الکترونی آن را در خانواده تریکو مونادیده (از تاژکداران) قرار داده اند (4و5).

نحوه انتقال دی آنتاموبا فراژیلیس تا کنون ناشناخته باقی مانده است . بسیاری از تک یاخته های روده ای که از طریق مدفوعی – دهانی انتقال می یابند به یک مرحله کیستی نیاز دارند تا بتوانند در محیط بیرون زنده بمانند. اگر چه تعدادی معدودی از محققان مراحل Pseudocystic , Precystic یا مرحله کیستی را برای دی آنتاموبا فراژیلیس گزارش کرده اند، اما به طور کلی پذیرفته شده است که این انگل مرحله کیستی ندارد(6). Dobell معتقد بود همانطور که Histomonas meleagridis دارای فرم کیستی نیست و توسط تخم های نماتودی به نام Heterakis gallinae منتقل می شود، این امر احتمال دارد که دی آنتاموبا فراژیلیس هم از طریق تخم یک نماتود منتقل شود، او تریکوریس تریکورا و آسکاریس لومبریکوئیدس را کاندیدای این نقش معرفی کرد. Burrows و Swerdlow اعتقاد داشتند که میزبان واسط انتروبیوس ورمیکولاریس است. آنها در مطالعاتشان دریافتند که میزان شیوع عفونت همزمان با کرم سنجاقی 20 برابر بیشتر از میزان قابل انتظار است همچنین مشاهده اجسام آمیبوئید کوچک با هسته هایی شبیه به هسته های دی انتا موبا فراژیلیس در داخل تخمهای کرم سنجاقی آنها را در اعتقاد خود راسخ تر کرد(7). شواهد دیگری در تایید این نظریه در مطالعات سایر محققان به دست آمده بود(8و9). با تمام این دلایل شیوع بالای عفونت همزمان این انگل با دیگر انگل هایی که از طریق مدفوعی – دهانی منتقل می شوند احتمال انتقال مشابه برای دی آنتاموبا فراژیلیس را متصور می سازد.

در مورد پاتوژن بودن دی آنتاموبا فراژیلیس تردید های زیادی وجود دارد و تا مدتها این انگل غیر بیماری زا محسوب می گردید ولی در حال حاضر شواهد زیادی در مورد بیماری زا بودن آن وجود دارد(10). مطالعات نشان داده است که در مبتلایان، دی آنتاموبا فراژیلیس سبب تظاهرات بالینی از قبیل خستگی، بی اشتهائی، درد موضعی شکم، کاهش وزن، نفخ ، تهوع، اسهال مقاوم و اسهال بلغمی می شود که این علائم با درمان ضد آمیبی بهبود می یابند (8 ، 11 و 12).

میزان شیوع این انگل در مطالعات متعدد از4 /0% تا 16/8% گزارش شده که موید مشکلات موجود در تشخیص این انگل می باشد(13 و 14). این انگل با استفاده از لام مرطوب تشخیص داده نمی شود و چون فاقد مرحله کیستی است در بررسی با استفاده از روشهای تغلیظ از بین می رود لذا استفاده از مواد نگهدارنده و رنگ آمیزی دائمی برای تشخیص انگل توصیه شده است(3، 14 ، 15 و 16).

هدف از این مطالعه، مقایسه میزان شیوع دی انتاموبا فراژیلیس در مراجعان به آزمایشگاههای مراکز بهداشتی منطقه چالوس در درمانگاه امام رضا و بیمارستان طالقانی، با استفاده از دو روش PCR و رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن بوده است.

روش بررسی

مطالعه حاضر، یک مطالعه مقطعی است. نمونه ها به صورت راندوم از بین مراجعه کننده گان به آزمایشگاههای امام رضا و بیمارستان طالقانی سطح شهرستان چالوس انتخاب گردیدند . 302نمونه مدفوع انسانی از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاههای مذکوردر شهرستان چالوس طی ماههای خرداد تا بهمن ماه سال 1389 جمع آوری شدند. پس از جمع آوری نمونه ها و تکمیل پرسشنامه مربوط به مراجعه

Archive of SID

www.SID.ir

کننده که شامل مشخصات عمومی (سن، جنس، محل سکونت و...) و علت مراجعه بود، نمونه اخذ و بلافاصله در محل نمونه از نظر وجود تروفوزوئیت فعال دی آنتاموبا فراژیلیس و سایر انگلها با استفاده از لام مرطوب و در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته و جواب در برگه پرسشنامه ثبت گردید. پس از مطالعه لام مرطوب مقداری از نمونه مدفوع به دو میکروتیوب 1/5 سی سی که یکی حاوی ماده نگهدارنده پلی وینیل الکل (برای رنگ آمیزی) و دیگری حاوی اتانل 70% (برای کارهای مولکولی) بود انتقال یافته و پس از به هم زدن در پایان روز کاری با اتوبوس مستقیما به در جعبه یخ آزمایشگاه بیمارستان امام رضا(ع) تبریز حمل شده و پس از فیکس کردن نمونه ها بر روی لام در روز بعد لامها با استفاده از رنگ آمیزی آهن – هماتوکسیلین رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار می گرفتند. برای استخراج DNA از CTAB (hexadecylcetyltrimethylammonium bromide)، SDS و پروتئیناز k استفاده شد. 300 میکرولیتر از مدفوع حل شده در الکل به میکروتیوب منتقل و بر روی آن 60 میکرولیتر SDS 10%، 150 میکرولیتر بافر TE 10/1 و 5 میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) اضافه گردید. میکروتیوب پس از بهم زده شدن برای یک روز در بن ماری 55 درجه سانتی گراد قرار داده شد. روز بعد با استفاده از CTAB و Nacl 5 مول و به دنبال آن محلول کلرفورم و ایزوآمیل الکل (24/1) DNA استخراج و پس از رسوب در ایزوپروپانول و شستشو با الکل 70% در 30 میکرولیتر بافر TE حل و تا روز PCR در فریزر نگهداری شد. PCR اولیه با استفاده از پرایمرهای خارجی موجب تکثیر قطعه ای از ژن 16S rRNA خانواده تریکومونادها می شد. توالی پرایمرهای خارجی به ترتیب زیر بود:

Forward: 5´-GATACTTGGTTGATCCTGCCAAGG-3´
Reverse: 5´- GATCCAACGGCAGGTTCACCTACC-3´

برنامه ترمال سایکلر برای PCR اولیه به ترتیب دناتوراسیون اولیه یک دقیقه در دمای 94 درجه به دنبال آن 30 سیکل دناتوراسیون 60 ثانیه در 94 درجه، اتصال 90 ثانیه در 55 درجه و تکثیر120 ثانیه در 72 درجه و بالاخره تکثیر نهائی 5 دقیقه در دمای 72 درجه بود. این پرایمرها توسط Silberman و همکاران طراحی شده است(17) سپس 2 میکرولیتر از محصول PCR اولیه مورد استفاده برای PCR ثانویه با استفاده از پرایمرهای زیر قرار گرفت.

Forward: 5´-GGTTGGATACTCCTACTCTCGC-3´
Reverse: 5´-TTGTAACCTAGCAGAGGGCCAG-3´

برنامه ترمال سایکلر برای PCR ثانویه به ترتیب دناتوراسیون اولیه یک دقیقه در دمای 94 درجه به دنبال آن 30 سیکل دناتوراسیون 60 ثانیه در 94 درجه، اتصال 60 ثانیه در 55 درجه و تکثیر90 ثانیه در 72 درجه و بالاخره تکثیر نهائی 5 دقیقه در دمای 72 درجه بود. این پرایمرها توسط Menghi و همکاران طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفته بود(18) در انجام PCR اولیه و ثانویه از کنترل منفی استفاده شد. برای بررسی محصول PCR ثانویه از روش الکتروفورز بوسیله ژل آگارز 2% استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ 90 ولت و در مدت 90 دقیقه انجام گرفت. برای رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) استفاده گردید و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

از302 نمونه جمع آوری شده 145 نمونه مربوط به مردان و 157 نمونه مربوط به زنان بود. افراد مورد بررسی در محدوده سنی 10 ماه تا 79 سال قرار داشتند. در بررسی مستقیم نمونه ها با استفاده از لام مرطوب هیچ مورد مثبتی مشاهده نگردید.

نتایج حاصل از بررسی لام های رنگ آمیزی شده بیانگر 6 مورد مثبت قطعی (1/99%) دی آنتاموبافراژیلیس که از این تعداد 2 موردمربوط به زنان و 4 مورد مربوط به مردان بود. در این بررسی دی آنتاموبا فراژیلیس در بین مردان نسبت به زنان شیوع بالاتری داشت.

شیوع سایر انگل ها در لام های بررسی شده به این ترتیب بود. آنتامبا کلی در 12 مورد (3/97%)، بالاترین درصد آلودگی و تخم تنیا ساژیناتا با یک مورد (0/33 %)پا یین ترین میزان آلودگی را نشان داد. شیوع سایر انگل ها در لام های بررسی شده به این ترتیب بود. آمیب هیستولیتیکا/ دیسپار 2 مورد (0/66%)، ژیاردیا 7 مورد (2/31 %) ، یدو مبا بوچلی 4 مورد (1/32 %)، بلاستوسیستیس هومونیس5 مورد(1/65 %) و تخم

Archive of SID

www.SID.ir

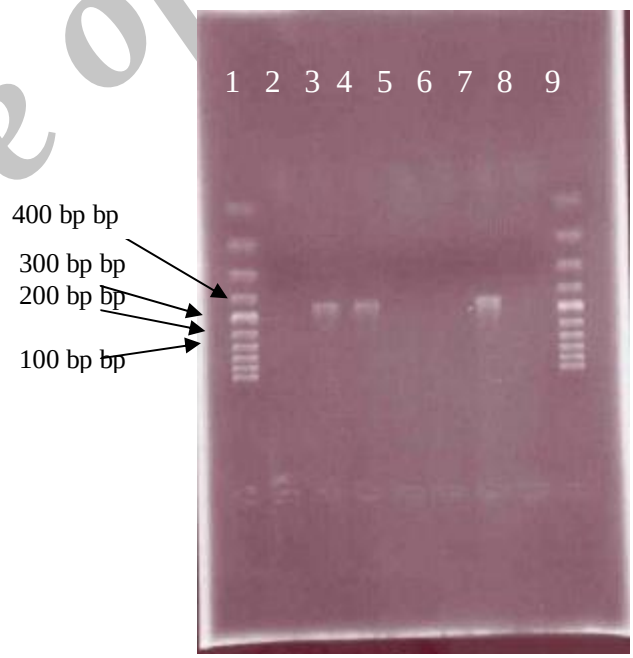
اکسیور 2 مورد (0/66%) مشاهده گردید.

آلودگی توام دی آنتاموبا فراژیلیس با آنتامبا کلی در 2 مورد و با بلاستوسیستیس هومونیس در 1 مورد مشاهده گردید.

تمامی بیمارانی که به انگل دی آنتاموبا فراژیلیس مبتلا بودند دارای علائم اسهال و درد شکم بودند.

بر روی تمامی نمونه های مثبت و 100 مورد از نمونه های منفی که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، Nested PCR انجام گردید.

در بررسی باندهای ایجاد شده در مرحله Nested PCR تنها 5 نمونه، باندی به طول تقریبی 414 bp ایجاد کرده بودند که همگی مربوط به نمونه های مثبت بود. PCR قادر به شناسائی یکی از نمونه های مثبت نبود. تمامی نمونه های منفی با آزمایش PCR منفی بودند.(تصویر1)



تصویر1: نتیجه الکتروفورز مربوط به Nested PCR بر روی ژل آگاروز ، ردیف1 و 9: سایز مارکر 100bp، ردیف 2: کنترل منفی، ردیف 3، 4 و 7: نمونه های مثبت(طول باند 414bp)، ردیف: 5 ، 6و 8 نمونه های منفی،

بحث

دی انتاموبا فراژیلیس تک یاخته آمیبوئید انگل ساکن روده بزرگ انسان است که با تریکومونادهای فلاژل دار وابستگی نزدیکی دارد. این ارگانیسم در انسان ایجاد علائم گاستروانتریت از قبیل اسهال، دردهای شکمی، کاهش وزن، بی اشتهایی و ... می نماید (8، 19 و 20). اغلب به صورت دو هسته ای دیده می شود. مرحله کیستی در این انگل تاکنون گزارش نشده است. در مطالعه حاضر روش مولکولی PCR دو مرحله ای برای شناسایی عفونت با دی آنتاموبا فراژیلس در مراجعان به آزمایشگاههای مراکز بهداشتی امام رضا و بیمارستان طالقانی چالوس با استفاده از دو روش PCR و رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن انجام گردید.

نتایج حاصل از بررسی 302 نمونه بالینی که رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن شده بودند، بیانگر 6 مورد مثبت قطعی(1/9%) دی آنتاموبا فراژیلیس بود. در ایران در بررسی ای که سلیمانی محمدی و همکارانش بر روی تک یاخته های روده ای انجام دادند، میزان آلودگی با دی آنتاموبا فراژیلیس را 0/5 % گزارش کردند(21). و در مطالعه دیگر که در روستا های شمال ایران بر روی شیوع تک یاخته های روده ای انجام گرفته میزان آلودگی با دی آنتاموبا فراژیلیس 1/1 % گزارش شده است(22). در مطالعه دیگری که توسط دکتر رضائیان و هوشیار در اهواز به منظور بررسی انگلهای روده ای در منطقه اهواز و حمیدیه صورت گرفته شیوع دی آنتامبا فراژیلیس 0/76 % گزارش شده است(23).

در بررسی علائم بالینی مبتلایان به عفونت دی آنتاموبا فراژیلیس، نتایج ما نشان داد که اسهال و درد شکم در تمامی 6 مورد مثبت از نظر دی آنتاموبا فراژیلیس (100 %) وجود داشت میزان بروز علایم حاکی از غالب بودن اسهال و درد شکم در مبتلایان به دی آنتاموبا فراژیلیس است. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات مختلف انجام شده که نشان داده اند دی آنتاموبا فراژیلیس در مبتلایان عامل ایجاد علایم مختلف گاستروانتریت می باشد کاملا" هم خوانی دارد(19 و 8) نتایج ما نشان دادکه در مراجعان با علامت یبوست این انگل دیده نمی شود.

در مرحله بعد بر روی نمونه های مثبت و منفی PCR و Nested-PCR انجام گردید. در واکنش Nested-PCR ، 5 مورد مثبت تشخیص داده شد. در بررسی 100 مورد منفی، پس از انجام واکنش PCR و Nested PCR باند مربوط به دی

Archive of SID

www.SID.ir

آنتامبا فراژیلیس در هیچ موردی مشاهده نگردید. با توجه بدین نتایج در مطالعه حاضر چنانچه روش رنگ آمیزی بعنوان معیار در نظر گرفته شود حسا سیت و ویژگی PCR به ترتیب 85 % و 100 % تعیین می گردد.

در زمینه تشخیص عفونت با دی آنتامبا فراژیلیس با روش PCR مطالعات محدودی انجام گرفته است. مقایسه نتایج ما با مطالعات دیگر حاکی از سازگاری این نتایج با مطالعات قبلی است. در مجموع حساسیت و ویژگی روش مولکولی PCR در مطالعات محدودی که قبلا صورت گرفته به ترتیب 88/9 تا 100% و 93 تا 100% (24، 25 و 26) به طوری که در مطالعه قبلی انجام شده(24) بر روی 200 نمونه، 48 مورد در روش PCR و 50 مورد در روش رنگ آمیزی از نظر دی آنتامبا فراژیلیس مثبت بود که در این مطالعه حساسیت و ویژگی روش مولکولیPCR به ترتیب88/9 %تا 100% و در مقایسه با روش رنگ آمیزی و مطالعه میکروسکوپی که دارای حساسیت و ویژگی 92/4 و 98/7 بوده گزارش شده است .

علت پایین بودن حساسیت روش مولکولی PCR نسبت به روش رنگ آمیزی ممکن است ناشی همزمان نبودن رنگ آمیزی هماتوکسیلین آهن و آزمایش PCR باشد چرا که دی آنتاموبا فراژیلیس مرحله کیستی نداشته ، فرم تروفوزوئیتی به سرعت از بین رفته ، با گذشت زمان DNA تخریب و غیر قابل شناسایی می گردد. بنابراین بهتر است برای دقت بیشتر زمان نگهداری نمونه تا استخراج DNA و PCR کوتاه تر شود و یا از نمونه های تازه استفاده گردد.

دلیل بعدی اختلاف بین دو روش ممکن است به دلیل تشابه سایر تک یاخته های ساکن روده با این انگل باشد که باعث افزایش گزارش درصد شیوع در دید مستقیم شود. این مشکل را می توان با به کار گیری افراد با تجربه در آزمایشگاهها حل کرد.

معمولا عفونت با دی آنتاموبا فراژیلیس توام با دیگر عفونت های تک یاخته های روده ای است و بررسی ها عفونت توام با اکسیور را فقط در 5% این افراد تایید کرده است، اما بلاستوسیستیس هومی نیس در 40,3% و اندولیماکس نانا در 24% موارد، آنتامبا کلی در 6% موارد و ژیاردیا در 5,7% موارد یافت شدند.

وجود میزان بالای عفونت با دیگر ارگانیسم هایی که از طریق مدفوعی – دهانی منتقل می شوند این موضوع را تقویت می کند که احتمال انتقال مشابه برای دی آنتاموبا فراژیلیس وجود داد. در مطالعه ای بر روی 6750 بیمار تعداد 60 مورد در رنگ آمیزی و 54 مورد درواکنش PCR مثبت گزارش شدند که میزان شیوع در این مطالعه 0/9% گزارش شده است. در این مطالعه نیز همانند مطالعه حاضر موردی از آلودگی توام دی آنتاموبا فراژیلیس با اکسیور مشاهده نگردید که این نتایج تقریبا با مطالعه حاضر هم خوانی دارد. (14).

بر خلاف نتایج این مطالعه، در مطالعه ای که در کشور ترکیه در سال 2007 انجام گردیده از 217 کودک آلوده به اکسیور 99 مورد (45/6%) آلوده به دی آنتاموبا فراژیلیس بودند(27). در بررسی لامهای مرطوب و رنگ آمیزی شده 2206 بیمار در شهر دورهام کشور انگلستان به ترتیب صفر و یک مورد دی آنتاموبا فراژیلیس گزارش گردید(16)، این در حالی است که در مطالعه حاضر نیز بررسی مستقیم نمونه ها با استفاده از لام مرطوب هیچ مورد مثبتی مشاهده نگردید و نتایج حاصل از بررسی لام های رنگ آمیزی شده بیانگر 6 مورد مثبت قطعی دی آنتاموبافراژیلیس بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت تشخیص این انگل با استفاده از روشهای متداول در آزمایشگاهها (لام مرطوب و لوگل) ممکن نبوده و برای تشخیص قطعی این انگل حتما می باید حداقل رنگ آمیزی مناسب بکار برده شود و در مواردی که احتمال بیماریزا بودن آن مطرح است بهتر است از روشهای مولکولی نیز سود برد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با همکاری معاونت پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس به انجام رسید که بدینوسیله تشکر و قدردانی می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-Levine ND, Corliss JO, Cox Feg, et al. *A newly revised classification of the protozoa*. J Protozool. 1980; 27: 37-58.

2-Schwartz MD, Nelson ME. *Dientamoeba fragilis infection presenting to the emergency department as acute appendicitis*. J Emerg Med. 2003; 25(1): 17-21.

3-Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. *Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(3): 553-70.

4-Johnson JA, Clark CG. *Cryptic genetic diversity in Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol, 2000; 38(12): 4653-4.

5-Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis: the unflagellated human flagellate.* Br J Biomed Sci, 1999;56(4), 293-306.

6-Stark D, Philips O, Peckett D, Munro U, Marriott D, Harkness J, et al. *Gorillas are a host for Dientamoeba fragilis: an update on the life cycle and host distribution.* Vet parasitol. 2008; 151(1): 21-6.

7-Burrows Robert B, Swerdlow Martin A. *Enterobius vermicularis as a probable vector of Dientamoeba fragilis.* Am J Trop Med Hyg. 1956**;** 5(2): 258-265.

8-Yang J, Scholten T. *Dientamoeba fragilis: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission, and diagnosis*. Am J Trop Med Hyg.1977; 26(1): 16-22.

9-Gerbod D, Edgcomb VP, Noel C, Zenner L, Wintjens R, Delgadoviscogliosi P , et al. *Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, Histomonas meleagridis (smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence*. J Eukaryot Microbiol.2001;48(4):498-504.

10-Lagace-Wiens PR, Van Caeseele PG, Koschik C. *Dientamoeba fragilis:an emerging role in intestinal disease*. CMAJ.2006; 175(5): 468-9.

11-John DT, Petri WA. Markell and Voge's Medical Parasitology. 9th edition. Philadelphia, Elsevier-Saunders, 2006; pp: 59-62

12-Schmidt GD, Roberts LS. Foundations of Parasitology. 8th edition. New York, McGraw-Hill, 2011; pp:102-103

13-Peek R, Reedeker FR, Van Gool T. *Direct amplification and genotyping of Dientamoeba fragilis from human stool specimens*. J Clin Microbiol. 2004; 42(2): 631-5.

14- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. *Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of Dientamoeba fragilis infections in an Australian population*. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2718-23.

15-Chan FT, Guan MX, Mackenzie A.M. *Application of indirect immunofluorescence to detection of Dientamoeba fragilis trophozoites in fecal specimens*. J Clin Microbiol.1993; 31(7):1710-4.

16- Estevez EG, Levine JA. *Examiniation of preserved stool specimens for parasites: Lack of value of the direct wet mount*. J Clin Microbiol. 1985; 22(4): 666-7.

17-Silberman J D, Clark C G, Sogin M L. *Dientamoeba fragilis shares a recent common evolutionary history with the trichomonads*. Mol Biochem Parasitol. 1996;76:311–314.

18-Menghi CI, Gatta CL , Makiya R , Mendez OC. *Molecular detection of Dientamoeba fragilis in faeces: Removal of DNA- polymerase inhibitors*. Parasitol Latinoam.2006; 61: 146 – 151.

19- Norberg A, Nord CE, Evengard B. *Dientamoeba fragilis--a protozoal infection which may cause severe bowel distress.* Clin Microbiol Infect. 2003; 9(1): 65-8.

20- Cuffari C, Oligny L, Seidman EG. *Dientamoeba fragilis masquerading as allergic colitis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1998; 26(1): 16-20.

21-Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, et al. *Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections in asymptomatic cyst passers in Iran*. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):2258-61.

22- Kia EB , Hosseini M, Nilforoushan MR, Meamar AR, Rezaeian M. *Study of intestinal protozoan parasites in rural inhabitants of Mazandaran province , northern Iran*. Iranian J parasitol. 2008; 3(1): 21-25.

23-Rezaian M, Hooshyar H. *Differential diagnosis of Entamoeba histolytica from Entamoeba dispar and a study on the intestinal parasites in rural areas of Ahwaz and Hamidieh.* Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research**.** 2007: 4(4): 33-38

24-Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including Real-Time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2006 ;44(1): 232-5.

25-Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J.*Detection of Dientamoeba fragilis in fresh stool specimens using PCR*. Int J Parasitol . 2005 ; 35(1): 57-62.

26-Verweij JJ, Mulder B, Poell B, Van Middelkoop D, Brienen EA, van Lieshout L. *Real-time PCR for the detection of Dientamoeba fragilis in fecal samples*. Mol Cell Probes. 2007;21(5-6): 400-4.

27-Girginkardeşler N, Kurt O, Kilimcioğlu AA, Ok UZ. *Transmission of Dientamoeba fragilis: evaluation of the role of Enterobius vermicularis*. Parasitol Int. 2008; 57(1):72-5.

Archive of SID

www.SID.ir