

Dientamoeba fragilis, un parasite fréquent mais méconnu

B. PESSON (*) (**), A. ABOU-BACAR (*),
E. LIENHART (***) , E. CANDOLFI (*) (***)

RÉSUMÉ

Dientamoeba fragilis est un flagellé parasite dont la prévalence est largement sous-évaluée. Les travaux récents rapportés dans cet article, confirment sa position systématique dans l'ordre des *Trichomonadida* et montrent qu'il s'agit d'un protiste entéropathogène. Son diagnostic repose sur l'identification du trophozoïte, seule forme connue et éliminée dans les selles. Au laboratoire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, la recherche de protozoaires intestinaux dans les selles comprend l'examen microscopique extemporané sur platine chauffante, la coloration au MIF et la mise en culture sur milieu diphasique. 9,3 % des patients ainsi examinés depuis cinq ans sont porteurs de dientamibe.

MOTS CLÉS : *Dientamoeba fragilis*, morphologie, diagnostic, rôle pathogène, prévalence.

I. - INTRODUCTION

Près d'un siècle après sa description par Jepps et Dobell (35) *Dientamoeba fragilis* reste un protozoaire énigmatique. Si son statut de flagellé est aujourd'hui confirmé et sa position taxonomique précisée, son rôle pathogène comme son mode de transmission restent discutés. En 2004, Johnson et coll. (36) intitulaient leur revue sur la dientamibe « *Emerging from obscurity: biological, clinical and diagnostic aspects of Dientamoeba fragilis* ». Il est certain que l'apport de la biologie moléculaire a suscité au cours de la dernière décennie un regain d'intérêt pour la dientamibe en démontrant la prévalence élevée de la parasitose humaine et son association à des manifestations cliniques digestives (62). La sous-estimation de la fréquence de la dientamibe dans les examens coprologiques de routine est principalement due au fait qu'on ne lui connaît pas de forme kystique et que la mise en évidence de la forme végétative (ou trophozoïte) exige le respect scrupuleux des bonnes pratiques de l'examen parasitologique des selles. Nous nous proposons de présenter dans cet article un aperçu bibliographique sur ce parasite, et les résultats de notre expérience de son diagnostic parasitologique tel qu'il est pratiqué, en utilisant des méthodes classiques, au laboratoire de parasitologie et mycologie médicale des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

II. - TAXONOMIE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Les particularités morphologiques de la dientamibe l'ont fait assez rapidement distinguer des autres amibes de la famille des *Entamoebidae*. En 1953, dans son traité de zoologie, P. Grassé crée pour elle une nouvelle famille : les *Dientamoebidae*. Au cours des années 70, les premières observations en microscopie électronique (8) comme les comparaisons antigéniques (17, 18, 19) mettent en évidence les similarités de la dientamibe et des flagellés *Trichomonadines*. À la fin du XX^{ème} siècle, l'amplification des gènes codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal confirme cette affinité (60). Aujourd'hui, la dientamibe est considérée comme un eucaryote unicellulaire flagellé

(*) Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Plateau Technique de Microbiologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, rue Koeberlé 67000 Strasbourg

(**) Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, 67400 Illkirch

(***) Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de la Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg.

bien qu'il n'existe que sous forme amiboïde chez l'homme. Elle est rattachée à la classe des *Parabasalia* (organismes dépourvus de mitochondrie et possédant un appareil parabasal qui est un volumineux appareil de Golgi) et à l'ordre des *Trichomonadida*. Les phylogénies moléculaires de cet ordre montrent que la dientamibe est plus proche du genre *Histomonas* (24, 31, 32) que du genre *Trichomonas* et regroupent ainsi *Dientamoeba fragilis* et *Histomonas meleagridis*, parasite fréquent chez les volailles, dans la même famille des *Monoceradidae*. L'analyse par RFLP/PCR du polymorphisme génétique des souches de dientamibes isolées de patients a d'abord permis de distinguer deux formes génétiques présentant environ 2 % de divergence de leurs gènes ribosomiaux mais l'un des deux génotypes est rare et aucun lien ne peut être établi avec le pouvoir pathogène des souches (37, 52). En 2006 Windsor et coll. (80) mettent en évidence l'hétérogénéité des gènes ITS dans les deux génotypes et en 2008 Bart et coll. (3) identifient 11 variants du gène ITS-1 de *Dientamoeba fragilis* qui pourraient être utilisés comme marqueurs en épidémiologie moléculaire. Récemment, Hussein et coll. (33) en utilisant la technique de « fusion haute résolution » (*High-Resolution Melting* ou HRM) associée à la PCR montrent l'existence de 4 profils chez des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable. Un profil est associé aux patients présentant une diarrhée aiguë, un autre à ceux développant une diarrhée chronique.

III. - CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Dans les suspensions fécales examinées au microscope, la dientamibe se présente uniquement sous forme végétative, ou trophozoïte, dont la taille varie de 3 à 20 µm. Les trophozoïtes sont généralement nombreux et apparaissent comme autant de globules sphériques granuleux. Même en utilisant une platine chauffante à 37°C, il est souvent nécessaire de les observer pendant quelques minutes avant de les voir bouger. Le mouvement est alors très caractéristique : *Dientamoeba fragilis* ne coule pas son endoplasme dans des pseudopodes éruptifs et lobés comme les entamibes ; elle reste sur place et forme un pseudopode à base large et frangé à son extrémité, et qui se déplace autour de la cellule puis se rétracte (Figure 1). Fréquemment deux ou trois pseudopodes se forment en même temps, ce qui confère un aspect tourmenté au contour de la cellule (Figure 2), qui prend parfois l'aspect de pales de ventilateur. Ce mouvement permet d'identifier assez facilement le parasite dès l'examen direct. La dientamibe est binuclée mais les noyaux ne sont pas visibles à l'état frais. Le cytoplasme granuleux contient des vacuoles et des éléments phagocytés de taille irrégulière. La dientamibe se colore mal par le Lugol et par la technique de Sapero, Lawless et Strome, ou MIF (56), qui est la coloration de routine la plus utilisée en France (Figures 3 à 8). Au mieux, les deux noyaux apparaissent en négatif par rapport à la coloration du cytoplasme (Figure 6). Il n'est pas exceptionnel de trouver des populations dont plus de la moitié des trophozoïtes n'ont qu'un seul noyau mais, généralement, leur proportion reste en dessous de 20 %. Ces

Tableau I - Composition et utilisation du fixateur de selles SAF.

Acétate de sodium	15 g
Acide acétique	20 mL
Formol 40 %	40 mL
Eau distillée	925 mL
- 1 mL de triton peut être ajouté au fixateur.	
- On fixe le prélèvement en mélangeant un volume de selles pour quatre volumes de SAF.	
- Ce prélèvement est utilisé pour la confection de frottis fécaux et peut être concentré par une technique diphasique.	

trophozoïtes mononucléés sont considérés comme des formes qui viennent de se diviser ; le second noyau apparaît après cette division binaire et reste relié au premier noyau par un filament (paradesmose). Si le mouvement n'a pas été observé à l'état frais et si les amibes sont donc examinées uniquement après une coloration au MIF, la démarche du diagnostic morphologique devient souvent celle d'une identification « par élimination » après avoir écarté le diagnostic des autres espèces d'amibes chez lesquelles les structures nucléaires sont bien mises en évidence par le MIF. Chez les trophozoïtes en voie de lyse, une grosse vacuole peut se former au centre de la cellule, repoussant en périphérie le cytoplasme et les noyaux. Il est alors possible de confondre la dientamibe avec certaines formes de *Blastocystis hominis* (Figures 7, 8).

De nombreux laboratoires en Europe et en Amérique du Nord privilégient aujourd'hui les colorations sur frottis confectionnés à partir de selles prélevées sur un liquide fixateur comme le SAF (acétate de sodium - acide acétique - formol) (86 - Tableau I). Bien entendu, il n'est alors plus possible d'examiner les mouvements des protozoaires mais ces techniques permettent de mieux visualiser la structure des noyaux de la dientamibe à condition que la coloration soit appropriée. Le May-Grünwald Giemsa (ou le Giemsa, après fixation au méthanol) qui est proposé par certains auteurs donne, selon notre expérience, des résultats insuffisants. Le trichrome de Wheatley (79) comme les diverses colorations de référence à l'hématoxyline ferrique (Figure 9) mettent mieux en évidence les noyaux. La technique au noir chlorazol E de Kohn (40, 43 - Tableau II) qui s'effectue en un seul temps peut plus facilement être adaptée à la routine (76). Elle permet de voir les deux noyaux (Figure 10), dont la chromatine apparaît fragmentée en 4 à 8 petits grains dont un est souvent plus volumineux (Figure 11). Sur certains exemplaires, apparaît le filament unissant les deux noyaux (Figure 12). La microscopie électronique a montré que cette paradesmose est un faisceau de microtubules qui se forme à partir du centrosome au moment de la division nucléaire et persiste lorsque celle-ci est achevée. Ce caractère ultrastructural se retrouve chez d'autres *Trichomonadida* tout comme la présence d'hydrogénosomes, organites intracytoplasmiques dans lesquels s'effectue en partie le métabolisme énergétique anaérobie de ces parasites (8, 36).

Fig. 1 à 12 - *Dientamoeba fragilis* : observations à l'état frais et après coloration au MIF, à l'hématoxyline et au noir chlorazol (barre = 10µm).

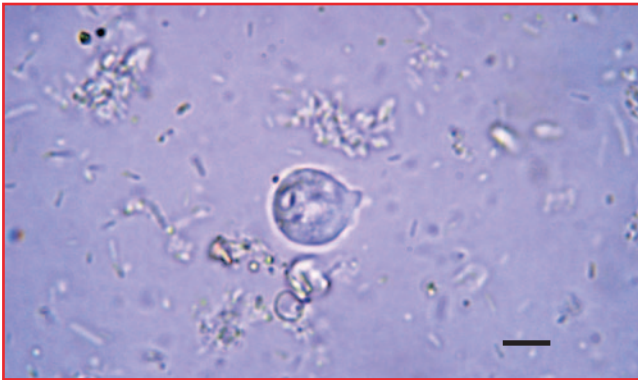


Fig. 1 - Pseudopode.

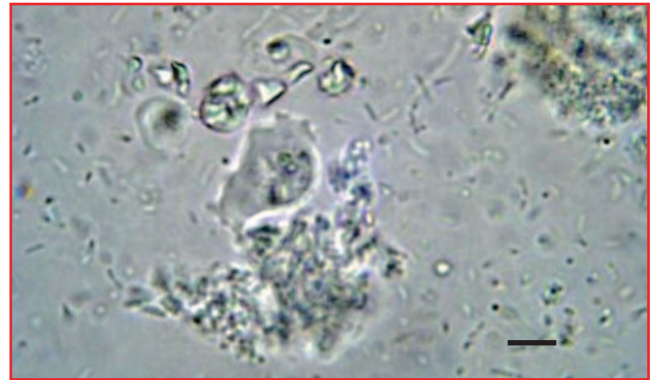


Fig. 2 - Pseudopodes.

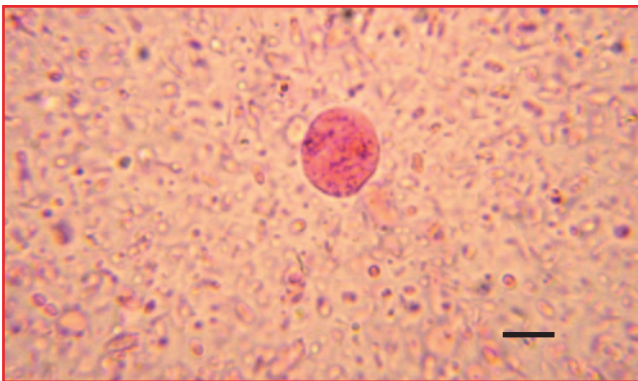


Fig. 3 - MIF.

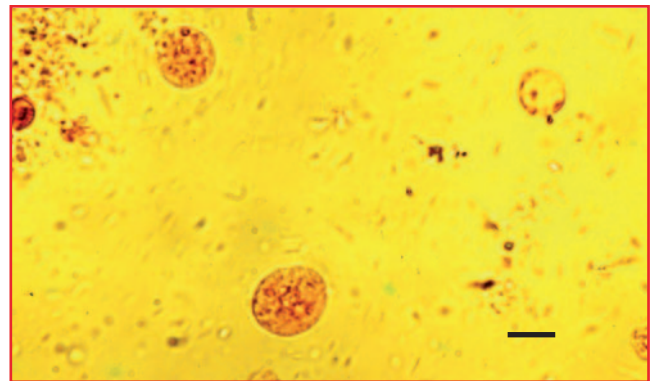


Fig. 4 - MIF : 2 trophozoïtes + 2 *Blastocystis*.

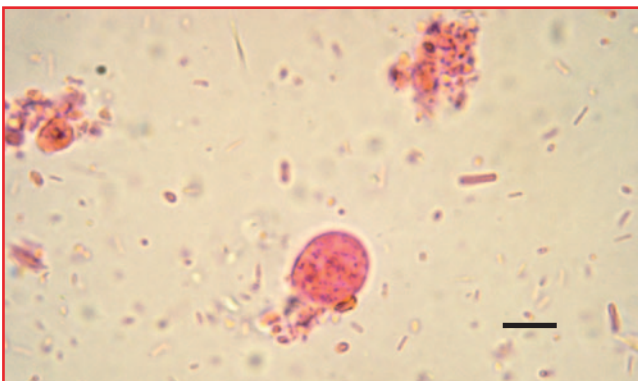


Fig. 5 - MIF.



Fig. 6 - MIF : noyaux visibles.

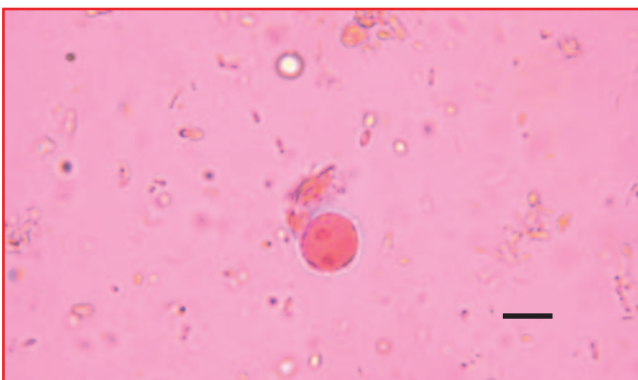


Fig. 7 - MIF : trophozoïte en voie de lyse.

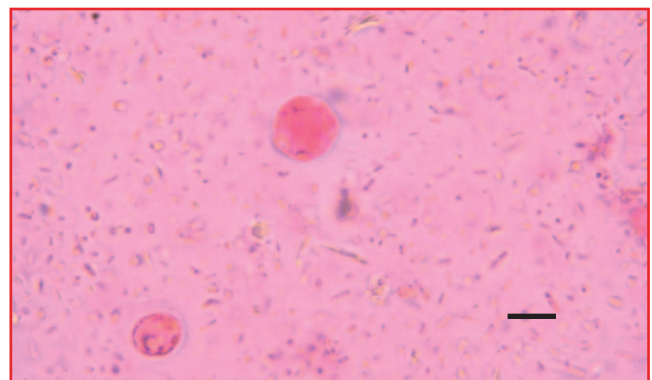


Fig. 8 - MIF : *Blastocystis*.

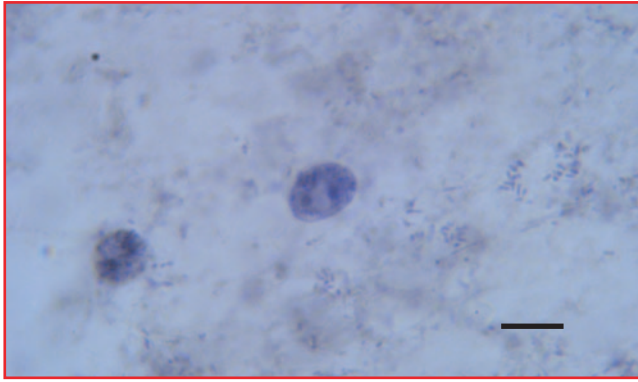


Fig. 9 - Coloration à l'hématoxyline ferrique.

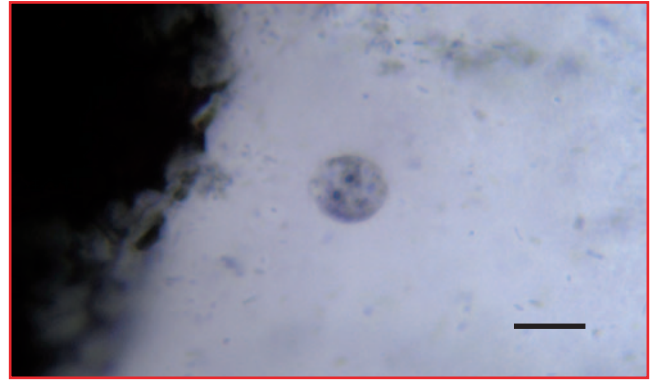


Fig. 10 - Coloration au noir chlorazol.

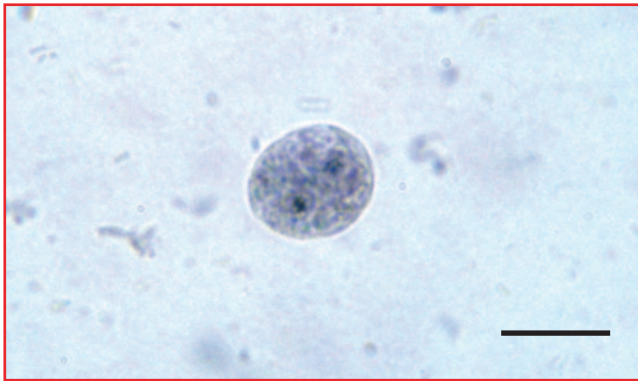


Fig. 11 - Coloration au noir chlorazol (après fixation par le SAF) : dans chaque noyau la chromatine est fragmentée en 3 à 8 grains.

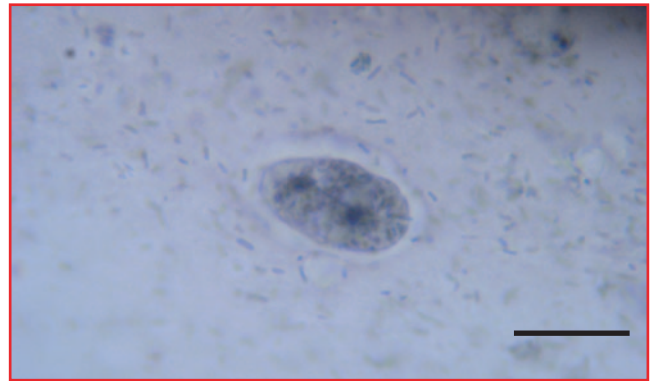


Fig. 12 - Coloration au noir chlorazol montrant le filament réunissant les deux noyaux.

IV. - CYCLE DE DÉVELOPPEMENT ET TRANSMISSION

Le mode de transmission de *Dientamoeba fragilis* - comme celui d'un autre *Trichomonadida* parasite intestinal de l'homme, *Pentatrichomonas hominis* - demeure une énigme. Contrairement aux autres protozoaires intestinaux, ces deux flagellés n'ont pas de formes kystiques connues et leur transmission directe par ingestion de formes végétatives souillant l'eau ou les aliments suppose que celles-ci résistent aux conditions défavorables du milieu extérieur et de la digestion. Ceci ne semble pas être le cas au vu de l'expérience de Dobell rapportée par Johnson et coll. (36), qui tenta en vain de s'infester en avalant une culture riche de plusieurs milliers de dientamibes. Les similitudes de *Dientamoeba fragilis* et d'*Histomonas meleagridis* ont très vite suscité des recherches sur d'éventuels vecteurs du protozoaire. Le cycle d'*Histomonas meleagridis* est en effet connu : les formes végétatives de ce flagellé, qui vivent dans les cæcums des galliformes, ne s'enkystent pas ; elles vont coloniser les voies génitales puis les ovules d'un ascaris - *Heterakis gallinarum* - qui partage la même niche écologique. Ce sont les œufs du nématode rejetés à l'extérieur par les excréments qui protègent et véhiculent ainsi *Histomonas meleagridis* vers de nouveaux hôtes qui, en les ingérant, se trouvent contaminés par le ver et par le protozoaire (87). Chez l'homme, les nématodes incriminés

ont d'abord, été l'ascaris *Ascaris lumbricoides* et le trichocéphale *Trichuris trichiura*, mais depuis les travaux de Burrows et Swerdlow (5, 6) montrant une fréquence élevée de coinfections dientamibe - oxyure dans des appendices parasités, c'est vers *Enterobius vermicularis* que s'est orientée la majorité des recherches. Les infestations expérimentales réalisées dans les années 70 par Ockert (49, 50) comme les études statistiques comparant la prévalence des infestations par les deux parasites dans les examens coprologiques (26, 52, 53, 85), apportent des arguments en faveur de ce rôle vecteur de l'oxyure. Notons que dans leur étude de 2008, Girginkardesler et coll. (26) ont procédé chez tous les patients au dépistage de l'oxyurose par la technique de Graham à la cellophane adhésive ce qui n'est pas le cas de beaucoup de publications qui ne font que comparer les taux d'infestation par les deux parasites. Cependant, d'autres travaux récents remettent en cause cette hypothèse (45, 62, 65, 67) et soulignent l'absence de données sur le rôle que pourraient jouer les autres protistes intestinaux plus souvent associés à la dientamibe. Ayadi et Bahri (1) dans leur synthèse sur les résultats de 11 254 examens positifs pratiqués sur 5 ans au CHU de Sfax, constatent par exemple que *Dientamoeba fragilis*, diagnostiquée 1 497 fois, est associée dans 5 % des cas à *Enterobius vermicularis* mais dans 40 % des cas à *Blastocystis hominis* et dans 24 % à *Endolimax nana*. Le développement des méthodes de diag-

nostic et de typage moléculaire de la dientamibe et de ses « vecteurs » potentiels pourrait à terme trancher la question.

Quant aux informations sur un éventuel réservoir animal, elles sont encore plus réduites : aucun modèle expérimental n'existe et la recherche d'hôtes naturels se limite à des données anciennes et de rares études actuelles. En 2008, Stark et coll. (70) analysent des échantillons fécaux d'un large spectre (plus de 40 espèces) d'hôtes mammifères domestiques et sauvages et oiseaux. Seul le gorille *Gorilla gorilla* est parasité par la dientamibe et les 135 porcs examinés dans cette étude australienne sont tous négatifs. Ces résultats contredisent ceux publiés un an plus tôt en Italie par Crotti et coll. (14) qui constatent une prévalence de 43,8 % (53/121) dans un élevage de porcs. Ces divergences de résultats montrent combien il est nécessaire aujourd'hui de standardiser les techniques du diagnostic biologique de *Dientamoeba fragilis* pour comprendre l'épidémiologie de « la dientamoebiose ».

V. - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

A) Recherche et identification microscopique des trophozoïtes dans les selles

Comme nous l'avons vu, cet examen peut être réalisé par l'observation immédiate d'une suspension fécale en soluté physiologique ou sur des selles fixées et colorées en tube (MIF) et sur frottis. Dans les deux cas se pose le problème de la bonne conservation des formes végétatives dans les prélèvements. S'il est classique de dire que les selles doivent être examinées ou fixées le plus rapidement possible, certains auteurs ont évalué la survie de *Dientamoeba fragilis* dans les prélèvements : Sawangjaroen et coll. (57) l'estiment à 24 h à la température du laboratoire et à 10 h à +4°C alors que De Canale et coll. (16) peuvent encore reconnaître le parasite coloré au Giemsa sur des frottis de selles conservées depuis 60 jours au réfrigérateur ! Quoiqu'il en soit, l'actuel Code de Nomenclature des actes de biologie médicale est sans équivoque à ce sujet puisqu'il prévoit dans le sous-chapitre des examens de parasitologie, l'examen immédiat des selles : acte 0259 : « *examen parasitologique de selles émises au laboratoire en vue de la recherche extemporanée des formes végétatives de protozoaires et identification des formes végétatives d'amibes et/ou autres protozoaires par coloration élective : MIF et/ou noir chlorazol, et/ou hématoxyline* ». Cet impératif vise surtout à imposer l'examen immédiat des selles dysentériques susceptibles d'héberger des formes végétatives pathogènes d'*Entamoeba histolytica* qui se lysent rapidement. Mais il nous conforte dans notre opinion que le meilleur moyen de diagnostiquer la dientamibe par les méthodes classiques est de l'observer vivante dans des selles fraîches ou en culture. En cas d'examen différé, c'est le MIF qui est le plus souvent utilisé en routine en France mais c'est un mauvais colorant de la dientamibe. La fixation des échantillons par le SAF semble aujourd'hui supplanter celle des autres fixateurs (21, 22, 28) dans les laboratoires qui pratiquent les colorations permanentes de frottis fécaux (4, 44, 63, 75, 76).

Tableau II - Composition et utilisation du colorant de Kohn.

Noir chlorazol E	5 g
Alcool éthylique 90°	170 mL
Alcool méthylique	160 mL
Acide acétique	20 mL
Phénol liquéfié	20 mL
Acide phosphotungstique en solution aqueuse 1 %	12 mL
Eau distillée q.s.p.	1L
– Il est conseillé (particulièrement pour les selles liquides ou les prélèvements de cultures) de confectionner les frottis en mélangeant une parcelle fécale avec une goutte de solution d'alginate à 1 % qui favorise l'adhésion à la lame :	
Alginate de sodium	1 g
Chlorure de sodium	0,6 g
Eau distillée	100 mL
– Les frottis fécaux sont plongés humides dans le colorant et placés 1 heure à 37°C.	
– Les frottis sont ensuite rincés avec précaution à l'eau, puis déshydratés et montés.	

L'émission de la dientamibe dans les selles est irrégulière et, comme pour d'autres parasites, il existe des périodes « muettes » dans l'examen coprologique. Quelle que soit la méthode utilisée il est donc recommandé, en cas de suspicion de protozooses intestinales, de recommencer une ou deux fois l'examen coprologique à quelques jours d'intervalle et si possible sur des selles de consistances différentes.

B) Culture

La culture des protistes endocavitaires est une excellente méthode de diagnostic et les revues de Robinson (55) et de Clark et Diamond (9) proposent un grand nombre de milieux. La dientamibe se cultive bien et plusieurs auteurs utilisent systématiquement la culture pour l'isoler (57, 82). Très récemment Barratt et coll. (2) ont publié une mise au point sur les meilleures conditions de culture et de cryoconservation des dientamibes afin d'en optimiser le diagnostic et de préserver les souches en vue d'études moléculaires.

Notre Code de Nomenclature prévoit également l'utilisation de cette technique dans l'acte 0289 : « *culture d'amibes à partir de selles émises au laboratoire, sur milieu diphasique pour protozoaires, avec identification des espèces par coloration élective* ». Depuis l'arrêt de la commercialisation en France de ce milieu (dérivé du milieu de Dobell et Laidlaw), les biologistes se trouvent démunis. C'est pourquoi nous présentons dans le **tableau III** la préparation et le mode d'emploi du milieu que nous utilisons et qui s'avère très efficace pour la mise en évidence de la majorité des protistes intestinaux dont la dientamibe. À noter qu'il n'est pas rare que celle-ci se multiplie lentement et ne soit retrouvée qu'après 48 heures de culture à 37°C.

C) Caractérisation moléculaire

Depuis une dizaine d'années, le diagnostic traditionnel de *Dientamoeba fragilis* a bénéficié des apports de la biologie moléculaire, d'abord dans la mise au point de techniques de PCR conventionnelles sur les selles (51, 67, 68, 45, 46), puis de techniques de PCR en temps réel utilisée seule (7, 63, 78) ou combinée en multiplex pour la recherche d'autres protistes à objectivation coprologique (4, 61). Toutes ces techniques amplifient des gènes codant pour la petite sous-unité de l'ARNr de *Dientamoeba fragilis*. Dans leurs études comparatives d'une PCR conventionnelle et du diagnostic par culture, Yakoob et coll. (84) comme Stark et coll. (63, 66) constatent que les sensibilités des deux techniques sont analogues. Par contre, la PCR en temps réel atteint une sensibilité et une spécificité proches de 100 % ; elle est rapide et reste efficace sur des échantillons de selles conservées depuis plusieurs jours voire plusieurs semaines (4, 7, 61, 63, 78).

VI. - ASPECTS CLINIQUES ET THÉRAPEUTIQUES

Bien qu'elle ait été découverte chez des patients atteints de diarrhée, la dientamibe a longtemps été considérée comme non pathogène et rangée avec les amibes commensales. Néanmoins, périodiquement, des cas l'associant à des troubles digestifs ont été publiés et Johnson et coll. (36) en donnent un historique détaillé dans leur revue de 2004. Ce n'est que récemment que s'est posée avec plus d'acuité la question de la non pathogénicité devant la forte prévalence de *Dientamoeba fragilis* chez les patients auxquels sont prescrits des examens parasitologiques des selles et la disparition des symptômes après des traitements éradiquant ce parasite. En 1999, Ayadi et Bahri (1) posent la question « *Dientamoeba fragilis* : flagellé pathogène ? » et Windsor et Johnson écrivent dans le BMJ (81) « *More laboratories should test for Dientamoeba fragilis* » en suggérant que ce protiste soit enfin classé dans les organismes entéropathogènes !

Dans leur revue de 2010 sur les symptômes de la dientamoébose, Stark et coll. (62) classent comme principaux signes cliniques : la diarrhée, qui peut être chronique (persistant depuis plus de deux semaines) ou aiguë, et les douleurs abdominales souvent diffuses, accompagnées de flatulences et parfois de nausées et/ou de vomissements et de fièvre. Ayadi et Bahri (1) observent comme manifestations cliniques les plus fréquentes : les douleurs abdominales (88,5 % des cas), puis l'anorexie (50 %) et l'alternance d'épisodes de constipation et de diarrhée (40 %). Des tableaux cliniques plus rares sont rapportés : appendicite (11, 59), cholécystite (72), colite (15, 34). Enfin plusieurs auteurs retiennent la dientamibe comme agent étiologique possible du syndrome de l'intestin irritable (12, 69, 83), bien que son association à ce syndrome semble moins fréquente que celle de *Blastocystis hominis* (84).

Les traitements de la dientamoébose (Tableau IV) ont

Tableau III - Milieu diphasique pour culture de protozoaires.

Le milieu diphasique comprend :

- Une base solide : sérum de cheval coagulé en pente.
- Un milieu nutritif liquide : liquide de Ringer enrichi en sérum de cheval.
- De l'amidon de riz.

BASE : sérum de cheval coagulé

- Décongeler le sérum de cheval.
- Distribuer 3 à 4 mL de sérum stérilement dans des tubes de verre de 10 cm de long et bouchés avec des bouchons en plastique (préalablement autoclavés).
- Mettre à coaguler au four à 90°C, tubes inclinés à 30° de l'horizontale, pendant 1 à 2 heures.

LIQUIDE : Ringer 7 volumes + Sérum de cheval 1 volume

Liquide de Ringer :

NaCl	6,5 g
KCl	0,25 g
CaCl ₂	0,30 g
Eau distillée	900 mL
NaHCO ₃	0,20 g
Eau distillée	100 mL

- Autoclaver séparément les 2 solutions ainsi que le matériel (tubes, éprouvettes,...).
- Mélanger les deux solutions refroidies.

Sérum de cheval :

- 140 mL de sérum de cheval qu'on ajoute au litre de liquide de Ringer.
- Distribuer stérilement en remplissant des tubes à vis.
- Si on prépare du Ringer avec antibiotiques, ajouter par litre avant distribution :

Pénicilline G	1 million d'UI
Streptomycine	1 g (ou Gentamicine 400 mg)

Les milieux de Ringer avec et sans antibiotiques sont à renouveler tous les 15 jours.

AMIDON : crème de riz

- Répartir environ 1 à 2 g en tubes à hémolyse stériles bouchés avec du coton.
- Tyndalliser au four Pasteur à 60°C 3 fois 1 h sur 3 jours.

Emploi :

Pour reconstituer le milieu, utiliser du Ringer avec antibiotique pour les selles et du Ringer sans antibiotique pour les pus d'abcès, biopsies...

- Verser une petite quantité d'amidon dans le tube contenant la base.
- Recouvrir la base de liquide de Ringer (± 5 ml).
- Inoculer un fragment de selles, de glaire, de mucus ou de pus.
- Dilacérer contre la paroi du tube.
- Mettre le tube vertical à l'étuve.
- À 24 h, 48 h, 72 h, prélever avec une pipette Pasteur coupée large, à l'interface entre l'amidon et la selle.
- Lire entre lame et lamelle sur la platine chauffante à 37°C.

Tableau IV - Traitements de la dientamoebiose d'après Lagacé-Wiens et coll. (42), Stark et coll. (65), Girginkardesler et coll. (25), et Kurt et coll. (41).

Médicament (<i>per os</i>)	Posologie (par jour)	Durée du traitement (jours)
Métronidazole	400 à 750 mg	3 à 10
Secnidazole / Ornidazole	2 g	1
Iodoquinol	650 mg	10
Paromomycine	8-12 mg/kg	7 à 10
Doxycycline	100 mg	10

souvent recours, en première intention, au métronidazole en cure prolongée de 3 à 10 jours. Devant les échecs survenant avec cette molécule (21,4 %) Stark et coll. (62) utilisent avec succès la paromomycine ou l'iodoquinol administré seul ou en association avec la doxycycline. D'autres auteurs préconisent de remplacer le métronidazole par un autre nitro-5-imidazolé : le secnidazole (25) ou l'ornidazole (41), administré en une seule prise.

VII. - PRÉVALENCE

A) Données de la littérature

Dientamoeba fragilis est un protiste cosmopolite largement distribué dans toutes les régions du globe. Même si elle représente une cause de diarrhée du voyageur (64), elle est en fait aussi fréquente dans les pays industrialisés que dans ceux en voie de développement. La dientamibe est en effet l'un des parasites intestinaux les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme avec des prévalences pouvant dépasser 50 %, mais ces taux très élevés sont recensés dans des communautés dont les conditions d'hygiène sont précaires (48). Le **tableau V** présente un aperçu non exhaustif d'enquêtes publiées depuis une dizaine d'années. La majorité d'entre elles fait apparaître une prévalence élevée de la dientamoebiose, qui est fréquemment supérieure à celle de la giardiose (13, 42). Il n'est pas rapporté de variation saisonnière. L'association dientamibe - blastocystis est très souvent constatée. Si dans la plupart de ces études, les fréquences semblent indépendantes du sexe des patients, les résultats sont parfois opposés en ce qui concerne la tranche d'âge la plus touchée : pour Stark et coll (62) les enfants sont les plus atteints alors que pour Crotti (13) la prévalence est beaucoup plus élevée chez les adultes.

B) Notre expérience aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Lors d'une suspicion de protozoose intestinale, le laboratoire de coprologie effectue systématiquement sur chaque prélèvement les examens suivants :

- une observation microscopique directe sur platine chauffante,
- une coloration par la technique du MIF,
- une mise en culture sur milieu diphasique.

Ces examens sont pratiqués immédiatement sur des selles émises au laboratoire. Si le patient ne peut s'exonérer sur place, ces techniques ne sont mises en œuvre que si les selles sont apportées dans un délai de moins d'une heure après leur émission.

De janvier 2006 à mai 2010, 878 analyses ont été pratiquées sur 664 patients. Les résultats concernant *Dientamoeba fragilis* sont résumés dans le **tableau VI**. La prévalence de *Dientamoeba fragilis* est de 9,3 % et les résultats positifs augmentent de cent pour cent par la mise en culture. Les autres protistes entéropathogènes les plus souvent diagnostiqués dans cette série sont : *Blastocystis hominis* : 200/664 (30,1 %), *Entamoeba histolytica/dispar* : 38/664 (5,7 %), *Giardia duodenalis* : 35/664 (5,2 %). La dientamibe est associée 56 fois sur 200, soit dans 28 % des cas, à *Blastocystis hominis*. Les autres associations les plus fréquentes sont celles avec *Entamoeba coli* (16), *Endolimax nana* (13), *Entamoeba histolytica/dispar* (12, dont 1 *Entamoeba histolytica*).

Ces résultats viennent à l'appui des études déjà publiées (13, 42) puisque la dientamibe apparaît comme le second protiste diagnostiqué après *Blastocystis hominis* dans les prélèvements analysés pour suspicion de protozoose intestinale. Ils montrent en outre l'intérêt de pratiquer des examens extemporanés, comme le demande la nomenclature, et l'efficacité incontestable de la mise en culture. Si les frottis fécaux colorés peuvent apporter des résultats utiles au diagnostic de la dientamoebiose, il n'en demeure pas moins vrai que leur réalisation comme leur lecture n'est pas plus facile que celle de l'examen direct, qui seul permet d'observer le mouvement si caractéristique de la dientamibe.

VIII. - CONCLUSION

Le diagnostic coprologique parasitaire reste un exercice délicat puisqu'il repose toujours sur la mise en œuvre de techniques manuelles associées à une recherche de critères morphologiques qui comprend une part d'interprétation subjective. Le diagnostic de *Dientamoeba fragilis* illustre bien cette difficulté puisqu'il ne peut se faire que sur la reconnaissance d'un seul stade fragile, la forme végétative, et c'est certainement pour cette raison qu'il est nettement sous-estimé. En 1991, Grendon et coll. (28) analysant les résultats d'un contrôle de qualité national aux États-Unis relevaient déjà la faiblesse des performances de ce diagnostic puisque 6 laboratoires sur 34

Tableau V - Publications récentes (2001-2010) sur le diagnostic coprologique de *D. fragilis*.

Publication	Pays	Prévalence	Nombre de patients	Examen direct ± frottis	Culture	PCR
Stark D et coll. 2010 (61)	Australie	5,5 %	472	+ (2,1 %)		+ (5,5 %)
Guidetti C et coll. 2010 (29)	Italie	1 %	1 343	+		
González-Moreno O et coll. 2010 (27)	Espagne	1,6 %	8 313	+		
Yakoob J et coll. 2010 (84)	Pakistan	3 %	171	+ (2 %)	+ (3 %)	+ (2 %)
Calderaro A et coll. 2010 (7)	Italie	21,4 %	491	+	+ (9,2 %)*	+ (21,4 %)
Stark D et coll. 2010 (63)	Australie	5,4 %	650	+ (1,8 %)	+ (2,1 %)	+ (5,4 %)
Ta Cengiz Z et coll. 2009 (74)	Turquie	0,4 %	2 975	+		
Bruijnesteijn van Coppenraet et coll. 2009 (4)	Pays-Bas	30,7 %	397	+ (17,4 %)		+ (30,7 %)
Schuster H, Jackson RS. 2009 (58)	Grande-Bretagne	14,6 % (2002-4) 16,9 % (2005-6)	543 421	+		
Hamzé M et coll. 2008 (30)	Liban	3,9 %	308	+		
Menghi CI et coll. 2007 (47)	Argentine	2,7 %	112	+		
Rayan HZ et coll. 2007 (54)	Egypte	29,8 %	168	+ (8,9 %)	+ (29,8 %)	
Kassem HH et coll. 2007 (39)	Libye	2 %	350	+		
Stensvold CR et coll. 2007 (71)	Danemark	11 %	103	+		
Crotti D, D'Annibale ML. 2007 (27)	Italie (2004)	3,4 %	1 141	+		
Karaman U et coll. 2006 (38)	Turquie	0,8 %	241	+		
El Shazly AM et coll. 2006 (20)	Egypte	5,1 %	3 180	+		
Vandenberg O et coll. 2006 (77)	Belgique	6,3 %	448	+		
Garg PK et coll. 2005 (23)	USA (réfugiés)	3 %	533	+		
Crotti D et coll. 2005 (13) Crotti D, D'Annibale ML. 2007 (11)	Italie (2002-2003)	4,1 %	1 989	+		
Stark D et coll. 2005 (67)	Australie	0,9 %	6 750	+		+ **
Tanyuksel M et coll. 2005 (73)	Turquie	2,3 %	380	+		
De Canale E et coll. 2003 (16)	Italie (2001)	2 %	2 500	+		
Windsor JJ et coll. 2003 (82)	Grande-Bretagne	2,6 %	976	+ (1,3 %)	+ (2,6 %)	
Girginkardesler N et coll. 2003 (25)	Turquie	8,8 %	400	+		
Crotti D, D'Annibale ML. 2001 (10)	Italie (1999)	11,3 %	151	+		

* : Examen direct + culture. ** : Dans cet article, la PCR est utilisée comme technique de confirmation.

totalisaient 82 % des diagnostics de dientamibe (sur selles fixées). Mais aujourd'hui, à l'heure de l'accréditation, comment le biologiste peut-il assurer la qualité d'un tel examen ? Deux articles récents montrent que des spécialistes s'investissent dans cette démarche.

En 2008, Libman et coll. (44), du centre de Médecine Tropicale Mc Gill de Montréal, mettent au point un contrôle interne de détection des protozoaires pathogènes (*Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia duodenalis*, *Dientamoeba fragilis*). Les tests proposent une évaluation par des relectures en aveugle d'échantillons de selles contenant des protozoaires fixées au SAF. La concordance des observations est relativement bonne pour les entamibes et giardia... mais plus faible pour la dientamibe !

Le second article, paru fin 2010, aborde le contrôle externe (75). Il s'agit de laboratoires référents européens qui sont évalués dans le but d'organiser un réseau de contrôle qualité. Plus de vingt parasites (protozoaires et helminthes) sont répertoriés et des comparaisons des performances sont commentées... mais une espèce manque dans la liste : la dientamibe !

Ces articles montrent comment il est difficile d'avoir un référentiel pour ce type de diagnostic tant que les techniques moléculaires et/ou d'immunochromatographie n'ont pas remplacé le microscope et que les échantillons de contrôle de qualité ne peuvent pas reproduire la situation de l'examen tel qu'il est pratiqué au laboratoire. C'est pourquoi nous ne pouvons que conseiller aux biologistes de respecter les règles élémentaires de bonne pratique de

Tableau VI - Prévalence de *Dientamoeba fragilis* (janvier 2006-mai 2010 Strasbourg).

Nombre total de patients	664
Nombre total d'exams	878
<i>Dientamoeba fragilis</i> :	
- Examen direct sur platine chauffante	42/878 (4,7 %)
- Culture	84/878 (9,6 %)
Nombre de patients porteurs de <i>D. fragilis</i>	62/664 (9,3 %)
Associations :	
<i>D. fragilis</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	56
<i>D. fragilis</i> + <i>B. hominis</i> + protozoaires	28
<i>D. fragilis</i> + protozoaires	10

l'examen parasitologique des selles et en particulier celle de l'examen direct extemporané lors d'une suspicion de protozoose.

IX. - REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient toutes les personnes qui ont contribué aux analyses présentées dans ce travail, en particulier les biologistes, les internes, les techniciennes et les techniciens du laboratoire de parasitologie – mycologie médicale des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Ayadi A, Bahri I. *Dientamoeba fragilis*: flagellé pathogène? *Bull Soc Pathol Exot.* 1999 ; **92** (5) : 299-301.
- (2) Barratt JL, Banik GR, Harkness J, Marriot D, Ellis JT, Stark D. Newly defined conditions for the in vitro cultivation and cryopreservation of *Dientamoeba fragilis*: new techniques set to fast track molecular studies on this organism. *Parasitology.* 2010 ; **137**(13) : 1867-78.
- (3) Bart A, van der Heijden HM, Greve S, Speijer D, Landman WJ, van Gool T. Intragenomic variation in the internal transcribed spacer 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. *J Clin Microbiol.* 2008 ; **46** (10) : 3270-5.
- (4) Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Wallinga JA, Ruijs GJ, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect.* 2009 ; **15** (9) : 869-74.
- (5) Burrows RB, Swerdlow MA. *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1956 ; **5** (2) : 258-65.
- (6) Burrows RB, Swerdlow MA, Frost JK, Leeper CK. Pathology of *Dientamoeba fragilis* infections of the appendix. *Am J Trop Med Hyg.* 1954 ; **3** (6) : 1033-9.
- (7) Calderaro A, Gorrini C, Montecchini S, Peruzzi S, Piccolo G, Rossi S, Gargiulo F, Manca N, Dettori G, Chezzi C. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 ; **67** (3) : 239-45.
- (8) Camp RR, Mattern CF, Honigberg BM. Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I. Electron microscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *J Protozool.* 1974 ; **21** (1) : 69-82.
- (9) Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002 ; **15** (3) : 329-41.
- (10) Crotti D, D'Annibale ML. *Dientamoeba fragilis* and dientamoebiasis: aspects of clinical parasitology and laboratory diagnosis. *Parassitologia.* 2001 ; **43** (3) : 135-8.
- (11) Crotti D, D'Annibale ML. Intestinal infections caused by *Dientamoeba fragilis* and *Giardia duodenalis* in our experience. *Recenti Prog Med.* 2007 ; **98** (6) : 361-6.
- (12) Crotti D, D'Annibale ML. Role of *Dientamoeba fragilis* in human bowel infections. *Infez Med.* 2007 ; **15** (1) : 30-9.
- (13) Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Lalle M, Cacciò SM, Pozio E. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite.* 2005 ; **12** (2) : 165-70.
- (14) Crotti D, Sensi M, Crotti S, Grelloni V, Manuali E. *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Vet Parasitol.* 2007 ; **145** (3-4) : 349-51.
- (15) Cuffari C, Oligny L, Seidman EG. *Dientamoeba fragilis* masquerading as allergic colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998 ; **26** (1) : 16-20.
- (16) De Canale E, Tessari A, Campion L, Rossi L. *Dientamoeba fragilis*: is it really fragile? Approach to specimen handling and rapid microscopic diagnosis. *Parassitologia.* 2003 ; **45** (1) : 19-22.
- (17) Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. I Quantitative fluorescent antibody methods. *J Protozool.* 1972 ; **19** (2), 316-25.
- (18) Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. II Gel diffusion methods. *J Protozool.* 1972 ; **19** (2), 326-32.

- (19) Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. III Immunoelectrophoresis technics. *J. Protozool.* 1974; **21** (1), 139-45.
- (20) El Shazly AM, Awad SE, Sultan DM, Sadek GS, Khalil HH, Morsy TA. Intestinal parasites in Dakahlia governorate, with different techniques in diagnosing protozoa. *J Egypt Soc Parasitol.* 2006; **36** (3) : 1023-34.
- (21) Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. *J Clin Microbiol.* 1998; **36** (7) : 1974-6.
- (22) Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate and mercuric chloride based compounds for use in Schaudinn's fixative. *J Clin Microbiol.* 1993; **31** (2) : 307-10.
- (23) Garg PK, Perry S, Dorn M, Hardcastle L, Parsonnet J. Risk of intestinal helminth and protozoan infection in a refugee population. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; **73** (2) : 386-91.
- (24) Gerbod D, Edgcomb VP, Noël C, Zenner L, Wintjens R, Delgado-Viscogliosi P, Holder ME, Sogin ML, Viscogliosi E. 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.
- (25) Girginkardesler N, Co kun S, Cüneyt Balcio lu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin Microbiol Infect.* 2003; **9** (2) : 110-3.
- (26) Girginkardesler N, Kurt O, Kilimcio lu AA, Ok UZ. Transmission of *Dientamoeba fragilis*: evaluation of the role of *Enterobius vermicularis*. *Parasitol Int.* 2008; **57** (1) : 72-5.
- (27) González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 2011; **108** : 87-93.
- (28) Grendon JH, Digiacomo RF, Frost FJ. *Dientamoeba fragilis* detection methods and prevalence: a survey of state public health laboratories. *Public Health Rep.* 1991; **106** (3) : 322-5.
- (29) Guidetti C, Ricci L, Vecchia L. Prevalenza delle parassitosi intestinali a Reggio Emilia e provincia nel corso del 2009. *Infez Med.* 2010; **18** (3) : 154-61.
- (30) Hamzé M, Naja M, Mallat H. Biological analysis of workers in the food sector in north Lebanon. *East Mediterr Health J.* 2008; **14** (6) : 1425-34.
- (31) Hauck R, Hafez HM. Partial sequence of the beta-tubulin of *Histomonas meleagridis* and the activity of benzimidazoles against *H. meleagridis* *in vitro*. *Parasitol Res.* 2009; **104** (5) : 1183-9.
- (32) Hauck R, Hafez HM. Systematic position of *Histomonas meleagridis* based on four protein genes. *J Parasitol.* 2010; **96** (2) : 396-400.
- (33) Hussein EM, Al-Mohammed HI, Hussein AM. Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting curve (HRM) analysis. *Parasitol Res.* 2009; **105** (4) : 1053-60.
- (34) Ito R, Sakagami J, Kataoka K, Nakamura H, Motoyoshi T, Takada R, Kanemitsu D, Yasuda H, Mitsufuji S, Okanoue T. Chronic diarrhea and protein-losing gastroenteropathy caused by *Dientamoeba fragilis*. *J Gastroenterol.* 2004; **39** (11) : 1117-9.
- (35) Jepps MW, Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., new intestinal amoeba from man. *Parasitology* 1918; **10** : 352-67.
- (36) 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.
- (37) Johnson JA, Clark CG. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J Clin Microbiol.* 2000; **38** (12) : 4653-4.
- (38) Karaman U, Atambay M, Aycan O, Yolo lu S, Daldal N. Incidence of intestinal parasites in municipal sanitary workers in Malatya. *Turkiye Parazitolo Derg.* 2006; **30** (3) : 181-3.
- (39) Kassem HH, Zaed HA, Sadaga GA. Intestinal parasitic infection among children and neonatus admitted to Ibn-Sina Hospital, Sirt, Libya. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007; **37** (2) : 371-80.
- (40) Kohn J. A one-stage permanent staining method for faecal protozoa. *Dipim Refuin Med Quart Israël.* 1960; **19** : 160-1.
- (41) Kurt O, Girginkarde 1^{er} N, Balcio lu IC, Orbilgin A, Ok UZ. A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of *dientamoebiasis*. *Clin Microbiol Infect.* 2008; **14** (6) : 601-4.
- (42) Lagacé-Wiens PR, VanCaeseele PG, Koschik C. *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. *CMAJ.* 2006; **175** (5) : 468-9.
- (43) Lamy L, Lamy H, Crignon I, Thiebault M. La technique de Kohn au noir chlorazol pour la coloration des protozoaires. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1966; **59** : 70-3.
- (44) Libman MD, Gyorkos TW, Kokoskin E, Maclean JD. Detection of pathogenic protozoa in the diagnostic laboratory: result reproducibility, specimen pooling, and competency assessment. *J Clin Microbiol.* 2008; **46** (7) : 2200-5.
- (45) Menghi CI, Makiya R, Gatta CL, Méndez OC. *Dientamoeba fragilis* : Técnicas moleculares para dilucidar su modo de transmisión. *Parasitol Latinoam.* 2005; **60** : 25-31.
- (46) Menghi CI, Gatta CL, Makiya R, Méndez OC. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitol Latinoam.* 2006; **61** : 146-51.
- (47) Menghi CI, Iuvaro FR, Dellacasa MA, Gatta CL. Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. *Medicina (B Aires).* 2007; **67** (6 Pt2) : 705-8.
- (48) Millet V, Spencer MJ, Chapin M, Stewart M, Yatabe JA, Brewer T, Garcia LS. *Dientamoeba fragilis*, a protozoan parasite in adult members of a semi-communal group. *Dig Dis Sci.* 1983; **28** (4) : 335-9.
- (49) Ockert G. Zur Epidemiologie von *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell, 1918. 2.Mitteilung: Versuch der Übertragung der Art mit *Enterobius* Eiern. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1972; **16** (2) : 222-5.
- (50) Ockert G. Zur Epidemiologie von *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell, 1918. 3.Mitteilung: Weitere zur Übertragung der Art mit *Enterobius* Eiern. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1975; **19** (1) : 17-21.
- (51) 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.
- (52) Portús M, Prats G. Contribution to the knowledge of intestinal protozoa infestation in the hospital population of Barcelona. *Med Clin (Barc).* 1981; **76** (5) : 203-5.
- (53) Preiss U, Ockert G, Brömme S, Otto A. *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klin Padiatr.* 1990; **202** (2) : 120-3.
- (54) Rayan HZ, Ismail OA, El Gayar EK. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007; **37** (2) : 599-608.
- (55) Robinson GL. Laboratory cultivation of some human parasitic amoebae. *J Gen Microbiol.* 1968; **53** : 69-79.
- (56) Sapero JJ, Lawless DK, Strome CP. An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. *Science* 195; **114** (2969), 550-1.
- (57) Sawangjaroen N, Luke R, Procvic P. Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhoea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; **87** (2) : 163-5.
- (58) Schuster H, Jackson RS. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* among patients consulting complementary medicine practitioners in the British Isles. *J Clin Pathol.* 2009; **62** (2) : 182-4.
- (59) Schwartz MD, Nelson ME. *Dientamoeba fragilis* infection presenting to the emergency department as acute appendicitis. *J Emerg Med.* 2003; **25** (1) : 17-21.
- (60) Silberman JD, Clark CG, Sogin ML. *Dientamoeba fragilis* shares a recent common evolutionary history with the trichomonads. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; **76** (1-2) : 311-4.
- (61) Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. An evaluation of a multiplex tandem real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium* spp, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *J Clin Microbiol.* 2011; **49** (1) : 257-62.
- (62) Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; **82** (4) : 614-9.

- (63) Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Comparison of microscopy, two xenic culture techniques, conventional and real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in clinical stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; **29** (4) : 411-6.
- (64) Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. *Dientamoeba fragilis* as a cause of travelers' diarrhea: report of seven cases. *J Travel Med*. 2007; **14**(1) : 72-3.
- (65) Stark DJ, Beebe N, Marriott D, Ellis JT, Harkness J. Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. *Trends Parasitol*. 2006; **22** (2) : 92-6.
- (66) 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.
- (67) 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.
- (68) 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.
- (69) Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol*. 2007; **37** (1) : 11-20.
- (70) Stark D, Phillips O, Peckett D, Munro U, Marriott D, Harkness J, Ellis J. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Vet Parasitol*. 2008; **151** (1) : 21-6.
- (71) Stensvold CR, Arendrup MC, Mølbak K, Nielsen HV. The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clin Microbiol Infect*. 2007; **13** (8) : 839-42.
- (72) Talis B, Stein B, Lengy J. *Dientamoeba fragilis* in human feces and bile. *Isr J Med Sci*. 1971; **7** (9) : 1063-9.
- (73) Tanyuksel M, Yilmaz H, Ulukanligil M, Araz E, Cicek M, Koru O, Tas Z, Petri WA Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Exp Parasitol*. 2005 Jul; **110** (3) : 322-6.
- (74) Ta Cengiz Z, Akbayram S, Çiçek M, Yilmaz H. Intestinal parasitoses detected in primary school children in the Van province. *Türkiye Parazitol Derg*. 2009; **33** (4) : 289-93.
- (75) Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N, Gulletta M, Lebbad M, Manser M, Matthys B, N'Goran EK, Tannich E, Vounatsou P, Marti H. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2010; **16** (3) : 267-73.
- (76) Van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. Triple faeces test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22** : 284-90.
- (77) Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, Scheen R, Retore P, Ziss G, van Gool T. Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: a comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *Int J Infect Dis*. 2006; **10** (3) : 255-61.
- (78) 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.
- (79) Wheatley WB. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. *Am J Clin Pathol*. 1951; **21** : 990-1.
- (80) Windsor JJ, Macfarlane L, Clark CG. Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J Eukaryot Microbiol*. 2006; **53** (3) : 188-92.
- (81) Windsor JJ, Johnson EH. More laboratories should test for *Dientamoeba fragilis* infection. *BMJ*. 1999; **318** (7185) : 735.
- (82) Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Continuing Education Topics and Issues*. 2004; **280** : 144-8.
- (83) Windsor JJ, Macfarlane L. Irritable bowel syndrome: the need to exclude *Dientamoeba fragilis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; **72** (5) : 501.
- (84) Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. Blastocystis hominis and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res*. 2010; **107** (3) : 679-84.
- (85) 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.
- (86) Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am J Trop Clin Pathol*. 1977; **67** (3), 300-4.
- (87) Zenner L. Données actuelles sur l'infection à *Histomonas meleagridis* chez les volailles. *Bull Acad Vét. France* 2005; **158** (2) : 161-6.