AF158

پژوهش و سازندگی
در
امور دام و آبزیان شماره ۸۰ پاییز ۱۳۸۷

مطالعه هیستوپاتولوژیک آلودگی *Pnumocystis carinii* در ریه رت های با ایمنی سرکوب شده

• **عبدالحسین دلیمی اصل**
استاد گروه انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
• **پروانه صیفوری**
آسیب شناس، سازمان دامپزشکی کشور
• **حسن مروتی**
کارشناس ارشد بخش کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
Email: dalimi4@yahoo.com

چکیده

(*Pneumocystis jiroveci*) (*Pnumocystis carinii*) عامل عفونی فرصت طلبی است که در آلوئل های انسان و حیوانات یافت می شود *Pnumocystis carinii* یکی از مهمترین عوامل پنومونی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی است. در این مطالعه که برای تعیین نقش *Pnumocystis carinii* در ایجاد پنومونی در ریه رت هایی که دچار سرکوب ایمنی بودند طراحی گردیده بود ابتدا به کمک داروی متیل‌پردنیزولون از روش سرکوب سیستم ایمنی برای تولید *Pnumocystis carinii* در رت استفاده شد. سپس رت ها را کشته و برای اطمینان از صحت آلودگی، یک گسترش فشاری (Impression smear) از نمونه بر روی لام تهیه کرده، سپس لام‌های حاوی گسترش فشاری با دو روش رنگ آمیزی گیمسا و رنگ آمیزی گوموری متنامین نقره(GMS) رنگ آمیزی و موردبررسی قرار گرفتند. از بافت ریه نیز نمونه آسیب شناسی تهیه و پس از رنگ آمیزی با روش های هماتوکسیلین وائوزین (H&E)، گیمسا و گوموری متنامین نقره (GMS) مورد مطالعه قرار گرفتند. طبق نتایج حاصله، ریه رت ها بزرگ و سنگین با قوام سفت بوده است. در بررسی هیستوپاتولوژی بافت ها، وجود کیست انگل در دیواره آلوئول ها و وجود ترشحات ائوزینوفیلی همراه با کف در آلوئول های لانه زنبوری کاملاً مشهود بود. دیواره آلوئول ها ضخیم شده و یک التهاب بینابینی واضح با نفوذ سلول های آماسی با غالبیت پلاسما سل، پر خونی و ادم بینابینی به ویژه در بافت همبند بین لوبولی قابل مشاهده بود. در ارتباط با مشاهده انگل در گسترش و بافت ریه، روش رنگ آمیزی گوموری متنامین نقره از روش های دیگر بسیار مناسب تر بوده است.

کلمات کلیدی: *Pnumocystis carinii*، رت، هیستوپاتولوژی، پنومونی بینابینی پلاسماسلی.

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 143 - 148

Histopathology of *Pneumocystis carinii* in the lung of immunodeficient rats

By: Dalimi, A. Parasitology Dept., Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University,, Tehran, Iran. Seyfoori, P. Iranian Veterterinary Organisation and Morovati H. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Pneumocystis carinii or *P.jiroveci* is an opportunistic agent living in human and animal lungs. P.carinii was found to be an important patant pathogen causing pneumocytosis in immunosupressed hosts. In the present work, immune system of rats (*Sprague dawley*) was supressed by methyl prednisolone firstly. Then the infected rats were killed and impression smear was prepared from their lungs. The smears were stained by geimsa and Gomori's methenamine silver (GMS) methods. Inaddition, the infected lungs were cut and tissue sections were prepared for histological study. The tissue sections were stained by H&E, geimsa and Gomori's methenamine silver methods. Results indicated that, the infected lungs were found enlarged and heavy with a firm rubbery consistency. The principal finding on examination of lung section is the presence of the parasite cysts attached to the alveolar septa and hyaline foamy granular eosinophilic exudate in the honycomb from alveoli. The alveolar septa are thickened and there is typically interstitial inflammation with proliferation of plasma cells, congestion and intra-lobolary eodema in connective tissue. For detection of *P.carinii* organisms either in smear or in tissue section, the GMS staining was found more convenient.

Key words: *Penumocystis carinii,* Histopathology, Rats, Plasma cell interstitial pneumonia

مقدمه

Pnumocystis carinii یا *Pneumocystis jiroveci* عامل عفونی فرصت طلبی است که در گذشته به عنوان تک یاخته و امروزه براساس مطالعات انجام شده برروی اسیدنوکلئیک آن (RNA) و آنالیزهای بیوشیمیایی آن، جایگاهی در میان قارچ ها یافته است. (۱، ۴، ۵) این عامل در آلوئل های انسان و حیوانات، تحت شرایط خاص موجب اختلال عملکرد دستگاه تنفس و پنومونی پنوموسیستی در انسان، سگ و اسب و خوک و بز و موش و رت و میمون می گردد. ارگانیسم در ریه بسیاری از حیوانات بدون هیچ گونه علامت بالینی مشاهده می شود ولی بیماری ناشی از آن در میزبانانی که از نقص و یا اختلال سیستم ایمنی رنج می‌برند مشاهده می‌گردد (۴- ۱) این ارگانیسم حداقل ۲ مرحله تروفوزوئیت وکیست داشته که در آلوئل های ریوی مشاهده شده‌اند و در شرایط خاص در سایر بافت ها نیز دیده می‌شوند. ترفوزوئیت‌ها اجرام آمیبی شکل با قطر ۵-۱ میکرومتر با هسته‌ای کوچک و سیتوپلاسمی ظریف و کیست‌ها نیز با دیواره ضخیم به قطر ۸-۴ میکرومترکه ۸ اسپوروزوئیت یا اجسام داخل کیستی با اشکال هلالی و یا فنجانی مشاهده می‌شوند (۲، ۳).

تروفوزوئیت‌ها علاوه بر طی سیکل جنسی خود قادرند از طریق تقسیم دوتایی نیز تکثیر یابند. به نظر می‌رسد که در موارد ضعف شدید ایمنی در میزبان تقسیم دوتایی افزایش می‌یابد بنابراین در این میزبانان تروفوزوئیت‌ها به تعداد بیشتر مشاهده می‌گردند (۲) هر چند که تروفوزوئیت‌ها به ندرت در سیتولوژی و هیستوپاتولوژی مشاهده می‌شوند و تشخیص غالباً بر مبنای مشاهده اشکال کیستی ارگانیسم صورت می‌پذیرد. (۱، ۴) ولی تشخیص هنوز بر پایه سیتولوژی و هیستوپاتولوژی انجام می‌گیرد. چرا که آزمایشات سرولوژی هنوز قابل اعتماد نیست و کشت این ارگانیسم نیز چندان ساده نیست (۱)

رنگ آمیزی نقره GMS (Gomories methenamin silver) بطور گسترده جهت رنگ آمیزی کیست انگل استفاده می‌شود که کیست انگل قهوه‌ای تیره با پوسته‌ای کلاپس کرده مشاهده می‌شوند. رنگ‌آمیزی رایت و گمیسا نیز جهت رنگ‌آمیزی تروفوزئیت‌ها بکار برده می‌شوند. در رنگ‌آمیزی نقره چنانچه رنگ‌زمینه (کنتراست) از گیمسا استفاده شود شرایط مطلوب جهت مشاهده تمام مراحل انگل فراهم می‌آید (۲) ایمونوپراکسیداز و ایمونوفلورسنت نیز روش های اختصاصی و معتبر برای تأیید تشخیص می‌باشند (۳). در این مطالعه ابتدا بصورت تجربی سیستم ایمنی رت سرکوب شده سپس از ریه آنها مقطع تهیه کرده و علایم آسیب شناسی آنها مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نحوه آلوده سازی رت ها

ابتدا ۶ سر رت ماده نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم از موسسه رازی تهیه شد. غذای رت نیز بصورت استریل تهیه و بسترآن‌ها هر روز با پوشال استریل تعویض می‌شد، قفس نیز هر بار بعد از تعویض بستر، با الکل و ساولن ضد عفونی و یکروز در میان قفس رت‌ها اتوکلاو و آب خوراکی رت‌ها هر روز با آب استریل تعویض می‌شد برای پیشگیری از آلودگی باکتریال و قارچی از ۱میلی گرم در میلی لیتر تتراسیکلن، ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر آمپی‌سیلین و ۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر آمفوتریسین در آب خوراکی استفاده شد. برای تولید پنوموسیستیس کارینی در رت ها از روش سرکوب سیستم ایمنی به کمک داروی متیل‌پردنیزولون به مقدار ۴۰ میلی لیتر در کیلوگرم هفته‌ای یکبار به مدت ۸ هفته بصورت زیرجلدی استفاده شد.

رت‌هـا در طول ۸ هفته پس از تزریق دچار کاهش چشـمگیر وزن، کم مویی، کمبود اشـتها و گوشه‌گیر شده و کمتر به تحریکات فیزیکی واکنش نشان می‌دادند (۶).

نحوه تهیه نمونه

بعد از کشتن رت‌ها با CO_2، ریه‌ها در زیر هود لامینارفلو از حیوان جدا و در داخل یک پتری‌دیش با اضافه کردن PBS بوسـیله یک پیپت اسـتریل شستشو شـد تا از خون‌های اضافی عاری شـود. پس از اینکه قسمت‌های غضروفی و چربی و بافت همبند و نای با قیچی جدا می‌شد با یک پنس ریه از قسـمت مرکز لب بلند شـده و با قیچی حاشیه‌های ریه برش خورده و جدا می‌شـد. محل برش برروی یک گاز اسـتریل به آرامـی فشـار داده تا خونها و مایعات اضافی جدا شـوند. برای اطمینان از صحت آلودگی، یک گسـترش فشـاری (Impression smear) از نمونه برروی لام تهیه شـد. برای این کار قسـمت برش داده شـده ریه محکم برروی لام فشار داده شد.

نحوه مطالعه هیستوپاتولوژی وگسترش های بافتی

سـپس لام‌های حاوی گسـترش فشـاری بـادو روش رنگ آمیزی گیمساجهت بررسی مراحل تروفوزوئیت و کیست اجرام پنوموسیستیس و رنـگ آمیزی گمـوری متنامین نقره(GMS) جهت بررسـی مراحل تروفوزوئیـت و کیسـت اجرام پنوموسیسـتیس، رنگ آمیـزی و مورد بررسـی قرار گرفت. از بافـت ریه نمونه هایی بـا ضخامت حداکثر ۰/۵ سـانتی متر تهیه ودر محلول ثبوتی فرمالین بافـر ۱۰٪ تثبیت گردید. پس از ثبوت نمونه های اخذ شـده،با اسـتفاده از درجات صعودی الکل اتیلیک، گزیلل و پارافین مذاب (۵۶ درجه سـانتیگراد) به ترتیب مراحل آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی انجام گردیده و بافت جهت تهیه بلوک پارافینی و برش مقاطع با ضخامت ۵ میکرون آماده گردید. اسـلایدهای حامـل مقاطع بافتی پس از رنگ آمیزی مونته گردیده و مورد بررسـی هیسـتوپاتولوژی قرار گرفتند. روش های رنگ آمیزی به کار گرفته شده در این بررسـی شامل رنگ آمیزی مورد اسـتفاده برای مطالعه عمومی بافت، روش هماتوکسیلین وائوزین (H&E)، رنگ آمیزی گیمسا و رنگ آمیـزی گموری متنامین نقـره (GMS) جهت رنـگ آمیزی افتراقی اشکال مختلف انگل استفاده گردید.

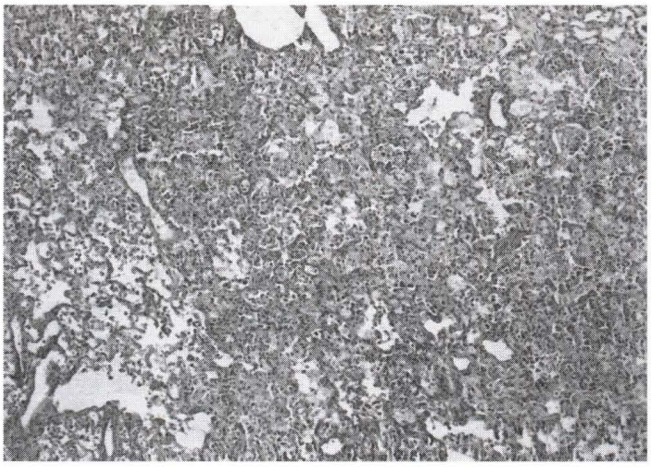
نتایج

چهره ماکروسکوپی مشاهده شده

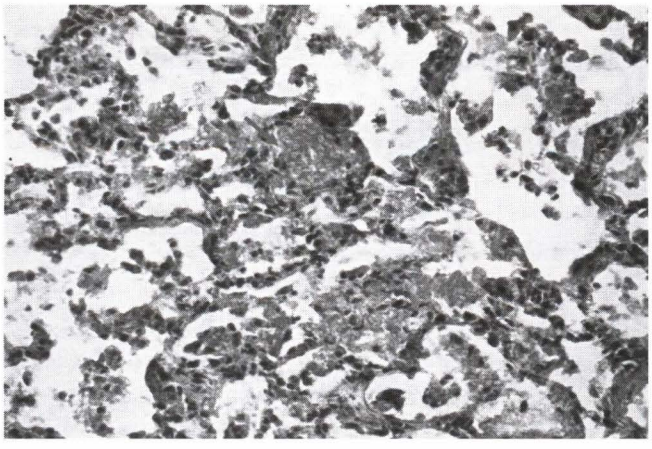
ریـه پر خون و بطور موضعی دارای قوام سـفت و کبدی بوده و در نواحی دیگر آمفیزم و آتلکتازی به چشـم می‌خورد. در مقطع برش ریه نواحی متراکم رنگ پریده و بدون هوا مشاهده شد.

مشاهدات هیستوپاتولوژی

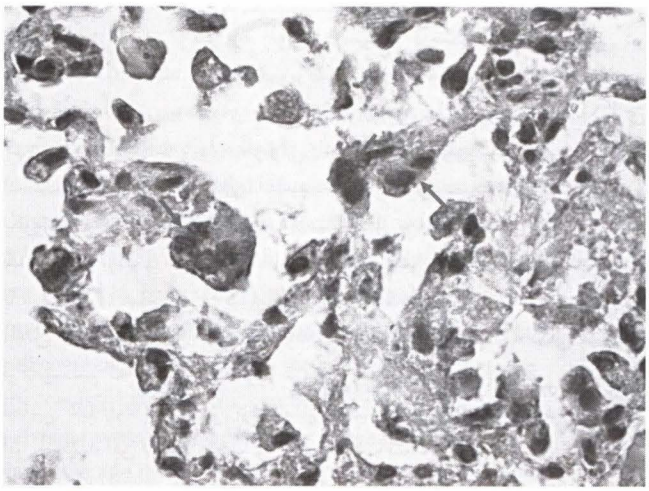
در بررسـی هیستوپاتولوژی اسلاید های بافتی تهیه شده موارد زیر مشـاهده گردید: گسـترش فضای بینابینی و نفوذ سلول های آماسی با غالبیت سلولهای تک هسته‌ای بویژه پلاسما سل که بیانگر یک پنومونی بینابینی پلاسماسـلی اسـت. پر خونی و ادم بینابینـی به ویژه در بافت همبند بین لوبولی و نیز ادم آلوئولی همراه با ترشـحات ائوزینوفیلی در آلوئول ها مشـاهده گردید(تصویر شماره ۱). پنومونی بینابینی و تهاجم سـلولهای آماسی به فضای بینابینی در برخی نواحی منجر به آتلکتازی گردیـده و تخریب دیواره آلوئولی باعث آمفیزم بصورت موضعی گردیده اسـت. فضای داخلی آلوئلها اغلب مملو از پنوموسـیت‌های کنده شده و نکروزه و ماکروفاژهای آلوئلی و پلاسماسـل و سـلول های آماسـی تک هسـته‌ای بوده و حضور اکسـودای ائوزینوفیلی کف آلـود نیز که همراه با سـلولهای آماسـی و اپیتلیالی کنده شـده می‌باشـند نیـز در برخی آلوئل ها به چشم می‌خورد. اکسودای ائوزینوفیلی مملو از اشکال کیستی ارگانیسـم که به صورت اجرام کروی که رنگ پذیری ضعیفی داشته‌اندو نمایی کف آلود به آن می دهند، می‌باشـد(تصویر شماره۲). در برخی از این آلوئلها، این اجرام زنجیر وار و پی‌در پی سطح اپیتلیوم پوششی آلوئل را پوشـانده‌اند(تصویر شـماره۹). دیو سـلول های تک هسته‌ای و چند هسـته‌ای در فضای آلوئلی مشـاهده می‌کردند(تصویر شماره۴) که در سیتوپلاسم برخی از آنها اجرام بلعیده شده به وضوح قابل مشاهده است (تصویر شماره۵).



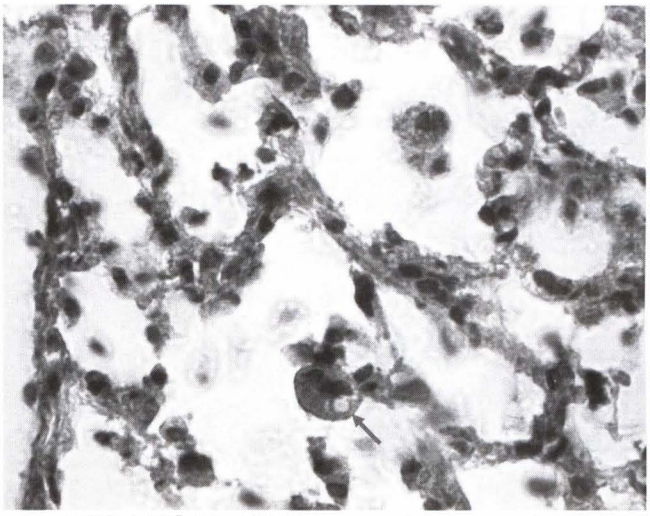
تصویر شماره ۱: پنومونی بینابینی همراه با ادم و ترشح اکسودای فراوان، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰x



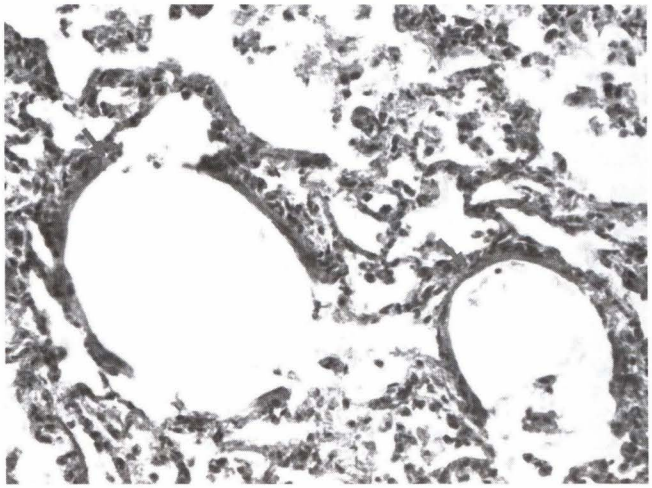
تصویر شماره ۲: حضور اکسودای کف آلود حاوی اشکال مختلف پنوموسیستیس، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰x



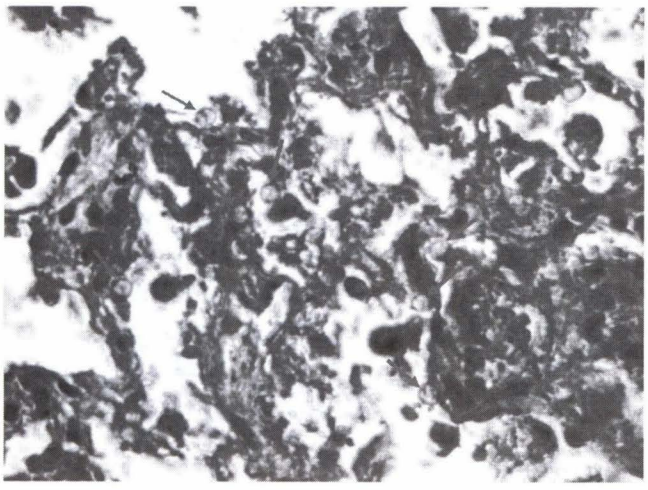
تصویر شماره ۳: حضور جاینت سلهای چند هسته ای(نوک پیکان ها)در فضای آلوئولی، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰x



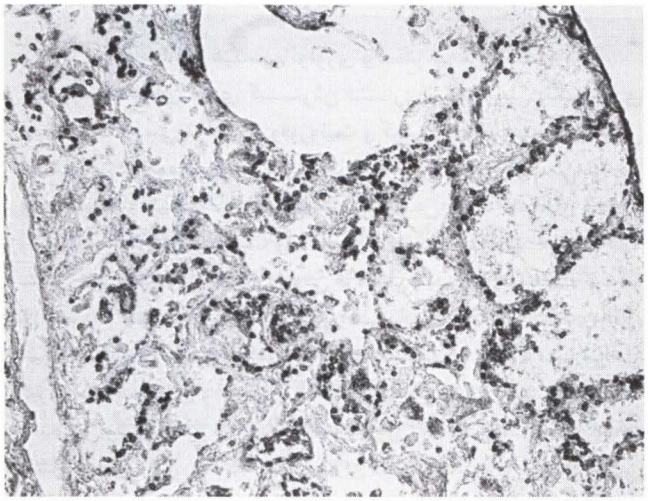
تصویر شماره ۵: حضور دیو سلولی های چند هسته ای(نوک فلش)در فضای آلوئولی که اشکال کیستی پنوموسیستیس بلعیده شده در سیتوپلاسم آن نمایان می باشد، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰۰x



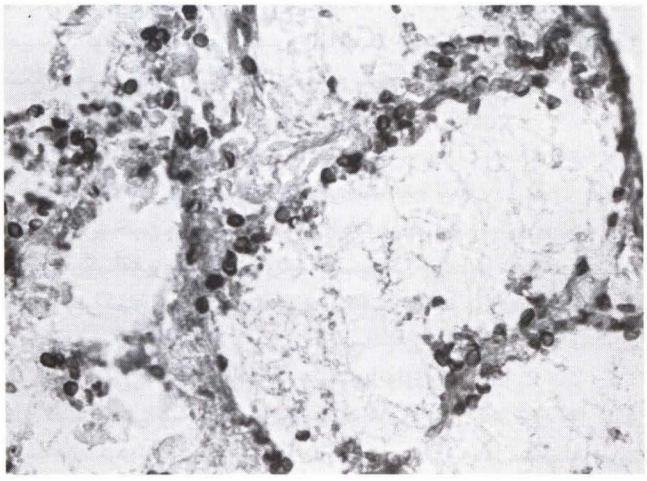
تصویر شماره۶: دو برونشیول که عاری از سلولهای پوششی گردیده اند، رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰x



تصویر شماره ۷: اجسام داخل کیستی و تروفوزوئیت که در کیستها در فضای آلوئلی و چسبیده به سطوح پوششی آن مشاهده می گردند. رنگ آمیزی گیمسای بافتی، بزرگنمایی ۱۰۰۰x



تصویر شماره ۸: اشکال کیستی پنوموسیستیس که در فضای بینابینی آلوئولها پراکنده اند و سطح کیسه های هوایی را پوشانده اند. رنگ‌آمیزی GMS ، بزرگنمایی ۱۰۰x



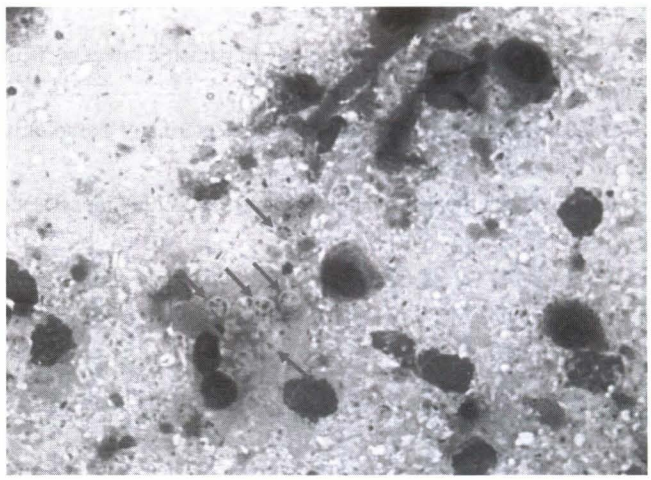
تصویر شماره ۹: اشکال کیستی پنوموسیستیس که سطح کیسه هوایی را فراگرفته اند (نمای بزرگتر تصویر شماره ۸). رنگ‌آمیزی GMS ، بزرگنمایی ۴۰۰x

مجاری هوایی و برونشیول ها نیز عاری از سلول های پوششی گشته و بقایای سلول‌های نکروزه در آنها به چشم می‌خورد (تصویر شماره۶).

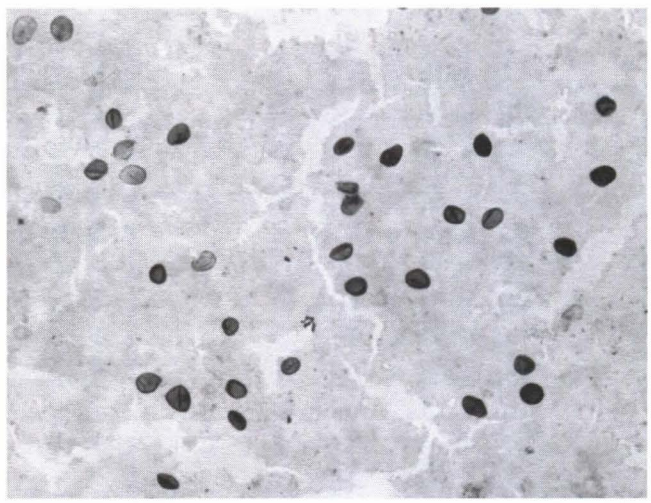
در اسلایدهای رنگ شده با روش H&E کیست های پنوموسیستیس به صورت خوشه هایی غوطه ور در اکسودای کف آلود داخل آلوئول ها و یا به صورت یک ردیف منظم سطح اپیتلیوم پوششی آلوئول ها را فرا گرفته اند(تصویر شماره۲).

در رنگ آمیزی نقره (GMS) این کیست ها با دیواره مشخص قهوه ای رنگ با اندازهای حدود ۸-۶ میکرون به وفور در آلوئولها مشاهده گردیدند (تصاویر شماره۸ و ۹).

در رنگ آمیزی گیمسای بافتی، کیست ها رنگ پذیری چندانی نداشته و به صورت اجرام کروی با رنگ پذیری ضعیف که حاوی اجسام داخل کیستی و تروفوزوئیت می باشند در آلوئول ها و نیز کست های پروتینی آلوئولی مشاهده شدند (تصویر شماره۷).



تصویر شماره ۱۰: تروفوزوئیت ها و اجسام داخل کیستی(نوک پیکان) در گسترش فشاری تهیه شده از بافت ریه. رنگ آمیزی گیمسای، بزرگنمایی ۱۰۰۰x



تصویر شماره ۱۱: کیست های بیضوی و چین خورده پنوموسیستیس در گسترش فشاری تهیه شده از بافت ریه رنگ آمیزیGMS، بزرگنمایی ۱۰۰۰x

در بررسی میکروسکوپی گسترش ها با رنگ آمیزی با روش گیمسا نیز تروفوزئیت ها و اجرام داخل کیستی به صورت نقاط یا اجسام میله ای تیره آبی تا بنفش رنگ که گاهی آرایش حلقوی داشتند مشاهده گردیدند (تصویر شماره۱۰).

در بررسی میکروسکوپی گسترش ها با رنگ آمیزی نقره(GMS) نیز پنوموسیستیس به صورت اجرام کروی یا بیضی ویا به صورت فنجانی شکل (اشکال کروی چروک خورده) توخالی به رنگ قهوه ای تا سیاه رنگ به قطر ۸-۶ میکرون مشاهده شدند (تصویر شماره۱۱).

بحث

در مطالعه پاتوژنز پنوموسیستیس در ریه معمولاً انگل با مجاری هوایی پایینی دستگاه تنفس آدابته است، سورفکتانت ترشح شده از پنوموسیت های تیپ دوم حاوی لیپو پروتئین هایی می باشند که به شدت به سطح خارجی پنوموسیستیس اتصال یافته لذا آلوئول های ریوی موضعی مطلوب برای استقرار این ارگانیسم می باشد سپس محکم به پنوموسیت‌ها بویژه تیپ یک اتصال می یابند، بگونه‌ای که سطوح انگلی زوائد در هم رفته‌ای را ایجاد نموده که باعث کشش سطح سلول های اپی‌تلیالی می‌گردند. این امر باعث کشیده شدن غشاء سلول های اپی‌تلیالی در بین اتصالات انگل می‌شود به گونه‌ای که منجر به تشکیل زوائد قلاب مانند سلول میزبان در بین سیتوپلاسم سلول های انگلی می‌شود. و این آسیب به غشای سلول های اپیتیالی سرانجام منجر به نکروز و کنده شدن آنها می‌گردد (۲).

در نمای ظاهری ریه مبتلا به پنوموسیستوزیس، ریه دارای قوام متراکم بوده که باعث بزرگ شدن آن شده به نحوی که حفره صدری را تقریباً پر می‌نماید. در مقطع برش ریه پارانشیم رنگ پریده، بدون هوا خشک و با قوام کبدی بدون درگیری پرده جنب مشاهده می‌شود. گاهی تغییرات آمفیزماتوز دیده می‌شود (۲) ندول های ترمیم یافته با دیواره فیبروزه و مراکز نکروزه شامل اجرام پاتوژن می‌باشند (۲، ۴).

ارگانیسم در آلوئل ها در مجاورت و چسبیده به پنوموسیت‌های تیپ یک و دو قرار می‌گیرند که اغلب با واکنش التهابی اندکی همراه است. اما سلول های پنوموسیت تیپ دو ممکن است بزرگ شوند. تداوم عفونت پنوموسیتی با ۳ مرحله بافت شناسی مشخص می‌گردد: ابتدا تعداد اندکی کیست مشاهده می‌شود. سپس سلول های اپیتلیوم آلوئلی کنده شده (تخریب آلوئلی) و با افزایش تجمع ارگانیسم، نفوذ سلول های التهابی رخ می‌دهد. در نهایت : هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول های پوششی آلوئلی همراه با تعداد فراوان ارگانیسم در اکسودای کف آلود داخل آلوئل مشاهده می‌شود، در این مرحله نیز نفوذ سلول های تک هسته‌ای ادامه می‌یابد (۲).

چهره میکروسکوپی پنومونی حاصل از این ارگانیسم شامل افزایش فضای بینابینی همراه با نفوذ سلول های آماسی با غالبیت پلاسما سل می‌باشد که باعث نامیده شدن این پنومونی به پنومونی بینابینی پلاسماسلی گردیده است. به علاوه آلوئل ها با اکسودای ائوزینوفیلی کف آلود (کست پروتئینی) پر شده‌اند که شامل تعداد بی شماری ارگانیسم در مراحل مختلف چرخه تکاملی خود می باشند این کست‌های پروتئینی آلوئلی (Proteinaceous alveolar casts) شامل اشکال

مختلف ارگانیسم می‌باشند. در آلوئل ها، سلول های اپی‌تلیالی کنده شده و نیز هیستوسیت‌های آلوئلی و نیز دیوسلول نیز مشاهده می‌گردند. (۲، ۳) چهره آماس بینابینی احتمالاً به علت عدم کفایت فعالیت فاگوسیتی سلول های فاگوسیتیک بروز می نماید. در میزبان هایی که دچار سندرم کمبود ایمنی می‌شوند هیستوسیت‌ها به هم ملحق شده و دیوسلول هائی را ایجاد می‌کنند که یا به صورت منفرد در آلوئل ها و یا همراه با گرانولوم ها دیده می‌شوند (۲) در برخی از موارد بویژه موارد انسانی ترشحات آلوئلی وجود نداشته و به جای آن آماس گرانومانوزی همراه با آسیب پراکنده آلوئلی Diffuse alveolar damage (DAD) بروز می‌نماید. که این گرانولوم ها یا واجد مراکز نکروزی و یا فاقد آن می‌باشند (۲، ۴).

در بررسی حاضر با توجه به آنکه رت ها تحت تاثیر داروهای سرکوبگر ایمنی قرار داشتند وسیستم ایمنی تا آن حد تضعیف گردید که امکان فعالیت عفونی برای این عامل فرصت طلب فراهم گردد، لذا سیستم ایمنی از کفایت لازم برخوردار نبوده و همانگونه که در نتایج مشاهده شده ذکر گردید، یافته های هیستوپاتولوژی مؤید واکنش های تخریبی آلوئل ها و تخریب و کنده شدن اپیتلیوم پوششی بوده و آسیب ریوی به صورت یک پنومونی پلاسماسلی خودنمایی نموده بود و فعالیت سلول های آماسی در حد نفوذ خفیف سلول های آماسی با غالبیت تک هسته ای به ویژه ماکروفاژ و تشکیل دیوسلولی های آلوئلی، خودنمایی می نمود.

سرکوب سیستم ایمنی زمینه مستعدی برای فعالیت شدید پنوموسیستیس و در نتیجه نکروز پنوموسیت ها و اپیتلیوم پوشاننده مجاری فراهم نموده بود. در این بررسی اثری از آماس گرانولوماتوز به چشم نخورده و مشاهدات صرفاًحکایت از پنومونی حاد بینابینی در فاز اکسوداتیو که همراه با ادم و ترشحات اکسودایی فراوان می باشد، می نماید.ضایعات مشاهده شده بسیار شبیه موارد بروز بیماری در شرایط طبیعی که اغلب همراه با اختلالات ایمنی می باشند (ضعف سیستم ایمنی، نقص ایمنی، پیوند عضو، HIV و ...) بوده و عدم بروز واکنش های سلولی و آماس گرانولوماتوز می تواند به علت سرکوب شدید ایمنی وبروز فرم حاد بیماری باشد.

منابع مورد استفاده

۱- مروتی، حسن و محمود زاده عباس ۱۳۸۴: تکثیر پنوموسیتیس کارینی برروی سلولهای محیط کشت، مجله پزشکی کوثر دوره ۱۰، شماره ۴، صفحات ۲۶۳- ۲۷۰.

1- Gray W. , McKee G.T, Diagnostic cytopathology - Second edition 2003; 41-43, 555-556

2- Gutierrez Y., Diagnostic pathology of parasitic infection with clinical correlation. 1990. 156-167.

3- Jones T.C., Hunt R.D,, King N.W, Veterinany pathology, Sixth edition, 1996, 581-582.

4- Ramzy L., Clinical cytopathology and aspiration biopsy. Second edition, 2001.176-177

5- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefileld AE., A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for pneumocystis from human. Emerg infect Dis 2002, 8:891-896.