

Talking of... *Dientamoeba fragilis*

Giulia Zorzi, Ettore De Canale, Lucia Rossi, Valeria Besutti

Servizio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova

Key words: Bowel protozoosis, *Dientamoeba fragilis*, Italy, Zoonosis

Dientamoeba fragilis e... dintorni

SUMMARY

Introduction: *Dientamoeba fragilis* is a protozoan parasite of human gastrointestinal tract with worldwide distribution and a controversial pathogenic role. Data on prevalence and geographical distribution are underestimated for difficult microscopic recognition and "fragility" of the protozoan. Generally to perform the O & P exam for identification of *D. fragilis* it is necessary to recur to a permanent stain and to an expert microscopist.

Methods: we analyzed fecal samples of 3907 patients enrolled among the patients referred to the Service of Microbiology of Padova University Hospital for routine parasitology examinations from June 2011 to June 2012. The aim of this study was to document the prevalence and the clinical features of *D. fragilis* infection.

The laboratory detection rate of the organism is greatly enhanced by use of preservative to fix stool specimens immediately after passage. As previously described for a rapid identification of *D. fragilis*, in unstained fixed fecal material by direct microscopy (400X), the demonstration of the characteristic "golf-club" and "acanthopodia-like" structures are suitable.

Results: in this study the prevalence was found to be 6.8%, higher than our previous reports. Out of the 267 patients in which we detected *D. fragilis*, 26.0% presented with extra-intestinal symptoms, 19.8% reported gastrointestinal complaints and 17.0% referred abdominal pain.

Conclusions: *D. fragilis*, even if considered a neglected parasite, is not rare and the presence of this fecal agent is associated to various intestinal and probably systemic clinical symptoms, even though asymptomatic carriers have been reported. *D. fragilis* infects in high rates among close household contacts; so the Authors stress the importance of screening close contacts to prevent re-infections after treatment.

INTRODUZIONE

Dientamoeba fragilis è un protozoo flagellato, dell'ordine Trichomonadida che, nel corso della sua storia evolutiva ha manifestato la perdita del flagello e, attualmente, la sola forma conosciuta del parassita è quella di un trofozoite ameboide. È un parassita del tratto gastrointestinale dell'uomo, a distribuzione cosmopolita; il suo ruolo come patogeno è tuttora controverso ma ormai sono sempre più frequenti le segnalazioni che lo vedono responsabile di enteriti acute o protratte e di altri disturbi extraintestinali (1, 2).

Poco si sa sul ciclo vitale di questo protozoo, anche se si ritiene che esista solo nello stadio di trofozoite (2, 6, 11). Questo ultimo presenta uno o, più spesso, due nuclei ed è possibile osservarne una considerevole varietà di forme e di dimensioni (da 5 a 15-20 µm, ma anche più); il fragile citoplasma si denatura rapidamente e perde velocemente vitalità al di fuori del tratto intestinale, per cui le osservazioni microscopiche, dirette ed anche con colorazioni permanenti, devono essere eseguite tempestivamente, subito dopo l'evacuazione o in ogni caso quanto prima possibile, per

poter sospettare e diagnosticare la presenza di *D. fragilis* (2). Al contrario, in caso di utilizzo di liquidi fissativi per la raccolta a domicilio del materiale fecale, l'osservazione al microscopio ottico può essere tranquillamente differita senza perdere in sensibilità. Comunque è necessario sottolineare che la sua individualizzazione nel contesto del materiale fecale non è agevole, ed è necessario ricorrere a personale microscopista esperto. Le modalità di trasmissione e la sua catena epidemiologica non sono ancora uniformemente accettate: *D. fragilis* è probabilmente trasmessa per via fecale-orale attraverso acque o cibi contaminati da deiezioni di soggetti infetti; sembra inoltre confermata, pur persistendo dati conflittuali sull'argomento, la trasmissione da uomo a uomo attraverso le uova di nematodi (*Enterobius vermicularis*, soprattutto ed in caso, *Ascaris lumbricoides*) all'interno delle quali il protozoo potrebbe sopravvivere a lungo sfruttandone l'effetto protettivo nei confronti dell'ambiente esterno e dei succhi gastrici; alcuni studi infatti dimostrano la presenza di DNA di *D. fragilis* all'interno, ad esempio, di uova di *E. vermicularis* (9). Questa paras-

Corresponding author: Giulia Zorzi

Servizio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova,
Via Giustiniani 2; 35128 Padova - Tel 049 8213051; Fax 049 8213054
E-mail: juliettaz@libero.it

sitosi è stata anche segnalata come una zoonosi avente come probabile serbatoio il suino; e questo potrebbe far riflettere sulla frequenza del suo reperimento, quando e se adeguatamente ricercato (3). D'altro canto è stata anche descritta un'inaspettata resistenza ambientale del protozoo nel materiale fecale, soprattutto alle basse temperature, dove i trofozoiti hanno presentato degli aspetti morfologici compatibili con un quadro di adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli alla vita vegetativa (6). Questa caratteristica potrebbe rendere ragione della relativamente alta prevalenza di questa parassitosi registrata nelle regioni a "clima freddo" (13).

I dati sulla prevalenza e distribuzione geografica sono sottostimati a causa della difficoltà di riconoscimento all'esame microscopico e della "fragilità" del protozoo, come in parte detto.

Recenti studi hanno documentato la potenziale patogenicità di questo organismo che causa prevalentemente sintomi gastro-intestinali, come diarrea, vomito e dolori addominali ma anche affaticabilità, prurito e rash cutanei orticarioidi (1, 2, 5, 11). Inoltre, questo parassita è uno dei pochi protozoi in grado di dare anche forme lievi di ipereosinofilia (2, 5, 11).

MATERIALI E METODI

Nel nostro studio, effettuato nel periodo compreso tra Giugno 2011 e Giugno 2012 presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia di Padova, abbiamo analizzato per l'esame copro-parassitologico i campioni fecali di 3907 pazienti di provenienza sia ambulatoriale che da ricovero ospedaliero presso la nostra Azienda.

Tali campioni, non selezionati, sono pervenuti alla nostra attenzione come *routine* per svariate motivazioni: sintomatologia gastro-intestinale, disturbi extraintestinali interpretabili genericamente di natura allergopatica (ipereosinofilia, prurito, allergie di NDD) ed infine un numero considerevole di pazienti, che non ha segnalato sintomi particolari sul questionario in uso, ed ha eseguito l'esame copro-parassitologico come *screening* non meglio specificato.

La fase pre-analitica del nostro protocollo operativo per le ricerche parassitologiche di *routine* prevede la diretta distribuzione all'utente di 3 flaconi contenenti SAF (sodio acetato, acido acetico e formalina) come liquido fissativo per la raccolta a domicilio del materiale fecale. Questo accorgimento permette l'immediata fissazione del materiale subito dopo l'evacuazione impedendo in tal modo l'eventuale autolisi del protozoo. Al paziente, o eventualmente al medico curante, viene inoltre consegnata una scheda per la raccolta dei più importanti dati anamnestici e dell'eventuale sinto-

matologia. È fondamentale sottolineare l'importanza di raccogliere almeno tre campioni, possibilmente a giorni alterni, in quanto a scopo diagnostico un unico campione non è sufficiente poiché l'eliminazione dei parassiti non è continua e può presentare una fase di eclissi.

La fase analitica dell'esame copro-parassitologico (ECP) prevede che, dopo arricchimento dei campioni fissati (SAF) tramite filtrazione per gravità, i campioni vengano direttamente osservati mediante microscopia a fresco (400X); per la risospensione del fondello del materiale fecale concentrato viene di solito utilizzata della soluzione fisiologica.

La ricerca al microscopio ottico viene eseguita da personale specificamente addestrato al riconoscimento diretto a fresco dei parassiti. Nella nostra realtà epidemiologica solo i trofozoiti, e forse le cisti, di *Endolimax nana* possono raramente essere confusi con quelli di *D. fragilis*. Come precedentemente descritto, un *marker* tipico di questo protozoo potrebbe essere una appendice filiforme con l'estremità distale rotondeggiante che protrude dal corpo del trofozoite avendo la forma di una mazza da golf ("golf-club") (6).

Queste appendici ben visibili a 400X nei campioni raccolti in presenza di SAF, sono praticamente assenti con alcuni altri liquidi fissativi e dopo la colorazione permanente di Giemsa (7).

La "mazza da golf" verosimilmente si forma, al momento della fissazione, per effetto delle proprietà corrosive del SAF su loci *minoris resistentiae* del corpo del trofozoite in movimento e/o in divisione. A volte la "mazza da golf" presenta il tratto prossimale estremamente assottigliato che, per fatti traumatici successivi al momento della fissazione, può perdere l'estremità rotondeggiante distale con il risultato che dal corpo del trofozoite fissato protrude solo la parte filiforme prossimale (*achantopodia-like*).

Nei casi dubbi, viene richiesta la raccolta di un ulteriore campione di feci in contenitore privo di liquido fissativo, per poter velocemente eseguire una colorazione di Giemsa o, in caso di ricerca microscopica negativa al Giemsa, la ricerca di *D. fragilis* tramite real-time PCR, procedura che permette di ottenere un risultato nell'arco di poche ore (5).

RISULTATI

Nella nostra casistica sono risultati positivi per *D. fragilis* 267 individui sui 3907 analizzati, pari perciò ad una prevalenza del 6.8%. La frequenza cumulata relativa, delle ricerche positive per *D. fragilis*, è risultata del 68% con la raccolta e l'osservazione di un singolo campione fecale, dell'85% con due campioni e del 100%

con i tre campioni raccolti in liquido fissativo direttamente a domicilio.

Di questi soggetti in cui è stato osservato il parassita, il 45.3% erano maschi e il 54.7% femmine: questo dato concorda con altri studi in cui si evince una maggiore prevalenza nel sesso femminile probabilmente per la maggior frequenza di contatti stretti con i bambini (1, 13). La fascia di età dei pazienti positivi era compresa tra 1 anno e 83 anni; è importante evidenziare che i soggetti pediatrici (età inferiore o uguale a 14 anni) erano 108, rappresentando perciò il 40% dei nostri positivi; attualmente non vi è ancora concordanza tra i vari studi riguardo alla maggiore o minore prevalenza di dientamoebiasi nei bambini rispetto agli adulti ma, data la probabile trasmissione fecale-orale, è plausibile che bassi *standard* igienici, indipendentemente dall'età, predispongano all'infezione (1). I pazienti non italiani, per la maggior parte di provenienza dall'Est Europa (soprattutto Romania, Albania e Moldavia) e Nord Africana (prevalentemente Marocco) erano 52 (19.4%). 27 individui segnalavano un recente viaggio all'estero (effettuato non più di un anno prima), soprattutto in America centro-meridionale; infine 4 pazienti erano bambini giunti in Italia nell'ambito di un'adozione internazionale (2 dall'India e 2 dall'Etiopia).

Dai dati che abbiamo raccolto dalle schede anamnestiche e da eventuali colloqui con il paziente o con il medico curante, la sintomatologia che abbiamo rilevato più frequentemente è risultata così distribuita:

- 71 individui lamentavano prurito cutaneo *sine materia* e/o anale (26.0% dei casi) da più di 3 mesi;
- 53 pazienti riferivano disturbi gastro-intestinali persistenti quali diarrea, vomito, inappetenza o perdita di peso (19.8% dei casi);
- 45 soggetti presentavano dolori addominali (17.0% dei casi).

I restanti 98 pazienti (37.2%) non avevano dichiarato la presenza di sintomi clinici e avevano eseguito l'esame copro-parassitologico come screening non meglio specificato.

In 47.5% dei positivi sono stati inoltre riscontrati, oltre a *D. fragilis*, questi altri protozoi:

- *Blastocystis hominis* in 104 pazienti (39.0%),
- *Entamoeba coli* in 8 pazienti (3.0%),
- *Giardia duodenalis* in 5 pazienti (1.9%),
- *Endolimax nana* in 4 pazienti (1.5%),
- *Chilomastix mesnili* (1.5%)
- *Entamoeba hartmanni* in 2 pazienti (0.7%).

Nel 7.5% dei casi è stata inoltre rilevata la presenza di *E. vermicularis*, valore sicuramente sottosti-

mato nella nostra casistica in quanto l'esame *gold standard* per questo elminta, lo Scotch-test, non è stato richiesto nella maggior parte dei campioni a noi pervenuti impedendoci così di valutare l'eventuale concomitanza dei due parassiti. Il riscontro di questo elminta in associazione alla *D. fragilis* potrebbe supportare l'ipotesi di un suo ruolo nella trasmissione e sottolinea l'importanza di una sorveglianza epidemiologica e di misure di intervento sulla salute pubblica (9).

CONCLUSIONI

Nella nostra casistica risulta una prevalenza del 6.8%, più elevata rispetto a precedenti indagini eseguite nel nostro centro nel 2003 in occasione delle quali era stata rilevata una prevalenza del 3.5% (6). I nostri dati contribuiscono inoltre a confermare il carattere endemico di questo protozoo la cui diffusione appare in aumento nonostante le norme igieniche tradizionalmente praticate nella nostra comunità; questo fenomeno potrebbe sottendere una capacità di resistenza ambientale di questo trofozoite che sarebbe in contrasto con l'appellativo di "*fragilis*" (6, 12). Nulla si conosce dei meccanismi patogenetici alla base della sintomatologia clinica associata a questa infezione e *D. fragilis*, sebbene non abbia capacità tessuto-invasive, sembrerebbe in grado di violare l'integrità della barriera mucosa intestinale. Infatti, è stata segnalata la sua capacità di evocare sia una risposta infiammatoria eosinofila locale, a livello della mucosa del colon, che sistemica (4, 5, 8, 10, 11) anche se non ulteriormente indagata.

Questo fatto potrebbe generare, mediante un danno immunomediato e in individui predisposti, una gamma di patologie classificabili genericamente di natura allergica che vanno ad esempio dal colon irritabile sino al prurito cutaneo diffuso *sine materia* che alle manifestazioni orticarioidi. L'infezione da parte di *D. fragilis*, così come di altri parassiti, potrebbe quindi avere un ruolo come possibile *trigger* di queste condizioni patologiche.

Quanto da noi osservato conferma che questo protozoo appare in grado di causare manifestazioni cutanee (peraltro da chiarire e confermare) oltre che intestinali e che, nella nostra realtà epidemiologica, prevale in maniera assoluta rispetto a *G. duodenalis*, altro protozoo patogeno indubbiamente in grado di causare queste patologie (2, 5, 11). Riteniamo inoltre importante segnalare il frequente riscontro di dientamoebiasi all'interno dei nuclei familiari e di contatti stretti. In particolare nella nostra casistica abbiamo individuato 10 nuclei familiari all'interno dei quali almeno due soggetti sono risultati positivi.

Sottolineiamo perciò la necessità di eseguire uno

screening di tutti i contatti dei pazienti infetti per individuare l'eventuale presenza del protozoo ed evitare la re-infezione dei membri del nucleo familiare dopo la terapia (1).

Un dato significativo infine, ancora peraltro da approfondire, è costituito dal numero elevato di individui (circa 37% nella nostra casistica) che, pur albergando *D. fragilis*, non hanno dichiarato la presenza di sintomatologia clinica.

Una parte significativa di questi soggetti, in realtà, ha probabilmente trascurato di compilare correttamente la scheda anamnestica.

Tuttavia, la presenza di portatori cronici sintomatici e asintomatici viene confermata e rappresenta uno dei fattori che certamente contribuisce alla alta prevalenza e apparente alta contagiosità (12).

BIBLIOGRAFIA

- Barratt JNL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans, several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes* 2011; 2: 1: 3-12.
- Crotti D, D'Annibale ML. Role of *Dientamoeba fragilis* in human bowel infections. *Infez Med.* 2007 Mar; 15 (1): 30-9.
- Crotti D, Sensi M, Crotti S, Grelloni V, Manuali E. *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Vet Parasitol* 2007; 145: 349-51.
- Cuffari C, Oligny L, Seidman EG. *Dientamoeba fragilis* masquerading as allergic colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 16-20.
- De Canale E, Biasolo MA, Tessari A, Bettanello S, Besutti V, Mengoli C. Real time PCR for *Dientamoeba fragilis*: a comparison between molecular and microscopical approach. *Microbiologia Medica* 2009; 24 (3): 133-8.
- 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 Mar; 45 (1): 19-22.
- De Canale E, Tessari A, Lo Russo L, Campion L. *Dientamoeba fragilis* e liquidi fissativi: valutazione ai fini di una rapida identificazione dei trofozoiti. *Microbiologia Medica*, volume 19, numero 2, 2004 Poster.
- Preiss U, Ockert G, Broemme S, Otto A. *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. *Klin Padiatr* 1990; 202: 120-3.
- Röser D, Nejsum P, Carlsgart AJ, Nielsen HV, Stensvold CR. DNA of *Dientamoeba fragilis* detected within surface-sterilized eggs of *Enterobius vermicularis*. *Exp Parasitol* 2013; 133: 57-61.
- Spencer MJ, Garcia LS, Chapin MR. *Dientamoeba fragilis*. An intestinal pathogen in children? *Am J Dis Child* 1979; 133: 390-3.
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriot D, Harkness J, Ellis J. A review of the clinical presentation of dientamoebosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr; 82(4): 614-9.
- Stark D, Roberts T, Marriot D, Harkness J, Ellis J. Detection and Transmission of *Dientamoeba fragilis* from Environmental and Household Samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(2): 233-236.
- Yang J, Scholten TH. *Dientamoeba fragilis*: A review with notes on its epidemiology and diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 16-22.