Rassegna

Review

L'importanza di chiamarsi *Dientamoeba fragilis*

The importance of being Dientamoeba fragilis

Vita Lacasella[1], Olga Brandonisio[2], Carmen Capolongo[3], Marianna Marangi[1], Annunziata Giangaspero[1]

[1]Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia, Foggia, Italy;
[2]Dipartimento di Clinica Medica, Immunologia e Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari, Italy;
[3]U.O. di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari, Italy

INTRODUZIONE

Dientamoeba fragilis è un protozoo a localizzazione intestinale e a diffusione cosmopolita; inizialmente classificato come un'ameba e quindi associato, anche metabolicamente, a *Entamoeba spp.* ed *Endolimax nana* è oggi considerato, sulla base dei più recenti studi molecolari, un tricomonade che ha perduto in maniera permanente il flagello [1, 2]. L'unico stadio di sviluppo riconosciuto nel ciclo biologico di *D. fragilis* è il trofozoita, organismo pleomorfico, generalmente binucleato, di 5-15 µm di diametro (Figura 1), mentre una eventuale forma di resistenza (cisti) non è mai stata individuata.

Numerosi studi documentano la notevole diffusione di *D. fragilis* particolarmente in gruppi ben definiti di popolazione (persone che vivono in istituti psichiatrici, missionari, popolazione giovanile e sesso femminile) e con percentuali di prevalenza anche assai elevate [3-6].

Malgrado *D. fragilis* sia stato a lungo considerato un protozoo non patogeno e un margine di incertezza sul suo reale potenziale patogeno permanga, numerose segnalazioni, anche assai recenti, dimostrano la responsabilità di questo microrganismo nella comparsa di sindromi intestinali [7-9]. Inoltre, indagini epidemiologiche registrano prevalenze più elevate di questo parassita rispetto ad altri comuni patogeni intestinali dell'uomo, come *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. [10].

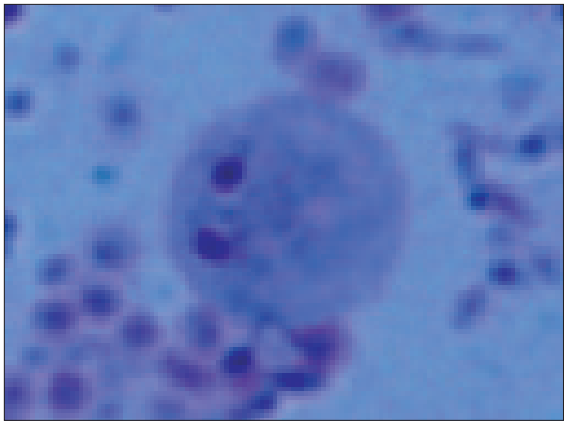

Figura 1 - Trofozoita di *D. fragilis* in feci umane (colorazione di Giemsa, ×1000) (Originale O. Brandonisio).

Uno degli ostacoli per lo studio approfondito della dientamebiasi, così come per la dimostrazione della patogenicità del protozoo, è legato alla mancata segnalazione, ad oggi, di epidemie che documentino il coinvolgimento e la responsabilità di questo agente patogeno.

Negli ultimi anni l'interesse nei confronti di *D. fragilis* da parte di biologi, clinici e parassitologi è cresciuto in maniera considerevole per la necessità di chiarire i tanti aspetti ancora irrisolti legati al parassita e alla parassitosi. Il presente contributo intende fornire una breve sintesi sullo stato delle conoscenze di *D. fragilis* nei suoi diversi aspetti e documentare, attraverso l'analisi della letteratura e dei dati di più recente acquisizione, le ragioni per cui questo protozoo, benché ancora poco noto, non deve essere sot-

*Corresponding author
Annunziata Giangaspero
E-mail: a.giangaspero@unifg.it

tovalutato nella diagnosi delle infezioni parassitarie dell'uomo, anche nel nostro Paese.

Diffusione di D. fragilis nel mondo

Considerato attualmente un parassita intestinale più comune di *Entamoeba hystolitica* e *Giardia duodenalis*, *D. fragilis* è diffuso in tutto il mondo con un *range* di prevalenza assai ampio (tra 0,3% e 52%), in funzione della popolazione studiata e del metodo diagnostico impiegato [6, 11].

Nel corso degli anni le segnalazioni relative al protozoo, così come i valori stessi di prevalenza, sono aumentati non soltanto per la maggiore attenzione dei clinici nei confronti di questa parassitosi, ma soprattutto per il progressivo perfezionamento delle tecniche di indagine. Infatti, la natura molto fragile di *D. fragilis* e i possibili ritardi nella fissazione del campione, giustificano, particolarmente negli studi meno recenti, le ridotte percentuali di prevalenza riportate. In seguito, il progressivo impiego di metodi di indagine più affidabili ha portato alla segnalazione, in diverse parti del mondo, di tassi di prevalenza sempre più elevati.

La maggior parte degli studi di prevalenza, compresi quelli effettuati nel nostro Paese, sono stati condotti impiegando metodologie classiche, e in particolare la microscopia. Questa tec-

Tabella 1 - Prevalenze di D. fragilis nei paesi europei.

Prevalenza (%)	*Tipologia di campione*	*N. di soggetti*	*Tecnica impiegata*	*Paese*	*Bibliografia*
11,7	Pazienti con sospetta parassitosi intestinale	103	Microscopia	Danimarca	[16]
≤32	Pazienti con sintomi gastrointestinali	397 nr	Microscopia e Real-Time PCR nr	Olanda	[15] [14]
6,3	Pazienti con sospetta parassitosi intestinale	448	Microscopia	Belgio	[17]
82.9	Pazienti pediatrici con infezione da protozoi intestinali	123	Microscopia	Germania	[13]
1,6	Pazienti con sintomi gastrointestinali	8313	Microscopia	Spagna	[60]
3,7	Pazienti con sintomi gastrointestinali	3139	Microscopia	Italia (Umbria)	[18]
4,1	Pazienti con sintomi gastrointestinali	1989	Microscopia	Italia (Umbria)	[19]
3,4	Pazienti con sintomi gastrointestinali	1141	Microscopia	Italia (Umbria)	[20]
11.3	Pazienti con sintomi gastrointestinali	151	Microscopia	Italia (Umbria)	[27]
21,4	Pazienti con sospetta parassitosi intestinali	491	Real-Time PCR	Italia (Emilia Romagna)	[55]
0,9	n.r.	1503	Microscopia	Italia (Emilia Romagna)	[58]
0,1	Pazienti con sospetta parassitosi intestinali	2962	Microscopia	Italia (Lombardia)	[59]
6,9	Pazienti con sospetta parassitosi intestinale	364	Microscopia	Italia (Puglia)	p.a.

Nr: non riportati; p.a.: dati riportati nel presente articolo.

nica è certamente meno sensibile se comparata alle tecniche molecolari o colturali ma è considerata ancora un ottimo metodo laddove non sia possibile applicare i metodi molecolari [12]. La tabella 1 fornisce una sintesi delle prevalenze di *D. fragilis* riportate in Europa, indipendentemente dalla tipologia di studio effettuata e dalle modalità diagnostiche applicate.

Fra i paesi europei, in Germania *Dientamoeba* è risultato il protozoo più frequente in una popolazione pediatrica con infezione da protozoi intestinali ma elevate prevalenze sono state registrate nei Paesi Bassi [13-15]. In questo paese, con tecniche di microscopia (colorazione permanente con nero clorazolo), *D. fragilis* è stata recentemente rilevata in 69 su 397 (17,4%) soggetti; tutti i campioni provenivano da indagini parassitologiche di routine [15]. In questo stesso studio, la prevalenza è risultata maggiore quando i campioni sono stati testati per *D. fragilis* con metodiche molecolari. In Danimarca, *D. fragilis* è stata rilevata microscopicamente in 12 dei 103 (11,7%) pazienti oggetto di studio, tutti provenienti da aree metropolitane [16]. In Belgio, in uno studio condotto su 448 soggetti, *D. fragilis* è risultato il protozoo più diffuso (6,3%), dopo *Giardia lamblia* (7,1%) [17].

Diffusione di D. fragilis in Italia

In Italia, i dati di prevalenza sulla diffusione di *D. fragilis* differiscono sensibilmente (da 0,1 fino a 21,4) in funzione delle aree indagate e delle metodiche impiegate (Tabella 1). Il maggior numero di dati riguarda soprattutto una regione del Centro, l'Umbria; nella città di Perugia, un'estesa indagine condotta su pazienti ambulatoriali (966 bambini e 1.023 adulti) ha consentito di rilevare la maggiore presenza di *D. fragilis* rispetto ad altri parassiti, con una prevalenza del 7,8% negli adulti e dello 0,5% nei bambini. Una prevalenza più elevata (8,7%) è stata registrata in adulti con sintomi clinici [18, 19]. Nella stessa area geografica indagini successive hanno confermato la presenza di *D. fragilis* con prevalenze del 6,6% negli adulti (28 positivi su 425 esaminati) e dello 0,46% nei bambini (1 bambino positivo su 219 esaminati) [20].

Più recentemente, un'indagine epidemiologica, condotta da chi scrive, ha riguardato la Puglia. Nel periodo compreso tra Giugno 2007 e Giugno 2011, nell'ambito della diagnostica coproparassitologica di routine effettuata presso il Laboratorio di Parassitologia dell'U.O. di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari, sono stati esaminati, per la presenza di *D. fragilis* e possibili fattori di rischio correlati, 364 soggetti, di cui 181 femmine e 182 maschi, di età compresa tra 9 mesi e 96 anni (età media 51 anni). I soggetti selezionati per questa indagine presentavano tutti feci non formate e/o liquide. Dal punto di vista clinico, 146 soggetti presentavano anche altri sintomi gastrointestinali oltre alla diarrea (dolori addominali e/o vomito), 7 orticaria, 31 febbre, 4 valori elevati di eosinofilia e 4 diarrea cronica persistente. Tutti i campioni sono stati analizzati entro 6 ore dalla raccolta e sono stati sottoposti ad esame microscopico sia mediante esame diretto a fresco che mediante colorazione di Giemsa (Figura 1). Per quest'ultima sono stati allestiti degli strisci, asciugati poi a 37°C, fissati in metanolo assoluto per 2 min e colorati con colorante di Giemsa in commercio, diluito al 10% in acqua distillata, per 30 min. La lettura dei preparati è stata effettuata esaminando, ad immersione con obiettivo 100X, almeno 250 campi per ciascun vetrino. L'identificazione è stata basata sulla caratteristica morfologia di *D. fragilis*: trofozoiti di 5-15 µm di diametro, con uno o due nuclei, contenenti un largo nucleolo centrale spesso frammentato.

Le differenze di prevalenza, in relazione ai dati epidemiologici dei pazienti sono state valutate tramite test del chi-quadro. Le stesse variabili sono poi state utilizzate in modelli di regressione logistica per evidenziare possibili fattori di rischio predisponenti all'infezione con *D. fragilis* [21].

Dei 364 soggetti esaminati, 25 (6,9%), di cui 17 femmine e 8 maschi, di età compresa tra 18 e 85 anni, presentavano un'infezione da *D. fragilis*. In un solo caso, *Dientamoeba* era associata a *Giardia duodenalis* e in sei casi a *B. hominis*. Nessun soggetto portatore di *D. fragilis* presentava coinfezioni batteriche, virali o fungine.

Possibili fattori di rischio

I diversi contributi alla possibile correlazione tra infezione ed età dei soggetti, o tra infezione e sesso (possibili fattori di rischio) forniscono dati non univoci.

La maggiore diffusione tra i soggetti adulti (da 30 a 59 anni) è un dato che emerge in diversi contributi provenienti da diversi paesi, Italia compresa [19, 20, 22]. Non mancano, tuttavia, contributi sulla maggiore diffusione di *D. fragilis* in soggetti più giovani, di età compresa tra 16 e 20 anni così come nei bambini tra 0 e 15 anni [3, 16, 23, 24].

La minore prevalenza registrata nei bambini di

età inferiore all'anno di età trova una giustificazione alimentare (soggetti ancora lattanti); tuttavia, il dato non risulta univoco [4]. Poiché è molto probabile che *D. fragilis* sia trasmessa per via oro-fecale, è possibile che cattive condizioni igieniche, situazioni di sovraffollamento, coabitazione, cattiva qualità dell'acqua, predispongano i diversi gruppi ad acquisire l'infezione da *D. fragilis*, indipendentemente dall'età dei soggetti [8]. Anche rispetto al sesso i risultati delle ricerche non sono univoci. Anche in questo caso la non univocità di dati tende ad essere interpretata con il diverso ruolo che i sessi rivestono nei diversi ambiti sociali o comunità [10].
Elementi di riflessione sull'epidemiologia di *D. fragilis* derivano dalla succitata indagine condotta da chi scrive, in Puglia tra il 2007 e il 2011. L'analisi univariata ha, infatti, messo in evidenza correlazioni significative tra la presenza di *D. fragilis* ed il sesso femminile ($p<0.05$), la coinfezione con *B. hominis* ($p<0.01$) e l'aumento dell'età, in particolare nei pazienti sopra i 50 anni ($p<0.01$).

Ruolo patogeno di D. fragilis

Malgrado ci siano numerose evidenze scientifiche che documentano il ruolo patogeno di *D. fragilis*, la reale patogenicità di questo protozoo rimane ancora non completamente chiarita.
L'assenza, nel panorama mondiale, di epidemie ufficialmente confermate, causate da questo protozoo, ha indotto inizialmente a considerare *D. fragilis* un microrganismo scarsamente patogeno. Comunque la maggior parte dei ricercatori descrive *D. fragilis* come un protozoo in grado di provocare nell'uomo sintomi gastrointestinali quali diarrea associata a dolore addominale, sensazione di gonfiore addominale, flatulenza, ma anche vomito, nausea, anoressia, perdita di peso, febbre ed eosinofilia [6-9]. In Olanda, *D. fragilis* è stata rilevata nel 23% di 220 bambini con dolori addominali ricorrenti [25].
L'aggressività del microrganismo è ben documentata anche in un recentissimo studio condotto in Australia, nel quale sintomi gastrointestinali erano presenti nel 98% dei bambini con dientamebiasi; diarrea e dolori addominali erano i sintomi più frequenti, e presenti, rispettivamente, nel 71% e nel 29% dei casi [26]. In Belgio, in uno studio condotto su 448 soggetti, solo il 15,4% dei soggetti positivi a *D. fragilis* non mostrava sintomi [17].
La relazione tra presenza di disturbi intestinali e *D. fragilis* è documentata anche in Italia nei contributi di Crotti e D'Annibale [19, 27].

Identità genetica di D. fragilis e patogenicità

Le numerose incertezze sul ruolo patogeno di *D. fragilis* possono in parte essere spiegate con l'esistenza di varianti genetiche. Poiché nella maggior parte dei casi solo alcune delle persone infette manifestano sintomi, è possibile che la specie *Dientamoeba fragilis* riconosca al suo interno specie multiple o sottospecie con potenziale patogeno diverso, analogamente a quanto descritto in altri protozoi, tra i quali *Giardia* e *Cryptosporidium* [28]. Ad oggi, mediante lo studio dei geni SSU rDNA e ITS1, all'interno della specie *D. fragilis* sono riconosciuti due genotipi: genotipo 1 e genotipo 2 [29, 30].
Il genotipo 1 sembra essere più diffuso. La maggior parte dei pazienti portatori di *D. fragilis* genotipo 1 mostra sintomi intestinali, mentre una minoranza non manifesta alcun sintomo [17, 31, 32]. Sul genotipo 2, isolato in Europa da un bambino con feci diarroiche, il numero di studi è ancora assai limitato [29].
In un recente studio, il rilievo, mediante il gene SSU rDNA, di subgenotipi di *D. fragilis* ha dimostrato una possibile più stretta relazione tra sottogenotipo e sintomi; l'assenza, tuttavia, di isolati di *D. fragilis* da pazienti asintomatici rappresenta un serio limite di affidabilità del dato fornito [2]. L'esistenza di varianti sembra essere confermata da studi condotti *in vitro*. Poiché la crescita di *D. fragilis* su determinati terreni di coltura varia tra i diversi isolati è possibile che tale diversità fenotipica sia l'espressione di una differenza su base genetica [33].
Comunque, al momento non sono disponibili studi dedicati, che mettano in correlazione il/i genotipo/i con i sintomi, con una attendibilità statisticamente significativa.

Associazione di D. fragilis con altri patogeni e correlazione con altre patologie

Numerosi studi hanno dimostrato che un elevato numero di pazienti portatori di *D. fragilis* alberga anche altri protozoi enterici, la maggior parte dei quali trasmessi per via oro-fecale [31, 34]. *D. fragilis* è spesso associata a *Blastocystis hominis* e/o a *Giardia duodenalis* [8, 23, 35]. In un recente studio il 35% di pazienti portatori di *B. hominis* erano infettati anche da *D. fragilis* [36].
Il ruolo di *D. fragilis* in soggetti affetti da AIDS non è chiaro, in quanto gli studi disponibili hanno fornito risultati contrastanti; in ogni caso, nei soggetti AIDS positivi, con manifestazioni diarroiche una verifica della presenza di *D. fragilis* consente di aggiungere informazioni cliniche importanti ai fini della terapia [11, 37].

Anche se non sono disponibili evidenze convincenti sulla relazione causale tra *D. fragilis* e la sindrome del colon irritabile (*Irritable Bowel Disease*, IBS), in numerosi studi condotti in diversi paesi è stata osservata una analogia fra i sintomi causati da *D. fragilis* e quelli della sindrome del colon irritabile [7, 38, 39]. È inoltre probabile che soggetti con IBS non siano riconosciuti come infetti da *D. fragilis* semplicemente perché questo protozoo non è ricercato di *routine*.

Modalità di trasmissione e ruolo degli animali

Le modalità di trasmissione di *D. fragilis* non sono ancora completamente chiarite (Figura 2). L'unico stadio di sviluppo descritto al momento nel ciclo biologico di *D. fragilis* è lo stadio di trofozoita, una forma estremamente fragile in ambiente esterno che consente solo la trasmissione diretta da un soggetto infetto ad un altro. Ad oggi, non è stata identificata nessuna forma di resistenza (cisti, oocisti). Per la natura assai fragile di *D. fragilis* e l'assenza di stadi di resistenza, l'intervento di un vettore è stata ritenuta, soprattutto in passato, una evenienza possibile. Tuttavia, la trasmissione esclusivamente diretta è ugualmente possibile, in analogia a quanto accertato in altri parassiti intestinali in grado di infettare l'uomo, tra i quali *Pentatrichomonas hominis* [40].

Se l'esistenza di forme resistenti fosse definitivamente esclusa, e le ricerche in questo senso non si sono fermate, la biologia di *D. fragilis* sarebbe sovrapponibile a quella di altri protozoi, filogeneticamente correlati ad esso, quali *Histomonas meleagridis*, protozoo che si trasmette tra gli uccelli attraverso le uova del nematode *Heterakis gallinarum*. Tuttavia la possibilità assai suggestiva che *D. fragilis* possa essere trasmessa con le uova di elminti, e tra queste quelle di *Enterobius vermicularis*, non ha ottenuto conferme in più sofisticati studi recenti [3, 31, 41-43].

Un interessante dibattito è ancora in corso sul possibile ruolo zoonosico di *D. fragilis*. Segnalazioni della presenza di *D. fragilis* in animali risalgono a oltre 50 anni fa, in primati non umani e in particolare in macachi e in babbuini e in pecore [44-46]. Il recente rilievo, peraltro proprio nel nostro paese, di trofozoiti di *D. fragilis* in 53 campioni fecali di suini dei 121 esaminati (43,8%) aveva riaperto uno scenario interessante sul possibile ruolo degli animali nella disseminazione e circolazione di *D. fragilis* nell'ambiente [47]. Tuttavia, la segnalazione di *D. fragilis*, mediante tecniche microscopiche e molecolari, esclusivamente in *Gorilla g. gorilla*, tra le 46

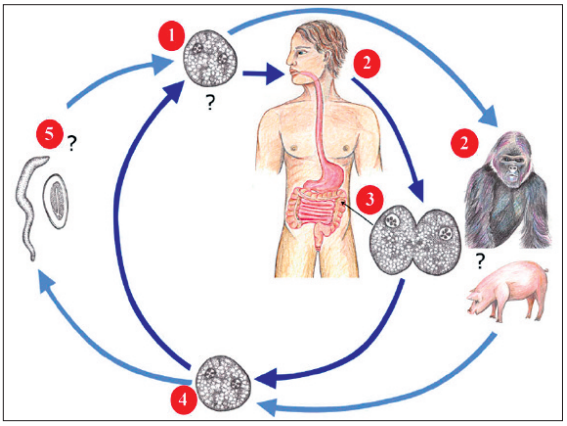

Figura 2 - Possibile ciclo biologico di *Dientamoeba fragilis*. I trofozoiti di *Dientamoeba* (o uno stadio di trasmissione non ancora noto) sono ingeriti dall'ambiente esterno dall'ospite (1). La specie umana è ritenuta ospite preferenziale di *Dientamoeba*, anche se gorilla e altri primati, suini e pecore possono essere considerate ospiti potenziali (2). Una volta ingerita, *D. fragilis* raggiunge il grosso intestino e si moltiplica per scissione binaria (3). *Dientamoeba* passa poi nell'ambiente esterno con le feci (4) che possono contaminare cibi e acqua. Ingerita da un altro ospite, *D. fragilis* completa il suo ciclo. Alcuni autori suggeriscono che, a causa della natura fragile dei trofozoiti al di fuori dell'ospite e dell'assenza di uno stadio di resistenza (cisti), difficilmente *D. fragilis* possa infettare direttamente l'uomo. Si ritiene che Dientamoeba possa essere trasmessa tramite uova di *Enterobius vermicularis* (5) anche se il ruolo di questo nematode nel ciclo di *Dientamoeba* è alquanto controverso (da Barratt et al., 2011 [40]).

specie di animali indagate, compreso il suino, dimostrerebbe che *D. fragilis* ha un *range* di ospiti molto ristretto e che gli animali potrebbero non avere un ruolo epidemiologico importante nella trasmissione dell'infezione [48]. Il limitato numero di ospiti sembra confermato anche da un recentissimo contributo di Stark *et al.*, i cui dati dimostrano l'assenza di *D. fragilis* in specie di animali da compagnia vicini a contesti abitativi infestati [49].

Tuttavia, alla luce di un recentissimo lavoro condotto nel nostro Paese, la discussione sul possibile ruolo zoonosico dei suini rimane ancora aperta. L'analisi molecolare dei frammenti dei geni 18S e 5.8S rRNA ha infatti evidenziato che i suini e gli allevatori condividono il genotipo 1 [50].

Diagnosi di laboratorio

Microscopia

I trofozoiti di *D. fragilis* appaiono come corpi sferici rifrangenti di 5-15 m su strisci fecali (Fi-

gura 1), ma se il preparato non è sottoposto a colorazione i nuclei (uno o più spesso due) non sono facilmente individuabili. È questa la ragione per cui è importante effettuare strisci fecali impiegando colorazioni permanenti. Tra queste, le più usate sono l'ematossilina ferrica dopo fissazione con sodio acetato-acido acetico-formalina (SAF), o la colorazione tricromica su preparati fissati con polivinil-alcool (PVA). In molti laboratori, tuttavia, trovano ampio spazio la semplice colorazione di Giemsa o colorazioni simili (Field's stain o Diff-3), che sono tutte ritenute valide [18, 51].
La diagnostica microscopica è considerata meno sensibile e specifica rispetto alla diagnostica molecolare, ma si ritiene che laddove non sia possibile adottare test molecolari, sia sempre preferibile ricorrere alla microscopia, piuttosto che omettere completamente la ricerca di *D. fragilis*.
L'osservazione di campioni fecali multipli può ridurre sensibilmente le false negatività, in quanto l'eliminazione attraverso le feci dei trofozoiti di *D. fragilis*, come quella degli altri parassiti intestinali, è intermittente [14].

Coltura
È bene premettere che la coltivazione dei protozoi intestinali è tecnicamente complessa, richiede tempi lunghi e pertanto non trova possibilità di applicazione in laboratori diagnostici di routine [52]. In ogni caso, i sistemi di coltura di *D. fragilis* sono numerosi. In particolare, si è osservato che *D. fragilis* cresce molto bene in colture xeniche come il terreno di Robinson modificato e, più recentemente, che la coltura in terreno di Loeffler a becco di clarino garantisce una crescita significativamente migliore rispetto ad altri media di sviluppo, qualora impiegato alla temperatura di 42°C e in atmosfera microaerofila [33, 53].
L'attuale indisponibilità di una coltura axenica in grado di far crescere *D. fragilis* giustificherebbe i limitati progressi scientifici fatti ad oggi per lo studio di questo microrganismo, e in particolare gli studi sulla sensibilità *in vitro* del protozoo nei confronti dei differenti farmaci. Infatti le molecole impiegate *in vitro* potrebbero agire direttamente nei confronti del parassita, o indirettamente agendo sulla flora batterica necessaria per la crescita di *D. fragilis* in coltura.
A differenza di altri protozoi (*Giardia duodenalis, Cryptosporidium spp., Entamoeba histolytica*), al momento non sono disponibili in commercio test di immunofluorescenza indiretta o kit ELISA per la ricerca di antigeni fecali.

Diagnostica molecolare
L'estrazione diretta del DNA di *D. fragilis* da campioni fecali e il conseguente impiego di tecniche di PCR si sono rivelati in grado di superare le difficoltà di utilizzo delle colture nella routine diagnostica. Tra le PCR convenzionali per il rilievo del DNA di *D. fragilis* da campioni fecali umani, il protocollo sviluppato da Stark et al. [31] (gene target il SSU rRNA, frammento di 887 bp) ha garantito una elevata specificità (100%) e una sensibilità del 93%. Questa metodica si è rilevata veloce, semplice e assai efficiente anche per gli studi di epidemiologia molecolare.
Più recentemente, lo sviluppo di una RealTime-PCR ha mostrato, rispetto alla PCR convenzionale, un'efficienza ancora migliore in termini di sensibilità e specificità, pari al 100%, tempi più veloci di esecuzione (due ore) e ridotto rischio di contaminazione [2, 54]. In un ampio studio effettuato su 472 campioni fecali, la comparazione tra diverse metodiche (microscopia con colorazione permanente, colture xeniche, PCR convenzionale e RealTime-PCR) ha confermato la maggiore efficienza della RealTime-PCR [9]. Questa tecnica molecolare ha trovato applicazione nei più recenti studi epidemiologici in diversi paesi, compresa l'Italia, confermando prestazioni molto più elevate rispetto alle metodiche tradizionali [15, 55].
È importante ricordare che anche per l'impiego di tecniche molecolari per la diagnosi di *D. fragilis* si raccomanda, come per gli altri parassiti intestinali, la raccolta di campioni fecali multipli.

TERAPIA

Non è al momento ancora chiaro quale sia il trattamento più efficace nei confronti della dientamebiasi, soprattutto per l'assenza di *trial* condotti su vasta scala e randomizzati. Tuttavia numerosi studi dimostrano che la completa eliminazione del parassita dalle feci del paziente, in seguito al trattamento chemioterapico, comporta anche la risoluzione dei sintomi [2]. Diverse molecole antiprotozoarie (iodoquinolo, paramomicina, tetraciclina, doxiciclina, metronidazolo, tinidazolo, secnidazolo, ornidazolo) hanno effetto anti-*D. fragilis* sia *in vitro* sia *in vivo* con l'eliminazione, in questo ultimo caso, sia del parassita che dei sintomi correlati [56]. Lo iodoquinolo è considerato il farmaco di prima scelta nel Nord America, anche se non ufficialmente approvato dall'FDA per questa specifica indicazione. Il metronidazolo, benché efficace

nella remissione dei sintomi e nella *clearance* del parassita nell'85% dei casi in una casistica infantile, ha richiesto, nei casi più ostinati, un secondo ciclo di somministrazione [26]. L'ornidazolo è ritenuto una valida alternativa al metronidazolo per la sua emivita più lunga e i più limitati effetti collaterali [57].

CONCLUSIONI

D. fragilis è un parassita unicellulare insolito e singolare, descritto per la prima volta nel 1918 da Jepp e Dobell [1]. Questo protozoo sta via via emergendo dall'oscurità in quanto, come si è visto, la prevalenza supera talvolta quella di *Giardia duodenalis*, sembra rivestire un'importanza clinica specifica, ed è trattabile farmacologicamente. Malgrado la maggior parte delle segnalazioni provenga da paesi ad economia avanzata e da contesti dove le condizioni sanitarie e di salute sono mediamente buone, in diversi paesi europei, negli Stati Uniti, in Australia e Nuova Zelanda, *D. fragilis* non è annoverato nella lista dei microrganismi soggetti a denuncia obbligatoria perché di particolare interesse sanitario nell'uomo [11]. L'assenza di indagini epidemiologiche nei paesi in via di sviluppo non consente di comprendere la relazione tra dientamebiasi e condizioni sanitarie precarie o altri possibili fattori di rischio correlati.
Come emerge da questa rassegna, nonostante la notevole diffusione del protozoo, molti aspetti su *D. fragilis* rimangono da chiarire (identità genetica del parassita, biologia e ciclo biologico, rischio zoonosico, ruolo patogeno, reale prevalenza della parassitosi, fattori di rischio - incluse patologie quali l'AIDS o l'immunodeficienza severa combinata (SCI) o altre infezioni protozoarie - ed infine la terapia di elezione. In tal senso, lo sviluppo di un modello animale diverso dai primati consentirebbe di fare notevoli passi avanti nella conoscenza di molti di questi aspetti.
Per accrescere le conoscenze di questa parassitosi, la comunità scientifica internazionale suggerisce studi approfonditi in grado di rivedere diverse acquisizioni su *D. fragilis* che da oltre 65 anni appaiono quasi immodificate. Anche nel nostro paese, si ritiene indispensabile incoraggiare lo studio di questa parassitosi, a partire dall'ampliamento degli studi epidemiologici e dall'applicazione della diagnosi sistematica di *D. fragilis* almeno in tutti i soggetti con sintomi gastrointestinali. Questa indagine andrebbe condotta non solo nei laboratori di ricerca, ma in quelli dedicati alla diagnostica di routine, sia in campo umano sia veterinario. A questo riguardo, le tecniche molecolari potranno garantire strumenti diagnostici più efficienti e contributi epidemiologici più affidabili.

Keywords: *Dientamoeba fragilis*, dientamebiasis.

Ringraziamenti
Gli Autori ringraziano la prof.ssa Gioia Capelli dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per il suo prezioso contributo nell'elaborazione statistica dei risultati ottenuti.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni l'interesse nei confronti di *Dientamoeba fragilis* da parte di biologi, clinici e parassitologi è cresciuto in maniera considerevole per la necessità di chiarire i numerosi aspetti ancora irrisolti legati al parassita e alla parassitosi. Il presente contributo intende fornire una sintesi sullo stato delle conoscenze di *D. fragilis* nei suoi diversi aspetti e documentare, attraverso l'analisi della letteratura e dei dati più recenti, le ragioni per cui questo protozoo, benché ancora poco noto, non debba essere sottovalutato nella diagnosi delle infezioni parassitarie dell'uomo, anche nel nostro paese.

SUMMARY

In recent years, interest in Dientamoeba fragilis *on the part of biologists, clinicians and parasitologists has increased considerably due to the need to clarify the many unresolved issues related to the parasite and the associated infection.*
This paper aims to provide a summary of the state of knowledge of D. fragilis *in its different aspects, and, through the analysis of the literature and the most recent data, the present review aims to record the reasons why this protozoan, although little known, should not be underestimated in the diagnosis of human parasitic infections also in Italy.*

BIBLIOGRAFIA

[1] Jepps M.W., Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., new intestinal amoeba from man. *Parasitology* 10, 352-367, 1918.

[2] 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*. 44, 232-235, 2006.

[3] Hakansson, E.G. *Dientamoeba fragilis*: some further observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 17, 349-362, 1937.

[4] Talis B., Stein B., Lengy J. *Dientamoeba fragilis* in human feces and bile. *Isr. J. Med. Sci.* 7, 1063-1069, 1971.

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

[6] Johnson E.H., Windsor J.J., Clark C.G. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 553-570, 2004.

[7] Yakoob J., Jafri W., Beg M.A., et al. *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol. Res.* 107, 679-684, 2010.

[8] 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.* 82, 614-619, 2010.

[9] Stark D., Al-Qassab S.E., Barratt J.L. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium spp., Dientamoeba fragilis, Entamoeba histolytica,* and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J. Clin. Microbiol*. 49, 257-262, 2011.

[10] Chan F., Stewart N., Guan M., et al. Prevalence of *Dientamoeba fragilis* antibodies in children and recognition of a 39 kDa immunodominant protein antigen of the organism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 950-954, 1996.

[11] Barratt J.L., Harkness J., Marriott D., Ellis J.T., 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*. 2, 3-12, 2011.

[12] 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*. 29, 411-416, 2010.

[13] Preiss U., Ockert G., Broemme S., Otto A. On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol*. 35, 27-34, 1991.

[14] van Gool T., Dankert J. 3 emerging protozoal infection in The Netherlands: *Cyclospora, Dientamoeba* and *Microspora* infection. *Ned. Tijdschr. Geneeskd*. 140, 155-160, 1996.

[15] Bruijnesteijn van Coppenraet L.E., Wallinga J.A., Ruijs G.J., Bruins M.J., Verweij J.J. 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*. 15, 869-874, 2009.

[16] Stensvold C.R., Arendrup M.C., Mølbak K., Nielsen H.V. The prevalence of *Dientamoeba fragilis* in patients with suspected enteroparasitic disease in a metropolitan area in Denmark. *Clin. Microbiol. Infect*. 13, 839-842, 2007.

[17] Vandenberg O., Peek R., Souayah H., et al. 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.* 10, 255-261, 2006.

[18] Crotti D., D'Annibale M.L. Human intestinal parasitosis: role of *Dientamoeba fragilis* in human infections. *Ann. Ig*. 19, 27-34, 2007.

[19] Crotti D., D'Annibale M.L. Intestinal infections caused by *Dientamoeba fragilis* and *Giardia duodenalis* in our experience. *Recenti Prog. Med*. 98, 361-366, 2007.

[20] Crotti D., D'Annibale M.L. Role of *Dientamoeba fragilis* in human bowel infections. *Infezioni in Medicina* 15, 30-39, 2007.

[21] Hosmer D.W., Lemeshow S. Applied logistic regression (2nd Edition) 2000. New York, NY: John Wiley & Sons.

[22] Rayan H.Z., Ismail O.A., El Gayar E.K. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 37, 599-608, 2007.

[23] Lagacé-Wiens P.R., VanCaeseele P.G., Koschik C. *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. *C.M.A.J*. 175, 468-469, 2006.

[24] Norberg A., Nord C.E., Evengård B. *Dientamoeba fragilis* a protozoal infection which may cause severe bowel distress. *Clin. Microbiol. Infect*. 9, 65-8, 2003.

[25] Gijsbers C.F., Benninga M., Büller H. Clinical and laboratory findings in 220 children with recurrent abdominal pain. *Acta Paediatr*. 100, 1028-1032, 2011.

[26] Banik G.R., Barratt J.L., Marriott D., Harkness J., Ellis J.T., Star k D. A case-controlled study of *Dientamoeba fragilis* infections in children. *Parasitology* 27, 1-5, 2011.

[27] Crotti D., D'Annibale M.L. *Dientamoeba fragilis* and dientamoebiasis: aspects of clinical parasitology and laboratory diagnosis. *Parassitologia* 43, 135-138, 2001.

[28] Xiao L., Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol*. 38, 1239-55, 2008.

[29] Johnson J.A., Clark C.G. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J. Clin. Microbiol*. 38, 4653-4654, 2000.

[30] Windsor J.J., Macfarlane L., Clark C.G. Internal transcribed spacer dimorphism and diversity in *Dientamoeba fragilis*. *J. Eukaryot. Microbiol*. 53, 188-192, 2006.
[31] Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J. Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int. J. Parasitol*. 35, 57-62, 2005.
[32] Bart A., van der Heijden H.M., Greve S., Speijer D., Landman W.J., van Gool T. Intragenomic variation in the internal transcribed spacer 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. *J. Clin. Microbiol*. 46, 3270-3275, 2008.
[33] Barratt J.L., Banik G.R., Harkness J., Marriott D., Ellis J.T., 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* 137, 1867-1878, 2010.
[34] Windsor, J. J., Rafay A.M., Shenoy A.K., and Johnson E.H. The incidence of *Dientamoeba fragilis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br. J. Biomed. Sci.* 55, 172-175, 1998.
[35] Staat M.A., Rice M., Donauer S., et al. Intestinal parasite screening in internationally adopted children: importance of multiple stool specimens. *Pediatrics* 128, 613-622, 2011.
[36] Stensvold C.R., Lewis H.C., Hammerum A.M., et al. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect*. 137, 1655-1663, 2009.
[37] Garcia J.A., Cimerman S. Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 45, 156-158, 2012.
[38] Windsor J.J., Macfarlane L. Irritable bowel syndrome: the need to exclude *Dientamoeba fragilis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 72, 501, 2005.
[39] 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*. 37, 11-20, 2007.
[40] Barratt J.L., Harkness J., Marriott D., Ellis J.T., Stark D. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology* 24, 1-16, 2011.
[41] Burrows R.B., Swerdlow M.A. *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 5, 258-265, 1956.
[42] Cerva L., Schrottenbaum M., Kliment V. Intestinal parasites: a study of human appendices. *Folia Parasitol. (Praha)*. 38, 5-9, 1991.
[43] Menghi C.I., Makiya R., Gatta C.L., et al. *Dientamoeba fragilis*: molecular biology techniques for the elucidation of its mode of transmission. *Parasitol. Latinoam*. 60, 25-31, 2005.
[44] Knowles R., Das Gupta B.M. Some observations on the intestinal protozoa of Macaques. *Ind. J. Med. Res.* 24, 547-556, 1936.
[45] Myers B.J., Kuntz R.E. Intestinal protozoa of the Baboon Papio doguera Pucheran, 1856. *J. Protozool.* 15, 363-365, 1968.
[46] Noble G.A., Noble E.R. *Entamoeba* in farm animals. *J. Parasitol*. 38, 571-595, 1952.
[47] Crotti D., Sensi M., Crotti S., Grelloni V., Manuali, E. *Dientamoeba fragilis* in swine population: a preliminary investigation. *Vet. Parasitol*. 145, 349-351, 2007.
[48] Stark D., Phillips O., Peckett D., et al. Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Vet. Parasitol*. 151 (1), 21-26, 2008.
[49] Stark D., Roberts T., Marriott D., Harkness J., Ellis J.T. Detection and transmission of *Dientamoeba fragilis* from environmental and household samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 86 (2), 233-236, 2012.
[50] Cacciò S.M., Sannella A.R., Manuali E., et al. Pigs as Natural Hosts of *Dientamoeba fragilis* Genotypes Found in Humans. *Emerg. Infect. Dis*. 18 (5), 838-841, 2012.
[51] Windsor J.J., Bamber A.I. and Macfarlane L. Detection of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis hominis* using a simple staining method. *Br. J. Biomed. Sci.* 63 (1), 27-28, 2006.
[52] Clark C.G., Diamond L. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev*. 15, 329-341, 2002.
[53] Windsor J.J., Macfarlane L., Hughes-Thapa G., Jones S.K., Whiteside T.M. Detection of *Dientamoeba fragilis* by culture. *Br. J. Biomed. Sci*. 60 (2), 79-83, 2003.
[54] Verweij J.J., Mulder B., Poell B., van Middelkoop D., Brienen E.A., van Lieshout L. Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Mol. Cell. Probes*. 21 (5-6), 400-404, 2007.
[55] Calderaro A., Gorrini C., Montecchini S., et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Dientamoeba fragilis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 67 (3), 239-245, 2010.
[56] Girginkarde ler N., Co kun S., Cüneyt Balcio lu I., Ertan P., Ok U.Z. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. *Clin. Microbiol. Infect*. 9 (2), 110-113, 2003.
[57] Kurt O., Girginkarde ler N., Balcio lu I.C., Ozbilgin A., Ok U.Z. A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clin. Microbiol. Infect*. 14 (6), 601-604, 2008.
[58] Guidetti C., Ricci L., Vecchia L. Prevalenza delle parassitosi intestinali a Reggio Emilia e provincia nel corso del 2009. *Infezioni in Medicina.* 3, 154-161, 2010.
[59] Grande R., Ranzi M.L., Restelli A., Maraschini A., Perego L., Torresani E. Prevalenza delle parassitosi intestinali nella popolazione afferente alla Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano: confronto tra il 1984-1985 e il triennio 2007-2009. *Infezioni in Medicina.* 1, 28-38, 2011.
[60] González-Moreno O., Laia 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.* 108, 87-93, 2011.