



RAPPORTI ISTISAN 19|14

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Amebe a vita libera nell'ambiente: ecologia, epidemiologia e metodi di rilevamento

A cura di L. Bonadonna, M. De Giusti, E. De Vito,
D. Di Cave, S. Di Pasquale, U. Moscato



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Amebe a vita libera nell'ambiente: ecologia, epidemiologia e metodi di rilevamento

A cura di

Lucia Bonadonna (a), Maria De Giusti (b), Elisabetta De Vito (c),
David Di Cave (d), Simona Di Pasquale (e), Umberto Moscato (f)

(a) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma.

*(c) Dipartimento di Scienze Umane, Sociali e della Salute,
Università di Cassino e del Lazio Meridionale, Cassino*

*(d) Dipartimento di Scienze cliniche e Medicina Traslazionale,
Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma*

*(e) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(f) Istituto di Sanità Pubblica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
19/14

Istituto Superiore di Sanità

Amebe a vita libera nell'ambiente: ecologia, epidemiologia e metodi di rilevamento.

A cura di Lucia Bonadonna, Maria De Giusti, Elisabetta De Vito, David Di Cave, Simona Di Pasquale, Umberto Moscato

2019, iii, 53 p. Rapporti ISTISAN 19/14

Le amebe a vita libera sono protozoi unicellulari che possono vivere all'interno di un ospite in condizioni di parassitismo facoltativo o avere un'esistenza autonoma nell'ambiente dove sono ubiquitarie e cosmopolite. Tra gli agenti microbici responsabili di patologie umane trasmesse attraverso l'acqua le amebe a vita libera rivestono un ruolo particolare. Infatti, oltre ad essere note per la patogenicità di alcuni generi e specie, manifestano anche la potenzialità di veicolare microrganismi patogeni presenti nell'ambiente idrico. All'interno del volume è presentato lo stato dell'arte sulle amebe a vita libera la cui diffusione nelle acque può rappresentare un rischio potenziale per la salute umana. Verranno descritte le caratteristiche ecologiche ed epidemiologiche di questi organismi, il loro adattamento nelle reti di distribuzione idrica e le dinamiche di interazione con gli altri microrganismi.

Parole chiave: Acqua; Amebe a vita libera; Ambiente; *Acanthamoeba*; *Naegleria*

Istituto Superiore di Sanità

Free-living amoebae in the environment: ecology, epidemiology and detection methods.

Edited by Lucia Bonadonna, Maria De Giusti, Elisabetta De Vito, David Di Cave, Simona Di Pasquale, Umberto Moscato

2019, iii, 53 p. Rapporti ISTISAN 19/14 (in Italian)

Free-living amoebae (FLA) are unicellular protozoans that can live within a host in conditions of optional parasitism or have an autonomous existence in the environment where they are ubiquitous and cosmopolitan. Among the microbial agents responsible for human waterborne diseases, free-living amoebae play a special role. In fact, in addition to pathogenicity of certain genera and species, they also show the potential to carry pathogenic microorganisms present in aquatic environment. This volume presents an overview of the state of art on free-living amoebae whose spread in water environment may pose a potential risk to human health. It describes the ecological and epidemiological characteristics of these organisms, their adaptation in water distribution systems and the dynamics of interaction with other microorganisms.

Key words: Free-living amoebae; Environment; *Acanthamoeba*; *Naegleria*; Water

Per informazioni su questo documento scrivere a: lucia.bonadonna@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, De Giusti M, De Vito E, Di Cave D, Di Pasquale S, Moscato U (Ed.). *Amebe a vita libera nell'ambiente: ecologia, epidemiologia e metodi di rilevamento*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2019. (Rapporti ISTISAN 19/14).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Premessa

Lucia Bonadonnaiii

Tassonomia delle amebe a vita libera

Simona Di Pasquale..... 1

Ecologia delle amebe a vita libera

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Rosa Paradiso, Maria Cristina Angelici 6

Epidemiologia delle infezioni da amebe a vita libera

Maria De Giusti, Domenico Barbato, Domenico Cacchio, Lucia Marinelli 15

Batteri resistenti alle amebe e implicazioni in sanità pubblica

Elisabetta De Vito, Ornella Di Bella, Fulvio Castellani, Elisa Langiano 23

Impianti idrici e governance della qualità dell'acqua

Umberto Moscato, Alice Borghini, Salvatore Ferrara 37

Considerazioni finali

*Lucia Bonadonna, Maria De Giusti, Elisabetta De Vito, David Di Cave,
Simona Di Pasquale, Umberto Moscato* 43

Appendice. Determinazione di amebe a vita libera

*Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Rosa Paradiso, David Di Cave, Federica Berrilli,
Margherita Montalbano Di Filippo* 47

PREMESSA

Le amebe a vita libera (spesso conosciute come *Free-Living Amoebae*, FLA) sono protozoi presenti in tutte le matrici ambientali a diffusione cosmopolita. L'etichetta di organismi "a vita libera" deriva dal fatto che il loro serbatoio è l'ambiente acquatico naturale, e quello realizzato dall'uomo è un habitat secondario favorevole. Sono protozoi unicellulari che possono vivere all'interno di un ospite in condizioni di parassitismo facoltativo o avere un'esistenza autonoma. Per tale proprietà sono anche definite amebe anfizoiche.

In particolare, anche se in realtà è *Acanthamoeba* spp. il protozoo più frequentemente rilevabile nell'ambiente, amebe a vita libera sono state isolate da suolo, sedimenti, polveri, aria, acque naturali e reflue, dolci, marine, termali, e sono state anche rilevate in acque confezionate, potabilizzate e sottoposte a trattamenti di disinfezione (acque destinate al consumo umano e di piscina) e in biofilm. Numerose specie di amebe a vita libera sono state segnalate in torri di raffreddamento, impianti di climatizzazione, deumidificatori, unità di dialisi, riuniti dentistici, apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua e su lenti a contatto. Individuate nell'uomo e in animali a sangue caldo e freddo, in soggetti malati sono state isolate da ferite, dalla cornea, dai polmoni e dal sistema nervoso centrale, anche se la loro presenza è stata dimostrata anche in individui sani.

La loro distribuzione e diversità nell'ambiente sono fortemente influenzate da temperatura, umidità, pH, disponibilità di nutrienti e appare chiara l'esistenza di un loro andamento stagionale. In condizioni ambientali ostili le amebe producono cisti che esistono solo in condizioni favorevoli liberando trofozoiti. Sopravvivenza e moltiplicazione sono anche associate sia alla presenza di batteri, soprattutto Gram-negativi, sia alla concentrazione degli stessi batteri. Infatti, con rapporti di concentrazione ameba: batteri di 1:10⁴, lo sviluppo dei protozoi è inibito.

Per il basso numero di infezioni riscontrate, le amebe non hanno mai rappresentato un argomento sanitario di interesse prioritario, anche se la mancanza di farmaci efficaci e l'esito quasi sempre fatale delle malattie indotte da alcune specie, le hanno sempre rese oggetto di interesse e di studio.

Negli ultimi decenni tuttavia, un'attenzione particolare è stata loro rivolta per il ruolo che rivestono come veicolo di trasmissione di microrganismi patogeni presenti nell'ambiente idrico. Infatti, circa un quarto degli isolati di origine ambientale, clinica o derivanti da lenti a contatto contengono microrganismi endosimbionti, definiti *Amoeba-Resistant Microorganisms* (ARM), microrganismi resistenti alle amebe, che sono in grado di mantenere la loro vitalità a livello intracellulare. Le amebe fungono così da riserva per altri microrganismi, proteggendoli da fattori ambientali ostili e fornendo condizioni favorevoli alla loro replicazione.

Per questa circostanza, nel 2017, presso la III Sezione del Consiglio Superiore di Sanità, presieduta dalla Prof.ssa Anna Teresa Palamara, e coordinata dalla Dott.ssa Anna Gaspardone, è stato istituito un Gruppo di Lavoro il cui compito è stato quello sia di approfondire gli aspetti sanitari associati alle amebe a vita libera rilevabili nelle acque, sia di valutare la rilevanza del problema in un'ottica di salvaguardia della salute. A seguito delle attività del Gruppo di lavoro è stato quindi predisposto il documento condiviso e di seguito presentato che produce informazioni sulle caratteristiche tassonomiche ed ecologiche di questi organismi, sulle loro possibili implicazioni di carattere sanitario, sul loro adattamento nelle reti di distribuzione idrica e sulle dinamiche di interazione con gli altri microrganismi. Inoltre, il volume fornisce un indirizzo metodologico univoco e specifiche raccomandazioni per minimizzare il rischio associato alla presenza di amebe nell'ambiente idrico, nonché, in Appendice, metodi analitici colturali e molecolari per la ricerca di questi organismi nelle acque.

Lucia Bonadonna
 Coordinatrice del Gruppo di Lavoro
 su Amebe a vita libera

TASSONOMIA DELLE AMEBE A VITA LIBERA

Simona Di Pasquale

Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le amebe a vita libera sono organismi unicellulari ubiquitari e opportunisti, ampiamente distribuiti in natura. Soltanto *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia* sono responsabili di infezioni nell'uomo.

Da un punto di vista filogenetico le amebe rappresentano un gruppo polifiletico, che includono specie che non hanno origine da un unico progenitore. Infatti *Acanthamoeba* e *Balamuthia* sono più strettamente correlate, molto distanti filogenicamente da *Naegleria* e *Sappinia*. Attualmente per la classificazione delle amebe a vita libera vengono impiegate tecniche di biologia molecolare in particolare il sequenziamento di filamenti genomici e ciò sta comportando continui aggiustamenti nella tassonomia (1).

Secondo la Società Internazionale di Protozoologia le amebe a vita libera sono classificate secondo un nuovo sistema di classificazione che non prevede designazioni di rango, come "classe", "sottoclasse", "super ordine" o "ordine". Questo nuovo approccio è stato scelto per evitare che un singolo cambiamento possa causare un problema a cascata su tutto il sistema e inoltre ha il vantaggio di essere più flessibile e più facile da modificare (2-4).

Acanthamoeba

Attualmente *Acanthamoeba* è classificata nel Super Gruppo Amorphea: Amoebozoa: Discosea: Longamoebia: Centramoebia (4).

Acanthamoeba è una ameba ubiquitaria ed è presente in tutto il mondo e nonostante l'elevata possibilità di contatto, le infezioni umane sono rare e sono associate a: Cheratiti, Encefalite Granulomatosa Amebica (EAG) (5, 6), lesioni cutanee, infezioni nasofaringeo, infezioni polmonari e renali (6).

Diverse specie di *Acanthamoeba* sono state isolate non solo dalla cornea di individui infetti ma anche dal cervello, dai polmoni, dalla pelle (7) e le specie che sono state spesso associate alle infezioni sistemiche umane sono *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, e *A. healyi*.

Più di 20 specie sono state riconosciute e classificate in base alle dimensioni delle cisti e al numero delle strutture citoscheletriche di actina (chiamate acanthopoda) presenti sulla superficie cellulare. Sulla base di questa valutazione le amebe sono state suddivise in tre gruppi distinti (7-9). Al Gruppo I sono state assegnate quattro specie *A. tubiashi*, *A. astromyxis*, *A. comandoni* e *A. echinulata*, che posseggono cisti di grandi dimensioni ($\geq 18 \mu\text{m}$) con una parete cistica interna "l'endocisti" stellata e con una parete esterna "l'ectocisti" liscia o rugosa e con grandi trofozoi (25-35 μm). Nel Gruppo II sono state incluse 11 specie: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. mauritaniensis*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradivionensis* e *A. hatchetti*, che presentano cisti di piccole dimensioni ($< 18 \mu\text{m}$) con un'endocisti poliedrica, globosa, ovoidale, o stellata e con un'ectocisti liscia o ondulata (9). Infine al Gruppo III sono state attribuite tutte le specie di amebe con cisti di piccole dimensioni ($< 19 \mu\text{m}$) e con un'endocisti globulare o ovoidale e con un'ectocisti liscia o ondulata.

Le condizioni di crescita, tuttavia, possono influenzare la morfologia delle cisti rendendo inaffidabile il riconoscimento delle specie basato solo sui criteri morfologici. Per questa ragione, sono stati adottati anche altri metodi per l'identificazione, come l'analisi dei profili di tre isoenzimi (l'esochinasi, l'esterasi e la fosfatasi acida) che purtroppo è risultata non del tutto soddisfacente (10); invece la classificazione basata su tecniche molecolari, in particolare sul sequenziamento completo (>2000 bp) dell'RNA ribosomiale 18S (rDNA SSU o rDNA 18S) ha identificato 20 diversi genotipi (T1-T20).

In alcuni casi, l'identificazione delle amebe mediante i criteri morfologici e la caratterizzazione molecolare hanno coinciso e fornito lo stesso risultato come per il genotipo T4 che corrisponde alla specie *A. castellani*, il genotipo T5 alla specie *A. lenticulata*, il genotipo T10 alla specie *A. culbertsoni*, il genotipo T15 alla specie *A. jacobsi* (11), in altri casi invece i genotipi di *Acanthamoeba* non sono stati correlati alle 21 specie classificate sulla base della morfologia delle cisti (12, 13).

Diversi autori hanno stabilito che se i genotipi presentano una variabilità genetica pari al 5% sono genotipi diversi. Un esempio è rappresentato dal genotipo T2 che presenta un polimorfismo al suo interno per cui si distinguono due allelomorfi T2a e T2b, divergenti tra loro del 4,9% e quindi potenzialmente genotipi diversi. Infatti il genotipo T2a è responsabile di cheratiti ed encefaliti nell'uomo mentre il T2b non è patogeno.

Acanthamoeba ha un ciclo di vita costituito di due fasi: una fase vegetativa e una fase di ciste. Nella fase vegetativa o di trofozoite le amebe si alimentano di detriti, di batteri, di lieviti e di altri organismi presenti nell'acqua e nel suolo e si riproducono per scissione binaria. I trofozoiti variano nelle dimensioni da 15 a 50 µm a seconda della specie. Sono uninucleati, e il nucleo ha una posizione centrale, di grandi dimensioni; è presente anche un nucleolo densamente colorato. Il citoplasma contiene sia numerosi mitocondri, ribosomi, vacuoli alimentari, sia un vacuolo contrattile. Il trofozoite è in grado di emettere sottili propaggini citoplasmatici filiformi detti acantopodi deputati al movimento e che spesso conferiscono al trofozoite un aspetto a riccio (14).

In condizioni sfavorevoli, come temperature estreme (da -20°C a 56°C), ambiente anaerobico, carenza di sostanze nutritive, disinfezione ed essiccamento o altri stress ambientali, le amebe si arrotondano e si incistano (15).

Le cisti si presentano uninucleate e in possesso di un nucleolo denso posizionato centralmente e con una doppia parete. Quando le condizioni diventano nuovamente favorevoli, ad esempio la temperatura ottimale, le cisti si schiudono e i trofozoiti emergono dai pori per nutrirsi e moltiplicarsi (16).

In entrambi le fasi, trofica o cistica questi organismi sono molto resistenti alle condizioni ambientali ed hanno un'ampia distribuzione in natura, ed è praticamente impossibile non isolare membri di questo genere da: suolo, acque salmastre, acqua minerale in bottiglia, torri di raffreddamento delle centrali elettriche e nucleari, impianti di riscaldamento, impianti di ventilazione e di aria condizionata, umidificatori, vasche idromassaggio, piscine per idroterapia negli ospedali, unità di irrigazione dentale, macchine per la dialisi, contenitore delle lenti a contatto, secrezioni polmonari, tamponi ottenuti da mucosa nasofaringea di pazienti con disturbi respiratori e di individui sani, autoinnesti mandibolari, e in campioni di feci (7).

Infine, è stato evidenziato che in condizioni di laboratorio, le cisti di *Acanthamoeba* possono rimanere vitali per circa più di 20 anni (17).

Balamuthia mandrillaris

Balamuthia mandrillaris è un patogeno che appartiene al Super Gruppo Amorphea: Amoebozoa: Discosea: Longamoebia: Centramoebia: *Balamuthia* (4).

Balamuthia mandrillaris come *Acanthamoeba* è responsabile EAG e interessa principalmente individui suscettibili (individui immunodepressi, immunocompetenti) ma è anche responsabile di infezioni nasofaringee e cutanee.

Per elevata omologia della sequenza dell'RNA ribosomiale 16S e per il tipo di infezioni provocate, la specie *Balamuthia mandrillaris* è strettamente correlata ad *Acanthamoeba*, e presenta un ciclo di vita, costituito da due stadi: lo stadio di trofozoite e lo stadio di ciste. Il trofozoite è pleomorfo con dimensioni comprese tra 12 a 60 µm (in media di 30 µm) e con un solo nucleo in posizione centrale, anche se forme binucleate sono state osservate occasionalmente (due o tre nuclei) nei tessuti infetti; vi è anche un denso nucleolo (7, 18). Questa specie si muove mediante pseudopodi e non si nutre di batteri, ma si può nutrire anche di piccole amebe e / o di piccoli lieviti (18).

Le cisti sono anch'esse uninucleate, hanno una forma più o meno sferica, con dimensioni che variano da 12 a 30 µm (in media di 15 µm). Si presentano con una doppia parete, una parete esterna ondulata (l'ectocisti) e una parete interna (l'endocisti), e un mezzo amorfo (mesocisti fibrillare) (17). Non presentano pori sulla parete (7).

Balamuthia è presente nel suolo e molto probabilmente anche nelle acque ma, non è mai stata isolata dall'ambiente probabilmente per le difficoltà di crescita

Sappinia

Sappinia è un'ameba patogena classificata tra il Super Gruppo Amorphea: Amoebozoa: Discosea: Longamoebia: Thecamoebida (4); attualmente comprende tre specie *Sappinia pedata*, *Sappinia diploidea*, e *Sappinia platani*.

L'analisi filogenetica per *S. pedata* e *S. diploidea* è basata sul sequenziamento del gene dell'RNA ribosomiale 18S.

Anche le amebe di *Sappinia* sono state identificate come potenziale agente eziologico della encefalite amebica negli esseri umani (18). Si presentano come piccole amebe globose nude e con un ciclo di vita di due fasi: la fase di trofozoite e di ciste.

Il trofozoite di *S. diploidea* si presenta con dimensioni elevate di circa 55-60 µm a forma ovoidale, appiattito, con due nuclei (raramente con 4 nuclei) opposti l'uno all'altro, con una superficie esterna liscia e con piccole rughe e con pseudopodi indistinti. Il citoplasma contiene un vacuolo alimentare e un vacuolo contrattile. Alcune cellule contengono batteri endosimbionti nei vacuoli citoplasmatici. La ciste matura si presenta con forma rotondeggiante di piccole dimensione (15-30 µm) con una doppia parete e con pori nucleari.

Il trofozoite di *S. pedata* ha una forma ovale con rughe lungo i bordi, ma non con rughe dorsali regolari. Ha una lunghezza di 45-65 µm e una larghezza di 18-35 µm e presenta due nuclei (raramente presenta 1-4 nuclei), e un grande nucleolo.

Le cisti di *S. pedata* sono rotonde, con un diametro di 21-23 µm, e le cisti immature possono presentarsi binucleate mentre le cisti mature sono uninucleate.

Queste amebe a vita libera sono diffuse in tutto il mondo e sono state isolate dal suolo, da materiale vegetale, dagli stagni di acqua dolce, ma anche dalle feci degli animali.

Naegleria fowleri

Naegleria è una ameba che appartiene al Super Gruppo Excavata: Discoba (4).

È meno ubiquitaria di *Acanthamoeba*, è dotata di flagelli, e si può ritrovare sia nel suolo che nell'acqua, è sensibile alle condizioni ambientali, al pH, alla disidratazione e non è in grado di vivere in acque marine.

Sulla base degli studi di sequenziamento genomico, sono state identificate 47 specie appartenenti a *Naegleria*, ma una sola specie, *Naegleria fowleri*, è patogena per l'uomo ed è responsabile della Meningoencefalite Necrotizzante Emorragica (MNE) chiamata Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP) (7, 18).

La classificazione di *Naegleria* si basa sul sequenziamento dell'RNA ribosomiale e prevede la retrotrascrizione nel seguente ordine: subunità piccola (18S) rDNA, un interno trascritto distanziale (ITS1), 5.8S rDNA, un secondo trascritto ITS (ITS2), e la subunità grande (28S) rDNA. La sequenza del trascritto ITS è stata utilizzata per la caratterizzazione e l'identificazione di tutte le specie di *Naegleria* finora isolate.

La specie *Naegleria fowleri* presenta tre fasi del suo ciclo di vita, una fase ameboide, una fase flagellata, una fase di cisti. La *N. fowleri* può mutare da un fenotipo all'altro a seconda delle condizioni ambientali. In condizioni favorevoli, quando le temperature aumentano e raggiungono i 42°C, *Naegleria* si presenta nello stadio di trofozoite (fase ameboide), si nutre di batteri Gram-negativi, si riproduce per scissione binaria ed è infettiva (7, 18). Il trofozoite misura 10-25 µm ed è caratterizzato da un singolo nucleo con un prominente nucleolo, numerosi mitocondri, vacuoli alimentari, un vacuolo contrattile, un reticolo endoplasmatico, i ribosomi e altri organelli citoplasmatici di membrana. Si presenta con un aspetto lungo e sottile e per muoversi forma una o più pseudopodi lobosi. L'estremità posteriore presenta filamenti vischiosi a cui batteri patogeni e non, possono aderire prima di essere ingeriti (18). Solo i trofozoiti possono nutrirsi, riprodursi e / o diventare cisti.

Naegleria fowleri quando si trova nella fase flagellata ha una forma allungata a forma di "pera", con dimensioni di 10-16 µm, in possesso di due flagelli nella parte anteriore, un nucleo nella regione anteriore più stretta e un grande nucleolo. In questo stadio la *Naegleria fowleri* non presenta il citostoma quindi non può alimentarsi, non si riproduce e non forma cisti, per questa ragione ritorna nella forma ameboide (18, 19).

Quando l'ambiente diventa sfavorevole, come la sovrappopolazione, la scarsità di approvvigionamento alimentare, le basse temperature (sotto i 10°C) e l'essiccazione, i trofozoiti interrompono il loro metabolismo e diventano metabolicamente inattivi e passano alla forma dormiente conosciuta come fase di cisti. Le cisti sono sferiche con diametro di 7-12 µm, hanno un unico nucleo con un grande nucleolo e due pareti: una parete spessa l'endocisti e una parete sottile l'ectocisti. L'esame dell'ultrastruttura rivela la presenza di uno a due pori mucoidi per ciste, attraverso i quali emerge il trofozoite. Come nella fase flagellate, le cisti di *Naegleria fowleri* non si nutrono e non si riproducono. Le tre forme e la loro inter-conversione rendono questa ameba un'eccellente modello per studiare i processi di differenziazione cellulare.

Bibliografia

1. Briancesco R, Bonadonna L. Free living amoebae in water environment: health implications. *Microbiol Med* 2013;28(3):140-7.
2. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot Microbiol* 2005;52:399-451.
3. Adl S M, Leander B S, Simpson, AGB, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle, G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld F, Mendoza L,

- Moestrup Ø, Mozley-Stanridge SE, Smirnov AV, Spiegel F. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* 2007;56:684-9.
4. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mcmanus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S., Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2012;59(5):429-93.
 5. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis* 1990;12(3):490-513.
 6. Martinez AJ. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991;13 Suppl 5:S399-402.
 7. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50(1):1-26.
 8. Fuhrich Fabres L, Peixoto dos Santos SR, Brittes Benitez L and Brittes Rott M. Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in Southern Brazil. *Acta Parasitologica* 2016;61(2):221-7.
 9. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol* 2013;60:626-33.
 10. Costas M and Griffiths AJ. Enzyme Composition and the Taxonomy of *Acanthamoeba*. *J Protozool* 1985;32(4):604-7.
 11. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45:45-54.
 12. Corsaro D, Walochnik J, Köhlsler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 2015;114:2481–90.
 13. Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol* 2005;54:755-9.
 14. Angelici MC, De Sanctis A, Funari E, Di Cave D, Mantelli F, Bonini S. *Acanthamoeba nelle acque: un problema di sanità pubblica in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016 (Rapporti ISTISAN 13/16).
 15. Gruppo di lavoro SItI - Scienze Motorie della Società Italiana di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica. *Linee guida per gli ambienti acquatici salubri ad uso ricreativo. Piscine e ambienti simili*. Quaderni sanitari per scienze motorie, Vol. 2. Organizzazione Mondiale della Sanità. Roma: Antonio Delfino; 2006.
 16. Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (*Amoebozoa*, *Acanthamoebidae*). *Parasitol Res* 2010;107:233-8.
 17. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veter Parasitol* 2004;126:91-120.
 18. Govinda S, Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:590-4.
 19. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica* 2016;164:375-94.

ECOLOGIA DELLE AMEBE A VITA LIBERA

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Rosa Paradiso, Maria Cristina Angelici
Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le amebe a vita libera si ritrovano in numerosi ambienti, molto diversi tra loro. Lo studio di questi organismi è complicato dalle loro dimensioni e proprio dalla capacità di essere rilevate in una molteplicità di ecosistemi. Le amebe a vita libera (*Free-Living Amoebae*, FLA) vivono all'interfaccia acqua-suolo, acqua-animale, acqua-aria, piante acquatiche, ecc. dove si nutrono di batteri, funghi, lieviti, alghe e altri protozoi. La particolare composizione e il numero di specie presenti in un ecosistema dipendono dalla loro capacità di mantenersi in ambienti biotici e abiotici, che determinerà la loro distribuzione (1, 2).

Colonizzare un ambiente dipende in larga misura da fattori ambientali, quali disponibilità di nutrienti e temperatura. Le FLA sono distribuite in tutti gli ambienti, ma la composizione specie-specifica in un sito particolare dipende in gran parte dalle condizioni del mezzo circostante, dalle popolazioni microbiche con cui convivono, dallo stadio fisiologico, dalle caratteristiche fisiche e chimiche dell'ecosistema e dai nutrienti presenti (3, 4). In altre parole, l'organizzazione di una comunità microbica dipende anche dalla storia di quel sito, come anche dall'ordine con cui la specie si stabilisce rispetto ad altri organismi, dal tipo di interazioni che si sviluppano tra essi, e dalla capacità della comunità microbica di raggiungere uno stato o un equilibrio permanente.

La diffusione/distribuzione/concentrazione di qualsiasi specie microbica si basa sulla propria capacità di sopravvivere in condizioni avverse. Le FLA hanno sviluppato due strategie principali: la formazione di cisti e la produzione di organismi più piccoli e più numerosi; quest'ultima può essere osservata in specie che non formano cisti, come alcune specie appartenenti al genere *Mayorella* che permette di sfruttare i vantaggi che derivano dall'accumulo temporaneo di nutrienti in ambienti disomogenei. Tuttavia, senza un substrato nutritivo, questi organismi hanno vita relativamente breve (4).

Le FLA che formano cisti possono invece sopravvivere più a lungo anche durante i periodi di scarsità di nutrienti o di altre circostanze avverse. Tuttavia, non sono in grado di attivare processi di excistazione se le condizioni non tornano favorevoli e la quantità di nutrienti sufficiente.

In entrambi le fasi del ciclo vitale, trofica o cistica le amebe a vita libera sono molto resistenti alle condizioni ambientali. Le cisti di *Naegleria* possono sopravvivere per almeno 12 mesi a 4°C ed excistare in trofozoiti ancora infettivi dopo tale arco di tempo (5). In condizioni di laboratorio, le cisti di *Acanthamoeba* sono state rinvenute vitali dopo più di 20 anni. *Acanthamoeba* vive in un ampio range di condizioni di temperatura, pH e salinità e, da un punto di vista ecologico, il fattore limitante è rappresentato dalla disponibilità di batteri che costituiscono la fonte di alimento. *Naegleria fowleri*, molto diffusa nel suolo e nell'acqua, è meno ubiquitaria di *Acanthamoeba* e più sensibile alle condizioni ambientali, al pH, alla disidratazione e non è in grado di vivere in acque di mare.

Nell'ambiente naturale il vento e le correnti d'acqua sono i meccanismi specifici di diffusione delle FLA che in tal modo vengono disperse ovunque. Una volta sospesi nell'aria, cisti e trofozoiti si comportano come il resto del particolato sospeso: il trasporto e la loro diffusione dipendono sostanzialmente dalle dinamiche atmosferiche piuttosto che da meccanismi propri. La luce ultravioletta e la siccità sono le principali cause della perdita di vitalità e poco si sa sugli effetti dei contaminanti sulla sopravvivenza amebica.

Le FLA svolgono un ruolo importante negli ecosistemi in quanto predatori di batteri, alghe, funghi, mentre sono predate da altre amebe, nematodi, piccoli crostacei, rotiferi. Di conseguenza,

le dinamiche delle loro popolazioni sono collegate tra loro. Questo legame è molto importante per la stabilità e la produttività delle comunità biologiche, perché più importante della loro abbondanza è il turnover di nutrienti (6).

Amebe, e protozoi in generale, aumentano la riconversione dei nutrienti e collegano i livelli trofici inferiori con quelli superiori. Questi livelli sono determinati dalla dinamica delle popolazioni (7).

L'efficienza della sintesi della biomassa protozoaria è di circa il 50-70%; la presenza di protozoi stimola il ricambio batterico di fissazione del fosforo e dell'azoto (8). I protozoi rappresentano anche una riserva di carbonio e nutrienti minerali quando formano cisti. Per la loro fisiologia, questa riserva è essenziale per la stabilità e la produttività delle comunità di piante e animali (9).

Le amebe sono descritte come un gruppo di organismi che si nutre di cellule (batteriche, fungine) come substrato nutritivo. Dipendono da composti specifici presenti nelle cellule microbiche ingerite come fattori di crescita e hanno bisogno di una dieta equilibrata di amminoacidi e di altre importanti sostanze (10). Sono una classe di organismi che vivono in acqua con elevate concentrazioni di sostanza organica contenente batteri, particolato, e materiale in decomposizione. Sono spesso aerobi facoltativi. I loro sistemi di trasporto e permeabilità sono ben sviluppati per la sopravvivenza in ambienti con fonti ridotte di carbonio e azoto.

Acanthamoeba polyphaga è un buon esempio di organismo che può diventare un parassita occasionale o stabilire una simbiosi. Ad esempio, *A. castellani* può albergare *Legionella*, come altri batteri endosimbionti, che può vivere all'interno di amebe senza essere digerita. Le amebe forniscono fattori di crescita per la sopravvivenza di *Legionella* che può mantenersi a basso pH nel citoplasma e nei vacuoli digestivi dei protozoi.

Per approfondimenti sul tema si rimanda al capitolo specifico.

Le FLA sono diffuse in tutto il mondo e occupano una grande varietà di regioni e microhabitat. Esse possono trovarsi in atmosfera, rizosfera, fillosfera, suolo, particolato sospeso nella colonna d'acqua, su funghi, all'interno delle cavità degli organismi superiori e nella regione orale degli esseri umani.

Importante è quindi analizzare il ruolo che svolgono nell'ambiente per valutare la loro reale importanza ecologica, come anche la loro potenzialità di agenti patogeni.

Amebe nei corpi idrici

Le FLA possono essere trovate in tutti gli ambienti acquatici.

Negli ambienti marini, i generi più comuni sono *Paramoeba*, *Platyamoeba*, *Vexillifera*, *Flabellula*, *Mayorella*, e *Acanthamoeba*. Quasi nessuna ameba del suolo può sopravvivere alle condizioni ambientali marine, ad eccezione di *Acanthamoeba* (11, 12). Queste specie possono sopravvivere per la loro tolleranza ai forti cambiamenti di osmolarità e ad altre situazioni avverse che eliminano la maggior parte delle specie terrestri. Alcune sono molto adattate all'ambiente salino; per esempio, *Platyamoebae pseudovannellida* può sopravvivere a un grado di salinità del 150‰ (13).

Amebe del suolo possono comunque svilupparsi abbastanza bene in ambienti d'acqua dolce. Frequentemente vengono veicolate come cisti e trasportate da correnti d'acqua, movimenti d'aria, o associate ad animali. Possono anche raggiungere l'acqua come trofozoiti.

Una volta in acqua, devono aderire a particolato sospeso nella colonna d'acqua per nutrirsi e avere a disposizione un substrato protettivo. Il particolato sospeso è un elemento importante nel comportamento dei laghi come nicchia ecologica e risorsa per i microrganismi. La materia organica è usata dai batteri, che a loro volta alimentano le amebe. Il tasso più alto di attività

amebica si manifesta in acqua superficiale, sedimenti, particolato e strutture sommerse di piante e animali. L'attività nella colonna d'acqua dipende dalla quantità di particelle sospese. Poiché le amebe non nuotano (con l'eccezione delle amebe flagellate), hanno bisogno di una superficie per il completamento del loro ciclo vitale. Le FLA preferiscono generalmente i cianobatteri perché possono utilizzarli come substrato e come nutrimento quando agli aggregati aderiscono altri batteri. Possono anche utilizzare mucillagini algali e sostanze extracellulari per crescere (14).

La diffusione di ossigeno raggiunge solo il primo centimetro nei sedimenti in alcuni corpi idrici. Tuttavia, i sedimenti di laghi profondi possono manifestare attività biologica maggiore rispetto alla zona litorale. La presenza di batteri e dei loro predatori aumenta il trasferimento di energia nella catena alimentare acquatica. I protozoi recuperano il carbonio che altrimenti potrebbe andare perduto, utilizzandolo come scarto, essudato animale e vegetale, e parete della cellula vegetale.

I generi che si trovano più frequentemente nelle acque sono *Acanthamoeba*, *Vermoamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Tetramitus*, *Naegleria*, *Adelphamoeba*, *Echinamoeba*, *Balamuthia* e *Sappinia* (15). Poiché la maggior parte degli studi si basa su metodi colturali, risultano sottostimate sia la diversità delle amebe a vita libera, sia la loro concentrazione. Inoltre l'identificazione basata sul riconoscimento morfologico porta spesso ad errate identificazioni.

L'abbondanza stagionale di specie termotolleranti sembra essere correlata ai cambiamenti della temperatura dell'acqua. La densità delle popolazioni amebiche termotolleranti ha il suo massimo sviluppo durante l'estate. In alcune aree, in genere, la specie litorale più rappresentata in maggio è *Vahlkampfia*, *Hartmannella* in giugno, e *Acanthamoeba* e *Naegleria* in agosto. *Acanthamoeba* è più abbondante durante l'estate (circa l'82% delle amebe totali), seguito da *Hartmannella* e *Vahlkampfia*. *Acanthamoeba* e *Naegleria* compaiono ancora alla fine dell'estate, suggerendo che sono altamente resistenti alle condizioni anossiche e riducenti dei sedimenti profondi.

I picchi di concentrazione di *Acanthamoeba* osservati in agosto, settembre e novembre potrebbero essere correlati alla predazione di alghe e cianobatteri che solitamente hanno incrementi di concentrazione alla fine dell'estate.

È ancora da approfondire la capacità dei trofozoiti di mantenersi nell'ambiente perché il loro ruolo ecologico dipende dal loro stadio fisiologico, in quanto le cisti sono inattive e servono solo come serbatoi. I trofozoiti sono l'effettivo collegamento tra microsistemi e macrosistemi.

Il particolato sospeso è un'importante nicchia ecologica, e le FLA sono state trovate nello strato detritico. Il numero di amebe è maggiore nello strato di Neuston rispetto alla colonna d'acqua o nei sedimenti, il che suggerisce differenze di microhabitat tra la pellicola superficiale dell'acqua e il resto del corpo idrico (16, 17). Le FLA resistono alle condizioni mutevoli dello strato di Neuston. Sono più abbondanti a pH 7,6; il loro numero è più basso a pH da 7,3 a 7,5 o da 7,7 a 7,8, e si riduce a pH alcalini, anche se alcune amebe, tuttavia, possono tollerare pH 8,6 e oltre.

Le specie di FLA tollerano normalmente temperature tra i 10°C e i 30°C. Sotto i 4°C, possono sopravvivere solo ceppi resistenti a basse temperature come *A. poliphaga*, isolata anche dal ghiaccio antartico e norvegese. Specie termotolleranti come *N. fowleri* possono crescere molto bene sopra i 37°C, prediligendo i 40°C, e alcuni ceppi di *Hartmannella* possono tollerare anche 48°C.

Attualmente i prolungati periodi di caldo e di siccità connessi ai cambiamenti climatici, stanno provocando incrementi di temperatura nelle acque dolci superficiali con aumento della concentrazione di amebe nei bacini di approvvigionamento idrico. È probabile queste modifiche climatiche favoriscano la diffusione e l'insediamento di *N. fowleri* in aree e territori dove la sua presenza non è ancora stata segnalata (18). Pertanto, il riscaldamento globale, influenzando sulla

temperatura dell'acqua, potrebbe determinare un incremento numerico di casi di infezioni amebiche e un ampliamento delle aree geografiche interessate (19).

Più autori hanno riportato un'elevata prevalenza di amebe a vita libera a seguito di eventi di grandi precipitazioni e sversamenti di reflui fognari (20, 14).

In uno studio effettuato nel 2010 sulla concentrazione delle amebe in un lago nel sud della Carolina, le precipitazioni sono state associate ad incrementi delle conte amebiche. La revisione dei dati meteorologici ha evidenziato che le temperature nelle aree in cui era praticata la balneazione raggiungevano e mantenevano valori soglia favorendo la crescita delle amebe e anche le precipitazioni giocavano un ruolo importante (15).

Prove sperimentali condotte da Tyndall *et al.* (21) hanno dimostrato che l'apporto di acqua termale in un laghetto di acqua fredda determinava incrementi di cinque ordini di grandezza di amebe termofile e di due ordini di grandezza di *Naegleria* patogene, concentrazioni che tornavano ai valori originari 30-60 giorni dopo la cessazione degli apporti idrici. L'indagine, condotta nel sud-est degli Stati Uniti, sulle acque del Savannah River, a monte e a valle di un impianto di depurazione che sversava nel fiume, ha dimostrato che la concentrazione di FLA e di *Naegleria* termofile era significativamente correlata con la temperatura dell'acqua e con la conducibilità.

Nell'intervallo di temperatura da 7°C a 28,5°C non è stata tuttavia evidenziata alcuna correlazione tra temperatura e concentrazione di amebe a vita libera nell'ambiente idrico, come dimostra lo studio effettuato su acque superficiali utilizzate per scopi potabili in otto Paesi europei (22).

Le specie di *Acanthamoeba* sono molto tolleranti a condizioni estreme. Per esempio, *A. polyphaga* è stata isolata da sedimenti a 2500 m di profondità (23). La resistenza è dovuta alla struttura delle cisti e alla capacità dei trofozoi di tollerare salinità, pressioni osmotiche e altre caratteristiche variazioni dell'ambiente marino.

A. rhysodes è la più abbondante ameba che si trova in terreni umidi indiani ricoperti da mangrovie. La sua popolazione è più alta durante la stagione umida forse a causa della bassa salinità dovuta all'acqua piovana, ma è anche possibile che ciò sia una conseguenza di una maggiore quantità di nutrienti derivati dal loro dilavamento durante la stagione dei monsoni.

Le acque con elevate quantità di materia organica producono un aumento della popolazione batterica che nutre amebe e protozoi in generale. Le FLA approfittano di questa situazione, in particolare negli impianti di trattamento delle acque reflue (24). Molte amebe vivono in questi sistemi. Tra le specie più comuni trovate nelle acque reflue grezze e nei sistemi di trattamento si ritrovano *Amoeba proteus*, *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *Iodamoeba butschlii*, *H. exundans*, *H. vermiformis*, *Naegleria* spp., *Pelomixa palustris*, *Rosculus ithacus*, *Vahlkampfia avara*, e *V. russelli*. Tutte queste specie sono presenti come cisti e come trofozoi.

In sintesi, le FLA vivono normalmente nelle acque, su sedimenti, particolato e residui animali e vegetali fino a che i processi di risospensione li portano nella colonna d'acqua, da dove poi risedimentano. Una volta nei sedimenti, solo le amebe resistenti alle condizioni anossiche e riducenti sono capaci di sopravvivere come cisti o trofozoi fino a quando i processi di risospensione li portano di nuovo in superficie. Questi processi possono consentire alle amebe dei sedimenti di raggiungere le interfaccia acqua-aria dove possono trovare migliori condizioni per sopravvivere, anche se queste condizioni possono cambiare all'improvviso. Disponibilità di superfici per l'adesione, variazioni di pH, osmolarità, temperatura e contenuto di materia organica determinano le condizioni di sopravvivenza delle FLA nei corpi idrici.

Da una rassegna di studi condotti in Europa e negli Stati Uniti è emerso che le concentrazioni delle amebe a vita libera sono più elevate nelle acque dolci superficiali piuttosto che nelle acque profonde, mentre la biodiversità subirebbe solo variazioni di lieve entità (25).

La concentrazione e la biodiversità delle amebe all'interno delle reti di distribuzione dell'acqua potabile sono generalmente più alte di quelle riscontrate nelle acque dopo trattamento

in uscita dagli impianti, probabilmente per fenomeni di contaminazione, riconducibili a rotture accidentali e danneggiamento di tubi, esistimento di cisti amebiche e riduzione di disinfettante residuo.

Le fluttuazioni stagionali delle amebe nei reservoir hanno un andamento opposto a quello delle popolazioni batteriche e dei protozoi flagellati che tendono ad aumentare nei mesi caldi, a causa dell'azione predatrice svolta da rotiferi e crostacei.

I "rami morti" e i tratti terminali ciechi costituiscono siti ideali di proliferazione; e in particolare, a livello del biofilm adeso alle pareti dei tubi che si suppone abbia preferenzialmente luogo la moltiplicazione delle amebe. Infatti, la concentrazione e la biodiversità delle amebe presenti nel biofilm sono di gran lunga superiori a quelle riscontrate nel lume dei tubi (26). Il biofilm può pertanto costituire un sito di rilascio delle amebe a vita libera nelle acque che possono anche andare a colonizzare altre aree; i meccanismi e i fattori che regolano tale processo necessitano tuttavia di ulteriori approfondimenti. Anche i sedimenti presenti nelle reti idriche contengono amebe, a concentrazioni e diversità addirittura superiori a quelle dei biofilm. Pertanto, la frequenza con cui le amebe a vita libera vengono rinvenute nei serbatoi di stoccaggio è molto più elevata (>79%) di quella delle reti di distribuzione (>10%), probabilmente per l'accumulo di biofilm e sedimenti.

Amebe in atmosfera

Acanthamoeba è uno dei generi di protozoi più frequentemente isolati dall'aria, per la peculiarità di essere facilmente trasportata. Il suo isolamento è importante per la sua potenzialità di patogeno e la sua capacità di internalizzare e trasportare patogeni umani.

Acanthamoeba, *Hartmannella* e *Vahlkampfia* sono i principali generi isolati dall'aria urbana. Sono da approfondire le ricerche circa la loro presenza nell'aria rurale per meglio comprendere la loro dipendenza dalle attività svolte.

L'abbondanza di ciascuna specie è ancora incerta, ma la loro diversità può essere considerata come un elemento indiretto, segno della loro abbondanza e delle condizioni sanitarie all'interno del luogo dove sono isolate (27).

Amebe nei suoli

Il suolo è un sistema molto dinamico in cui si svolgono attività biologica e ciclo dei nutrienti per sostenere gli ecosistemi terrestri. La composizione organica è il prodotto dell'attività biologica e comporta il passaggio di materia ed energia attraverso la catena alimentare, che è sostenuta principalmente da tessuti vegetali morti ed essudati delle radici con un piccolo contributo da fonti animali. I minerali si trovano nelle loro forme ioniche o come particolato. La porosità del suolo ha una grande influenza sulla concentrazione di ossigeno e sulla distribuzione dei microrganismi.

Pori di 2-10 µm trattengono l'acqua per capillarità formando un ambiente quasi anaerobico che si traduce in una grande abbondanza di piccoli flagellati e FLA. La dimensione dei pori controlla anche la distribuzione di ciliati, amebe testate e meiofauna (gastrotrichi, rotiferi e nematodi); i piccoli pori favoriscono i piccoli protozoi (28). Questo in parte spiega perché, nei suoli, i ciliati sono meno numerosi dei flagellati e delle FLA. La composizione all'interno dei pori del suolo è molto diversa da quella sulla superficie degli aggregati (29). La materia organica è un fattore di modificazione della struttura del suolo e può essere trovata come sostanza in decomposizione di piante e animali o di humus e acidi umici.

La materia organica del suolo è spesso composta per l'85% di materia in decomposizione, 10% di radici, 4% di batteri e funghi e 1% di fauna terricola che include principalmente protozoi che possono essere costituiti da tre classi. La prima classe include protozoi, gastrotrichi, rotiferi, e nematodi, la seconda include acari e collemboli, e la terza è costituita da microartropodi, principalmente ditteri e oligocheti (che ridistribuiscono la materia organica nella matrice minerale del suolo) (29). L'humus e le argille formano una matrice colloidale la cui grande superficie può assorbire tossine, enzimi extracellulari, sostanze nutritive, o anche gli stessi microrganismi. L'adsorbimento sulle superfici può cambiare l'attività microbica, la sopravvivenza, il tasso di crescita, e le interazioni con piante, animali, e microrganismi che possono fare aderire argilla e materia organica sulla loro superficie e con alcuni polisaccaridi favoriscono la formazione di aggregati del suolo con particelle minerali (30, 31).

Anche nel suolo secco dei deserti, dove l'acqua è non disponibile, l'umidità relativa del suolo è superiore a quella dell'atmosfera circostante, rendendo possibile la sopravvivenza di spore, cisti, e di altre forme microbiche di resistenza per lunghi periodi di tempo.

L'aria presente tra le particelle di suolo contiene dal 10 al 100% di anidride carbonica in più rispetto all'aria in atmosfera. Tuttavia non esiste una relazione diretta tra questo e le proporzioni di microrganismi aerobi/anaerobi nei suoli (32, 33).

Sulla superficie del suolo si instaurano condizioni variabili di temperatura, mentre i cambiamenti nel sottosuolo sono di tipo steapico.

La variazione del pH è importante per la microflora. Variazioni critiche del pH possono verificarsi durante i periodi di forte attività biologica. Le variazioni di pH possono variare da valori tipici di 0,5 a 1 o 2 unità in alcuni suoli e climi (queste variazioni sono comuni nei suoli tropicali), e sono più alte dove il suolo ha una bassa capacità tampone, come nei suoli acidi sabbiosi.

Il ruolo del pH nella distribuzione microbica nel suolo è molto complesso perché ha un ampio range di effetti sulla disponibilità di sostanze nutritive per i microrganismi. Modifica anche l'adsorbimento e l'attività di enzimi extracellulari. Le amebe testate preferiscono suoli acidi e le amebe ciliate più neutri o alcalini.

L'ambiente della rizosfera permette di ottenere un'elevata e più diversificata popolazione microbica. Ogni grammo di suolo della rizosfera contiene milioni di batteri, centinaia di migliaia di funghi, e decine di migliaia di protozoi e alghe. La biomassa batterica e fungina può essere equivalente; protozoi e alghe possono essere un ordine di grandezza più basso. I microrganismi sono distribuiti in tutta la rizosfera, formando un *continuum* dall'endoderma radicale fino a 1 mm al di fuori di esso (34, 35).

Le relazioni tra piante e microrganismi portano loro vantaggi reciproci: batteri e funghi si nutrono di essudato vegetale e, in cambio, le piante ottengono nutrienti minerali trasformati e traslocati da microrganismi, oltre che protezione contro gli agenti patogeni trasportati dal suolo. Tra i microrganismi rizosferici ci sono azotofissatori sia liberi che endosimbionti, e alcuni batteri rizosferici promuovono la crescita delle radici delle piante. L'importanza delle FLA sulla crescita delle radici, la mineralizzazione e il ciclo dei nutrienti risiede nel loro ruolo di predatori batterici (alcuni amebe dei generi *Gephiramoeba*, *Vampirella*, *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Mayorella*, e *Saccamoeba* predano anche funghi) (36, 37). È possibile la partecipazione diretta delle FLA nel ciclo dell'azoto. *A. polifaga*, *A. castellanii* e *H. vermiformis* non hanno bisogno di purine e pirimidine presintetizzate e il loro metabolismo dell'azoto ha un'attività elevata. Devono comunque essere approfondite ancora le relazioni tra il ruolo della FLA in questi cicli di nutrienti e nella produttività del suolo.

L'abbondanza di protozoi nel suolo dipende direttamente dal numero di batteri presenti, anche se amebe testate possono essere direttamente correlate con materia organica, presenza di FLA e funghi. I generi di FLA presenti nel suolo sono simili a quelli che si trovano nell'acqua, ma le

specie più piccole sono più abbondanti. Pochi generi si trovano esclusivamente nei suoli. Le specie più comuni di protozoi del suolo sono *Heteromita globosa*, *Oicomonas termo*, *Cercomonas* sp. (flagellati), *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba* sp., *Hartmannella hyalina* (38).

I protozoi sono più comuni sulle superfici dei suoli, ma la loro presenza nella rizosfera è importante perché la loro predazione sui batteri aumenta il ricircolo di azoto e fosforo. Questa regione ha piccoli pori ed è dominata dalle *Gimnamoebae*.

Le amebe sono distribuite anche negli strati interni del suolo, sotto i 20 cm di profondità, e si possono trovare nelle acque sotterranee a circa 20 m sotto la superficie del suolo. È stato stimato che le FLA costituiscono circa il 50-90% dei protozoi dei rifiuti (29). In un ambiente di questo tipo, la loro biomassa media è costante (39).

I protozoi e gli altri organismi si nutrono di batteri, ma solo i protisti hanno caratteristiche idonee a far diminuire improvvisamente la popolazione batterica. I Nematodi e gli altri organismi batteriofagi hanno lo svantaggio di tempi di generazione più lunghi e dimensioni maggiori, che sono ostacoli per risposte rapide ad aumenti temporanei della biomassa batterica; essi mantengono la loro pressione di predazione nei pori più grandi. I protozoi possono nutrirsi di 150-190 g di batteri per metro quadrato all'anno e sono il collegamento principale tra microsistemi e macrosistemi (40).

L'elevato numero di FLA nei sistemi terrestri, rispetto a quelli acquatici si potrebbe spiegare sulla base di diverse caratteristiche tipiche delle amebe, quali ad esempio il loro movimento sulle superfici di particolato che permette loro di nutrirsi di batteri che crescono negli aggregati del suolo, come anche la mancanza di strutture rigide che consente loro di muoversi e alimentarsi sul biofilm che circonda gli aggregati del suolo (41), e persino nei pori di 2 μm del suolo, dove la maggior parte dei flagellati e dei ciliati non arrivano a causa della loro rigidità cellulare. Queste caratteristiche fanno delle FLA il modello più importante ed efficace di predatori batterici nei suoli.

L'importanza dei diversi gruppi di protozoi e nematodi del suolo nel controllo dei batteri è stato stimato in microcosmi edafici, dove le FLA sono l'unico gruppo che cresce sufficientemente ed è in grado di ridurre la popolazione batterica. Le amebe sono generalmente abbondanti, con 10^5 individui per grammo di suolo (come peso secco), all'inizio della stagione delle piogge. Il loro numero aumenta di 20 volte dopo 4 giorni e poi diminuisce drasticamente dopo qualche giorno. I flagellati, con un modello di crescita simile a quello di batteri e ciliati, ne hanno mostrato uno molto più irregolare (41).

La proliferazione batterica è limitata dai predatori (amebe), ma la popolazione di nematodi aumenta quando le FLA sono presenti nel terreno. Gli studi di predazione amebica sui batteri hanno dimostrato che le amebe possono produrre un declino del numero di batteri da 10^8 a 10^5 per grammo di suolo (42-44). Tuttavia, questa capacità è diversa per ogni specie di amebe, da 600 a 3600 cellule di *Rhizobium meliloti* sono necessarie per produrre un trofozoite di *H. vermiformis*, da 800 a 7500 cellule di *Xantomonas campestris* per produrre un trofozoite di *Naegleria* sp. (45) e 8300 cellule di *Sphingomonas paucimobilis* per produrre un trofozoite di *A. polyphaga* (44).

Pertanto, le amebe svolgono un importante ruolo nei suoli dove, con la loro attività predatoria, contribuiscono allo sviluppo della microfauna. Paradossalmente è proprio decimando i batteri che esse ne favoriscono la presenza. L'attività predatoria delle amebe a favore del suolo e dell'agricoltura non si limita a favorire la presenza dei batteri, ma comprende anche il ricircolo dei nutrienti nei suoli, svolgendo quindi un ruolo essenziale per la sicurezza alimentare.

Bibliografia

1. Hutchinson GE. Concluding remarks. In: Richards BN (Ed.). *The microbiology of terrestrial ecosystems*. London: Longman; 1987. p. 399-407.

2. Anderson RO. *Comparative protozoology. Ecology, physiology, life history*. New York: Springer-Verlag; 1988.
3. Fenchel T. *Ecology of protozoa: the biology of free-living phagotrophic protists*. Madison: Science Tech. Publishers; 1987.
4. Van Baalen M, Sabelis MW. Coevolution of patch selection strategies of predator and prey and the consequences for ecological stability. *Am Nat* 1993;142:646-70.
5. Warhurst DC. Pathogenic free-living amoebae. *Parasitol Today* 1985;1:24-8.
6. Stout JD. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Adv Microbiol Ecol* 1980;4:1-50.
7. Pimm SL, Lawton JH. Number of trophic levels in ecological communities. *Nature* 1977;268(5618):329-31.
8. Clarholm M. Protozoan grazing of bacteria in soil - impact and importance. *Microb Ecol* 1981;7(4):343-50.
9. Banforth S. Terrestrial protozoa. *J Protozool* 1981;27(1):33-5.
10. Levandowski M, Hutner SH. *Introduction to Biochemistry and Physiology of Protozoa*, Vol. 1, 2nd edition. New York: Academic Press; 1979.
11. Sawyer TK. Marine amoebae from clean and stressed bottom sediments of the Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *J Protozool* 1980; 27:13-32.
12. Anderson OR. Fine structure of the marine amoeba *Vexillifera telmatalassa* collected from a coastal site near Barbados with a description of salinity tolerance, feeding behavior and prey. *J Euk Microbiol* 1994;41:124-8.
13. Hauer G, Rogerson A, Anderson OR. *Platyamoeba pseudovannellida* n. sp., a naked amoeba with wide salt tolerance isolated from the Salton sea, California. *J Eukaryot Microbiol* 2001;48:663-9.
14. Wright SJL, Redhead K, Maudsley H. *Acanthamoeba castellanii*, a predator of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1981;125:293-300.
15. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. I. Willard's pond, *J Protozool* 1986;33: 432-4.
16. Kyle DE, Noblet GP. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* 1985;32:99-105.
17. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Isaqueena. *J Prorozool* 1987;34:10-5.
18. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* 2010;8:201-6.
19. Cogo PE, Scaglia M, Gatti S, Rossetti F, Alaggio R, Laverda AM, Zhou L, Xiao L, Visvesvara GS. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1835-7.
20. John DT, Howard MJ. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res* 1995;81(3):193-201.
21. Tyndall RL, Ironside KS, Metler PL, Tan EL, Hazen TC, Fliermans CB. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Envir Microb Mar* 1989;55(3):722-32.
22. Loret JF, Robert S, Saucedo G, Catalan V, Corsaro D, Greub G. Characterization of amoebae and intra-amoebal bacteria in drinking water, and identification of control strategies. In: *Water Quality and Technology Conference*. Cincinnati: American Water Works Association; 2008. p 18-26.
23. Davies PG, Caron DA, Sieburth JMcN. Oceanic amoebae from the North Atlantic: culture, distribution and taxonomy. *Trans Am Microsc* 1978;97:73-88.

24. Rivera F, Rodriguez S, Warren A, Bonilfa P, Ramirez E, Calderon A, Ortiz R. An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoeba from the root zone method of wastewater treatment. *Water Air Soil Pollut* 1993;69: 93-8.
25. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:167-75.
26. Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret J-F, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213(3):158-66.
27. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 1994;20(3):225-41.
28. Campbell R. *Microbial ecology*, 2nd edition. Oxford: Blackwell Scientific;1983.
29. Banforth S. The role of protozoa in litters and soils. *J Protozool* 1985;32:404-9.
30. McDonald A. Sampling soil microflora: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. *Soil Biol Biochem* 1986;18:399-406.
31. Lynch JM. Promotion and inhibition of soil aggregate stabilization by micro-organisms. *J Gen Microbiol* 1981;126:371-5.
32. Richards BN. *The microbiology of terrestrial ecosystems*. London: Longman;1987.
33. Stolp H. *Microbial ecology. Organisms, habitats, activities*. Cambridge: Cambridge University Press;1988.
34. Gaskins MH, Albrecht SL, Hubbell DH. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: a review, *Agric Ecosyst Environ* 1985;12:99-116.
35. Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol* 1992;38:1219-32.
36. Chakraborty S. *Mycophagus amoebas* from arable, pasture, and forest soils. In: Parker CA, Rovira AD, Moore KJ, Wong PTW, Kollmorgen JF (Ed.). *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. St Paul (USA): APS Press; 1985. p 14-6.
37. Chakraborty S, Warkup JH. Reduction in take-all by mycophagous amoebas in pot assays. In: Parker CA, Rovira AD, Moore KJ, Wong PTW, Kollmorgen JF (Ed.). *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. St Paul (USA): APS Press; 1985. p 107-12.
38. Banforth S. Terrestrial protozoa. *J Protozool* 1981;27:33-6.
39. Lynch JM, Panting LM. Cultivation and soil biomass. *Soil Biol Biochem* 1980;12:29-33.
40. Stout JD, Heal OW. Protozoa. In: Burgers A, Raw F (Ed.). *Soil Biology*. London and New York: Academic Press; 1967. p. 149-95.
41. Clarholm M. Protozoan grazing of bacteria in soil - impact and importance. *Microb Ecol* 1981;7:343-350.
42. Habte M, Alexander M. Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacterial prey. *Ecology* 1978;59:140-6.
43. Habte M, Alexander M. Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. *Arch Microbiol* 1977;113:181-3.
44. Bryant RJ, Woods LE, Coleman DC, Fairbanks BC, McClellan JF, Cole CV. Interactions of bacteria and amoeba populations in soil microcosms with fluctuating moisture content. *Appl Environ Microbiol* 1982;43:747-52.
45. Danso SK, Alexander M. Regulation of predation by prey density: the protozoan-*Rhizobium* relationship. *Appl Microbiol* 1975;29(4):515-21.

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA AMEBE A VITA LIBERA

Maria De Giusti, Domenico Barbatto, Domenico Cacchio, Lucia Marinelli
Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma

Le amebe a vita libera causano un numero relativamente basso di infezioni se si considera la loro distribuzione ubiquitaria nell'ambiente. Nonostante il basso numero, le infezioni hanno esiti molto gravi (1). Esistono centinaia di specie di amebe, ma solo un numero limitato riveste interesse in campo sanitario: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, e, in un solo caso, è stata segnalata la specie *Sappinia*. In particolare, *Naegleria fowleri* è responsabile della Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP) mentre alcune specie di *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris* possono provocare Encefalite Amebica Granulomatosa (EAG), soprattutto in pazienti immunocompromessi. Inoltre *Acanthamoeba* può determinare gravi infezioni corneali note come Cheratiti Amebiche (CA). Infine, le amebe a vita libera possono fungere da *carrier* per alcune specie patogene per l'uomo quali legionelle, micobatteri, clamidie. Pertanto, la loro presenza come contaminanti delle acque può rappresentare un serio problema di sanità pubblica (2-4).

La Tabella 1 riporta i dati epidemiologici relativi alle malattie di origine idrica provocate da amebe a vita libera (4).

Tabella 1. Epidemiologia delle patologie a trasmissione idrica causate da amebe a vita libera

Ameba/ Patologia	Casi stimati nell'uomo (periodo)	Diffusione e habitat	Popolazione a rischio	Malattie in ospiti diversi dall'uomo	Possibilità di infezioni attraverso l'acqua
<i>Acanthamoeba</i> Encefalite	200 (1960-2000)	Globale; suolo e acqua	Soggetti immuno- compromessi (AIDS, trapiantati, persone con pato- logie ricorrenti)	Animali selvatici e domestici (cane, cavalli, scimmie, ovini, tori, canguro e bufalo indiano)	Ridotta
<i>Acanthamoeba</i> Cheratite	>3000 (1980-2000)	Globale; suolo e acqua	Portatori di lenti a contatto	Non sono descritte cheratiti	Acqua potabile utilizzata a livello domestico per la preparazioni di soluzioni saline per le lenti a contatto; Immersione in vasche per idromassaggio
<i>Balamuthia</i> Encefalite	100 (1990-2000)	Globale; suolo e acqua (probabile)	Soggetti immuno- compromessi e immunocompetenti	Scimmie, cavalli, pecore e cani	Ridotta
<i>Naegleria</i> Meningo- encefalite	200 (1990-2000)	Globale; acque calde o termali contaminate	Bambini, giovani apparentemente sani, frequenti nuotatori, viaggiatori in aree geografiche endemiche	Bovini e tapiri	Acque ad uso ricreativo e termali

Infezioni da *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. è un'ameba a vita libera ubiquitaria e alcune specie (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*) occasionalmente infettano l'uomo e possono causare infezioni cutanee, ossee e due diverse patologie: l'encefalite amebica granulomatosa e la cheratite amebica. Un caso raro d'infezione da *Acanthamoeba* è stato riportato in un paziente con una grave immunodepressione causata da infezione da *Mycobacterium tuberculosis* con coinvolgimento polmonare e del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (2, 5). In uno studio del 2017 è riportato un caso, il primo segnalato, di disseminazione cutanea di infezione da *Acanthamoeba*, post trapianto renale (6).

La maggior parte delle infezioni umane da *Acanthamoeba* è associata al genotipo T4 (7-9) che è responsabile del 90% delle cheratiti amebiche e di buona parte delle EAG e delle infezioni cutanee (2, 10-12).

Encefalite Amebica Granulomatosa

La EAG si può presentare in forma acuta o subacuta, in tutti i casi, pur se con uno sviluppo lento, ha un esito fatale. Ad oggi in letteratura sono stati riportati poche centinaia di casi (11, 13). Il periodo di incubazione non è conosciuto; tuttavia sembrano necessarie settimane, se non mesi, perché il quadro clinico si presenti. Non ci sono segni specifici legati all'agente e l'inizio è lento e insidioso con un quadro cronico associato a segni di irritazione meningea e segni vari di danno encefalico come febbre, mal di testa, atassia cerebellare, turbe visive, emi-parestesie, convulsioni, difficoltà motorie e coma (5, 11, 13). La EAG è una patologia che si sviluppa soprattutto nei pazienti immunocompromessi ma si può ritrovare anche tra soggetti immunocompetenti. I casi di EAG si verificano in qualsiasi momento dell'anno, senza relazione alla stagionalità (1). La letalità è elevata. Secondo le più recenti stime, la letalità è al di sotto del 70% nel caso in cui l'infezione non arrivi al cervello, mentre nei casi di EAG conclamata la letalità è del 100% (14, 15). Il fattore di rischio per la EAG è l'esposizione ad acqua contaminata. La via di infezione non è ancora certa, tuttavia, l'invasione del cervello sembrerebbe secondaria alla diffusione ematogena dell'infezione primaria in altri distretti, molto probabilmente a livello cutaneo, polmonare o nasale (2, 13). Sebbene la EAG possa essere contratta per contatto con acque contaminate da *Acanthamoeba*, la sorgente di infezione non è ancora certa, a causa della presenza ubiquitaria di *Acanthamoeba* nell'ambiente. Considerata l'ubiquitarietà dell'agente, la frequenza delle infezioni è tuttavia rara (5, 11, 13, 16).

Acanthamoeba è stata isolata in molte strutture termali caratterizzate da acque calde, con un aumento quindi del rischio per la salute degli utilizzatori, in particolare quelli immunocompromessi (16).

Cheratite amebica

Acanthamoeba T15, che corrisponde ad *A. jacobsi*, è stata identificata come responsabile della CA che si sviluppa in soggetti immunocompetenti, in particolare nei portatori di lenti a contatto. La CA colpisce, dunque, prevalentemente soggetti sani e può essere causa di gravi infezioni della cornea che possono portare alla cecità. Generalmente è colpito un solo occhio, anche se sono stati riportati casi di infezione bilaterale. La CA è caratterizzata da forti dolori e infiltrati anulari nello stroma corneale. Le vittime dell'infezione possono andare incontro a uno o più trapianti corneali per riparare il danno provocato dal parassita e nel passato in alcuni casi è stato necessario ricorrere

all'enucleazione, anche se oggi la disponibilità di più efficaci terapie ha reso questa eventualità non più praticata (13, 15-20).

La popolazione a rischio è rappresentata dai portatori di lenti a contatto tra i quali si è manifestato il 90 % delle infezioni. Più raramente, l'infezione può essere acquisita anche dai non portatori di lenti a contatto specie in seguito a trauma oculare ed esposizione a matrici contaminate. Secondo alcuni studi, la presenza di *Acanthamoeba* nelle lenti di soggetti asintomatici non è rara, attestandosi intorno al 8% (5, 21). Dai primi anni '80 il numero di casi di CA è in costante aumento parallelamente al crescente uso di lenti a contatto. Dai primi casi riportati negli USA nel 1973 e in Gran Bretagna nel 1974, la frequenza della diagnosi è aumentata con regolarità. Negli USA si stimano 1,36 casi per milione di portatori di lenti a contatto contro i 17-21 casi per milione in Gran Bretagna. Nel 2004 e nel 2006 negli USA si sono avute due epidemie correlate all'uso di soluzioni per lenti a contatto contaminate in fase di produzione, con 170 casi riportati nel 2007. In Francia è segnalata una prevalenza di 1 caso su 30.000 portatori di lenti a contatto. La scarsa igiene nella manutenzione delle lenti, in particolare la mancanza di attenzione alle pratiche di disinfezione e il risciacquo delle lenti con acqua corrente, così come l'uso delle lenti durante il nuoto o altri sport acquatici, sono ritenuti i principali fattori di rischio (5, 11, 13, 20). Nelle cheratiti da *Acanthamoeba* l'acqua di rubinetto, utilizzata per la preparazione della soluzione salina risulta essere la fonte più probabile di contaminazione (4). In numerosi studi la presenza di amebe è stata rilevata nel 20-30% di campioni di acqua condottata, prelevata ai punti d'uso domestici (22). Una maggiore prevalenza è segnalata nella rete idrica degli ospedali 68,9% (7, 23). In uno studio sulla colonizzazione da amebe della rete idrica domestica delle abitazioni di pazienti affetti da cheratiti è stata evidenziata una colonizzazione dell'89% (24).

Profilassi delle infezioni da *Acanthamoeba*

Il controllo della concentrazione di *Acanthamoeba* nell'acqua non può essere condotto con le pratiche correnti di disinfezione perché il microrganismo è resistente ai più comuni disinfettanti alogenati, così come all'applicazione di raggi UV. L'efficacia della filtrazione è stata studiata, prevalentemente, in impianti di potabilizzazione e si è rivelata anch'essa non particolarmente efficace lasciando ipotizzare un'ampia capacità di colonizzazione dei filtri tanto che la concentrazione in uscita si è rivelata maggiore che in entrata. L'ultrafiltrazione al momento sembra essere l'unico mezzo in grado di produrre un'efficace riduzione delle cisti di *Acanthamoeba* (16).

Accanto all'utilizzo di tecnologie efficaci è altrettanto importante effettuare corrette operazioni di pulizia e manutenzione degli impianti e dei filtri per agire sui fattori che contribuiscono alla crescita di *Acanthamoeba*: materia organica, biofilm e sedimenti. Gli utenti immunocompromessi, tuttavia, dovrebbero essere informati del rischio di acquisire infezioni da *Acanthamoeba* in piscine, bagni termali e vasche di idromassaggio (4, 16).

Per quanto riguarda, nello specifico, la profilassi delle CA, gli utilizzatori di lenti a contatto dovrebbero essere a conoscenza dei rischi legati a questo tipo di infezioni e adottare particolare attenzione in tutte le pratiche di disinfezione e risciacquo. La corretta procedura di disinfezione e risciacquo delle lenti con soluzioni sterili dovrebbe essere rispettata anche per prevenire la formazione di biofilm che rappresenta il potenziale supporto di crescita per *Acanthamoeba* (4, 5, 7, 16).

Il contatto mani-occhi espone al rischio di contaminazione e infezione: un appropriato lavaggio delle mani con acqua e sapone o con soluzioni disinfettanti a base di alcol è stato dimostrato essere efficace nell'eliminare fino al 99% dei trofozoiti (etanolo o isopropanolo al 63% per 30 secondi) e delle forme cistiche (etanolo 80% per 30 secondi o etanolo 63% per 2 minuti) di *Acanthamoeba* (25). Per quanto riguarda il rischio legato specificamente al nuoto si

consiglia, in generale, di rimuovere le lenti a contatto prima di accedere agli impianti oppure risciacquarle con soluzioni sterili dopo il nuoto o ancora di utilizzare lenti usa e getta (3, 4, 11, 26).

Infezioni da *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri è responsabile della Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP). Oltre a *N. fowleri* anche *N. philippinensis* e *N. italica* sono state identificate come possibili responsabili di infezioni nell'uomo. Inizialmente *N. italica* veniva isolata solo in Italia ma attualmente è diffusa in tutto il mondo. A causa delle caratteristiche della patologia, le naeglerie, e in particolare *N. fowleri*, sono oggi conosciute come “amebe mangia-cervello”. *Naegleria fowleri* è una specie termofila che può essere ritrovata in laghi, sorgenti, piscine, canali di irrigazione e sorgenti di acque calde (5, 16, 21, 27, 28).

Naegleria fowleri sia in forma di trofozoide sia in forma cistica utilizza come porta di ingresso le narici e, attraverso l'epitelio nasale, risale lungo i nervi olfattivi fino al cervello. È una infezione fulminante con un periodo di incubazione di 1-22 giorni (4, 29). Molte vittime di MAP sono bambini o giovani adulti in buono stato di salute con una storia di balneazione in acque calde o acque termali ove lo sviluppo delle amebe è favorito dalla temperatura elevata e dalla presenza di biofilm. La giovane età delle vittime sostiene quale fattore di rischio la prolungata esposizione all'acqua e la frequente e ripetuta aspirazione attraverso le narici di acqua contaminata da amebe. *Naegleria fowleri*, infatti, invade il sistema nervoso attraverso la via nasale, quando l'acqua è inalata profondamente ad esempio durante i tuffi (17). I sintomi sono: forte mal di testa, febbre alta, rigidità del collo, nausea, vomito, stato confusionale, convulsioni, allucinazioni e infine coma e morte (5, 11, 16). L'infezione non è contagiosa. La letalità è molto elevata, superiore al 97%, nonostante gli sviluppi terapeutici (30). Sono stati riportati solo 7 casi di sopravvissuti fino al 2002. La morte interviene in 3-10 giorni dalla manifestazione dei sintomi (5, 14). Il primo caso umano confermato risale al 1965 e fino al 2010 risultano 235 casi di MAP con la maggior parte dei casi riportati in USA, Australia e Europa (16). Negli USA un'indagine retrospettiva dal 1937 al 2013 ha riportato 142 casi di MAP (14). In Europa sono stati riportati sin ora 24 casi confermati di MAP in Gran Bretagna, Italia e Belgio (21, 28).

I casi di MAP si manifestano più frequentemente nella stagione calda, probabilmente in associazione all'aumento delle attività acquatiche ricreative, tuttavia, il rischio di infezione da *N. fowleri* attraverso acque di sorgente deve essere ulteriormente valutata in quanto *N. fowleri* è nota per resistere a condizioni ambientali estreme e può essere trovata durante tutto l'anno nelle acque di balneazione. Come *Acanthamoeba*, *Naegleria* si può ritrovare in piscine clorate e nei laghetti artificiali e nel biofilm nelle linee idriche degli impianti di acqua calda dove si instaurano condizioni ideali per lo sviluppo (4, 5, 11, 17, 31).

La presenza di *Naegleria* spp nelle acque di sorgenti calde e termali è stata riportata in molti Paesi: in acque termali in Thailandia (24,6-35,3%), Giappone (36%) e Taiwan (22,2-43,3%). Un caso confermato di MAP è stato segnalato a Bath (Regno Unito) nel 1978 e la vittima è stata una giovane che aveva nuotato in una piscina alimentata con le acque termali che sgorgano naturalmente in città (32). Tung *et al.* (2013) hanno analizzato il primo caso confermato di MAP a Taiwan, riportato nel novembre 2011, in cui il paziente ha visitato una sorgente termale una settimana prima del ricovero in ospedale (33). Il campionamento dell'acqua del resort è stato eseguito per verificare la presenza di *Naegleria* presso l'impianto. I genotipi di *Naegleria* individuati sono stati *N. fowleri*, *N. australiensis* e *N. lovaniensis*. Utilizzando la *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (meglio conosciuta come RT_PCR), venne confermato

che il ceppo di *N. fowleri* isolato dal campione di acqua prelevata, possedeva lo stesso genotipo del protozoo isolato clinicamente, pertanto, è stato ipotizzato che la sorgente termale fosse la fonte probabile di infezione. A seguito di questo studio iniziale, i serbatoi d'acqua, le piscine e le vasche della struttura termale vennero drenate e disinfettate. Lo studio di follow-up condotto un mese più tardi confermò assenza di riscontro di *N. fowleri* (33). Alcuni studi recenti riportano una presenza significativamente più alta di *N. fowleri* in acque termali rispetto ad altri ambienti acquatici. In Repubblica Ceca 16 casi di MAP sono stati associati all'uso di una piscina pubblica. In questo caso la sorgente della contaminazione è stata individuata in una cavità nella struttura della piscina, alimentata con l'acqua di un fiume (14, 16, 32).

Infine, particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'acqua destinata alle pratiche di irrigazione nasale, alle pratiche religiose, come le abluzioni rituali e/o purificazioni e alle pratiche ayurvediche che possono essere tutte considerate a rischio (29, 32, 34-36). Alcuni studi hanno menzionato l'abluzione rituale musulmana, effettuata con acqua non sicura, come la principale causa del crescente numero di casi mortali di MAP in Pakistan. Infatti, come parte dell'abluzione rituale, viene eseguita la pulizia nasale per assunzione di acqua nelle narici e ciò potrebbe rappresentare la via più probabile per l'acquisizione di infezione (34-36).

Profilassi delle infezioni da *Naegleria fowleri*

Le infezioni da *N. fowleri* sono associate al nuoto e altre attività che permettono l'ingresso del protozoo nel passaggio nasale mediante acqua contaminata (37).

Naegleria fowleri è abbastanza sensibile alla clorazione in un range di 20-60 mg min/L con una riduzione di 4 log del numero delle cisti; pertanto, mantenere livelli di clorazione efficace nelle piscine e nei bagni termali potrebbe essere sufficiente a tenere basso il rischio di infezione (4). Tuttavia, la clorazione potrebbe non essere sufficiente poiché la sua efficacia è legata anche ad altri fattori come la presenza di biofilm o il livello di contaminazione (38, 39). Per quanto sopra riportato, non solo è molto importante verificare che la sorgente di acqua abbia livelli di contaminazione contenuti ma anche applicare opportune metodologie di pulizia e manutenzione degli impianti e dei filtri per contrastare colonizzazione e moltiplicazione. Nelle tubature e nei filtri, infatti, si possono verificare condizioni di continua reimmissione di contaminanti (11).

In Francia, sulla base di diversi studi condotti sulla diffusione di *N. fowleri*, è stato stabilito che nei corsi d'acqua dove è possibile l'esposizione umana, la concentrazione di amebe non debba superare le 100 unità/L (32).

Infezioni da *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris è responsabile di infezioni granulomatose croniche dell'SNC note come *Balamuthia Amoebic Encephalitis* (BAE): comuni all'uomo e ad alcuni animali. *Balamuthia* può provocare anche infezioni disseminate della pelle, dell'utero, della prostata e dei polmoni. Le infezioni sono acquisite sia da soggetti immunocompetenti che da quelli immunocompromessi. Al momento si ritiene che l'infezione si acquisisca per contatto con il suolo o con acque di balneazione contaminate (4, 13, 15). La via d'ingresso è rappresentata dalla via cutanea attraverso tagli e lesioni della cute oppure per inalazione di materiale contaminato. Si suppone anche che *B. mandrillaris* possa raggiungere l'SNC attraverso i nervi olfattivi (4,13, 15, 40).

La sintomatologia è caratterizzata da cefalee, nausea, vomito, fotofobia, dolore o rigidità nucale accompagnate da febbre e stato di affaticamento generale che evolve verso segni

neurologici vari (emiparesi, paralisi, atassia, stato confusionale, difficoltà di movimento e parola (5, 13, 40). La morte sopravviene dopo una lunga evoluzione (da 2 mesi fino a 3 anni) e i casi di guarigione sono rari anche dopo l'individuazione di trattamenti terapeutici. La diagnosi è difficile e tardiva. In soggetti immuno-competenti sani è stata rilevata la presenza di anticorpi specifici contro *Balamuthia*, cosa che suggerisce la concreta possibilità del contatto con questo potenziale patogeno. La prevalenza aumenta con l'età (4, 13, 33, 40). Attualmente, sono stati riportati più di 160 casi di BAE nel mondo tra il 1990 e il 2009, la maggior parte nel continente americano, soprattutto nelle zone calde. Qualche caso è stato descritto anche in Europa ma, considerando le difficoltà diagnostiche, questa patologia rimane piuttosto sottostimata (13).

Infezioni da *Sappinia* spp.

Il primo e unico caso di infezione da *Sappinia pedata* (originariamente identificata come infezione da *S. diploidea*) si è manifestato come encefalite amebica. Il caso è stato descritto nel 2001 da Gelman *et al.* (41). Il paziente era un adulto immunocompetente di 38 anni, contadino del Texas, in contatto con diversi animali e con suolo contaminato da feci. L'uomo presentava una sintomatologia caratterizzata da nausea, vomito, mal di testa bifrontale, fotofobia, visione sfocata e perdita di coscienza. La risonanza magnetica rilevava una massa di 2 cm nel lobo temporale sinistro. La lesione fu asportata e la valutazione di sezioni di tessuto cerebrale mostrò la presenza di trofozoiti aventi due nuclei ben distinti: questa caratteristica rese possibile differenziare l'ameba *Sappinia*. Il paziente infetto venne trattato con azitromicina, pentamidina, itraconazolo e flucitosina.

Sappinia spp. può essere identificata tramite test molecolari come la *Polymerase Chain Reaction* (meglio conosciuta come PCR) (es. Internal Transcribed Spacer, ITS PCR, real-time PCR).

È stata isolata in infezioni umane occorse in Europa, Nord America, Egitto, Giappone, Medio India orientale e occidentale (42).

Bibliografia

1. Hall WA. Free-living amoebas: is it safe to go in the water? *World Neurosurg* 2012;78(6):610-1.
2. Kan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microb Rev* 2006;30:564-95.
3. Montalbano Di Filippo M, Novelletto A, Di Cave D, Berrilli F. Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp from geothermal springs in Italy. *Exp Parasitol* 2017;183:143-9.
4. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic diseases. *Vet Parasitol* 2004; 126:91-120.
5. Barratt JLN, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. Importance of non enteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:795-836.
6. Kutner A, Aldrich M, Patel S, Kang J, Amin B, Mann R, Puius YA. *Acanthamoeba* endophthalmitis during treatment for cutaneous disease in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis* 2018;e12843.
7. Behnia M, Hatam-Nahavandi K, Hajjalilo E, Niyati M, Tarighi F, Akram AB, *et al.* Occurrence of *Acanthamoeba* genotypes in wastewater samples in Tehran, Iran. *Iran J Parasitol* 2017;12(4): 516-21.
8. Casero R D, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teherán A, Ramírez JD. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol* 2017;54:170-5.

9. Lass A, Guerrero M, Li X, Karanis G, Ma L, Karanis P. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. *Sci Total Environ* 2017;584:489-94.
10. Cateau E, Mergey T, Kauffmann-Lacroix C, Rodier MH. Relationships between free living amoebae and *Exophiala dermatitidis*: a preliminary study. *Med Mycol* 2009; 47(1):115-8.
11. World Health Organization. *Guidelines for safe recreational water environments*. Volume 2: Swimming pools and similar environments. Geneva: WHO; 2006.
12. Xuan Y, Shen Y, Ge Y, Yan G, Zheng S. Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China. *Environm Health Prev Med* 2017;22(1):58-62.
13. Cateau E, Hécharde Y, Rodier MH. Les amibes libres: un danger méconnu. *RFL* 2014; 460:41-51.
14. Capewell LG, Harris AM, Yoder JS, Cope J R, Eddy BA, Roy SL, Visvesvara GS, Fox LM, Beach MJ. Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2015;4(4):e68-75.
15. Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:590-4.
16. Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:167-5.
17. Bright KR, Gerba CP. Review: Occurrence of the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri* in groundwater. *Hydrogeol J* 2017;25:953-8.
18. Garcia HH, Tanowitz HB, Del Brutto OH. Infections with free-living amoebae. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF. *Neuroparasitology and Tropical Neurology*. The Netherlands: Elsevier Amsterdam, 2013. P.114-53.
19. Pacella E, La Torre G, De Giusti M, Brillante C, Lombardi AM, Smaldone G, Lenzi T, Pacella F. Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol* 2013;7:991-4.
20. Stapleton F, Ozkan J, Jalbert I, Holden BA, Petsoglou C, McClellan K. Contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis. *Optom Vis Sci* 2009;86(10):e1196-e1201.
21. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 2012; 60(6):399-5.
22. Shoff ME, Rogerson A, Kessler K, Schatz S, Seal DV. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health* 2008;6(1):99-104.
23. Lasheras A, Boulestreau H, Rogues AM, Ohayon-Courtes C, Labadie JC, Gachie JP. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* 2006;34(8):520-5.
24. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, Matheson M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):165-9.
25. Aqeel Y, Rodriguez R, Chatterjee A, Ingalls RR, Samuelson J. Killing of diverse eye pathogens (*Acanthamoeba* spp., *Fusarium solani*, and *Chlamydia trachomatis*) with alcohols. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(2):e0005382.
26. Yoder JS, Verani J, Heidman N, Hoppe-Bauer J, Alfonso EC, Miller D, Jones DB, Bruckner D, Langston R, Jeng BH, Joslin CE, Tu E, Colby K, Vetter E, Ritterband D, Mathers W, Kowalski RP, Acharya NR, Limaye AP, Leiter C, Roy S, Lorick S, Roberts J, Beach MJ. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. *Ophthalmic Epidemiol* 2012;19(4):221-5.
27. Briancesco R, Bonadonna L. Free living amoebae in water environment: health implications. *Microbiol Med* 2013;28(3):40-7.

28. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola RL, D'Alfonso R, Berrilli F, Di Cave D. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12:3417-27.
29. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zúñiga R, Coronado-Velázquez, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol* 2016; 65:885-6.
30. Debnath A, Calvet CM, Jennings G, Zhou W, Aksenov A, Luth MR, Abagyan R, Nes WD, McKerrow JH, Podust LM. CYP51 is an essential drug target for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(12):e0006104.
31. Sifuentes LY, Choate BL, Gerba CP, Bright KR. The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *J Environ Sci Health Tox Hazard Subst Environ Eng* 2014;49(11):1322-30.
32. Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V, Bastaraud A, Romana M, Talarmin A. Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). Talamas-Rohana P. Ed. *PLoS ONE* 2013;8(1):e54414.
33. Tung MC, Hsu BM, Tao CW, Lin WC, Tsai HF, Ji DD, Shen SM, Chen JS, Shih FC, Huang YL. Identification and significance of *Naegleria fowleri* isolated from the hot spring which related to the first primary amebic meningoencephalitis (PAM) patient in Taiwan. *Inter J Parasitol* 2013;43(9):691-6.
34. Naqvi AA, Yazdani N, Ahmad R, Zehra F, Ahmad N. Epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis-related deaths due to *Naegleria fowleri* infections from freshwater in Pakistan: An analysis of 8-year dataset. *Arch Pharma Pract* 2016;7:119-29.
35. Shakoor S, Beg MA, Mahmood SF, Bandea R, Sriram R, Noman F, *et al.* Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* 2011;17:258-61.
36. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; (8): e3017.
37. Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Pernin P. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2927-31.
38. Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* 2010;8(4):201-6.
39. Heggie TW, Küpper T. Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Med Infect Dis* 2017;16:49-51.
40. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 2011;11(7):1520-28.
41. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, *et al.* Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc* 2001;285:2450-1.
42. Winiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol* 2001;152:613-9.

BATTERI RESISTENTI ALLE AMEBE E IMPLICAZIONI IN SANITÀ PUBBLICA

Elisabetta De Vito, Ornella Di Bella, Fulvio Castellani, Elisa Langiano
Dipartimento di Scienze Umane, Sociali e della Salute, Università di Cassino e del Lazio Meridionale,
Cassino (FR)

Alla rilevanza sanitaria che hanno assunto negli ultimi anni le amebe anfibioziche, si aggiunge l'interesse legato alla loro capacità di fagocitare batteri, funghi e virus, che sopravvivono al loro interno e che vengono quindi indicati con il termine di *Amoeba-Resistant Microorganism* (ARM).

Vi è una crescente attenzione verso il potenziale ruolo che le amebe a vita libera potrebbero svolgere come serbatoi di batteri patogeni e, di conseguenza, verso la possibilità che, attraverso le amebe, la loro persistenza e diffusione sia facilitata. Per questo motivo si indaga con sempre maggiore interesse sui meccanismi dell'interazione che consentirebbero soprattutto gli *Amoeba-Resistant Bacteria* (ARB), di acquisire una maggiore resistenza a condizioni ambientali estreme. Ma anche sui determinanti di virulenza capaci di esprimere una maggiore patogenicità, versatilità e adattamento anche quando pervengono in cellule di mammiferi, presentando una ridotta suscettibilità agli antibiotici.

Le amebe rappresenterebbero dunque un serbatoio per molti patogeni umani capaci di sopravvivere e replicarsi in amebe (*Legionella* spp., *Chlamidia* spp., micobatteri non tubercolari) e, nel contempo, un efficiente veicolo in grado di incrementare persistenza e diffusione nell'ambiente.

Per questa funzione ecologica che ha forti implicazioni in Sanità Pubblica, è stato riconosciuto alle amebe il ruolo di "Cavallo di Troia" (conosciuto come *Trojan horse*) per molte infezioni.

Oltre a diversi membri delle *Enterobacteriaceae* e delle *Vibrionaceae*, altri microrganismi sono stati individuati all'interno delle amebe e alcuni di essi sono stati riconosciuti come veri e propri organismi intracellulari, alcuni obbligati (*Mycobacterium leprae*, *Coxiella burnetii*), altri facoltativi (*Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Legionella* spp., *Mycobacterium avium* complex.). Altri ancora, come *Burkholderia cepacea* e *Pseudomonas aeruginosa*, non sembrano mostrare direttamente una associazione cellulare, ma è confermata comunque una loro capacità di resistenza simile a quella dimostrata da *Legionella* spp. È anche abbastanza recente la segnalazione della presenza di un mimivirus (microbe-mimicking virus) all'interno di *Acanthamoeba*, il più grande virus finora individuato (400 nm), e associato alle *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* e *Poxviridae*, il cui ruolo come patogeno umano non è ancora stato stabilito.

Recentemente, un mimivirus è stato scoperto in *A. polyphaga*. Inoltre, è noto che Coxsackie virus e adenovirus possono infettare *Acanthamoeba*.

Principali famiglie e specie di microrganismi resistenti alle amebe

A seguito di una approfondita analisi della letteratura scientifica esistente a supporto dell'evidenza di fenomeni di resistenza di numerosi microrganismi all'interno delle amebe, è stato possibile produrre una tabella (Tabella 1) che enucleasse i principali batteri e virus che abbiano dimostrato tale proprietà. Tra questi meritano un approfondimento maggiore tutti quei microrganismi che risultano essere più rilevanti data l'evidenza della possibilità di recare

patologia nell'uomo (es. *Legionella* spp.) oppure, per la possibilità di costituire un rischio per la salute umana in condizioni particolari (es. i microrganismi opportunisti e quelli che abbiano acquisito antibiotico-resistenza in ambito ospedaliero).

Tabella 1. Principali microrganismi con evidenze scientifiche di fenomeni di resistenza alle amebe

Microrganismo	Famiglia, genere e specie
Batteri	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Mycobacteriaceae</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Legionellaceae</i>
	<i>Pseudomonaceae</i>
	<i>Chlamydiales</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Meticillin resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>
	<i>Holosporaceae</i>
	<i>Parachlamydiaceae</i>
	<i>Rickettsia-like endosymbionts</i>
	<i>Membri del phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacterioides</i>
	<i>Beta-protobacteria</i>
	<i>Mobiluncus curtisii</i>
	<i>Rhodobacter massiliensis</i>
	<i>Azorhizobium spp.</i>
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	<i>Mezorhizobium amorphae</i>
<i>Vibrionaceae</i>	
<i>Coxiella burnetii</i>	
<i>Francisella tularensis</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Burkholderiaceae</i>	
<i>Campylobacter jejunii</i>	
Virus	Iridoviridae
	Phycornaviridae
	Poxviridae
	Ecovirus
	Mimivirus
	Coxsackie virus
	Adenovirus
	Enterovirus
Funghi	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Mycobacteriaceae

Il genere *Micobacterium* comprende almeno 170 specie, *M. tuberculosis* e *M. leprae*, non presenti nell'ambiente e trasmissibili da uomo a uomo e il vasto gruppo dei micobatteri non tubercolari (NonTuberculous Mycobacteria, NTM), microrganismi ambientali ubiquitari del suolo e delle acque dolci ormai riconosciuti come frequente causa di infezioni opportunistiche per l'uomo e gli animali (1-10).

Grazie alle migliorate tecniche di isolamento e identificazione dei campioni biologici e ambientali, il numero delle specie di NTM identificate è in continuo aumento (3, 11). Allo stesso tempo anche l'incidenza e la prevalenza delle infezioni da NTM risultano incrementate non solo grazie alle più efficienti tecniche diagnostiche ma anche per le mutate caratteristiche della

popolazione suscettibile come l'aumento della popolazione anziana e del numero di individui che presentano condizioni di comorbilità tra cui broncopneumomatosi cronico-ostruttiva, neoplasie maligne, immunodeficienza dovuta ad infezione da virus dell'immunodeficienza acquisita (Human Immunodeficiency Virus, HIV), diabete mellito e malattia renale cronica (1, 12-15). Sebbene nella maggior parte dei casi non sia stato possibile determinare la specifica fonte d'infezione, è diffusa opinione che gli aerosol contaminati, derivanti da acqua di doccia, suolo e acqua di piscina rappresentino le più probabili sorgenti di infezione con particolare attenzione al rischio di infezione in ambiente ospedaliero (4, 5, 12, 13, 16, 17).

Una recente indagine, condotta in un grande ospedale italiano, a seguito di un incremento significativo di campioni di espettorati NTM-positivi in degenti di reparti di malattie respiratorie, ha rivelato una massiccia presenza di NTM nella rete di approvvigionamento idrico ospedaliera. Dopo procedure di decontaminazione quali shock termico e installazione dei filtri ai rubinetti, i micobatteri non sono stati più rilevati né nei campioni d'acqua né in quelli umani (16, 18).

Numerosi studi hanno di recente dimostrato l'ipotesi che diverse specie di NTM sono in grado di resistere alla fagocitosi di alcune specie di amebe a vita libera (*Free Living Amoeba*, FLA) e di mantenere la capacità di svilupparsi al loro interno, fornendo l'evidenza del ruolo delle amebe nella persistenza ambientale e nella potenziale trasmissione degli NTM ai soggetti suscettibili. In particolare, risulta sempre più evidente la capacità dei micobatteri di utilizzare le amebe come un rifugio per resistere alle condizioni sfavorevoli, come per esempio la presenza di disinfettanti, sfruttando il contatto facilitato dalla condivisione nella stessa nicchia ecologica costituita dal biofilm delle condutture e degli scarichi idrici (8, 17, 19-21). L'ipotesi che le FLA possano rappresentare una importante riserva ambientale di NTM trova riscontro in numerosi studi negli studi.

Corsaro *et al.* citano l'isolamento di NTM nel 50% dei campioni positivi per amebe mentre nei campioni negativi per amebe l'isolamento è avvenuto nel 12% dei campioni (22). Delafont *et al.* in un'indagine effettuata nel 2014 riferiscono che l'87,6% delle FLA isolate da acque condottate ospitava NTM, presumibilmente vitali (20). In particolare *Mycobacterium llatzerense*, recentemente isolato anche in pazienti immunocompromessi, ha rappresentato il 90% delle specie isolate, seguito da *M. chelonae*, *M. aromaticivorans*, *M. phocaicum* e *M. mucogenicum* (2, 5, 20). A questo proposito Delafont *et al.* in uno studio del 2016 hanno fornito evidenze della capacità di *M. llatzerense* non solo di sopravvivere ma anche di moltiplicarsi in *A. castellanii*, spiegando così il suo frequente isolamento dall'acqua potabile (11). Tuttavia, non sempre è stata evidenziata questa concordanza di isolamenti in relazione alla presenza o assenza di amebe ma questo potrebbe essere dovuto non solo a problemi tecnici nell'isolamento delle amebe ma anche ad altri fattori come per esempio la presenza/assenza o l'entità del biofilm dove l'interazione tra batteri e amebe risulta favorita, oppure la concentrazione di disinfettanti (22).

Sebbene non sia stato ancora possibile delineare in maniera definitiva le caratteristiche delle interazioni ambientali tra le singole specie di NTM e di FLA, le evidenze disponibili al momento suggeriscono comunque di considerare il rischio potenzialmente associato all'esposizione ad aerosol contaminati in particolare nei soggetti più vulnerabili e in ambiente ospedaliero.

Il sequenziamento dell'intero genoma migliorerà le indagini sugli NTM in modo da rendere più chiari i meccanismi di diffusione globale della malattia. Una migliore comprensione delle nicchie utilizzate dagli NTM e della sua ecologia è essenziale per prevenire le infezioni da essi causate e sviluppare nuovi metodi per il suo trattamento ed eliminazione efficaci. Tali informazioni aiuteranno a definire meglio i percorsi di esposizione e a sviluppare le più idonee misure a tutela della salute pubblica.

Legionellaceae

Legionella pneumophila rappresenta il principale responsabile della legionellosi, una forma di polmonite con una elevata mortalità tra la popolazione immunocompromessa (23). Si tratta di un batterio Gram-negativo appartenente al genere *Legionella* e include almeno 20 specie che sono state associate a malattie umane. Nel 2015 in Europa sono stati notificati 7034 casi di legionellosi (24).

Legionella presenta una diffusione ubiquitaria negli ambienti di acqua dolce, sia naturali che artificiali, ed è capace di replicarsi all'interno di una vasta gamma di cellule ospitanti che vanno dai protozoi ciliati e amoebe a vita libera ai macrofagi umani.

La sopravvivenza di *Legionella* nei diversi ospiti dipende dalla sua capacità di eludere i meccanismi litici della fagocitosi messi in atto dalla cellula ospitante (23). Numerosi studi hanno confermato la moltiplicazione intracellulare di *Legionella* nelle FLA ed esperimenti di cocoltura in terreni liquidi hanno dimostrato come le amebe svolgono un'azione promuovente la moltiplicazione batterica (25–27). Infatti durante i focolai epidemici di legionellosi, nei corpi idrici interessati, normalmente viene rinvenuto un significativo numero di FLA e una elevata concentrazione di *Legionella* spp. Pertanto le amebe possono innescare la rivitalizzazione di ceppi di *Legionella* che a seguito di condizioni ambientali ostili sono passati nello stato vitale ma non coltivabile (Viable But Non-Culturable, VBNC) sui comuni terreni di coltura (28–30). All'interno dell'ospite, dopo aver esaurito i nutrienti, *L. pneumophila* entra nella fase trasmissiva portando a morte cellulare l'ospite e viene rilasciata nell'ambiente extracellulare (31). Il passaggio nelle cellule ospiti porta all'evoluzione dei tratti genetici che determinano la resistenza dei batteri alle amebe. Ciò potrebbe spiegare la capacità di resistere anche ad altre cellule fagocitarie come per esempio i macrofagi umani (32).

Lienard *et al.* in uno screening di batteri resistenti alle amebe condotto nel 2017 su 48 sistemi idrici domestici, hanno utilizzato il metodo della co-coltura con *Acanthamoeba castellanii* che risulta essere più permissiva per un maggior numero di batteri. *Legionella waltersii* è risultata la specie a maggiore prevalenza seguita da *L. pneumophila*, *L. anisa*, *L. longbeachae*. In tutti i campioni risultati positivi per *L. pneumophila* è stata sistematicamente isolata anche *Hartmanella vermiformis* supportando l'importanza di questa amoeba come *reservoir* di *L. pneumophila* (33).

Lo studio di Dey *et al.* nel 2009 ha dimostrato che non tutte le FLA sono ugualmente permissive per la moltiplicazione di *L. pneumophila* evidenziando che la distribuzione e la densità degli ARB potrebbe essere soggetta a variazioni dipendenti dalla composizione e dalla evoluzione della popolazione amebica con potenziali implicazioni sull'insorgenza di focolai di infezione di legionellosi (28).

Mou & Leung nel 2018 hanno studiato i fattori chiave di virulenza di *L. pneumophila* utilizzando una linea cellulare di monociti umani TPH-1 e *A. castellanii*. In particolare hanno studiato i geni *flaA*, *vipD*, *sdhA* e *sidF*, confrontando la loro espressione durante la fase replicativa intracellulare di *Legionella* e la successiva fase di morte cellulare delle cellule ospitanti. I profili di espressione genica osservati indicano un aumento della citotossicità di *L. pneumophila* suggerendo un incremento di adattamento all'ospite, caratteristica essenziale per la sua sopravvivenza (23).

Thomas *et al.* nel 2008 hanno condotto uno studio sulla valutazione della biodiversità di amebe e ARB nella rete idrica di un vecchio ospedale allo scopo di isolare tutte le specie di ARB presenti. I risultati hanno mostrato una forte associazione tra la presenza di *Legionella* e FLA ($p < 0,001$) sottolineando l'importanza di considerare questi aspetti nella progettazione delle misure di controllo sulle reti idriche (21).

Ji *et al.* nel 2014 hanno esaminato la presenza di FLA e *Legionella* in differenti corpi idrici (fiume, impianto di trattamento acque e sorgente termale). I risultati hanno evidenziato una

elevata concentrazione di *Acanthamoeba* e *Naegleria* nell'acqua termale e nell'acqua proveniente dall'impianto di trattamento, e una maggiore correlazione di coesistenza tra *Legionella* e *Vermamoeba vermiformis* (34).

Dietersdorfer *et al.* nel 2018 hanno studiato i cambiamenti di infettività di sei ceppi di *Legionella* nello stato vitale ma non coltivabile (Viable But Not Culturable, VBNC) posti in co-culture, mantenute in condizioni di carenza di nutrienti a breve e lungo periodo, con amebe, con macrofagi derivati dalla linea cellulare THP-1 di monociti umani e con una linea cellulare primaria di macrofagi umani. I risultati hanno dimostrato che numerosi ceppi di *Legionella* nello stato VBNC possono infettare direttamente i macrofagi umani anche dopo un anno in carenza di nutrienti e che il recupero della coltivabilità si realizza solo dopo il passaggio nella linea primaria di macrofagi umani (35).

Per sostenere la valutazione del rischio legionellosi sono necessarie ulteriori evidenze.

Enterobacteriaceae

Le *Enterobacteriaceae* e alcune specie di batteri *Gram*-negativi non fermentanti (*Stenotrophomonas maltophilia*) sono stati descritti come i nutrienti preferiti dalle amebe a vita libera. Come per altre specie batteriche, la capacità di alcune specie di *Enterobacteriaceae* Resistenti alle Amebe (ERA) di essere internalizzate, resistere e svilupparsi all'interno di protozoi è stata associata ad una aumentata resistenza e quindi sopravvivenza a condizioni ambientali estreme (biocidi, antibiotici, carenza di nutrienti), come pure ad una potenziata patogenicità conseguente all'acquisizione di fattori di virulenza (6, 36).

In un ampio studio che ha utilizzato per la prima volta il metodo della co-cultura con amebe per la determinazione della presenza di ARB nelle comunità microbiche di campioni di suolo e di sabbia a contatto umano, tra le 33 specie di ARB isolate vi erano anche *Enterobacter cloacae* e *Serratia plymuthica*, capaci di moltiplicarsi all'interno dell'ameba, unitamente a *Klebsiella variicola*, che occasionalmente causa infezioni nell'uomo e che rappresenta meno del 10% degli isolati clinici di *Klebsiella*, riconducibili prevalentemente a *K. pneumoniae* (37, 38-40).

Klebsiella spp., ceppi di *Escherichia coli* patogeni, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia* hanno attratto l'attenzione dei ricercatori che hanno indagato sul ruolo potenziale dei protozoi come *reservoir* ambientali di questi batteri.

Klebsiella pneumoniae è un specie ubiquitaria in natura con grande capacità di persistenza nell'ambiente; viene isolata anche da campioni non clinici quali suolo, acque superficiali, superfici di aree riservate ai pazienti e comuni all'area assistenza, in ambito nosocomiale (41).

Ceppi di *Klebsiella* isolati dall'ambiente sono molto simili a quelli di origine clinica, mostrando analoga espressione dei fattori di virulenza e stessa abilità di infezione in modelli animali. Si ipotizza che la capacità di *Klebsiella* di resistere nell'ambiente possa essere connessa anche alla abilità di entrare in relazione/predazione con protozoi come le amebe, resistendo alla predazione e sviluppando caratteri di virulenza (42, 43).

Escherichia coli agisce sia come specie batterica opportunistica patogena, soprattutto in ambito nosocomiale, dove è responsabile di infezioni favorite dall'abbassamento delle difese immunitarie dell'ospite e dalla circolazione di ceppi particolarmente virulenti, sia come patogeno primario, dotato di specifici meccanismi patogenetici, come nel caso dei ceppi enterotossigeni (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), enteropatogeni (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), enteroinvasivi (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), enteroemorragici o verocitotossici (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC o Verotoxin *E. coli*, VTEC), enteroadesivi (Enteroadherent *E. coli*, EAEC) ed enteroaggreganti (Enteroadgregative *E. coli*, EAEC).

Escherichia coli ed *Enterobacter aerogenes*, unitamente a *Stenotrophomonas maltophilia* e a *Klebsiella aerogenes*, in alcune prove sperimentali si sono rivelati i nutrienti preferiti dalle

amebe rispetto a *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*; questo spiega perché *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. vengano utilizzati frequentemente nelle procedure di arricchimento colturale per la ricerca di amebe, assicurando, nella forma vitale, una maggiore resa in trofozoiti rispetto alla loro forma vitale ma non coltivabile. *E. coli* risulta inoltre capace di moltiplicarsi in presenza di *Achantamoeba* e di resistere alla digestione da parte del predatore (6).

Barker *et al.* in esperimenti di co-coltura *in vitro*, hanno mostrato come vi sia una interazione reciprocamente vantaggiosa tra *E. coli* O157 e i trofozoiti di *A. polyphaga* e come si osservi un significativo incremento di *E. coli* O157. Le amebe potrebbero svolgere un ruolo determinante nella persistenza di ceppi patogeni di *E. coli* negli ambienti di allevamento (acque di abbeveraggio, insilati, foraggio) favorendone la diffusione (36).

Tra i ceppi enteroemorragici o verocitotossici, *E. coli* O157:H7 concorre in maniera importante nel determinare i casi umani accertati di infezioni da VTEC, il cui tasso di notifica nel 2106 si è attestato a 1,8 casi su 100.000 residenti, con un incremento dell'8,3% rispetto al 2015 (44-46).

Il serbatoio principale sono i bovini e la persistenza ambientale del patogeno (in suolo, acqua, erba, ma anche insilati), favorita dalle amebe, potrebbe determinare una aumentata diffusione ambientale e reinfezione degli erbivori, con conseguente incremento del rischio di infezione per l'uomo, che può acquisirla a seguito di ingestione di acqua o di alimenti contaminati anche con livelli di carica microbica inferiori a 100 cellule batteriche (46).

La sopravvivenza di *E. coli* O157 nelle cisti delle amebe può inoltre aumentare la sua resistenza all'aerodispersione così come dimostrato per *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* e *Mycobacterium avium* (45).

Anche per *Salmonella enterica* e *Salmonella enterica* Typhi sono stati descritte in letteratura interazioni con le amebe. Gouarabathini *et al.* hanno dimostrato una esaltata induzione dell'isola di patogenicità 2 durante l'internalizzazione di *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) in *A. polyphaga*, da cui dipende la sopravvivenza all'interno dell'ameba. Gli autori suggeriscono che i fattori di virulenza coinvolti nella patogenicità di *Salmonella* (resistenza agli acidi, ai fattori intestinali antimicrobici dell'ospite, sopravvivenza nei macrofagi, ecc.) possano avere un ruolo importante nell'ecologia di *Salmonella* e che l'interazione con le amebe abbia un effetto fondamentale nella sopravvivenza del batterio nell'ambiente e nella sua dispersione, agendo da potente *reservoir* e ostacolando in tal modo l'efficacia dei programmi nazionali di contenimento e monitoraggio della produzione primaria (47).

L'interazione tra *Shigella* spp. e le amebe a vita libera è stata ipotizzata molti anni fa e successivamente associata ad una aumentata sopravvivenza nell'ambiente, con un conseguente aumentato rischio di epidemie (48). A tale conclusione sono giunti Jeong *et al.* in uno studio del 2007 in cui hanno attribuito alle amebe, quali *reservoir* di *Shigella*, la causa dell'epidemia di shigellosi in Korea del 2002 (49).

Evidenze scientifiche sembrano supportare anche il ruolo delle amebe come serbatoio di *Yersinia pestis*, batterio patogeno intracellulare facoltativo, noto agente etiologico della peste che causa sporadiche epizootie. Benavides Montano *et al.* (2017) hanno descritto l'associazione di *Y. pestis* e amebe (*Hartmannella* e *Acanthamoeba castellanii*) dimostrando una persistenza intracellulare superiore a 5 giorni (50).

Recentemente Markman *et al.* hanno studiato il potenziale ruolo di cinque specie di amebe (*A. castellanii*, *A. lenticulata*, *A. polyphaga*, *Dictyostellium discoideum* e *V. vermiformis*) quali *reservoir* di *Y. pestis*, valutando in co-culture *in vitro* la prevalenza, l'intensità di infezione, la sopravvivenza intracellulare a 24 e 48 ore e la replicazione intracellulare (51). Gli autori hanno dimostrato che *Y. pestis* è resistente, o transitoriamente resistente, alle 5 specie amebiche testate. Il più efficiente modello di interazione era l'infezione in *D. discoideum* che consentiva a *Yersinia*

di sopravvivere fino a 48 h, un tempo significativamente superiore rispetto alle altre amebe; inoltre soltanto in *D. discoideum* è stata osservata replicazione intracellulare. *Y. pestis* è stata anche localizzata all'interno di strutture dell'ameba analoghe a quelle presenti nei macrofagi umani infettati e ciò spinge verso ulteriori ricerche sulle possibili interazioni tra batteri patogeni, amebe e sistema immunitario dell'ospite.

Quanto sopra suggerisce di riconsiderare le strategie di prevenzione delle infezioni idrodifuse e/o diffuse mediante gli alimenti come anche di quelle correlate all'assistenza, rilevato il ruolo cruciale che le amebe svolgono nelle reti idriche. Infatti, questi organismi, non solo offrono protezione ai patogeni nosocomiali, incrementandone la resistenza ai biocidi, aumentandone la disseminazione e la resistenza agli antibiotici, ma favoriscono anche l'acquisizione di determinanti di virulenza.

Le analisi microbiologiche per la valutazione della qualità dell'acqua dovrebbero includere non solo la determinazione di indicatori di contaminazione fecale, ma dovrebbero anche prevedere la ricerca di indicatori della presenza di organismi persistenti nell'ambiente e potenziali *reservoir* di microrganismi patogeni, quali sono le amebe (19, 52).

Chlamydiales

L'ordine delle *Chlamydiales* comprende 4 famiglie: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* e *Simkaniaceae*. Hanno tutte una distribuzione ubiquitaria e possono crescere e sopravvivere con un rapporto di dipendenza all'interno delle FLA. Le *Chlamydiales* possono essere divise in patogene e ambientali: in particolare, le seconde hanno uno stretto rapporto di dipendenza con le amebe, specialmente con *Acanthamoeba* spp. (53, 54).

Kahane *et al.* hanno dimostrato come l'incistamento dell'ameba protegga al suo interno la *Simkania negevensis* permettendone una lunga sopravvivenza (55).

Parachlamydia acanthamoeba sembra trovare sia una nicchia replicativa, sia un *reservoir* acquatico e un vettore in *Acanthamoeba* spp. Il ruolo potenziale del batterio come agente patogeno per affezioni del tratto inferiore del sistema respiratorio venne suggerito dal suo isolamento all'interno dell'ameba in acque provenienti da un umidificatore durante le indagini per un focolaio di febbre. Materiale genetico del batterio è stato anche ritrovato in amebe isolate all'interno della mucosa nasale di volontari sani. *P. acanthamoeba* sopravvive e si replica all'interno di macrofagi, fibroblasti e pneumociti e si ipotizza che possa aver usato l'ameba come nicchia per selezionare tratti di virulenza, permettendone la sopravvivenza all'interno dei macrofagi umani (56).

Diversi studi hanno dimostrato una stretta relazione tra *Acanthamoeba* spp. e *P. acanthamoeba*: l'ameba ha un ruolo significativo sulla sopravvivenza a lungo termine del batterio che, da solo, non potrebbe sopravvivere più di 3 giorni a 30°C e non più di 15 giorni a 15°C mentre all'interno dell'ameba riesce a tollerare lo *shock* termico, sopravvivendo a 37°C (57, 58). Gli studi di Fukumoto *et al.* (59), condotti in ambiente ospedaliero sui due microrganismi, hanno portato all'ipotesi che *P. acanthamoeba* possa essere introdotta nell'ospedale e circolare all'interno di esso proprio grazie al suo ruolo di ospite di *Acanthamoeba* spp.

Pseudomonadaceae

Batteri del genere *Pseudomonas* sono stati identificati all'interno di diversi generi di amebe, ovvero *Tetramitus* spp. e *Willaertia* spp., e materiale genetico di *Pseudomonas*, comprendente geni con proprietà amebicide, è stato ritrovato all'interno di *Dictyostellium discoideum* (60, 61).

Pseudomonas aeruginosa, inoltre, inibisce la crescita di *Acanthamoeba castellanii* (6, 62) e tra i due è stata riconosciuta un'interazione complessa, in cui il batterio riesce ad attuare strategie difensive e a neutralizzare l'attacco da parte dell'ameba (63).

Nel 2004, Carstens *et al.*, analizzando le falde acquifere di Mooi River nell'Africa del Sud, hanno isolato diversi ARB e, tra questi; *Pseudomonas* rappresentava il genere maggiormente presente (in particolare le specie *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. plecoglossicida* e *P. putida*). In questi batteri è stato rilevato un profilo di multiresistenza agli antibiotici aminoglicosidi, cloramfenicolo e beta-lattamici, verosimilmente dovuto a caratteristiche dell'ambiente interno dell'ameba che potrebbe favorire il trasferimento orizzontale di geni tra ARB e l'ameba stessa o tramite trasformazione per mezzo di DNA libero proveniente dalla digestione di batteri non resistenti alle amebe (52).

Listeria monocytogenes

L'identificazione di *Listeria monocytogenes* all'interno di amebe era stata già segnalata da Greub nel 2004 (56) ma la sua capacità di sopravvivenza all'interno di *A. castellanii* è controversa: se da una parte studi differenti raccolti da Doyscher nel 2013 (64) evidenziano l'impossibilità della replicazione del batterio all'interno dell'ameba, dall'altra parte, viene invece, sottolineato che la presenza del batterio all'interno di *A. castellanii* è limitata alla forma di trofozoita, mentre il batterio non sopravvive nella forma incistata (65) oltre le due settimane (66).

***Staphylococcus aureus* Meticillino Resistente (MRSA)**

La relazione di endosimbiosi può rappresentare per molti microrganismi un'importante condizione favorente la loro presenza e persistenza sia nell'ambiente che nei prodotti alimentari. Anacarso *et al.* nel 2012 hanno studiato il comportamento di alcuni microrganismi comunemente responsabili di patologie opportunistiche e malattie di origine alimentare, in relazione alla loro capacità di sfruttare le amebe (in particolare *A. polyphaga*) come vettori. In particolare, *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. enteritidis* hanno mostrato non solo una elevata capacità replicativa all'interno dell'ameba, ma anche un significativo aumento della loro carica microbica nell'ambiente extra-cellulare, con il conseguente potenziale rischio di diffusione non solo nell'ambiente ma anche negli alimenti (67).

Alcuni batteri endosimbionti sono in grado di sopravvivere all'interno di amebe transitate alla loro forma cistica, restando vitali e al riparo da condizioni ambientali avverse (6). In particolare, appare preoccupante come ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti si siano dimostrati in grado di favorire l'incistamento dell'ameba ospite, favorendo presumibilmente la persistenza di entrambi i microrganismi nel sito di infezione (68).

Acinetobacter baumannii

A. baumannii rappresenta un problema di sanità pubblica non risolto, data la sua natura ubiquitaria e la capacità di sopravvivere a diverse condizioni e stress ambientali, nonché di sviluppare antibiotico-resistenza e causare numerosi casi di infezioni correlate all'assistenza. Un interessante e recente *case-report* illustra un caso di infezione del torrente ematico causata da *A. baumannii*, presumibilmente dopo internalizzazione in un'ameba (69). La paziente, una donna cinese di 73 anni sottoposta ad intervento chirurgico per frattura dell'omero prossimale, con febbre elevata dopo l'intervento, manifestava emocolture negative. Dopo terapia antibiotica empirica non ci furono miglioramenti; dopo un mese, venne eseguito un esame batterioscopico

del sangue, che evidenziò microrganismi la cui morfologia lasciava ipotizzare la presenza di amebe. Dopo un breve miglioramento, la donna sviluppò nuovamente febbre elevata e disfunzione multiorgano, fino al decesso. Il sequenziamento molecolare del DNA del patogeno, richiesto per confermare la diagnosi di amebiasi, rilevò invece la presenza di *A. baumannii*. Tale anomalia può essere spiegata attraverso due ipotesi: 1) la paziente aveva avuto una batteriemia da entrambi i microrganismi, sia da ameba (presumibilmente *Vannella* spp.) sia da *A. baumannii*, che potrebbe essere stato internalizzato dall'ameba stessa, dando emocolture negative); 2) i microrganismi osservati all'esame batterioscopico non erano effettivamente amebe, bensì cellule ematiche (o parti di esse) che potrebbero essere state invase da *A. baumannii* (69).

***Burkholderia cepacia* complex**

Burkholderia cepacia complex (BCC) comprende un'ampia varietà di batteri Gram-negativi ambientali che rappresentano un rischio per la salute per la loro capacità di causare infezioni respiratorie specialmente in pazienti con malattia granulomatosa cronica e fibrosi cistica.

A causa della resistenza intrinseca a una vasta gamma di antibiotici e di strategie di evasione immunitaria naturali, il trattamento delle infezioni da BCC si rivela spesso fallimentare. Diverse osservazioni suggeriscono che isolati di *B. cepacia* possono resistere alla distruzione da amebe libere e possono sopravvivere intracellularmente all'interno di vescicole: i patogeni possono usare l'ameba come riserva nell'ambiente sopravvivendo all'interno di un vacuolo acido distinto dal compartimento lisosomale (6, 70).

Nello studio di Horward viene segnalato come *B. pseudomallei*, causa di melioidosi, resiste alla distruzione da amebe libere. La co-coltura di *B. pseudomallei* e *Acanthamoeba astronyxis* mostra un miglioramento notevole della sopravvivenza del batterio in presenza di agenti disinfettanti (71).

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori è uno degli agenti infettivi maggiormente trasmesso nell'uomo, con circa il 50% della popolazione mondiale colonizzata. È nota la sua presenza ambientale, in particolare nell'acqua, ma il meccanismo di sopravvivenza di questo batterio non è ancora ben definito. È stata ipotizzata la sopravvivenza tramite adesione al biofilm o mediante associazione ad amebe a vita libera (FLA) (6).

Le amebe potrebbero agire da cavallo di Troia per questo agente patogeno e potrebbero svolgere un ruolo importante nella sua trasmissione in quanto è stato dimostrato come *H. pylori* sia in grado di crescere quando co-coltivato con *A. castellanii*.

Nello studio di Moreno-Mesonero viene valutata l'interazione tra FLA e *H. pylori* concludendo che la crescita del batterio potrebbe essere stimolata da una diminuzione dell'ossigeno disciolto dovuta alla presenza di *A. castellanii*. È stato inoltre evidenziato che la vitalità di *H. pylori* potrebbe essere mantenuta fino a 8 settimane in co-coltura con *A. castellanii* (72, 73).

Il batterio è in grado di sopravvivere al trattamento di clorazione in presenza di *A. castellanii* e potrebbero essere utili ulteriori studi su campioni ambientali (73).

Conclusioni

Tra gli studiosi della materia è sempre più diffusa l'opinione che la ricerca di FLA dovrebbe essere inserita in qualsiasi valutazione del rischio per gli agenti patogeni dell'acqua potabile non solo allo scopo di ridurre le FLA stesse ma anche nell'ottica del controllo dei microrganismi patogeni che esse potrebbero veicolare.

Nell'analisi del rischio per presenza di FLA nell'acqua potabile, la letteratura suggerisce di considerare tre aspetti importanti. Innanzitutto che le FLA possono essere infettate da diversi ARB patogeni. In secondo luogo che le FLA possono fungere da veicolo per batteri patogeni all'interno dei sistemi di potabilizzazione delle acque agevolando efficacemente il contatto con l'uomo. Infine, che alcune FLA sono anch'esse agenti patogeni per l'uomo e causano infezioni sia cliniche che subcliniche.

Tuttavia, sono ancora molti gli aspetti dell'interazione tra FLA e ARB che non sono chiari e che dovranno essere indagati per poter sviluppare strategie di controllo adeguate alla problematica (21, 74, 75).

Bibliografia

1. Adjemian J, Frankland TB, Daida YG, Honda JR, Olivier KN, Zelazny A, *et al.* Epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease and tuberculosis, Hawaii, USA. *Emerg Infect Dis* 2017;23(3):439-47.
2. Cardenas AM, Gomila M, Lalucat J, Edelstein PH. Abdominal Abscess Caused by *Mycobacterium llatzerense*. *J Clin Microbiol* 2014;52(4):1287-9.
3. Chalmers JD, Aksamit T, Carvalho ACC, Rendon A, Franco I. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Pulmonology* 2018;24(2):120-31.
4. Dovriki E, Gerogianni I, Petinaki E, Hadjichristodoulou C, Papaioannou A, Gourgoulisanis K. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from hospitalized patients and drinking water samples examination of their correlation by chemometrics. *Envir Monit Assess* 2016;188(4):247.
5. Greninger AL, Langelier C, Cunningham G, Keh C, Melgar M, Chiu CY, *et al.* Two rapidly growing mycobacterial species isolated from a brain abscess: first whole-genome sequences of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium llatzerense*. *J Clin Microbiol* 2015;53(7):2374-7.
6. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(2):413-33.
7. Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM, Peralta RHS. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res* 2016;193:30-8.
8. Samba-Louaka A, Robino E, Cochard T, Branger M, Delafont V, Aucher W, *et al.* Environmental *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis hosted by free-living amoebae. *Front Cell Infect Microbiol* 2018 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811464/>; last visited 27 giugno 2018.
9. Wheat WH, Casali AL, Thomas V, Spencer JS, Lahiri R, Williams DL, *et al.* Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(12):e3405.
10. Teixeira L, Avery RK, Iseman M, Arrossi AV, Harrington S, Stephens K, *et al.* *Mycobacterium llatzerense* lung infection in a liver transplant recipient: case report and review of the literature. *Am J Transplant* 2013;13(8):2198-200.

11. Delafont V, Bouchon D, Héchard Y, Moulin L. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Wat Res* 2016;100:382-92.
12. Briancesco R, Semproni M, Libera SD, Sdanganelli M, Bonadonna L. Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. *Ann Ist Super* 2010;46(3):254-8.
13. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:27.
14. Donohue MJ, Mistry JH, Donohue JM, O'Connell K, King D, Byran J, *et al.* Increased frequency of nontuberculous mycobacteria detection at potable water taps within the United States. *Environm Sci Technol* 2015;49(10):6127-33.
15. Hermansen TS, Ravn P, Svensson E, Lillebaek T. Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century. *Sci Reports* 2017;7(1):6696.
16. D'Antonio S, Rogliani P, Paone G, Altieri A, Alma MG, Cazzola M, *et al.* An unusual outbreak of nontuberculous mycobacteria in hospital respiratory wards: Association with nontuberculous mycobacterial colonization of hospital water supply network. *Int J Mycobact* 2016;5(2):244-7.
17. Ichijo T, Izumi Y, Nakamoto S, Yamaguchi N, Nasu M. Distribution and respiratory activity of mycobacteria in household water system of healthy volunteers in Japan. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110554.
18. Scorzoloni L, Mengoni F, Mastroianni CM, Baldan R, Cirillo DM, De Giusti M, *et al.* Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* in a teaching hospital: importance of strictly following decontamination procedures and emerging issues concerning sterilization. *New Microbiol* 2016;25-34.
19. Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*. 1 luglio 2014;87(3):131-40.
20. Delafont V, Mougari F, Cambau E, Joyeux M, Bouchon D, Héchard Y, *et al.* First evidence of Amoebae-Mycobacteria association in drinking water network. *Environ Sci Technol* 2014;48(20):11872-82.
21. Thomas V, Loret J-F, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 2008;10(10):2728-45.
22. Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret J-F, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int J Hyg Environm Health* 2010;213(3):158-66.
23. Mou Q, Leung PHM. Differential expression of virulence genes in *Legionella pneumophila* growing in *Acanthamoeba* and human monocytes. *Virulence* 2018;9(1):185-96.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: *ECDC. Annual epidemiological report for 2015*. Stockholm: ECDC; 2017.
25. Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwaik YA. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 2004;6(1):129-39.
26. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(1):20-8.
27. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980;33(12):1179-83.
28. Dey R, Bodennec J, Mameri MO, Pernin P. Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila* *FEMS Microbiol Lett* 2009;290(1):10-7.
29. Marinelli L, Cottarelli A, Solimini AG, Del Cimmuto A, De Giusti M. Evaluation of timing of re-appearance of VBNC *Legionella* for risk assessment in hospital water distribution systems. *Ann Ig* 2017;29(5):431-9.

30. Solimini AG, Cottarelli A, Marinelli L, De Giusti M. Factors influencing persistence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in laboratory cocultures. *BMC Microbiol* 2014;14:249.
31. Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* 2000;192(9):1261-72.
32. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 1994;62(8):3254-61.
33. Lienard J, Croxatto A, Gervaix A, Lévi Y, Loret J-F, Posfay-Barbe KM, et al. Prevalence and diversity of *Chlamydiales* and other amoeba-resisting bacteria in domestic drinking water systems. *New Microbes and New Infect* 2017;15:107-16.
34. Ji W-T, Hsu B-M, Chang T-Y, Hsu T-K, Kao P-M, Huang K-H, et al. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments. *Sci Total Environ* 2014;499:212-9.
35. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Wat Res* 2018;141:428-38.
36. Barker J, Humphrey TJ, Brown MW. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 1999;173(2):291-5.
37. Evstigneeva A, Raoult D, Karpachevskiy L, La Scola B. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 2009;155(Pt 2):657-64.
38. Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol* 2004;7(4):261-8.
39. Pau CKY, Ma FFT, Ip M, You JHS. Characteristics and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in Hong Kong. *Infect Dis (Lond)* 2015;47(5):283-8.
40. Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME, Antypa E, Koteli A, Antoniadou E. Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in the intensive care unit. *J Infect* 2015;70(6):592-9.
41. De Giusti M, Cottarelli A, Del Cimmuto A, Lombardi A, Giordano A, Solimini AG, et al. Temporal pattern of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) on surfaces of an intensive care unit of a large hospital. *Senses Sci* 2017;410-4.
42. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ Microbiol* 2004;6(6):584-90.
43. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One* 2013; 8(2):e56847.
44. Coia JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20(1):1-9.
45. Codony F, Pérez LM, Adrados B, Agustí G, Fittipaldi M, Morató J. Amoeba-related health risk in drinking water systems: could monitoring of amoebae be a complementary approach to current quality control strategies? *Future Microbiol* 2012;7(1):25-31.
46. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):50778.
47. Gourabathini P, Brandl MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(8):2518-25.
48. Bracha R, Kobiler D, Mirelman D. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1982;36(1):396-406.

49. Jeong HJ, Jang ES, Han BI, Lee KH, Ock MS, Kong HH, *et al.* *Acanthamoeba*: could it be an environmental host of *Shigella*? *Exp Parasitol* 2007;115(2):181-6.
50. Benavides-Montañó JA, Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl Environ Microbiol* 2017;83(13).
51. Markman DW, Antolin MF, Bowen RA, Wheat WH, Woods M, Gonzalez-Juarrero M, *et al.* *Yersinia pestis* Survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerging Infect Dis* 2018;24(2):294-302.
52. Carstens A, Bartie C, Dennis R, Bezuidenhout C. Antibiotic-resistant heterotrophic plate count bacteria and amoeba-resistant bacteria in aquifers of the Mooi River, North West province, South Africa. *J Water Health* 2014;12(4):835-45.
53. Lienard J, Croxatto A, Gervais A, Lévi Y, Loret J-F, Posfay-Barbe KM, *et al.* Prevalence and diversity of *Chlamydiales* and other amoeba-resisting bacteria in domestic drinking water systems. *New Microbes New Infect* 2016;15:107-16.
54. Yamaguchi H, Matsuo J, Yamazaki T, Ishida K, Yagita K. Draft Genome sequence of high-temperature-adapted *Protochlamydia* sp. HS-T3, an amoebal endosymbiotic bacterium found in *Acanthamoeba* isolated from a hot spring in Japan. *Genome Announc* 2015;3(1):e01507-14.
55. Kahane S, Dvoskin B, Mathias M, Friedman MG. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(10):4789-95.
56. Greub G. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(1):18-28.
57. Fukumoto T, Matsuo J, Hayashi Y, Hayashi M, Oguri S, Nakamura S, *et al.* Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival *in vitro* without requirement for amoebae. *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3360-5.
58. Okude M, Matsuo J, Nakamura S, Kawaguchi K, Hayashi Y, Sakai H, *et al.* Environmental *Chlamydiae* alter the growth speed and motility of host *Acanthamoebae*. *Microbes Environ* 2012;27(4):423-9.
59. Fukumoto T, Matsuo J, Okubo T, Nakamura S, Miyamoto K, Oka K, *et al.* *Acanthamoeba* containing endosymbiotic *Chlamydia* isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. *BMC Microbiol* 2016;16(1):292.
60. Denet E, Coupat-Goutaland B, Nazaret S, Pélandakis M, Favre-Bonté S. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol Res* 2017;116(11):3151-62.
61. Arp J, Götze S, Mukherji R, Mattern DJ, García-Altare M, Klapper M, *et al.* Synergistic activity of cosecreted natural products from amoebae-associated bacteria. *PNAS* 2018;201721790.
62. José Maschio V, Corção G, Rott MB. Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015;57(1):81-3.
63. Iqbal J, Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart. *Parasit Vectors* 2014;7:56.
64. Doyscher D, Fieseler L, Dons L, Loessner MJ, Schuppler M. *Acanthamoeba* feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria. *Environ Microbiol* 2013;15(2):433-46.
65. Vaerewijck MJM, Baré J, Lambrecht E, Sabbe K, Houf K. Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: Potential Consequences for Food Safety. *Compr Rev Food Sci F* 13(5):924-44.
66. Lambrecht E, Baré J, Chavatte N, Bert W, Sabbe K, Houf K. Protozoan cysts act as a survival niche and protective shelter for foodborne pathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(16):5604-12.

67. Anacarso I, de Niederhäusern S, Messi P, Guerrieri E, Iseppi R, Sabia C, *et al.* *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *J Basic Microbiol* 2012;52(3):261-8.
68. Klein de Souza T, Soares SS, Benitez LB, Rott MB. Interaction Between Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. *Curr Microbiol* 2017;74(5):541-9.
69. Tang J, Zhu H, Cai L, Tang T, Tang J, Sun Y, *et al.* Postoperative infection caused by *Acinetobacter baumannii* misdiagnosed as a free-living amoeba species in a humeral head hemiarthroplasty patient: a case report. *Infect Dis Poverty* 2018;7(1):33.
70. Lamothe J, Thyssen S, Valvano MA. *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga*. *Cell Microbiol* 2004;6(12):1127-38.
71. Howard K, Inglis TJJ. Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Res* 2005;39(6):1085-92.
72. Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Res Microbiol* 2016;167(1):29-34.
73. Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environ Microbiol* 2017;19(10):4103-12.
74. Briancesco R, Bonadonna L. Free living amoebae in water environment: health implications. *Microbiol Med* 2013;28(3):140-7.
75. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard J-Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34(3):231-59.

IMPIANTI IDRICI E GOVERNANCE DELLA QUALITÀ DELL'ACQUA

Umberto Moscato, Alice Borghini, Salvatore Ferrara
 Istituto di Sanità Pubblica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Le differenti specie di amebe a vita libera, oltre ad essere pressoché ubiquitarie nella matrice acqua e nelle sue diverse espressioni di acqua potabile ad uso umano e ludico/terapeutico, sono anche relativamente acido-tolleranti e mostrano una variabile, e a volte notevole resistenza nei confronti delle alte temperature.

Alcuni studi hanno mostrato che amebe si rilevano a temperature in un ampio range (da +2-4°C, per le cisti, sino ad oltre +50-55°C) e si moltiplicano a temperature comprese in un range minimo tra i 20°C e i 45°C (1).

Oltre alla notevole resistenza delle *Free-Living Amoebae* (FLA), è comune la possibilità di rilevarle all'interno di biofilm con la loro capacità di essere vettori per numerosi agenti patogeni, anche quando si trovano nella forma di cisti (2).

La presenza di biofilm può essere rilevata in tutti gli impianti idrici, laddove si generino condizioni critiche favorevoli all'attaccamento e la proliferazione: in corrispondenza di punti a ridotta velocità di flusso (diramazioni, curve, raccordi, giunti, valvole) o laddove può esserci un potenziale ristagno ("bracci morti" o interrotti e altrimenti definiti "ciechi", tubi con deviazione ad angoli retti, rubinetti, soffioni, guarnizioni, raccordi e rompigitto); come conseguenza di un'inedonea progettazione di tubazioni troppo lunghe e con bracci morti oppure da un loro uso intermittente o lunghi periodi di non-utilizzo (es. in hotel ad occupazione stagionale); in seguito a scarsa possibilità di controllo della temperatura a causa di un'inadeguata progettazione del sistema di acqua calda, con insufficiente capacità di riscaldamento. Oppure, apparentemente al contrario, temperature troppo elevate nell'impianto di acqua fredda per la vicinanza ad un sistema di acqua calda scarsamente coibentato o esposizione dell'impianto di acqua fredda alla luce solare in zone climatiche calde.

Infine lo sviluppo di biofilm è dovuto a materiali degli impianti idrici non idonei allo scopo: prodotti che favoriscono la crescita microbica (quindi con formazione del biofilm) o comportano rischi chimici (rilascio di sostanze potenzialmente tossiche o nocive); materiali incompatibili con le caratteristiche fisiche e chimiche dell'acqua presente nell'impianto con conseguente aumento della corrosione o delle incrostazioni; serbatoi aperti di stoccaggio dell'acqua che consentono l'accesso a contaminanti dall'esterno.

Pertanto, la progettazione, la costruzione, l'installazione, il funzionamento e la manutenzione degli impianti idrici, se non correttamente eseguiti, possono favorire la formazione di biofilm o la proliferazione microbica. In condizioni di dinamicità del sistema idrico, elementi marginali del biofilm si distaccano dal substrato e, trasportati dall'acqua, giungono ai Punti di Utenza Terminale (PUT) o punti di erogazione (3).

Le FLA sfruttano il biofilm come fonte di protezione, e i microrganismi presenti al suo interno come fonte di nutrimento. Inoltre, non solo i batteri, tra cui i principali sono le legionelle (*L. pneumophila*) e i micobatteri, ma è stato dimostrato che anche alcuni enterovirus patogeni (es. Coxsackie virus B3), o altri parassiti (es. *Cryptosporidium*) interagiscono con questi protozoi (4).

Materiali degli impianti idrici

I tubi d'acciaio, ancorché rivestiti di carbone (idrofilo), potrebbero causare un incremento dell'adesività dei sedimenti planctonici rispetto all'acciaio inossidabile o rivestito con fluoropolimeri (idrofobo) che riducono l'adesività e quindi la formazione di biofilm. Inoltre, pressoché ogni tipo di materiale, come il rame o l'acciaio rivestito con polietilene, può indurre la formazione e/o la persistenza del biofilm, anche in assenza di rugosità della superficie o di fattori di adesività, a causa del rilascio e/o migrazione dalla superficie delle tubature di sostanze utilizzate dai microrganismi come nutrienti, in particolare in seguito a lesioni o fratture della superficie interna dei materiali (3, 5).

Materiali di tipo plastico ed elastomerico come il polipropilene, il polietilene, l'etileno-propilene-diene monomero (EPDM), il PVC o cloruro di polivinile, la gomma in nitrile butadiene, il silicone e il latex) sono i più ampiamente usati su scala mondiale, ma sono anche quelli più facilmente esposti alla formazione di biofilm e di microrganismi da esso dipendenti, sebbene ciò debba essere sempre posto in relazione con la modalità vettoriale del flusso idrico e con la presenza di variazioni "allo strato limite" di temperatura (6).

La gestione delle FLA inizia, di conseguenza, con il controllo dello sviluppo di biofilm all'interno del sistema idrico, minimizzando il carbonio biodisponibile, l'azoto e il fosforo presente, e avendo attenzione, nell'eliminare le zone di stagnazione del flusso idrico e nel mantenimento di un disinfettante residuo e una temperatura idonea (inferiore a 20°C o superiore a 55°C). Queste misure di controllo però, sebbene si siano dimostrate sufficientemente valide per molti microrganismi, non sono sempre risultate efficaci per le FLA (7).

Efficacia dei sistemi di trattamento dell'acqua vs amebe

L'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda la necessità di mantenere una certa concentrazione di cloro residuo libero nell'acqua in rete. In particolare, la normativa italiana (DL.vo 31/2001 aggiornato al Decreto 14/6/2017) suggerisce, per le acque destinate al consumo umano, una concentrazione di cloro al punto d'uso pari a 0,2 mg/L; 0,5 mg/L è raccomandato in ambiti di matrice da sorgente ad alto rischio (8-10).

Allo stato dell'arte emerge la notevole difficoltà di disinfezione delle acque rispetto alle amebe a causa della loro notevole resistenza ai comuni sistemi di disinfezione. Di fatto, a fronte di una certa sensibilità di *Naegleria fowleri* ai processi di trattamento fisico (termico) e chimico (clorazione o monoamminoclorazione) si osserva un variabile grado di resistenza o indifferenza di *Acanthamoeba* o di *B. Mandrillaris*, o di altre forme di genere e famiglia di amebe, ai trattamenti chimici e termici. Le cisti di *Acanthamoeba* possono resistere anche ad esposizioni pari a 50 mg/L di cloro per 18 ore o 100 mg/L di cloro per 10 min, vanificando l'esposizione a processi di "clorazione al *breakpoint*" o, addirittura, gli attuali trattamenti dell'acqua consigliati attraverso "iperclorazione" (3, 11). La maggiore suscettibilità al trattamento fisico o chimico, così come per gli altri sistemi di trattamento, dipende dallo stato delle amebe (se libero, associato ad alghe, altri protozoi, in fase cistica o non, combinati, ecc.). In base alle evidenze appena descritte si può affermare che l'utilizzo di sistemi di disinfezione a "ciclo combinato" (ovvero sistemi di tipo chimico, fisico e meccanico posti insieme), rappresentino la soluzione migliore per trattare le acque ad uso umano qualora si ipotizzi o si abbia certezza di contaminazione amebica. La filtrazione, associata alla chiariflocculazione dell'acqua, o meglio in combinazione con gli altri metodi di disinfezione citati, sembrerebbe essere un metodo valido di contrasto alla proliferazione

di amebe, sebbene anch'essa presti il fianco al fenomeno di *aftergrowth* (post-crescita) amebica, che potrebbe vanificare gran parte dell'efficacia del metodo (12, 13).

A conferma di ciò, è stata misurata la percentuale di amebe rimosse da due campioni di acqua potabile utilizzando filtri lenti a sabbia e filtri rapidi a sabbia. Dai risultati è emerso che l'utilizzo di sistemi di disinfezione meccanici, basati su filtri lenti a sabbia, è in grado di rimuovere l'83% delle amebe ($p \leq 0,017$), mentre l'uso dei filtri rapidi a sabbia ne rimuove il 71,4% ($p \leq 0,017$), benché la differenza tra i due metodi di trattamento non sia apparsa significativa ($p \leq 0,55$) (14).

È stata anche condotta una sperimentazione sull'azione della temperatura (in un intervallo tra 50°C e 70°C), come mezzo di disinfezione fisico, su trofozoiti e cisti di 4 specie di amebe (due specie di *Acanthamoeba* e due specie di *Hartmannella*). Trofozoiti e cisti sono stati esposti alla temperatura di 50°C per 5, 10, 20 e 30 minuti, alla temperatura di 60°C per 2, 5, 10, 15 e 20 minuti e alla temperatura di 70°C per 30 secondi, 1 e 2 minuti. I risultati hanno mostrato un'azione significativamente maggiore del trattamento termico sui trofozoiti rispetto alle cisti. Alle temperature di 60°C e 70°C, *Acanthamoeba* e *Hartmannella* hanno mostrato comportamento differente: cisti e trofozoiti di *Hartmannella* alle temperature di 60°C applicata per 2 minuti e 70°C applicata per 30 secondi hanno avuto una riduzione di numero di 4 unità \log_{10} . Al contrario, per quanto riguarda *Acanthamoeba*, sebbene una temperatura di 60°C applicata per 2 minuti sia apparsa efficace per eradicare i trofozoiti, le cisti, alla stessa temperatura, dovrebbero essere esposte per più di 10 minuti, per essere potenzialmente eliminate. Non è risultata crescita, invece, sia di cisti che di trofozoiti ad una temperatura di 70°C. Peraltro, non in tutte le *Acanthamoeba* gli autori hanno rilevato un comportamento omogeneo, risultando il trattamento termico di minor efficacia per *A. castellanii* rispetto alle altre specie di *Acanthamoeba*. L'utilizzo, infine, di temperature non letali potrebbe favorire l'incistamento delle amebe (15).

Altri studi dell'effetto del cloro su *Acanthamoeba* (*A. castellanii* e *Acanthamoeba* sp. 155 come trofozoite e come cisti, oltre alla valutazione di *Legionella* singolarmente con le due specie di ameba come vettore), hanno comportato che cisti e trofozoiti di *Acanthamoeba* siano stati esposti a concentrazioni di cloro di 1,2 mg/L per 30 minuti e 2,5 mg/L per 15 minuti. L'efficacia del cloro è stata maggiore nei confronti dei trofozoiti rispetto alle cisti, particolarmente alla concentrazione di 2,5 mg/L. I trofozoiti di *A. castellanii* e di *Acanthamoeba* sp. 155 sono stati ridotti di 3 unità \log_{10} dopo contatto di 30 minuti a 1,2 mg/L ($p < 0,001$) e dopo 15 minuti a 2,5 mg/L ($p < 0,05$). Per quanto riguarda le cisti i due trattamenti hanno ridotto di un'unità \log_{10} il loro numero, in entrambe le specie (16).

In acqua, nove specie di *Acanthamoeba* sono state sottoposte all'azione di vari tipi di disinfettanti, tra cui alcuni di tipo chimico a concentrazioni diverse, e all'azione di temperature e tempi di contatto differenti.

Nella Tabella 1 sono stati riportati i tipi di trattamento utilizzati, il tempo di contatto e la riduzione della popolazione amebica, sotto forma di riduzione di unità \log_{10} , nei vari campioni di acqua presi in esame.

In conclusione, mentre la minima temperatura cisticida è di 65°C (disinfezione fisica), la base derivata del perossido di idrogeno ha grande efficacia già a concentrazioni del 2% (disinfezione chimica), concentrazione significativamente inferiore a quella del perossido di idrogeno puro, utile ad ottenere risultati simili. Anche il prodotto base derivato dell'acido peracetico (*PerAcetic Acid*, PAA) ha dimostrato valida efficacia rispetto all'acido peracetico puro. Inoltre, un buon risultato è stato ottenuto anche con l'uso dell'alcol etilico, sebbene questo dimostri una scarsa azione contro batteri, virus e altri protozoi. Infine, appare evidente, come il cloro risulti inefficace contro le cisti di *Acanthamoeba* anche a concentrazioni da 2 a 5 ppm (17).

Tabella 1. Effetto cisticida dei trattamenti, includendo composti attivi non formulati, formulati, temperature, contro le cisti di nove tipi di *Acanthamoeba*

Biocida	Tempo contatto (fiume1)	2 (fiume2)	3 (ospedale1)	4 (ospedale2)	5 (fiume3)	6 (fiume4)	A. castellani CCAP 1501/10	A. castellani ATCC 30010	A. polyphaga CCAP 1501/18
55°C	10 min	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1
65°C	10 min	>4,7	>4,8	>4,7	>4,7	>4,8	>5,1	>4,7	>4,5
Sodio ipoclorito, 2,5%	10 min	>4,7	>4,8	>4,7	>4,7	>4,8	>5,1	>4,7	>4,5
Sodio ipoclorito, 0,25%	10 min	2,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	>4,1	2,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Sodio ipoclorito, 0,25%	20 min	>4,7	>4,8	1,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	>4,8	ND	>4,7	>4,5
Sodio ipoclorito, 0,25%	30 min	ND	ND	2,6 ± 0,2	>4,7	ND	ND	ND	ND
Etanolo 70%	10 min	>4,7	>4,8	2,8 ± 0,1	4,3 ± 0,3	3,5 ± 0,2	>4,1	>4,7	>4,5
Glutaraldeide 2%	10 min	1,6 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,1	1,1 ± 0,6	4,6 ± 0,1	>4,1	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Prodotto a base di glutaraldeide	10 min	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,8	0,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1
Prodotto a base di glutaraldeide	20 min	3,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,9 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	>4,5
Prodotto a base di glutaraldeide	30 min	>4,7	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	>4,7	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	>4,7	ND
glutaraldeide	10 min	>4,7	>4,8	3,7 ± 0,2	1,1 ± 0,3	>4,8	>4,1	>4,7	>4,5
Orto-ftalaldeide (OPA), 0,55%	10 min	2,8 ± 0,2	3,8 ± 0,1	2,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	4,6 ± 0,0	>4,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1
OPA	20 min	>4,7	>4,8	2,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	ND	ND	>4,7	>4,5
OPA	30 min	ND	ND	>4,7	>4,7	ND	ND	ND	ND
Perossido di idrogeno, 7,5%	10 min	1,1 ± 0,5	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,4 ± 0,3	2,5 ± 0,4
Perossido di idrogeno, 7,5%	20 min	3,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2	>4,8	>4,1	2,2 ± 0,1	>4,5
Perossido di idrogeno, 7,5%	30 min	3,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2	ND	ND	2,8 ± 0,2	ND
A base di perossido di idrogeno	10 min	>4,7	>4,8	>4,7	4,3 ± 0,4	>4,8	>4,1	>4,7	>4,5
H ₂ O ₂ /Acido Peracetico (PAA- a base di SporKlenz)	10 min	>4,7	3,6 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,8	4,1 ± 0,2	>4,1	>4,7	>4,5
H ₂ O ₂ / PAA- a base di SporKlenz RTU	20 min	ND	>4,8	>4,7	4,1 ± 0,8	ND	ND	ND	ND
H ₂ O ₂ / PAA- a base di SporKlenz RTU	30 min	ND	ND	ND	>4,5	ND	ND	ND	ND
PAA, 0,2%	10 min	>4,7	0,9 ± 0,3	>4,7	0,2 ± 0,2	>4,8	>4,1	2,1 ± 0,5	>4,5
PAA	10 min	>4,7	>4,8	>4,7	4,0 ± 0,2	>4,8	>4,1	>4,7	>4,5

ND: non determinato

Fouque *et al.* (18) hanno studiato *in vitro* l'azione di cloro, calore, PAA unito a perossido di idrogeno e la subtilisina (proteasi isolata da *Bacillus licheniformis*, *Novozymes*) su due specie di *Hartmannella vermiformis*. L'azione del cloro è stata valutata a varie concentrazioni e a 2,5 mg/L, così come a 5 mg/L, ha mostrato un bassissimo effetto amebicida (quest'ultima concentrazione si è dimostrata efficace se applicata per 8 ore a 25°C). Alla concentrazione di 10 mg/L, con un tempo di esposizione di 10 minuti, il cloro ha la capacità di ridurre il numero di amebe rilevate pari a due unità \log_{10} , mentre alla più alta concentrazione testata (15 mg/L) il cloro è stato capace di inattivare totalmente le due specie di *Hartmannella vermiformis*. Per quanto riguarda l'utilizzo di calore (energia termica) a 50°C l'inattivazione è stata trascurabile; mentre ad una temperatura di 55°C, applicata per 30 minuti, si è osservata una riduzione \log_{10} pari a 2,7 unità; ad una temperatura di 55°C per 60 minuti la riduzione rilevata è stata di 5,6 unità \log_{10} ; infine, a 60°C e 70°C le cisti delle due specie sono state completamente inattivate dopo 30 minuti. Sempre Fouque *et al.*, sperimentando l'azione disinfettante del PAA unito a perossido di idrogeno, hanno rilevato che le cisti di *Hartmannella vermiformis* sono state completamente inattivate applicando 0,5 e 1 g/L equivalenti, rispettivamente per 30 e 60 minuti di tempo/contatto. La subtilisina, infine, ha dimostrato un forte effetto cisticida, con una completa inattivazione delle due specie di *Hartmannella vermiformis* con una concentrazione efficace di 1,25 U/mL. Purtroppo, il limite intrinseco di questo interessante studio di Fouque *et al.* resta nel fatto che sia stato condotto esclusivamente *in vitro* e in condizioni controllate e non sulla comune acqua potabile e quindi non tenendo conto di tutte le altre variabili interferenti, confondenti e di "mascheramento" presenti nell'acqua in condizioni di flusso, contatto ed esposizione proprie di un impianto idrico complesso.

Heaselgrave *et al.* (19) hanno studiato l'effetto della SODIS (Solar disinfection) su *Acanthamoeba polyphaga*. Più nello specifico, gli autori hanno valutato la componente infrarossa (IR) e ultravioletta (UV) della radiazione solare sulla parete delle cisti di *A. polyphaga*, sottoponendo le amebe stesse a irraggiamento applicato a temperature e a tempi di esposizione diversi. Dai risultati emerge una lieve azione del SODIS per una temperatura di 45°C con una riduzione di 1,2 unità \log_{10} dopo 6 ore di esposizione; mentre a 55°C si ottiene una riduzione di 3,3 unità \log_{10} dopo 4 ore di esposizione. In conclusione l'efficacia del SODIS è correlata con l'utilizzo di alte temperature e, conseguentemente, gli autori hanno ipotizzato che le alte temperature (IR) aumentino la permeabilità di membrana delle cisti consentendo una migliore capacità di penetrazione dei raggi UV al loro interno. Le evidenze di ulteriori prove sperimentali relative all'azione del SODIS dimostrerebbero che questo metodo possa essere interpretabile come una buona alternativa quale meccanismo di disinfezione delle acque in regioni con scarsità d'acqua e accesso ad acqua potabile discontinuo nell'arco dell'anno.

Bibliografia

1. Moscato U, Poscia A, Cerabona V, Wachocka M, Del Cimmuto A, Dalla Torre F, Giannetti G, Grieco G. Igiene Ambientale. In: Ricciardi G *et al.* (Ed.). *Igiene, medicina preventiva e sanità pubblica*. Napoli: Idelson-Gnocchi; 2013. p. 295-476.
2. Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS and Greub G. Biodiversity of amebe and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2428-38.
3. Moscato U. *Acqua e salute. Governance e qualità dei sistemi complessi*. Perugia: Edizioni COM srl; 2018.
4. Balczun C, Scheid PL. Free-living amebe as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses* 2017;9(65):1-18.

5. Van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJ. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water-system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* 2005;39:2789-98.
6. Prévost M, Besner M-C, Laurent P, Servais P. Emerging issues of biological stability in drinking water distribution systems. In: van der Kooij D, Van der Wielen PW (Ed.). *Microbial growth in drinking water distribution systems. Problems, causes, prevention and research needs*. London (UK): IWA Publishing; 2014. p. 261-90.
7. Bédard E, Fey S, Charron D, Laferrière C, Cantin P, Dolcé P, Laferriere C, Déziel E, Prévost M. Temperature diagnostic to identify high risk areas and optimize *Legionella pneumophila* surveillance in hot water distribution systems. *Water Res* 2015;71:244-56.
8. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n.31. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001.
9. Italia. Decreto del Ministero della Salute 14 giugno 2017. Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787 che modifica gli allegati II e III della direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano. Modifica degli allegati II e III del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. *Gazzetta ufficiale* n. 192, 18 agosto 2017.
10. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*. 4th ed. Geneva: WHO; 2011.
11. Storey MV, Winiacka-Krusnell J, Ashbolt NJ, et al. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoeba* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 2004;36(9):656-62.
12. Moussa M, Tissot O, Guerlotté J, De Jonckheere JF, Talarmin A. Soil is the origin for the presence of for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitol Res* 2014;114(1):311-5.
13. Loret JF, Jousset M, Robert S, Saucedo G, Ribas F, Thomas V, Greub G. Amebe-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci Technol* 2008; 58(3):571-7.
14. Al-Herrawy AZ. Assessment of two different drinking water treatment plants for the removal of free-living amebe, Egypt. *Iran J Parasitol* 2017;12(3):413-22.
15. Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Canals O, Salvadó H, Araujo RM. Effect of thermal treatment on free-living amoeba inactivation. *J Appl microbiol* 2014;116(3):728-36.
16. Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM. Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free *Legionella* and amebe-associated *Legionella*. *PloS one* 2015;10(8):e0134726.
17. Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microb* 2010;48(8):2689-97.
18. Fouque E, Héchard Y, Hartemann P, Humeau P, Trouilhé MC. Sensitivity of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease. *J Water Health* 2015; 13(2):302-10.
19. Heaselgrave W, Patel N, Kilvington S, Kehoe SC, McGuigan KG. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water—a laboratory study using simulated sunlight. *Lett Appl Microb* 2006;43(2):125-30.

CONSIDERAZIONI FINALI

Lucia Bonadonna (a), Maria De Giusti (b), Elisabetta De Vito (c), David Di Cave (d),
Simona Di Pasquale (e), Umberto Moscato (f)

(a) *Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma*

(c) *Dipartimento di Scienze Umane, Sociali e della Salute, Università di Cassino e del Lazio Meridionale, Cassino*

(d) *Dipartimento di Scienze cliniche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma*

(e) *Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(f) *Istituto di Sanità Pubblica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

Le amebe a vita libera (*Free-Living Amoebae*, FLA) hanno diffusione cosmopolita e sono isolate da suolo, acqua e aria, come anche da ambienti artificiali (reti idriche, riuniti dentistici, torri di raffreddamento, ecc.). Quando rilevate nel suolo, sono più abbondanti all'interfaccia pianta-suolo, poiché le piante favoriscono la crescita di una varietà di microrganismi (batteri e funghi) di cui le amebe si alimentano. In acqua, le specie dotate di flagelli possono fluttuare e con le altre aderire al particolato in sospensione, colonizzando poi biofilm e sedimenti.

La loro abbondanza e diversità nell'ambiente sono influenzate da condizioni stagionali e meteo-climatiche, e fortemente da temperatura, umidità, pH e disponibilità di sostanze nutritive. Si nutrono principalmente di batteri, funghi, alghe per fagocitosi e digestione all'interno di fagolisosomi. Tuttavia, alcuni microrganismi, quando internalizzati, si sono evoluti diventando resistenti alle amebe entro le quali sopravvivono e si moltiplicano. Questo aspetto rappresenta un fattore importante nell'igiene pubblica se si considera che le amebe a vita libera, oltre ad essere note per la patogenicità di alcune specie, sono in grado di veicolare anche microrganismi patogeni nell'ambiente idrico e nei biofilm.

Le FLA rappresentano pertanto un potenziale, ma severo pericolo per la salute dell'uomo. Le manifestazioni cliniche gravi interessano, soprattutto, il sistema nervoso centrale. Le varie specie si differenziano nei tempi di incubazione e nel decorso della patologia (lunghi per quanto riguarda *Acanthamoeba* spp., e, al contrario, brevi per *Naegleria* spp.), ma hanno in comune un'elevata mortalità e pericolosità. In generale, le vie di ingresso preferenziali nell'organismo ospite sono rappresentate dal naso e dalla cute.

La popolazione a rischio è variegata, rappresentando un pericolo in soggetti di tutte le età, con interessamento rilevante sia pediatrico, sia geriatrico. Particolarmente a rischio di manifestazioni neurologiche sono i pazienti immunocompromessi, mentre per i soggetti immunocompetenti risulta significativo il problema delle cheratiti amebiche legate all'utilizzo delle lenti a contatto e del conseguente impiego di soluzioni acquose per il loro mantenimento e pulizia.

L'acqua è il veicolo principale e un punto di interesse sul quale concentrare le misure preventive. Grazie alla loro capacità di incistamento, le amebe a vita libera sono altamente resistenti alla disinfezione e, di conseguenza, la loro presenza può essere osservata anche in acque potabilizzate. Controlli analitici effettuati dall'Istituto Superiore di Sanità su acque destinate al consumo umano in uscita da un impianto di potabilizzazione hanno permesso di rilevare amebe dopo trattamento di acque superficiali filtrate attraverso filtri a sabbia e a carbone attivo (CAG).

Per *Acanthamoeba* spp. le tradizionali procedure di disinfezione non risultano efficaci, e quindi per un abbattimento completo delle concentrazioni sarebbe necessaria una filtrazione

spinta; per la riduzione sensibile del numero delle cisti di *Naegleria* spp., invece, sembra possa essere efficace anche solo la clorazione. Inoltre, *Acanthamoeba* dimostra una grande resistenza al calore e alla pressione osmotica.

Il numero delle infezioni causate dalle FLA è relativamente contenuto se si considera la loro numerosità, distribuzione globale e ubiquitaria e, di conseguenza, la diffusa esposizione della popolazione, pur considerando che non tutte le amebe presenti nell'ambiente sono patogene per l'uomo.

Per l'apparente conflitto tra ubiquità e rarità dei casi osservati (180 casi nel mondo) è stato sviluppato un modello per la stima del rischio di MAP a seguito di esposizione per balneazione ad acque contaminate da *Naegleria fowleri*. Il modello si è avvalso di dati acquisiti da un modello sperimentale animale adattandolo in base alle differenze rispetto a soggetti umani (es. la maggiore resistenza dell'uomo rispetto al topo nei confronti del meccanismo patogenetico delle amebe).

Nel calcolo della probabilità di rischio è stato considerato che le amebe in acqua assumono una distribuzione probabilistica di Poisson e che, in corso di immersione in acqua, la quantità media di acqua inalata potrebbe essere di 10 mL. Nella costruzione del modello è stato altresì considerato che anche una sola ameba sia in grado, dopo inalazione e moltiplicazione, di determinare la MAP. Pertanto, il rischio è stato calcolato per esposizione sia a basse che alte dosi. Ne è derivato, ad esempio, che il rischio di MAP è di $8,5 \times 10^{-8}$ ad una concentrazione di amebe pari a 10 per litro di acqua. Ad una concentrazione di 100 amebe/Litro il rischio sale a $2,5 \times 10^{-6}$. Limite questo, come riportato nel capitolo specifico, utilizzato dalle autorità francesi per le acque ove sussista esposizione umana in seguito a balneazione.

Il controllo delle concentrazioni delle amebe a vita libera nelle acque non può basarsi esclusivamente su trattamenti di disinfezione, ma devono essere utilizzati processi di rimozione idonei per permettere l'eliminazione delle cisti. Il sistema più efficace sarebbe sicuramente l'ultrafiltrazione che elimina comunque qualsiasi composto a basso peso molecolare; tuttavia questo trattamento non rientra tra i sistemi adottati nei comuni impianti di potabilizzazione delle acque. Tra gli agenti chimici, l'azione disinfettante del biossido di cloro, accompagnata da filtrazione su sabbia e carbone attivo, ha effetti comunque migliori rispetto a quelli dell'ipoclorito. Anche l'ozono, il più potente ossidante utilizzato nella disinfezione delle acque, riduce notevolmente la concentrazione delle FLA e ha anche un'efficace azione sulle cisti.

Strategie di controllo delle amebe a vita libera dovrebbero anche interessare i fattori che favoriscono la loro crescita: materia organica, biofilm e sedimenti.

Tra le misure preventive è, inoltre, importante aumentare la consapevolezza del pubblico riguardo ai rischi legati a carenza d'igiene negli impianti natatori o negli impianti termali, sia destinati alla terapia che ad attività ludiche, anche riguardo a specie patogene che possono rappresentare un rischio per specifici gruppi di popolazione.

Dalla disamina della letteratura emerge una difficoltà di reperimento di dati epidemiologici e di studi di efficacia di trattamenti specifici per la sicurezza d'uso delle acque.

Tuttavia, una serie di raccomandazioni e informazioni per la prevenzione di eventuali infezioni possono rappresentare validi strumenti per ridurre il rischio potenziale associato alla presenza ubiquitaria di amebe a vita libera nell'ambiente e soprattutto nelle acque:

- attuare una corretta progettazione e installazione degli impianti idrici e tecnologici, sia per nuove realizzazioni che per ristrutturazioni, adempiendo a quanto previsto da norme tecniche e legislative. Ponendo attenzione a che gli impianti siano lineari, previsti in modo integrato alla fase di realizzazione dell'opera edile, evitando tratti con rami terminali inattivi o con flusso lento o assente. Inoltre, è anche necessario porre attenzione alla tipologia dei materiali utilizzati per la realizzazione dell'impianto al fine di limitare lo sviluppo di biofilm e di consentire adeguati trattamenti di disinfezione;

- attuare una specifica informazione/formazione sul rischio chimico, fisico e microbiologico verso i responsabili e gli addetti alla progettazione, alla realizzazione e/o ristrutturazione, alla manutenzione e alla disinfezione ordinaria o straordinaria degli impianti idrici e tecnologici.
- definire, quale parte integrante della progettazione e realizzazione degli impianti idrici, appropriate misure preventive di “*governance*” degli impianti (manutenzione ordinaria e straordinaria, disinfezione ordinaria o straordinaria, ecc.) atte a contrastare la proliferazione e la diffusione di amebe negli impianti;
- prevedere da parte del *Water Safety Manager*, in particolare di strutture a rischio o impianti critici (strutture sanitarie con reparti di immunodepressi o immunosoppressi, centro trapianti, centro immaturi, scuole dell’infanzia, ecc.), l’adozione di opportuni sistemi filtranti a punti d’uso per prevenire il rischio anche di esposizione ad amebe;
- sensibilizzare, attraverso opportuna informazione, formazione e comunicazione, il personale sanitario sul rischio derivante dalle sorgenti di esposizione ad amebe, sui meccanismi di trasmissione e sugli effetti su soggetti suscettibili per classe di età, stato immunitario e patologie concomitanti;
- implementare le attività di ricerca coordinata e di didattica universitaria per le professioni sanitarie sul rischio rappresentato dalla presenza di amebe a vita libera nelle acque, in considerazione dell’ubiquità e della scarsa efficacia dei metodi attualmente applicati per il trattamento delle acque;
- attuare un’efficace comunicazione (informazione/formazione) verso i gestori e i fruitori per aumentare la consapevolezza riguardo ai rischi legati in generale alla inosservanza delle Buone Pratiche Igieniche negli impianti natatori, sia quelli destinati alla terapia che ad attività ludiche;
- rendere informati gli utilizzatori di lenti a contatto sulle corrette procedure di disinfezione e risciacquo delle lenti sul loro impiego potenzialmente inappropriato durante la doccia, le attività natatorie o in seguito ad altre forme di contatto con acqua nebulizzata;
- rendere informati gli utilizzatori di sistemi di aerosolizzazione terapeutica o ludica (es. idromassaggio) per aumentare la consapevolezza riguardo ai rischi legati in generale alla inosservanza delle Buone Pratiche Igieniche nella sterilizzazione/pulizia-disinfezione di tali sistemi, anche domestici.

Ulteriori ricerche, tuttavia, sono ancora necessarie per un migliore controllo delle amebe a vita libera nell’ambiente e nelle acque in particolare. Lo sviluppo di nuovi approcci per il trattamento delle acque, basati sulla conoscenza dei meccanismi di incistamento, sarebbero utili per minimizzare il rischio associato alle specie più resistenti, come *Acanthamoeba*, da materiali filtranti e biofilm.

Certamente è necessario un approccio integrato di gestione del biofilm per il controllo a lungo termine dei sistemi di distribuzione dell’acqua. Controllo e gestione potrebbero comprendere la riduzione dei nutrienti che alimentano il biofilm e il mantenimento di condizioni che selezionano un microbioma attivamente antagonista a patogeni presenti – una sorta di approccio probiotico. La combinazione di una conoscenza dell’ecologia microbica, dell’efficacia dei controlli ingegneristici e degli approcci di monitoraggio molecolare, negli anni più recenti, sta comunque facendo progressi in questo settore tanto necessario della gestione della salute pubblica.

APPENDICE

Determinazione di amebe a vita libera

Lucia Bonadonna (a), Rossella Briancesco (a), Rosa Paradiso (a), David Di Cave (b),
Federica Berrilli (b), Margherita Montalbano Di Filippo (b)
(a) Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
*(b) Dipartimento di Scienze cliniche e Medicina Traslazionale,
Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma*

0. Generalità e definizioni

Le amebe a vita libera sono protozoi unicellulari a diffusione cosmopolita presenti in tutte le matrici ambientali. In particolare, amebe ambientali sono state isolate da suoli, sedimenti, polveri, aria, acque reflue, dolci, termali, minerali, trattate e sottoposte a trattamenti di disinfezione (acque potabili e di piscina) e in biofilm, e *Acanthamoeba* spp. è il protozoo più frequentemente riscontrato nell'ambiente. Delle numerose specie di amebe a vita libera, diverse sono state segnalate in ambienti particolari: torri di raffreddamento, impianti di climatizzazione, deumidificatori, unità di dialisi, unità dentistiche, apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua e su lenti a contatto. La loro distribuzione e diversità nell'ambiente sono fortemente influenzate da temperatura, umidità, pH, disponibilità di nutrienti e appare chiara l'esistenza di un andamento stagionale della loro abbondanza nell'ambiente. La sopravvivenza e la moltiplicazione delle amebe sono anche condizionate dalla presenza e dalla densità della flora microbica associata.

Le amebe a vita libera, presentano almeno due stadi di sviluppo: il trofozoite, in forma amebica e la cisti; *Naegleria* presenta anche una forma flagellata di trofozoite. Il trofozoite, forma metabolicamente attiva, si divide per scissione binaria e si nutre di microrganismi, oltre che di alghe e flagellati. Le cisti, forme di resistenza metabolicamente inattive, sono generalmente costituite da due strati concentrici, uno più esterno, l'ectocisti e uno più interno, l'endocisti; un terzo strato, la mesocisti, è presente solo in alcune specie. Una simile struttura giustifica la loro elevata resistenza ai biocidi più comunemente usati, ai raggi ultravioletti e alle temperature estreme. Le dimensioni delle cisti sono variabili in relazione alle diverse specie.

Esistono centinaia di specie, ma quelle conosciute di interesse sanitario sono in numero limitato e includono *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia diploidea* che possono essere responsabili di patologie anche ad esito fatale, in taluni casi persino in individui immunocompetenti.

Acanthamoeba è il più comune genere di ameba a vita libera ed ha una distribuzione cosmopolita. Malgrado le ampie possibilità di contatto, le infezioni umane da *Acanthamoeba* sono rare e, ad eccezione delle cheratiti che coinvolgono anche individui immunocompetenti, sono limitate a soggetti immunodepressi in cui può causare Encefalite Amebica Granulomatosa (EAG). Le specie più frequentemente identificate come agenti eziologici di malattia sono *A. castellani*, *A. polyphaga* e *A. culbertsoni*.

Al genere *Naegleria* appartengono amebe flagellate diffuse nel suolo e nell'acqua, ma meno ubiquitarie di *Acanthamoeba* e più sensibili alle condizioni ambientali, al pH, alla disidratazione e non in grado di vivere in acque marine. *Naegleria* cresce meglio ad alte temperature, in acque termali, bacini idrici, ruscelli e laghetti artificiali, resistendo fino a 45°C. *Naegleria* è stata anche isolata da impianti idrici domestici, torri di raffreddamento ed effluenti di processi industriali. *N. fowleri* costituisce l'agente eziologico della Meningoencefalite Amebica Primaria (MAP) nell'uomo, infezione molto rara ma molto grave, di solito acquisita nuotando in acque contaminate.

Balamuthia mandrillaris è presente nel suolo e nelle acque. Può essere responsabile di infezioni granulomatose croniche del Sistema Nervoso Centrale che si acquisiscono per contatto con suolo o immersione in acqua.

Amebe di grandi dimensioni appartenenti al genere *Sappinia diploidea* sono state isolate nell'ambiente, nelle feci umane e in feci animali senza però essere responsabili di patologie. Tuttavia, è stato segnalato – al momento – un unico caso di infezione da *Sappinia pedata* (originariamente identificata come infezione da *S. diploidea*) che si è manifestato come Encefalite amebica.

Alla rilevanza sanitaria attribuita alle amebe anfizoiche, si aggiunge l'interesse legato alla loro capacità di fagocitare microrganismi tra cui legionelle e micobatteri. I microrganismi all'interno di amebe possono vivere come simbionti, essere protetti dalle condizioni ambientali avverse, dall'essiccamento, dall'azione battericida dei disinfettanti e, potenzialmente, questa localizzazione può potenziarne l'azione patogena.

Nelle reti idriche, il biofilm può costituire un sito di rilascio di amebe e di microrganismi, anche considerando che l'associazione tra amebe e microrganismi rappresenta una strategia adattativa vincente. È confermato inoltre che, al punto d'uso (rubinetti, soffioni delle docce, ecc.), la concentrazione e la diversità delle amebe nell'acqua risultano incrementati.

Lo sviluppo di metodi analitici di facile esecuzione per la determinazione delle amebe è il primo atto per una più accurata verifica della qualità delle acque. Infatti, per la stretta associazione tra amebe e microrganismi anche potenzialmente patogeni, l'estensione di controlli analitici con l'uso di tecniche valide può rappresentare una misura preventiva per una più adeguata e operativa attività di monitoraggio delle acque.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [019A rev. 00; 019B rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione di amebe a vita libera nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A019A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la Presenza/Assenza di amebe a vita libera in un determinato volume di acqua. La procedura analitica comprende una concentrazione per filtrazione su membrana, seguita da una fase di crescita su strato di *Escherichia coli* sia a $(29\pm 1)^\circ\text{C}$ che a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$, e infine l'osservazione ai microscopi invertito e ottico (1).

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1) sono necessari:

- Microscopio invertito
- Microscopio ottico

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare per la determinazione delle amebe a vita libera, generalmente pari a 5 L, è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare. I campioni possono essere trasportati e conservati a temperatura ambiente. Tuttavia, il campione deve essere analizzato nel minor tempo e comunque l'analisi non deve superare le 24 ore dal prelievo.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Soluzione salina di Page per amebe (PAS)

Composizione		
Cloruro di Sodio	120	mg
Solfato di Magnesio eptaidrato	4	mg
Cloruro di Calcio biidrato	4	mg
Sodio fosfato bibasico	142	mg
Potassio Fosfato monobasico	136	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH $6,8\pm 0,2$		

Sciogliere i sali in acqua distillata. Se si vuole stoccare la soluzione sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.1.4.2. Agar non nutritivo (NNA)

Composizione		
PAS	100	mL
Agar	1,5	g
pH 7,0±0,2		

Sospendere l'agar nella soluzione salina di Page, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di 1 mese in condizioni ottimali.

2.1.4.3. Agar soia triptone

Composizione		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a (121±3)°C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di 8 settimane in condizioni ottimali.

2.1.5. Procedura**2.1.5.1. Preparazione di piastre di agar non nutritivo seminate con *Escherichia coli***

Strisciare una singola colonia di *E. coli* ATCC 11775, o comunque di un ceppo di riferimento certificata, su Agar Soia Triptone (2.1.4.3.) e incubare overnight a (36 ± 1)°C.

Mettere le capsule di Agar non nutritivo, due per campione, in un incubatore a (36 ± 1)°C per 30 minuti. Mentre le capsule arrivano a temperatura, prelevare, con un tampone sterile, le colonie di *E. coli* cresciute overnight e sospenderle in 2 mL di soluzione salina di Page sterile (2.1.4.1.), o acqua distillata sterile, e preparare una sospensione carica, equivalente a circa 4 della scala di torbidità di McFarland.

Pipettare 2-3 gocce della sospensione di *E. coli* sulla superficie di ogni capsula di Agar non nutritivo e distribuirle su l'intera superficie con una spatola sterile.

Le capsule di Agar non nutritivo così preparate possono essere conservate in frigorifero a (2÷8)°C per una settimana.

2.1.5.2. Filtrazione su membrana

Filtrare lentamente, ad una velocità media di circa 250 mL/minuto, 5 L di acqua attraverso una membrana di acetato di cellulosa di 47 mm, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 1,2 µm in grado di non trattenere forme interferenti con l'identificazione al microscopio.

2.1.5.3. Coltura su terreno agarizzato

Trasferire la membrana rovesciata in una capsula di Agar non nutritivo seminata con *E. coli*. Incubare una capsula a (29±1)°C e l'altra a (36±1)°C fino a 10 giorni.

2.1.5.4. Osservazione al microscopio

A partire dal secondo giorno di incubazione, esaminare la superficie dell'agar per rilevare la comparsa di trofozoiti. Le amebe presentano un endoplasma granuloso in cui è riconoscibile almeno un vacuolo e un ectoplasma più ialino, dai contorni lobosi e non regolari. L'osservazione viene effettuata mediante microscopio invertito con un obiettivo 40X. Per meglio evidenziare la presenza di amebe di dimensioni minori possono essere asportate piccole parti superficiali di agar che possono essere osservate ad immersione con un obiettivo 100X. Eventualmente, continuare l'osservazione giornaliera fino a 10 giorni prima di considerare il campione come negativo per le amebe a vita libera.

2.1.6. Interpretazione dei risultati

La presenza di trofozoi tipici confermano la presenza di amebe nel campione analizzato. Eventualmente, consultare testi e atlanti sul tema.

2.1.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come Presenza/Assenza di amebe/L.

2.2. Metodo - ISS A019B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo consente di identificare a livello molecolare gli isolati di amebe presenti sui terreni di coltura descritti al paragrafo precedente.

2.2.2. Strumentazione

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- Termociclatore per PCR
- Sistema per elettroforesi
- Transilluminatore

2.2.3. Volume da analizzare

Dalle piastre di coltura che hanno evidenziato la presenza di cisti e trofozoi, le amebe sono raccolte con un'ansa sterile e poste in provette da 2 mL contenenti 500 µl di soluzione fisiologica incubate a 56°C per circa 30 min per sciogliere l'agar eventualmente presente. Il campione è quindi centrifugato per 1 min a 14000 rpm. Il volume di pellet da analizzare dipende dal metodo di estrazione del DNA utilizzato. In commercio sono disponibili diversi Kit utilizzabili per le procedure di estrazione manuale o automatica del DNA.

2.2.4. Amplificazione del DNA

La caratterizzazione molecolare degli isolati prevede differenti protocolli di end-point PCR per l'amplificazione dei diversi taxa di amebe a vita libera potenzialmente patogene per l'uomo, non essendo presente a tutt'oggi un'unica procedura in grado di evidenziare simultaneamente tutte le specie.

Tutte le reazioni di PCR amplificano frammenti del gene 18S rDNA eccetto quella riguardante il genere *Naegleria* che ha come target le regioni ITS e 5.8S. Primer specifici per i generi/specie *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. *N. fowleri*, *B. mandrillaris* e *Sappinia* sp. e primer specifici per le amebe in generale, possono essere utilizzati per ottenere l'amplificazione dei diversi taxa.

Nella tabella seguente sono riportati alcuni tra i primer utilizzabili. Per la descrizione dei corrispondenti protocolli di amplificazione fare riferimento alla relativa bibliografia.

Primer utilizzabili per la caratterizzazione molecolare degli isolati

Organismo	Forward primer	Reverse primer	Ref.
Amebe a vita libera *	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC	CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC	(2)
<i>Acanthamoeba</i> sp.	GGCCAGATCGTTTACCGTG	TCTACAAGCTGCTAGGGAGTCA	(3)
<i>Naegleria</i> spp.	GAACCTGCGTAGGGATCATT	TTTCTTTTCCCTCCCCTTATTA	(4)
<i>N. fowleri</i>	CAAACACCGTTATGACAGGG	CTGGTTTCCCTCACCTTACG	(5)
<i>B. mandrillaris</i>	CGCATGTATGAAGAAGACCA	TTACCTATATAATTGTCGATACCA	(6)
<i>Sappinia</i> sp.	TCTGGTGC AAGGCTGAAAC	GCACCACCCTTGAAATC	(7)

* Questa PCR permette la simultanea amplificazione di differenti taxa di amebe, i cui ampliconi variano tra 500 e 1500 basi (*V. vermiformis*: 800 bp; *N. fowleri*: 900 bp; *Vannella* sp., *Vahlkampfia* strains: 950bp; *Acanthamoeba* spp: 1080-1500 bp).

2.2.5. Interpretazione dei risultati

Per l'identificazione molecolare degli isolati, le sequenze degli ampliconi possono essere confrontate con quelle depositate in GenBank mediante il programma Nucleotide Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto indicando il nome del taxa (se necessario anche la percentuale di similarità) ottenuto dall'analisi con Blast.

Bibliografia

1. Bonadonna L, Lacchetti I, Paradiso R. Free-living amoebae: analytical methods for water and biofilm quality control. *Ann Ig* 2006;18(3):199-206.
2. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 2004;92:405-3.
3. Schroeder JM, Booton JC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 2001;39:1903-11.
4. Pelandakis M, Serre S, Pernin P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 2000;47:116-21.
5. Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B, and Müller N. PCRbased diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol* 2007;45:64-7.
6. Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J Clin Microbiol* 2003;41:453-55.
7. Qvarnstrom Y, Da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009;199:1139-42.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di agosto 2019*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, settembre 2019