

Free living amoebae in water environment: health implications

Rossella Briancesco, Lucia Bonadonna

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Key words: *Acanthamoeba*, Amoeba-resisting microorganisms, Free living amoebae, Health risks, Opportunistic pathogen, Water

Amebe a vita libera nell'ambiente idrico: implicazioni di carattere sanitario

INTRODUZIONE

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.

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. Per tale proprietà sono anche indicate col termine di amebe anfizoiche. Nell'ambiente possono essere rinvenute nella forma vegetativa, il trofozoite, che si alimenta di microrganismi presenti nell'acqua e nel suolo, e sotto forma di cisti metabolicamente inattiva, che rappresenta la forma di resistenza ambientale.

Non dipendendo da un ospite per la trasmissione e diffusione, sono ubiquitarie e ampiamente rinvenibili in natura; il loro *habitat* naturale è costituito da bacini d'acqua naturali ed artificiali, fango e suoli.

Ne esistono centinaia di specie ma quelle di interesse sanitario sono in numero limitato ed includono le specie *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. Per la capacità di sopravvivere nei mammiferi, possono essere considerate pseudo-parassiti con un ciclo biologico potenzialmente patogeno.

Il primo caso di meningoencefalite amebica fu descritto nel 1965 in Australia (16), dapprima impropriamente attribuito ad *Acanthamoeba* e, solo successivamente, ascritto ad amebe del genere *Naegleria*. Cheratiti da *Acanthamoeba* sono state per la prima volta diagnosticate nel 1974 nel Regno Unito e nel 1975 negli Stati Uniti, rispettivamente da Naginton e da Jones (26, 45). Il primo

caso di infezione umana attribuito a *Balamuthia* risale invece al 1993. Ad *Hartmannella*, termine che originariamente veniva usato come sinonimo del genere *Acanthamoeba* e che, solo in seguito, è stato utilizzato per indicare amebe di un genere distinto, non sono state ad oggi associate patologie umane.

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 nell'area della microbiologia ambientale. Negli anni più recenti tuttavia, un'attenzione particolare è loro rivolta per il potenziale ruolo di veicolo all'uomo di microrganismi patogeni presenti nell'ambiente idrico. Infatti, sembra che circa un quarto degli isolati di origine ambientale, clinica o derivanti da lenti a contatto contengono batteri endosimbionti (17).

Di seguito viene pertanto presentato lo stato dell'arte sulle specie amebiche la cui diffusione nell'ambiente idrico potrebbe costituire un rischio per la salute umana. Verranno descritte le caratteristiche ecologiche di questi organismi, il loro adattamento nelle reti di distribuzione idrica e le dinamiche di interazione con gli altri microrganismi.

Amebe a vita libera

Per i continui riarrangiamenti dovuti all'evolversi degli studi di sequenziamento genico, la tassonomia delle amebe a vita libera è in evoluzione.

Da un punto di vista filogenetico le amebe rappresentano un gruppo polifiletico, ovvero comprendente specie che non hanno origine da un unico progenitore. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* sono i generi più strettamente correlati, molto distanti filogeneticamente da *Naegleria* e *Sappinia*.

Acanthamoeba. È il più comune genere di ameba

Corresponding author: Lucia Bonadonna

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria - Istituto Superiore di Sanità - Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma
Tel.: 0649902317; 0649902390 - Fax: 0649902605

E-mail: lucia.bonadonna@iss.it

a vita libera. Isolata da acque dolci, marine e salmastre, suolo, sedimenti marini, piscine clorate, pozzanghere e, in ambiente *indoor*, acqua di rubinetto, umidificatori ed acquari e unità odontoiatriche, 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. Oltre all'uomo, *Acanthamoeba* infetta molti mammiferi (cani, scimmie, canguri, un toro, un bufalo indiano) con esito grave e spesso fatale. Le specie più frequentemente identificate come agenti eziologici di malattia sono *A. castellani*, *A. polyphaga* e *A. culbertsoni*.

In natura *Acanthamoeba* può essere rinvenuta nella forma vegetativa, il trofozoite, che si alimenta dei batteri presenti nell'acqua e nel suolo, e sottoforma di cisti, metabolicamente inattiva, che rappresenta la forma di resistenza ambientale.

Il trofozoite, di lunghezza 25-40 μm a seconda della specie, emette dalla superficie cellulare caratteristici pseudopodi filamentosi detti acanthopodi. La cisti, di dimensioni da 15 a 28 μm , a seconda della specie, protegge l'organismo dalla disidratazione, dalla deplezione di nutrienti, dall'azione di biocidi, agenti chimici e fattori ambientali; è dotata di un doppio strato contenente cellulosa con pori che permettono l'eventuale fuoriuscita del microrganismo con reversione alla forma trofozoitica.

Sia il trofozoite sia la cisti sono molto resistenti alle condizioni ambientali. Il trofozoite è aerobio e non può vivere in assenza di ossigeno, le cisti invece sono state isolate anche da materiale anaerobio come feci e liquami; la forma trofozoitica inoltre non vive a concentrazioni saline superiori all'1%, mentre cisti sono state isolate anche da acque marine (41, 51).

Esistono circa 20 specie di amebe appartenenti al genere e, basandosi sulla morfologia delle cisti, è possibile distinguere 3 gruppi: il Gruppo 1, caratterizzato da cisti con diametro superiore a 18 μm , con endocisti stellata ed esocisti liscia o rugosa; il Gruppo 2, in cui il diametro della cisti è inferiore ai 18 μm , l'endocisti può essere poliedrica, globulare, ovoidale o stellata e l'esocisti è ondulata; il Gruppo 3 con cisti di dimensioni inferiori ai 19 μm caratterizzate da endocisti globulare o ovoidale ed esocisti liscia o ondulata (49). La maggior parte delle amebe presenti in natura, tra cui anche le specie potenzialmente patogene *A. castellani* e *A. polyphaga* appartengono al gruppo 2.

Poiché le condizioni di crescita influenzano notevolmente la morfologia delle cisti, per un'esatta identificazione è opportuno procedere al sequenziamento dei geni che codificano per l'RNA ribo-

somiale 18S presente nella subunità ribosomiale minore. Isolati provenienti da colture diverse possono presentare oltre che diversa morfologia delle cisti, differenti profili di restrizione, diversa azione citopatogena, distinti pattern isoenzimatici.

Acanthamoeba vive in un ampio range di condizioni di temperatura, pH e salinità; il fattore limitante è rappresentato dalla disponibilità di batteri che costituiscono la fonte di alimentazione.

Anche se non tutte le specie termotolleranti sono patogene, i ceppi infettivi (*A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi* e *A. polyphaga*) per l'uomo e per altri mammiferi sono quelli in grado di sopravvivere a 37°C.

Malgrado l'elevata frequenza di contatto, l'incidenza delle infezioni umane da *Acanthamoeba* è sorprendentemente bassa. *Acanthamoeba* è responsabile di infezioni sistemiche (in individui immunodebitati e immunocompetenti) e di cheratiti. In questo caso, spesso la sorgente di infezione è l'acqua con cui si preparano le soluzioni per le lenti a contatto (32, 39), ma anche il biofilm che si forma sulla superficie di lenti non adeguatamente igienizzate può fornire un supporto di crescita per le amebe. Nuotare in piscina o vasche termali indossando lenti a contatto costituisce una situazione di rischio. A differenza delle infezioni sistemiche, quasi tutti i casi di cheratite riguardano individui immunocompetenti.

Nel caso delle infezioni sistemiche le vie di ingresso sono rappresentate da lesioni cutanee che possono essere infettate per contatto con suolo o acqua contaminati e attraverso l'inalazione di bioaerosol. Tramite il sangue le amebe si diffondono nel sistema nervoso centrale e in altri organi. In questo caso, infezioni come l'encefalite amebica granulomatosa, infezioni nasofaringee e cutanee possono, anche se non sempre e direttamente, essere associate al nuoto e alle attività in acqua.

Una continuativa esposizione ad amebe potrebbe determinare una certa immunità sia negli animali sia nell'uomo. È stato trovato che la percentuale di individui che presentavano anticorpi nel sangue variava dal 3% al 52% (11). Non è ancora chiaro, tuttavia, se gli anticorpi conferiscano o meno una protezione nei confronti di specie patogene di *Acanthamoeba*. Alcuni studi sembrano indicare un loro probabile ruolo nell'interferire nella capacità di adesione amebica, nell'attività di fagocitosi e nella neutralizzazione di fattori di virulenza.

Acanthamoeba è in grado di supportare la crescita di batteri endosimbionti tra cui *Legionella pneumophila* di cui stimolerebbe la virulenza (8). Numerosi sono gli studi *in vitro* effettuati per far luce sulla relazione di endosimbiosi tra *Acanthamoeba* e numerosi batteri (*Afpia felis*,

Burkholderia cepacia, *Burkholderia pseudomallei*, *E. coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Simkania negevensis* e *Vibrio cholerae*) (4, 12, 25, 27, 31, 39, 61) per determinarne la potenziale patogenicità. Anche *Francisella tularensis*, potenziale arma biologica, si moltiplica all'interno dei vacuoli di *Acanthamoeba* che rappresenta un importante serbatoio ambientale (1).

Naegleria. A questo genere 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. Oltre alla forma amebica, con pseudopodi ampi e smussati detti lobopodi, e a quella cistica, il ciclo biologico di *Naegleria* include anche una fase di trofozoite flagellato per lo più non in grado di alimentarsi e dividersi, ma che probabilmente riveste un ruolo importante nella diffusione nei suoli e nelle acque. Sulla base di tecniche molecolari sono state identificate 47 specie appartenenti al genere *Naegleria*. *N. fowleri* costituisce l'agente eziologico della meningoencefalite amebica primaria (MAP) nell'uomo, infezione molto rara ma molto grave (15). Altre specie sono agenti della stessa malattia in modelli animali. Nell'uomo l'infezione è di solito acquisita nuotando in acque contaminate (41).

Naegleria cresce meglio ad alte temperature, in acque termali, bacini idrici, ruscelli e laghetti artificiali, resistendo fino a 45°C. Le cisti possono sopravvivere a 4°C per almeno 12 mesi ed esistere in trofozoiti ancora infettivi dopo tale arco di tempo. *Naegleria* è stata anche isolata da impianti idrici domestici, torri di raffreddamento ed effluenti di processi industriali (41). La capacità di resistere alle alte temperature non è tuttavia direttamente correlata alla patogenicità; infatti, la specie *N. lovaniensis*, pur termotollerante, risulta non patogena in modelli animali (58).

La presenza di questo genere di amebe in acque ad uso ricreativo costituisce un pericolo per la salute umana. La MAP è una malattia fulminante che, per la rapidità dell'evolversi e la tardività della diagnosi, ha quasi sempre un esito fatale. L'infezione viene generalmente contratta per inalazione della forma amebica o della cisti attraverso la mucosa nasale durante lo svolgimento di attività ricreative in acque dolci calde o a seguito dell'utilizzo, per l'igiene personale, di acque contaminate da amebe. Attraverso gli epitelii della mucosa nasale le amebe migrano lungo i nervi olfattori fino ad arrivare al cervello. Purtroppo la diagnosi è quasi sempre retrospettiva.

Ad essere colpiti sono generalmente ragazzi e giovani adulti sani di sesso maschile (che svolgono attività con più energia) che praticano nuoto o effettuano bagni in acque dolci. Non ci sono casi segnalati di MAP associati ad esposizioni ad acque potabili contenenti amebe.

Sulla base di modelli di valutazione del rischio, in Francia, le autorità considerano non idonee alla balneazione acque che contengano più di 100 *N. fowleri* per litro (9), mentre valori più stringenti, pari a 5 *Naegleria* termofile per litro (valore guida) e 2 *Naegleria* termofile per litro (*action level*), sono stati adottati in Australia nella gestione di un parco acquatico (38).

Sembra che l'inquinamento termico dell'acqua di origine antropica e l'utilizzo di basse concentrazioni di cloro abbiano favorito la scomparsa dall'*habitat* di comunità di protozoi termosensibili naturali antagoniste di *N. fowleri*, favorendo la loro colonizzazione (23).

Negli isolati clinici ed ambientali di amebe appartenenti al genere *Naegleria* non sono mai stati trovati batteri endosimbionti. Studi *in vitro* dimostrano, tuttavia, la capacità di *N. fowleri* di supportare la crescita di *L. pneumophila*, solo però in determinate condizioni di crescita (47).

Balamuthia mandrillaris. Nel 1990 sono stati descritti per la prima volta casi di encefalite fatale nell'uomo e in alcuni primati dovuti ad un genere di amebe a vita libera molto simili morfologicamente a *Polimyxia* che tuttavia costituiscono un genere tassonomico distinto denominato *Balamuthia* (3).

Per l'estesa omologia di sequenza dell'RNA ribosomiale 16S e anche in base alla tipologia delle infezioni indotte, *B. mandrillaris* è strettamente correlata ad *Acanthamoeba*.

Il ciclo biologico comprende uno stadio amebico costituito da un trofozoite di dimensioni più estese di quello di *Acanthamoeba* e di *Naegleria* (diametro 50-60 µm), che si muove attraverso ampi pseudopodi, e da una cisti con triplice parete priva di pori.

In vitro si nutre di piccole amebe del suolo o di cellule di mammifero in coltura ma non di batteri e cresce molto lentamente (53).

Questo genere di amebe è presente nel suolo e con molta probabilità nelle acque ma, date le difficoltà di crescita, non ci sono dati in letteratura sull'isolamento di *B. mandrillaris* da acqua e o altra matrice ambientale.

La specie è responsabile dell'encefalite amebica granulomatosa (EAG) che può riguardare sia individui immunodepressi, sia immunocompetenti, e di infezioni nasofaringee e cutanee.

Alcuni casi di EAG attribuiti in un primo tempo

ad *Acanthamoeba*, solo a posteriori sono stati propriamente ricondotti a *B. mandrillaris*.

L'infezione non è direttamente correlabile al nuoto o ad attività ricreative acquatiche (10).

Come per *Acanthamoeba* l'infezione cutanea viene contratta attraverso piccole lesioni della cute contaminata da suolo infetto, oppure le cisti possono essere trasportate mediante correnti d'aria dal suolo al tratto respiratorio.

Infezioni da *Balamuthia* sono state diagnosticate anche in altri primati, cavalli, pecore e cani. Nell'uomo la malattia è difficile da distinguere da altre forme di meningite; può essere cronica ed evolvere in un periodo variabile da qualche settimana fino a due anni. I casi noti sono circa 100, in tutto il mondo (42).

Sappinia diploidea. È noto un solo caso di infezione da *Sappinia diploidea* in un individuo immunocompetente. Amebe appartenenti a questo genere sono state anche isolate nell'ambiente, nelle feci umane e in feci animali senza però essere responsabili di patologie. Le amebe sono di grandi dimensioni, hanno pseudopodi indistinti e presentano due nuclei. Le cisti, anch'esse binucleate, possono attraversare il tratto intestinale ed essere espulse con le feci senza che l'individuo abbia contratto la malattia.

Altre amebe a vita libera. Amebe appartenenti ai generi *Hartmannella* e *Vahlkampfia* sono state isolate da vari apparati di bovini, suini, cani, conigli e tacchini ma non sono associate ad alcuna patologia. Sebbene siano state isolate anche da casi di cheratite umana ed abbiano un'azione citopatica su colture cellulari di cheratociti, non sono attualmente ritenute patogene primarie ma solo responsabili di infezioni secondarie di lesioni preesistenti (14).

Ecologia delle amebe a vita libera nelle reti idriche e negli impianti di trattamento dell'acqua

Data l'ubiquità nell'ambiente, le amebe a vita libera sono frequentemente trasportate attraverso l'acqua nelle reti di distribuzione anche associate a suolo, aria, animali, piante.

Poiché la maggior parte degli studi si basano su metodi colturali, risultano sottostimate sia la diversità sia la loro concentrazione. Inoltre l'identificazione basata sul riconoscimento morfologico porta spesso ad errate identificazioni.

La frequenza con cui le amebe vengono rinvenute in acque grezze superficiali destinate alla potabilizzazione varia dal 75 al 100% (62). Dopo la fase di chiarificazione/filtrazione si ottiene una rimozione variabile da 0 a 4.6 ordini di grandezza,

mentre l'intero processo di potabilizzazione consente una rimozione di 1-2 unità logaritmiche. L'entità di rimozione ottenuta dipende sia dal carico di amebe in ingresso sia dall'instaurarsi di fenomeni di colonizzazione dei filtri a sabbia (5, 7, 62). All'interno di uno stesso impianto, a seconda delle fasi, possono prevalere generi di ameba distinti; ad esempio, può prevalere il genere *Acanthamoeba* in ingresso, *Naegleria* nei filtri e *Hartmannella* nei serbatoi. È inoltre interessante notare che alcuni generi di amebe quali *Hartmannella*, *Echinamoeba*, e *Vannella*, presenti a bassissime concentrazioni nelle acque sorgive in ingresso agli impianti, per fenomeni di colonizzazione e ricrescita, in uscita hanno densità più elevate (13).

Dopo i trattamenti finali di ultrafiltrazione o di disinfezione circa il 50% delle acque in uscita dagli impianti contiene ancora amebe. In particolare, il genere *Hartmannella* è risultato del tutto insensibile all'azione dei disinfettanti e richiederebbe studi mirati su tecniche di abbattimento alternative (13).

Densità e biodiversità delle amebe all'interno delle reti di distribuzione 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, eccistamento 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 (62).

I "rami morti" e i tratti terminali ciechi costituiscono siti ideali di proliferazione; è 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. 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 (13).

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 di sedimenti.

Nelle reti di distribuzione particolarmente estese, la concentrazione di amebe è più elevata, rispetto a piccole reti, poiché il cloro residuo tende ad essere più basso e i tempi di permanenza delle amebe più lunghi. È comunque evidente che al punto d'uso (rubinetti, soffioni delle docce, ecc.), il carico e la diversità delle amebe nell'acqua risultano incrementate e un fattore fondamentale che contribuisce al fenomeno è lo stazionamento dell'acqua nei serbatoi (28).

In uno studio effettuato su un ampio numero di campioni di acqua di rubinetto, le amebe sono state trovate nel 20-30% dei campioni esaminati (54), mentre una più alta prevalenza, pari al 70%, è stata riscontrata in ambienti ospedalieri su campioni di acqua calda prelevata da rubinetti, docce, serbatoi, torri di raffreddamento (34).

Le amebe sono molto resistenti ai trattamenti routinariamente applicati nella disinfezione delle acque. Infatti, se l'esposizione ad una concentrazione di 10 mg/L di cloro (libero e combinato) per 30 minuti è sufficiente ad inattivare le cisti di *H. vermiformis* (29), non altrettanto accade per le cisti di *Acanthamoeba* che possono resistere anche ad esposizioni pari a 100 mg/L di cloro per 10 min (59).

Le cisti di *Naegleria* risultano invece, in generale, più sensibili al cloro, al diossido di cloro e all'ozono. Il cloro, invece, ha un effetto molto limitato sulle cisti di *A. polyphaga* anche dopo un'esposizione pari a 5 mg/L per 60 minuti (36). Diversamente l'ozono, il più potente ossidante utilizzato nella disinfezione delle acque, riduce notevolmente la concentrazione delle amebe a vita libera e ha anche un'efficace azione sulle cisti (36), mentre l'acido peracetico ha effetto solo a concentrazioni molto alte (150 mg/L) (22).

Nell'ambito dei trattamenti di tipo fisico, il calore umido si è rivelato abbastanza efficace verso i trofozoiti, mentre l'inattivazione delle cisti richiede temperature più elevate. Generalmente, l'esposizione a temperature superiori a 65°C per 5 – 10 minuti potrebbe avere un'efficace azione cisticida (2, 37). Sembra invece che i trofozoiti di *B. mandrillaris* siano particolarmente resistenti al calore, rimanendo ancora attivi dopo un'esposizione a 60°C per 60 minuti (55). Le cisti sono anche molto resistenti al trattamento ai raggi ultravioletti (24).

Amebe a vita libera e organismi simbiotici nelle reti di distribuzione idrica

Amebe contenenti batteri endosimbionti sono state isolate da impianti di riscaldamento centralizzati e, in ambienti ospedalieri, da docce, rubinetti, umidificatori e acqua proveniente da unità di

terapia intensiva. Il rilascio di amebe attraverso gli aerosol può in questi casi costituire un serio rischio per soggetti immunodebitati.

Da un punto di vista ecologico vivere all'interno delle amebe risulta essere di grande vantaggio per i microrganismi. Oltre a supportare i batteri da un punto di vista nutritivo, la localizzazione intracellulare fornisce infatti una protezione dalle condizioni ambientali avverse, dall'essiccamento, dall'azione battericida dei disinfettanti in acqua.

Ad oggi sono state rinvenute almeno 14 specie di organismi patogeni opportunisti all'interno di amebe a vita libera isolate da acque potabili. Prove di laboratorio indicano inoltre che altri microrganismi patogeni correlati alle acque potabili sono in grado di vivere all'interno di amebe, tra cui, oltre ai batteri, protozoi e virus.

I microrganismi resistenti alle amebe (*Amoeba-Resisting Microorganisms, ARM*) sono fagocitati durante la fase di trofozoite e, anziché essere lisciviati all'interno dei vacuoli digestivi, eludono le difese dell'ospite e si moltiplicano al suo interno. Un'associazione positiva tra il loro tasso di rilevamento nelle amebe e acqua calda è stata recentemente evidenziata in acque di *reservoir* e impianti di trattamento (20).

All'interno delle amebe i microrganismi possono esercitare un'azione patogena (18, 40) o, più spesso, possono vivere come simbiotici (17, 19, 22). In particolari condizioni possono causare la lisi della cellula ospite con conseguente rilascio di microrganismi nelle reti idriche oppure l'espulsione può avvenire mediante rilascio di piccole vescicole (6).

Mediante il rilascio delle vescicole (2–6 μm), facilmente aerosolizzabili, si vengono a creare *pathway* di trasmissione alternativi per molte patologie indotte dai microrganismi potenzialmente presenti nelle amebe (6). D'altra parte, sia l'elevata sieroprevalenza per le amebe a vita libera riscontrabile nella popolazione umana, sia l'elevata frequenza con cui le amebe vengono isolate nell'uomo sembrano supportare l'ipotesi che esse agiscano come veicolatrici.

Per la capacità di sostenerne la sopravvivenza e la crescita e attivare la virulenza dei microrganismi veicolati, è altamente plausibile che le amebe a vita libera rivestano un ruolo preponderante nella proliferazione dei microrganismi nelle reti idriche.

La potenzialità ad acquisire una maggiore infettività (46, 48, 52) dopo la crescita all'interno delle amebe, unitamente alla possibilità che abbiano luogo fenomeni di scambio di materiale genetico (44), conferiscono ai microrganismi a diffusione idrica un notevole vantaggio biologico che è di fondamentale importanza nella loro evoluzione a

patogeni umani. È emerso che le amebe a vita libera presenti nelle reti idriche ospiterebbero microrganismi più frequentemente di quanto accada per quelle isolate da sorgenti idriche naturali. Delle 539 specie batteriche riconosciute al 2008 come patogeni umane dall'Environmental Protection Agency, 102 (circa il 20%) sono state descritte in grado di sopravvivere e/o moltiplicarsi all'interno delle amebe (63). Tale numero è sicuramente sottostimato se si considerano una serie di fattori. Negli studi sull'interazione amebe-batteri, vengono quasi esclusivamente utilizzati ceppi di *A. polyphaga* e *A. castellani*. Tuttavia, se tale interazione fosse ospite-specifica, come presumibilmente è, nella valutazione non si sarebbe tenuto conto della potenzialità di altre specie amebiche ad ospitare batteri patogeni di altro tipo. Per molti batteri inoltre, non ci sarebbero dati sufficienti a far luce su una possibile interazione con le amebe.

È stato dimostrato che anche alcuni enterovirus patogeni per l'uomo interagiscono con i protozoi. In uno studio, coxackie virus b3 è risultato in grado di sopravvivere all'interno dei trofozoiti di *Entamoeba castellani* risultando infettivo anche dopo un periodo di sei mesi caratterizzati da successivi cicli di excistazione – incistazione (43).

Nel 2003 da un ceppo di *Acanthamoeba*, è stato isolato un virus di grandi dimensioni mai descritto prima, denominato mimivirus *Acanthamoeba polyphaga*, che successivi studi hanno indicato come potenziale causa di polmoniti (31, 32).

Anche alcuni funghi sono in grado di crescere all'interno delle amebe. La virulenza di *Cryptococcus neoformans* sui topi risulta stimolata dopo il passaggio in colture di *Dictyostelium discoideum* (56). Altri funghi quali *Blastomyces dermatidis*, *Sporothrix schenckii* e *Histoplasma capsulatum*, in cocoltura con le amebe, possono, con meccanismi diversi, causarne la morte ed utilizzare le sostanze nutritive rilasciate a supporto della propria crescita (57).

Relativamente all'interazione con altri protozoi, *Toxoplasma gondii* può vivere fino a due settimane all'interno di *A. castellani* senza che abbiano luogo riduzioni dell'infettività. *Acanthamoeba* può inoltre contribuire a diffondere nell'ambiente le oocisti di *Cryptosporidium parvum*; non è tuttavia chiaro se dopo la veicolazione nelle amebe le oocisti siano ancora infettive (21, 60).

CONCLUSIONI

La presenza di amebe nelle acque, anche quelle destinate al consumo umano, è un dato incontrovertibile. È possibile che l'ottimizzazione dei trattamenti meccanici e di pratiche di controlavaggio dei filtri negli impianti di potabilizzazione potreb-

be rappresentare una strategia di controllo volta a ridurre il numero in rete. Appare anche evidente che l'associazione tra amebe e microrganismi nelle acque rappresenta una strategia adattativa vincente, necessaria a questi ultimi per sopravvivere. È comunque ipotizzabile che il numero di microrganismi che possono essere ospitati all'interno di amebe possa essere di gran lunga superiore a quello finora stimato.

Dai dati di letteratura emerge che i microrganismi rilasciati dalle amebe dopo lisi cellulare sono più virulenti rispetto a prima del loro ingresso nella cellula, esibendo una up-regolazione dei geni responsabili della virulenza. Malgrado la rilevanza dei dati a disposizione, non è tuttavia ancora definita l'associazione tra le infezioni umane e la presenza di microrganismi all'interno delle amebe nelle reti idriche. Sembra comunque, ad esempio, che vi siano molte analogie nei meccanismi attraverso cui i microrganismi infettano le amebe, e si replicano all'interno di esse, e quelli utilizzati, in qualità di patogeni, per invadere i macrofagi a livello polmonare.

Pertanto, per la loro capacità di eludere i trattamenti, moltiplicarsi nelle reti idriche e veicolare microrganismi patogeni, si può affermare che esse rappresentino un rischio sanitario emergente su cui indagare nell'immediato. È anche plausibile che in futuro ci sia un incremento nella varietà di amebe che colonizzano le reti idriche e che, tenuto conto del loro ruolo di vettori, si verifichi la comparsa di "nuovi" patogeni umani a trasmissione idrica.

Lo sviluppo di metodi analitici di facile esecuzione per la determinazione delle amebe è il primo atto per una più accurata verifica della qualità di 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 sorveglianza a tutela della salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandström G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 600-6.
2. Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* 2002; 88: 621-3.
3. Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, Visvesvara GS, Sher JH, Kozlowski PB. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Leptomyxid ameba*. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 21-5.
4. Barker J, Humphrey TJ, Brown MWR. Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: implica-

- tions for disease. *Fed Eur Microbiol Soc Microbiol Lett* 1999; 173: 291-5.
5. Baudin I, Jousset M, Debeauvais C, Schlumberger C, Dorko J, Debreczeny L. Decontamination of filtration media for controlling release of organisms. In: Water Quality Technology Conference. American Water Works Association: Cincinnati, OH, 2008
 6. Berk S, Ting R, Turner G, Ashburn R. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64 (1): 279-86.
 7. Bomo AM; Stevik TK, Hovi I. Bacterial removal and protozoan grazing in biological sand filters. *J Environ Qual* 2004; 33 (3): 1041-7.
 8. Brieland JK, Fantone JC, Remick DG, LeGendreM, McClainM, Engleberg NC. The role of *Legionella pneumophila* infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* 1997; 65: 5330-3.
 9. 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.
 10. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and risk factors. *Balamuthia mandrillaris* - Granulomatous amoebic encephalitis, 11 maggio 2007; <http://www.cdc.gov/parasites/balamuthia/epi.html>.
 11. Cerva L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol* 1989; 33: 99-103.
 12. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 1997; 65: 3759-67.
 13. Corsaro D, Pages G S, 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.
 14. De Jonckheere J, Brown S. Non-*Acanthamoeba* amoebic infection. *J Infect* 36, 1998: 349-50.
 15. De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1520-8.
 16. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* spp: a preliminary report. *Br Med J* 1965; 2: 740-3.
 17. Fritsche TR, Gautom RK, Seyedirashti S, Bergeron DL, Lindquist TD. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* 1993; 31, 1122-6.
 18. Gao L-Y, Susa M, Ticac B, Kwaik YA. Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb Pathog* 1999, 27 (5): 273-87.
 19. Gast, R J, Sanders RW, Caron, DA. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends Microbiol* 2009; 17 (12): 563-9.
 20. Garcia A, Goñi P, Cieloszyk J, et al. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol* 2013; 47 (7): 3132-40.
 21. Gomez-Couso H, Paniagua-Crespo E, Ares-Mazas E. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* 2006; 100: 1151-4.
 22. Greub G, Raoult D. Biocides currently used for bronchoscopic decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 784-6.
 23. Griffin JL. The pathogenic Amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Euk Microb* 1983; 30 (2): 403-9.
 24. Hwang TS, Hyon JY, Song JK, Reviglio VE, Spahr HT, O'Brien TP. Disinfection capacity of PuriLens contact lens cleaning unit against *Acanthamoeba*. *Eye Contact Lens* 2004; 30: 42-3.
 25. Inglis TJJ, Rigby P, Robertson TA, Dutton NS, Henderson M, Chang BJ. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamoebic bacterial survival, and escape. *Infect Immun* 2000; 68, 1681-6.
 26. Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975; 95: 221-32.
 27. 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: 4789-95.
 28. Kilvington S, Gray T, Dart J, et al. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophth Vis Sci* 2004; 45: 165-9.
 29. Kuchta JM, Navratil JS, Shepherd ME, et al. Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microb* 1993; 59: 4096-100.
 30. La Scola B, Raoult D. *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae. *Lancet* 1999; 353: 1330.
 31. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae. *Sci* 2003; 299: 2033.
 32. La Scola B. Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 449-52.
 33. Landers P, Kerr KG, Rowbotham TJ, et al. Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 121-3.
 34. 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.
 35. Legarreta JE, Nau AC.; Dhaliwal DK. *Acanthamoeba keratitis* associated with tap water use during contact lens cleaning: manufacturer guidelines need to change. *Eye Contact Lens* 2013; 39 (2): 158-61.
 36. Loret JF, Jousset M, Robert S, Anselme C, Saucedo G, Ribas F. Elimination of freelifving amoebae by drinking water treatment processes. *Eur J Water Quality* 2008; 39: 37-50.
 37. Ludwig IH, Meisler DM, Rutherford I, Bican FE, Langston RH, Visvesvara GS. Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest Ophth Vis Sci* 1986; 27: 626-8.
 38. Lugg R, Psaila-Savona P. A legal standard for thermophilic *Naegleria* in a freshwater body in Western Australia, in: Billot-Bonef S, Cabanes PA, Marciano-Cabral F, Pernin P, Pringuez E eds. IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, Proceedings. Paris: John Libbey Eurotext, 2001: 291-8.
 39. Ly TMC, Müller HE. Ingested *Listeria monocyto-*

- genes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* 1990; 33: 51-4.
40. Marciano-Cabral F, Han K, Powell E, Ferguson T, Cabral G. Interaction of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages. *J Eukaryot Microbiol*, 2003; 50 (suppl): 516-9.
 41. Martinez AJ ed. Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease. Boca Raton, FL, CRC Press, 1985.
 42. Martinez AJ, Visvesvara GS. *Balamuthia mandrillaris* infection. *J Med Microbiol* 2001; 50: 205-7.
 43. Mattana A, Serra C, Mariotti E, Delogu G, Fiori PL, Cappuccinelli P. *Acanthamoeba castellanii* promotion of *in vitro* survival and transmission of coxsackie b3 viruses. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 665-71.
 44. Moliner C, Fournier P-E, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2010; 34 (3): 281-94.
 45. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele ADMcG. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974; 2: 1537-40.
 46. Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, Lang, F. Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (3): 914-9.
 47. Newsome AL, Baker RL, Miller RD, Arnold RR. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1985, 50: 449-52.
 48. Nora T, Lomma M, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Molecular mimicry: an important virulence strategy employed by *Legionella pneumophila* to subvert host functions. *Future Microbiol* 2009; 4: 10.
 49. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protist* 1977; 13: 557-98.
 50. Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microb* 1998; 64: 1822-4.
 51. Sawyer TK, Lewis EJ, Galasso M, et al. Pathogenic amoebae in ocean sediments near wastewater sludge disposal sites. *J Water Pollut Control Fed* 1982; 54: 1318-23.
 52. Schmitz-Esser S, Tischler P, Arnold R, et al. The genome of the amoeba symbiont “*Candidatus Amoebophilus asiaticus*” reveals common mechanisms for host cell interaction among amoeba-associated bacteria. *J Bacteriol*, 2010; 192 (4): 1045-57.
 53. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebic encephalitides and amebic keratitis caused by pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Curr Treat Options Infect Dis* 2003; 5: 273-82.
 54. 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: 99-104.
 55. Siddiqui R, Ortega-Rivas A, Khan NA. *Balamuthia mandrillaris* resistance to hostile conditions. *J Med Microbiol* 2008; 57: 428-31.
 56. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 2003; 71: 4862-72.
 57. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 2004; 72: 3478-88.
 58. Stevens AR, De Jonckheere J, Willaert E. *Naegleria lovaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* 1980; 10: 51-64.
 59. Storey MV, Winiiecka-Krusnell J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 656-62.
 60. Stott R, May E, Ramirez E, Warren A. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Water Sci Technol* 2003; 47: 77-83.
 61. Taylor SJ, Ahonen LJ, de Leij AAM, Dale JW. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Appl Environment Microbiol* 2003; 69: 4316-9.
 62. Thomas JM, Ashbolt NJ. Do Free-Living *Amoebae* in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk? *Environ Sci Technol* 2011; 45: 860-9.
 63. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard J. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microb Rev* 2010; 34 (3): 231-59.