

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 trofozoiti (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. rhysodes*, *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 ribosomale 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, Köhler 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.