

AMEBE A VITA LIBERA PATOGENE (FREE-LIVING AMOEBAE, FLA)

Margherita Montalbano Di Filippo

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

Per molto tempo, solo i parassiti obbligati sono stati considerati possibili patogeni. Questo concetto è diventato insostenibile con l'identificazione di diversi generi di amebe a vita libera (*Free Living Amoebae*, FLA) in grado di infettare l'uomo e altri mammiferi, causando quadri patologici molto gravi.

Questa scoperta ha rivoluzionato il concetto di parassitismo, abbattendo la barriera che separa gli organismi viventi dai parassiti. Per il basso numero d'infezioni riscontrate, le amebe non hanno mai rappresentato un argomento sanitario d'interesse prioritario, anche se la mancanza di farmaci efficaci e l'esito spesso fatale delle malattie indotte da alcune generi, le hanno sempre rese oggetto d'interesse e di studio nell'area della microbiologia ambientale. Tuttavia, un'attenzione particolare è loro rivolta recentemente per il potenziale ruolo di veicolo di microrganismi patogeni presenti nell'ambiente.

Oggetto del presente seminario è lo stato dell'arte sulle specie amebiche la cui diffusione nell'ambiente potrebbe costituire un rischio per la salute umana. Saranno descritti le caratteristiche ecologiche di questi organismi, il loro adattamento e le dinamiche d'interazione con gli altri microrganismi.

Amebe a vita libera: ecologia ed epidemiologia

Le FLA sono dei parassiti facoltativi ampiamente distribuiti in natura, per questo possedere delle informazioni accurate sulla loro ecologia e la loro distribuzione è particolarmente importante, visto che alcuni generi (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vermamoeba* e *Naegleria*) sono agenti causali di patologie gravi nell'uomo e negli animali.

Le amebe a vita libera sono state isolate in *habitat* diversissimi tra loro, come: stagni, laghi, impianti di acqua a uso domestico e non (acque potabili e non), sorgenti termali, terme, piscine, acquari, impianti idroelettrici, nel suolo, in acque reflue, acqua di mare e sedimenti oceanici, nell'aria e nelle torri di raffreddamento delle centrali elettriche e nucleari. Nell'uomo sono state isolate nel naso e nella gola dei pazienti con malattie respiratorie e in soggetti sani, e nelle secrezioni bronchiali, auricolari e nei campioni di feci di pazienti con diarrea.

In generale, la sorgente d'infezione non è stata identificata, ma si ipotizza sia rappresentata dall'acqua, in particolare da acqua con temperature elevate.

Le infezioni causate da questi organismi ampiamente diffusi in natura sono rare ma stanno aumentando sempre più globalmente per la combinazione di diversi fattori tra cui: (i) l'aumento delle attività ricreative in acqua dolce durante le ondate di caldo – principale fattore di rischio per l'acquisizione della meningoencefalite primaria dovuta a *Naegleria (N.) fowleri*; (ii) un numero crescente di soggetti immuno-compromessi sensibili all'encefalite amebica granulomatosa

causata da *Acanthamoeba spp.* e *Balamuthia mandrillaris* e (iii) portatori di lenti a contatto a rischio di acquisire la cheratite amebica causata da diverse specie di *Acanthamoeba* e *Vermamoeba*.

Tuttavia, l'incidenza "reale" delle malattie amebiche non è precisamente nota. Fino al 2010, sono stati segnalati in tutto il mondo oltre 150 casi di encefalite granulomatosa dovuti ad *Acanthamoeba spp.* e più di 4000 casi di cheratite amebica (1).

La maggior parte dei casi clinici sono quindi rappresentati da infezioni oculari causate per lo più da *Acanthamoeba* ma diversi studi hanno evidenziato che tali infezioni potrebbero essere più prevalenti di quanto precedentemente riconosciuto e causate da altri generi di amebe a vita libera (es. *Vermamoeba*). Inoltre, dal 1965 a oggi, sono stati segnalati più di 190 casi di meningoencefalite fulminante causata da *N. fowleri* e sono stati riportati più di 85 ulteriori casi di encefalite dovuti a *Balamuthia* (1, 2).

Il numero effettivo è probabilmente più alto, poiché la diagnosi per encefalite amebica (*Acanthamoeba* e *Balamuthia*) e per meningoencefalite fulminante (*Naegleria*) viene solitamente effettuata durante l'autopsia, cosa che raramente viene eseguita in molti Paesi (3).

In Italia le prime segnalazioni di amebe a vita libera risalgono agli anni '80: dal 1982 al 1984 sono stati condotti i primi studi epidemiologici in piscine termali e nei fanghi in Nord Italia (4-6) riconoscendo morfologicamente diversi generi di amebe a vita libera (*Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria*).

Dopo queste prime segnalazioni di amebe a vita libera potenzialmente patogene nell'ambiente, negli anni '90 furono invece diagnosticate le prime infezioni amebiche umane, in particolare: un singolo caso di encefalite dovuta ad *Acanthamoeba spp.* in un paziente immuno-compromesso (7) e i primi casi di cheratite amebica (8-10).

Più recente è l'unico caso di meningoencefalite fulminante, nel Nord Italia, causato da *Naegleria fowleri* diagnosticata *post mortem* in un bambino che probabilmente ha acquisito l'infezione dopo aver nuotato in un fiume (11).

Dal 2009, grazie all'uso di strumenti di biologia molecolare in diagnosi è stato possibile segnalare e caratterizzare molti più casi clinici (cheratiti amebiche) (12-16) ampliando sempre di più gli studi epidemiologici analizzando diverse matrici ambientali (acque potabili, fontane ornamentali, pozzi, piscine, riuniti dentali, acque termali) (17-20).

Organismi resistenti alle amebe: implicazioni di carattere sanitario

Alla rilevanza sanitaria che hanno assunto negli ultimi anni questi parassiti facoltativi, si aggiunge l'interesse legato alla loro capacità di fagocitare batteri, funghi e virus, che riescono a sopravvivere e replicarsi al loro interno, e che vengono indicati con il termine di *Amoeba Resistant Microorganism* (ARM).

Le amebe rappresenterebbero un possibile serbatoio per molti patogeni umani capaci di sopravvivere e replicarsi all'interno delle amebe (es. *Legionella spp.*, *Chlamidia spp.*, micobatteri non tubercolari) e, nel contempo, un efficiente veicolo in grado di incrementare la loro persistenza e diffusione nell'ambiente. Per questa funzione ecologica che ha forti implicazioni di carattere sanitario, è stato riconosciuto alle amebe il ruolo di "Cavallo di Troia" (conosciuto come *Trojan horse*) per molte infezioni.

Tra le numerose specie batteriche che interagiscono con successo con le amebe a vita libera, molte sono note per essere patogene per l'uomo (21). Più di 100 agenti patogeni comprovati per l'uomo sono capaci di sopravvivere e replicarsi all'interno di varie specie amebiche (22). Il

numero effettivo è probabilmente più alto, poiché nella maggior parte degli studi in cui si analizzano le interazioni patogene dell'ospite spesso solo una, in genere *Acanthamoeba polyphaga*, è stata utilizzata e una gamma di agenti patogeni batterici non è stata ancora testata per interagire con le amebe a vita libera. Importanti patogeni come *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Vibrio cholera* sopravvivono non solo nei trofozoiti (stato attivo dell'ameba) ma anche nelle cisti (stato di resistenza dell'ameba) (23). È stato dimostrato che i batteri all'interno dei trofozoiti mostrano una maggiore resistenza ai biocidi, che aumenta ulteriormente quando si trovano all'interno delle cisti: quindi, i batteri patogeni interiorizzati nelle amebe rappresentano un rischio per la salute pubblica perché non sono raggiunti dal trattamento convenzionale con biocidi (23).

Per quanto riguarda le interazioni delle amebe con i virus, è anche abbastanza recente la segnalazione della presenza di un "mimivirus" (*microbe mimicking virus*) all'interno del genere *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 (23). Recentemente, un mimivirus è stato scoperto in *A. polyphaga*. Inoltre, è noto in letteratura che *Coxsackie virus* e *Adenovirus* possono infettare e sopravvivere all'interno di *Acanthamoeba*.

Prospettive future

Tra gli studiosi del settore è sempre più diffusa l'opinione che la ricerca delle amebe a vita libera dovrebbe essere inserita in qualsiasi valutazione del rischio per gli agenti patogeni dell'acqua (potabile e non potabile) non solo allo scopo di ridurre le amebe stesse ma anche nell'ottica del controllo dei microrganismi patogeni che esse potrebbero veicolare.

Nell'analisi del rischio per la presenza di amebe a vita libera nell'acqua, la letteratura scientifica suggerisce di considerare tre aspetti importanti: (i) le amebe a vita libera sono agenti patogeni per l'uomo e causano gravi patologie, (ii) possono essere infettate da diversi ARB (*Antibiotic Resistant Bacteria*) patogeni, e (iii) possono agire da serbatoio e veicolo per batteri e virus (più raramente per funghi e altri protozoi) patogeni all'interno degli impianti idrici agevolando efficacemente il contatto con l'uomo.

Tuttavia, sono ancora molti gli aspetti dell'interazione tra amebe a vita libera e ARB che non sono tutt'ora chiari e che dovranno essere indagati in futuro per poter sviluppare strategie di controllo adeguate alla problematica.

Bibliografia

1. Diaz JH. Increasing Intracerebral Infections Caused by free-living amoebae in the United States and worldwide. *Journal of Neuroparasitology* 2010;10:1-10.
2. Shin HJ, Im K. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 2004;42:93-119.
3. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. Naegleria and Acanthamoeba infections: Review. *Rev Inf Dis* 1990;12:490-513.
4. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V. Le amebe a vita libera, agenti di meningoencefaliti nell'uomo: ricerche epidemiologiche nelle acque non potabili della città di Pavia. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie* 1982;34:1140-8.
5. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM, De Jonckheere JF. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:1282-5.

6. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM. First isolation in Italy of *Naegleria australiensis* (De Jonckheere, 1981). *Parassitologia* 1984;26:305-9.
7. Di Gregorio C, Rivasi F, Mongiardo N, De Rienzo B, Wallace S, Visvesvara GS. Acanthamoeba meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1363-5.
8. Manso E, Biavasco F, Lupidi R, Giovannini A, Frongia G, Varaldo PE. Primo isolamento in Italia di un ceppo di Acanthamoeba da un paziente affetto da cheratite bilaterale. *Microbiol Med* 1993;8:100-4.
9. Giovannini A, Tittarelli R, Bertelli E, Frongia GB, Mariotti C, Manso E, Biavasco F. Bilateral Acanthamoeba keratitis in a gas-permeable contact lens wearer. *Ophthalmologica* 1994;208:321-4.
10. Mancino R, Iori A, Palma S, Corsi A, Cancrini G, Cerulli L. Acanthamoeba keratitis associated with contact lenses; report of three cases in Italy. *Parassitologia* 1997;39:37-40.
11. 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;10:1835-7.
12. Di Cave D, Monno R, Bottalico P, Guerriero S, D'Amelio S, D'Orazi C, Berrilli F. Acanthamoeba T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:607-12.
13. Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, Bruno A, Maserati R, Di Cave D. Isolation and genotyping of Acanthamoeba strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol* 2010;59:1324-30.
14. Di Cave D, D'Alfonso R, Dussey-Comlavi KA, D'Orazi C, Monno R, Berrilli F. Genotypic heterogeneity based on 18S-rRNA gene sequences among Acanthamoeba isolates from clinical samples in Italy. *Experimental Parasitology* 2014:145.
15. Pinna A, Porcu T, Boscia F, Cano A, Erre G, Mattana A. Free-living amoebae Keratitis. *Cornea* 2017;36:785-90.
16. Antonelli A, Favuzza E, Galano A, Montalbano Di Filippo M, Ciccone N, Berrilli F, Mencucci R, Di Cave D, Rossolini GM. Regional spread of contact lens-related Acanthamoeba keratitis infection in Italy. *New Microbiol* 2018;41:83-5.
17. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola L, 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.
18. Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F, Walochnik J. Update on *Acanthamoeba jacobsoni* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res* 2017;116:1273-84.
19. 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.
20. Montalbano Di Filippo M, Berrilli F, Di Cave D, Novelletto A. Novel data from Italian *Vermamoeba vermiformis* isolates from multiple sources add to genetic diversity within the genus. *Parasitol Res* 2019;118:1751-9.
21. Ecke DJ, Sampath R, Willett P, Samant V, Massire C, Hall TA, Hari K, McNeil JA, Buchen-Osmond C, Budowle B. The Microbial Rosetta Stone database: A common structure for microbial biosecurity threat agents. *J Forensic Sci* 2005;50:1380-5.
22. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:231-59.
23. Balczun C, Scheid PL. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses* 2017;9:1-18.