



Rapporti

ISTISAN

13/16



Acanthamoeba nelle acque:
un problema di sanità pubblica in Italia



ISSN 1123-3117

M.C. Angelici, A. De Sanctis,
E. Funari, D. Di Cave,
F. Mantelli, S. Bonini

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

***Acanthamoeba* nelle acque:
un problema di sanità pubblica in Italia**

Maria Cristina Angelici (a), Armando De Sanctis (a), Enzo Funari (a),
David Di Cave (b), Flavio Mantelli (c), Stefano Bonini (c)

*(a) Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma

(c) Area di Oftalmologia, Università di Roma Campus BioMedico, Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

13/16

Istituto Superiore di Sanità

***Acanthamoeba* nelle acque: un problema di sanità pubblica in Italia.**

Maria Cristina Angelici, Armando De Sanctis, Enzo Funari, David Di Cave, Flavio Mantelli, Stefano Bonini
2013, 31 p. Rapporti ISTISAN 13/16

Il presente contributo riporta informazioni sulla classificazione e la patogenicità emergente di amebe “free-living” del genere *Acanthamoeba*. La distribuzione nell’ambiente di queste amebe è correlata all’acqua e diventa d’interesse sanitario per via dell’utilizzazione antropica di quest’ultima per scopi quali cura dell’igiene, balneazione, applicazioni medico-sanitarie. L’obiettivo di questo lavoro è di fornire la base scientifica disponibile evidenziando la potenziale patogenicità associata con la sua presenza negli ecosistemi idrici. Ciò al fine di sensibilizzare la comunità scientifica e promuovere iniziative di controllo ambientale di questo patogeno sia in ambienti outdoor che indoor.

Parole chiave: *Acanthamoeba*; Ecosistemi idrici; Biofilm; Patogeno emergente

Istituto Superiore di Sanità

***Acanthamoeba* in water: a problem of public health in Italy.**

Maria Cristina Angelici, Armando De Sanctis, Enzo Funari, David Di Cave, Flavio Mantelli, Stefano Bonini
2013, 31 p. Rapporti ISTISAN 13/16 (in Italian)

This contribution provides information on the classification and pathogenicity of the free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba*. The distribution of these amoebas in the environment is related to water used for hygiene care, bathing, medical and health applications. The objective of this review is to give the scientific base on this emerging pathogen and the potential pathogenesis associated to its occurrence in water ecosystems. The final aim is to sensitize the scientific community and promote environmental monitoring activities both in outdoor and indoor environments.

Key words: *Acanthamoeba*; Water ecosystems; Biofilm; Emerging pathogen

Per informazioni su questo documento scrivere a: mariacristina.angelici@iss.it

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

Citare questo documento come segue:

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; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/16).

Presidente dell’Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Caratteristiche del genere <i>Acanthamoeba</i>	1
Tassonomia del genere e genotipi	2
Morfologia e ciclo biologico	3
Metabolismo	5
Localizzazione nel suolo	6
Localizzazione nelle acque	6
Associazione con il biofilm batterico	7
Problema delle simbiosi di <i>Acanthamoeba</i> con batteri, virus, lieviti ed altri protozoi	8
Infezioni umane da <i>Acanthamoeba</i>	11
Quadro clinico di encefalite granulomatosa amebica	12
Quadro clinico di cheratite amebica	12
Diagnosi di <i>Acanthamoeba</i> in campioni biologici	15
Diagnosi morfologica: esame al microscopico	15
Diagnosi parassitologica: esame colturale	16
Diagnosi molecolare: PCR	16
Diagnosi di <i>Acanthamoeba</i> in campioni idrici	18
Terapia dell'acantamebiasi	19
Epidemiologia e problema sanitario	20
L'acantamebiasi in Italia	21
Conclusioni	23
Bibliografia	25

CARATTERISTICHE DEL GENERE *ACANTHAMOEBA*

I protozoi parassiti di tipo obbligato necessitano di uno o più ospiti per compiere il proprio ciclo vitale. Vi sono, però, specie di protozoi che conducono normalmente vita libera ma possono occasionalmente venire a contatto con l'uomo, causando affezioni di vario tipo e gravità. Nell'ambito delle numerose specie di protozoi che trovano nell'ambiente il loro "habitat" naturale, vengono annoverate diverse specie di amebe definite "a vita libera". Fra queste, le specie appartenenti ai generi *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* spp. sono in grado di parassitare l'uomo e divenire patogene causando perfino infezioni fulminanti del sistema nervoso centrale. Quelle da *Naegleria* differiscono nella patogenesi dalle altre perché determinano la meningoencefalite amebica primaria (*Primary Amoebic Meningoencephalitis*, PAM) mentre l'infezione dovuta alle altre due amebe "free-living" è l'encefalite granulomatosa amebica (nota come GAE: *Granulomatous Amebic Encephalitis*,). Queste infezioni encefaliche presentano inizialmente sintomi subacuti con un decorso successivo veloce con induzione della risposta pro-infiammatoria che porta rapidamente il tessuto in necrosi ed esito infausto. Tale patogenesi è rara e tipica dei pazienti immunocompromessi (HIV+, immunosoppressi, alcolisti) ma *Acanthamoeba* determina anche una patologia oculare in persone immunocompetenti, particolarmente nei portatori di lenti di contatto, con infezione grave della cornea (cheratite amebica) che, se trascurata, porta a cecità.

Acanthamoeba è stata descritta per la prima volta nel 1930 da Castellani in colture di *Cryptococcus pararoseus*. Recentemente *Acanthamoeba* è stata anche associata a lesioni cutanee in pazienti affetti da AIDS, nonché a polmoniti (soprattutto in quanto veicolo di *Legionella*) ma, come già detto, la patologia oculare (cheratite amebica) che determina è a carico di persone sane ed immunocompetenti. I fattori responsabili della patogenicità delle amebe a vita libera sono ancora poco conosciuti, ma la patogenesi dell'infezione che generano è probabilmente dovuta allo stato infiammatorio che si innesca nell'ospite (Khan, 2009; Siddiqui & Khan, 2012). È stata comunque dimostrata per queste amebe una capacità di causare effetto citopatico *in vitro* su colture cellulari (Culbertson *et al.*, 1958) e sembra che il grado di patogenicità sia in stretta correlazione con la loro termo-tolleranza.

Dagli anni sessanta iniziarono le prime osservazioni sul ruolo patogeno di *Acanthamoeba* in alcuni topi sperimentalmente infettati, dopo essere stata rinvenuta come inquinante di colture cellulari mantenute in laboratorio. Da allora iniziarono le prime osservazioni sul ruolo patogeno di *Acanthamoeba* in quanto due clinici australiani rintracciarono con tecniche istologiche questi protozoi nell'encefalo di due persone decedute per meningoencefalite (Fowler & Carter, 1965). Furono poi segnalati, in diversi paesi del mondo, sempre più casi di infezioni attribuibili ad amebe a vita libera. In particolare, alcune specie del genere *Acanthamoeba* furono riconosciute come agenti eziologici di una forma di cheratite cronica e progressivamente distruttiva (Naginton *et al.*, 1974). La diagnosi di laboratorio si basa principalmente sull'identificazione microscopica diretta e/o colturale delle cisti da "scraping" corneali, biopsie, lenti a contatto e liquido di conservazione delle lenti. Recentemente sono state utilizzate metodiche di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per l'identificazione di *Acanthamoeba* spp., utili per una diagnosi rapida e sensibile di casi umani di cheratite e per l'identificazione del genotipo.

Per quanto riguarda l'Italia poco si conosce dell'epidemiologia di questa amebiasi nell'uomo e della presenza dei parassiti nell'ambiente, dei genotipi presenti e delle possibili vie di trasmissione dell'infezione e il numero di casi accertati d'infezione dovuta a questo protozoo potrebbe rappresentare una sottostima.

Tassonomia del genere e genotipi

Attualmente il genere *Acanthamoeba* viene classificato come riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Classificazione sistemica del genere *Acanthamoeba*

Regno	Protista
Sotto Regno	<i>Sarcomastigota</i>
Phylum	<i>Amoebozoa</i>
Classe	<i>Lobosea</i>
Ordine	<i>Amoebida</i>
Famiglia	<i>Acanthamoebidae</i>
Genere	<i>Acanthamoeba</i>

Nel 1966 Pussard analizzava le caratteristiche morfologiche del genere *Acanthamoeba* già descritto nel 1931 (Pussard, 1966) e nel 1977 Pussard e Pons proponevano per il genere *Acanthamoeba* una classificazione in base alle dimensioni della cisti e al numero delle “arms” o “punte” ovvero le strutture citoscheletriche di actina (chiamate *acanthopoda*) presenti sulla superficie cellulare, suddividendo le specie in tre gruppi morfologici (Pussard & Pons, 1977). Questa suddivisione attribuisce al primo gruppo le quattro specie *A. tubiashi*, *A. astromyxis*, *A. comandoni* e *A. echinulata*, che presentano trofozoiti grandi e cisti caratterizzate dai due strati della parete, l’ectocisti e l’endocisti, separati tra loro.

Al secondo gruppo appartengono 11 specie: *A. castellanii*, *A. polyphaga* (le più comunemente riscontrate nell’ambiente), *A. mauritaniensis*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. pardivionensis* e *A. hatchetti*. In questo gruppo di specie l’ectocisti può essere spessa o sottile e l’endocisti può essere poligonale, triangolare o rotonda con un diametro in media inferiore ai 18 µm.

Al terzo gruppo vengono, infine, attribuite 5 specie: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata*, e *A. pustolosa*. Queste ultime specie sono caratterizzate da un’ectocisti sottile e l’endocisti presenta da 3 a 5 “punte”, con cisti di diametro medio inferiore ai 18 µm.

Questa classificazione di *Acanthamoeba* spp. basata solo sulle caratteristiche morfologiche delle varie specie risultava ancora problematica ed inadeguata. Diversi Autori hanno dimostrato infatti incoerenze e/o variazioni nella morfologia delle cisti dello stesso isolato/ceppo. Questa difficoltà di assegnazione ad una data specie ha presentato una chiara e urgente necessità di riclassificazione basata su tecniche di biologia molecolare (Byers *et al.*, 1990) con l’utilizzazione delle sequenze di RNA ribosomiale 18S, tramite le quali il genere *Acanthamoeba* è stato suddiviso in 17 diversi genotipi (T1-T17).

La corrispondenza dei genotipi da T1 a T17 ai tre gruppi morfologici definiti da Pussard e Pons (1977) è:

- primo gruppo: genotipi T7, T8, T9 e T16
- secondo gruppo: genotipi T3, T4, T11 e T17
- terzo gruppo: genotipi T1, T2, T5, T6, T10 e T12.

I genotipi T13, T14 e T15 presentano caratteristiche originali non ascrivibili ai criteri con i quali sono stati descritti i gruppi morfologici.

Le relazioni tra i diversi genotipi e le singole specie morfologiche sono tutt’ora oggetto di studio e dall’analisi delle sequenze si è visto che il genotipo T4 corrisponde alla specie *A. castellanii*, il genotipo T15 alla specie *A. jacobsi* e il T10 alla *A. culbertsoni*, ma il genere *Acanthamoeba* risulta ancora poco conosciuto e rappresentato probabilmente da una

eterogeneità specifica ancora da indagare. Alcuni genotipi sono causa di patologie neurologiche dell'uomo. La maggior parte dei genotipi descritti non è patogena. In Tabella 2 è riportata la corrispondenza fra genotipo e patologia da esso determinata oppure la non patogenicità.

Tabella 2. Genotipi conosciuti di *Acanthamoeba* su base molecolare e patologia correlata

Genotipi	Patologia
T1-T12	encefalite
T3-T6-T11-T15	cheratite
T2a-T4-T5-T10	encefalite/cheratite
T2b-T7-T8-T9-T13-T14-T16-T17	non patogeni

È stato osservato che, in generale, i genotipi divergono geneticamente fra loro di un fattore percentuale pari al 5%. Il genotipo T2 presenta un polimorfismo al suo interno per cui si identificano degli allelomorfi, definiti T2a e T2b, divergenti fra loro del 4,9% e quindi potenzialmente definibili genotipi diversi. Per di più il T2a è causa di cheratiti ed encefaliti nell'uomo mentre il T2b non è patogeno, ad indicare un nesso fra patogenicità e divergenza genetica come indicatori di un processo evolutivo verso il parassitismo (parassiti emergenti). Tale meccanismo potrebbe essere alla base anche della maggiore neurotropicità dei genotipi che provocano encefaliti rispetto a quelli che provocano cheratiti quale indicatore di grado di patogenicità. In questo quadro evolutivo si inserisce la maggiore patogenicità dei genotipi T4, T2a, T5, T10 che sono in grado di provocare sia cheratite che encefalite (Maghsood *et al.*, 2005). Il genotipo T4 è quello più frequentemente associato alla patologia umana e più spesso isolato da campioni ambientali.

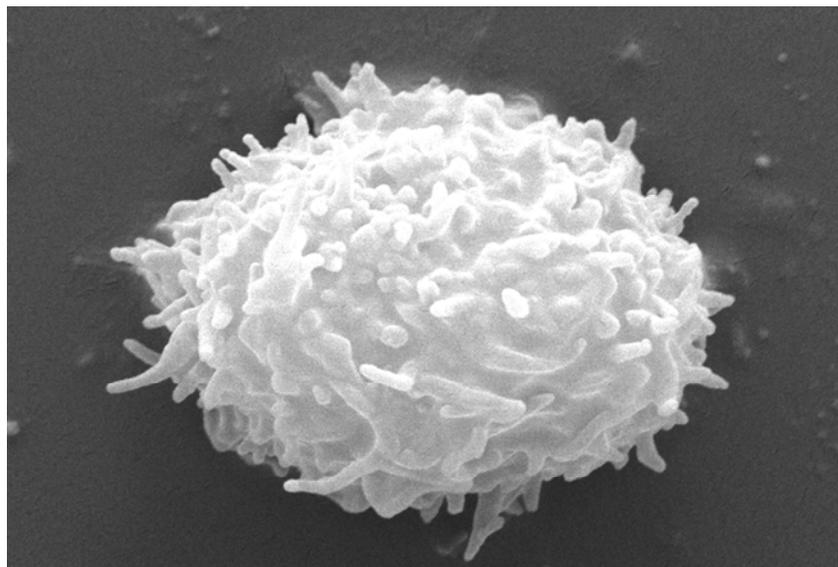
Morfologia e ciclo biologico

Acanthamoeba presenta due morfotipi cellulari nel suo ciclo di vita: il trofozoita corrispondente alla fase vegetativa e la cisti ovvero la fase resistente.

I trofozoiti presentano generalmente una misura compresa fra i 12 e i 35 µm, ma la dimensione varia notevolmente tra gli isolati appartenenti a specie diverse. Il trofozoite si muove lentamente per l'emissione di sottili propaggini citoplasmatiche filiformi a livello degli *acanthopoda*, che spesso conferiscono un aspetto a riccio al trofozoite stesso (Byers *et al.*, 1991) (Figura 1).

Gli *acanthopoda* permettono al protozoo di aderire alle superfici (biologiche o inerti), di muoversi e di catturare le prede. Durante la fase vegetativa, si nutrono di batteri, alghe, lieviti o piccole particelle organiche attraverso processi di fagocitosi e pinocitosi (Bowers & Olszewski, 1972; Bowers & Olszewski, 1983).

La divisione avviene per scissione binaria in un periodo di tempo compreso tra 8-24 ore a seconda dei ceppi. *Acanthamoeba* può mantenere lo stadio di trofozoita in presenza di condizioni ambientali favorevoli quali abbondanza di cibo, pH neutro, temperatura adeguata (30°C) e osmolarità compresa nell'intervallo di 50-80 mOsmol/L (Weisman, 1976). Tuttavia, condizioni difficili (mancanza di cibo, iper o ipo-osmolarità, condizioni estreme di temperatura e pH) inducono la trasformazione dei trofozoiti in cisti. Il trofozoita passa a vita latente (minima attività metabolica) e si racchiude all'interno di una parete esterna resistente (Tomlinson & Jones, 1962) (Figura 2). Il trofozoita diventa metabolicamente inattivo (minima attività metabolica) e si racchiude all'interno di una parete resistente (Bowers & Korn, 1974).



**Figura 1. Trofozoite di *Acanthamoeba* al microscopio elettronico a scansione
(per gentile concessione di CDC/ Catherine Armbruster; Margaret Williams)**



**Figura 2. Cisti di *Acanthamoeba* in matrice acquosa in preparato a fresco (1125x)
(per gentile concessione di CDC/ Dr. George R. Healy)**

Più precisamente, durante la fase di incistamento, l'eccesso di cibo, acqua e particolato vengono espulsi e il trofozoita dà inizio al processo di incapsidamento con la formazione della parete cistica; in questo stadio si inizia a condensare la parete cellulare che si arrotonda (stadio precistico), essa matura in una cisti a doppia parete – ectocisti ed endocisti – che permette al

parassita di sopravvivere in condizioni ostili. L'ectocisti può presentarsi liscia od ondulata; l'endocisti invece può presentarsi stellata, festonata, poliedrica ecc.

Nel corso del processo di incistamento cellulare si ha una diminuzione del volume cellulare e del peso secco ottenuto attraverso un dimezzamento dei livelli di RNA, proteine, trigliceridi e di glicogeno (Weisman, 1976). Le pareti delle cisti contengono cellulosa (non presente nella fase vegetativa) che rappresenta il 10% del peso totale a secco della cisti stessa (Tomlinson, 1962). Sebbene la composizione della parete delle cisti vari tra isolati appartenenti a specie/genotipi diversi, in isolati del genotipo T4 (*A. castellanii*) è stata dimostrata la presenza del 33% di proteine, 4-6% di lipidi, 35% di carboidrati (soprattutto cellulosa), 8% di ceneri e 20% di materiali non identificati (Neff, 1969).

Le cisti posseggono pori noti come "ostioles", che vengono utilizzati dall'organismo per monitorare cambiamenti ambientali. Nello stadio di cisti il protozoo possiede un diametro compreso tra 5 e 20 μm , variabile tra isolati appartenenti a diverse specie o genotipi.

Diversi studi riportano che nella forma cistica, queste amebe possono rimanere vitali per diversi anni mantenendo la loro patogenicità (Neff, 1969). Le amebe a vita libera hanno un ciclo biologico semplice che passa dallo stadio di trofozoite a quello di cisti e viceversa a seconda delle condizioni ambientali (temperatura, umidità, pH, possibilità nutritive ecc.). Le cisti di *Acanthamoeba* sono molto resistenti ed in grado di tollerare temperature particolarmente elevate, l'essiccamento e la disinfezione.

La leggerezza e la resistenza di queste cisti costituiscono gli elementi del successo adattativo del protozoo che grazie a queste caratteristiche è in grado di disperdersi nell'ambiente umido fra l'aria e il suolo ed attecchire in microhabitat molto specifici ove possa trovare i batteri di cui si nutre. Per questo *Acanthamoeba* può essere presente in tutti i tipi di terreno, in tutti gli ambienti idrici compresi i sedimenti marini (Liu *et al.*, 2006; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005) e il pulviscolo atmosferico (Scaglia, 1997). *Acanthamoeba* può diventare un parassita dell'uomo e degli animali quando il trofozoite entra in contatto con l'ospite prevalentemente con acque contaminate. A tutt'oggi non è chiaro quale sia il reale rischio di acquisizione dell'infezione da sistemi di climatizzazione e raffreddamento di impianti per i quali è stata dimostrata la presenza di *Acanthamoeba* (Chan *et al.*, 2011; Astorga *et al.*, 2011)

Metabolismo

Acanthamoeba ingerisce i batteri di cui si nutre per fagocitosi e mostra un tropismo specifico per i microrganismi acquatici che vivono in superficie nelle acque e anche nell'interfaccia aria-acqua, nonché nei biofilm (Preston *et al.*, 2001, Hsu *et al.*, 2011). Gli *acanthopoda* possono essere utilizzati anche per inglobare i batteri di cui si nutre (Weekers *et al.*, 1993) ed occasionalmente virus (Colson & Raoult, 2010), lieviti (Allen & Dawidowicz, 1990) ma anche altri protisti, quali alghe, e altri protozoi (Scheid & Schwarzenberger, 2012; Couso *et al.*, 2007).

Il processo di fagocitosi è condotto attraverso la complementarità sterica specifica fra recettore e ligando, mentre il processo di pinocitosi è aspecifico e condotto attraverso la formazione di invaginazioni della membrana, viene utilizzato per assumere grandi quantità di soluti/particelle di cibo disciolti nell'acqua (Bowers & Olszewski, 1983). Avvenuta l'ingestione del cibo, esso viene veicolato all'interno del vacuolo per essere digerito. *Acanthamoeba* possiede la capacità di differenziare vacuoli contenenti macromolecole digeribili da vacuoli contenenti macromolecole non digeribili. Di grande interesse risulta la comprensione dei meccanismi cellulari che permettono il differenziamento del destino dei vacuoli citoplasmatici e di grande importanza studiare il ruolo di questi vacuoli nella permanenza dei batteri all'interno del Protozoo che ne diventa veicolante come più avanti descritto.

Localizzazione nel suolo

I protisti come le amebe, i flagellati e i ciliati hanno due importanti ruoli ecologici nel suolo: influenzano la struttura della comunità microbica e migliorano il riciclo dei nutrienti. Le amebe nutrendosi di batteri presenti nel suolo ne controllano la popolazione influenzando fino al 60% della composizione di specie. In tal modo si evita un disequilibrio quantitativo e qualitativo di specie batteriche che popolano il terreno e che incidono sull'omeostasi ecologica.

I decompositori primari, come sono i batteri, metabolizzano direttamente i materiali organici ma sono inefficienti nel rilasciare i minerali catabolizzati dalla loro cellula. I decompositori secondari, come i protozoi a vita libera, ed in particolare le amebe che sono i protozoi più grandi, consumano i decompositori primari e rilasciano i nutrienti minerali come prodotti di scarto da essi catabolizzati. In questo modo, *Acanthamoeba* rende disponibili i nutrienti che derivano da tali batteri che normalmente non li eliminano e quindi non li rendono disponibili nell'ambiente. Tale osservazione è provata dalla presenza di una maggiore mineralizzazione con carbonio, azoto e fosforo in suoli contenenti *Acanthamoeba* e batteri rispetto a suoli che ne sono privi. *Acanthamoeba* gioca, quindi, un ruolo importante nella regolazione delle popolazioni batteriche dell'ambiente e del ciclo dei nutrienti, e contribuisce al funzionamento degli ecosistemi (Siddiqui & Kahn, 2012).

Localizzazione nelle acque

Il genere *Acanthamoeba* è ubiquitario. È ben documentata la sua presenza in piscine, acque termali, vasche da idromassaggio, docce (Alves *et al.*, 2012; Górnik & Kuźna-Grygiel, 2004; Caumo & Rott, 2011), acque marine costiere (dove le cisti non vengono disturbate dalla salinità) sabbie di spiagge (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Górnik, 2005; Booton *et al.*, 2004) e perfino in sedimenti oceanici (Liu *et al.*, 2006).

L'acquisizione dell'infezione da *Acanthamoeba* attraverso l'acqua avviene per contatto e non per ingestione come succede per le altre infezioni protozoarie trasmesse dall'acqua (criptosporidiosi, giardiasi). A causa di carenze nella gestione dei sistemi idrici, nei paesi tropicali più poveri le popolazioni sembrano maggiormente colpite, anche a causa della proliferazione agevolata di *Acanthamoeba* in acque tiepide e calde, come quelle temperate e appunto tropicali. Infine queste amebe sono particolarmente resistenti alla clorazione per cui è elevato il rischio della loro presenza in acque superficiali trattate per il consumo umano (Chang *et al.*, 2009; Baldursson & Karanis, 2010).

A sud di Taiwan, 211 campioni di acqua provenienti dai due bacini idrografici, il fiume Puzih e il fiume Kaoping, 34 (16%) sono risultati positivi per il genere *Acanthamoeba* (Kao *et al.*, 2012). Il genotipo T4 è stato identificato in 19 campioni, il T5 in 8, il T15 in 3 ed il T6 in 4, mostrando anche un'alta diversità genetica. Poiché tali bacini sono utilizzati come consuete fonti di acqua potabile, per l'agricoltura e per attività di balneazione, risulta evidente il rischio di esposizione all'infezione per l'uomo.

Uno studio effettuato su acque di rubinetto di alcune scuole di Rio Grande Du Sol (Winck & Caumo, 2011) ha evidenziato 31 isolati appartenenti al genere *Acanthamoeba* su 136 campioni (genotipi T4 e T2). Uno studio effettuato su 72 campioni d'acqua provenienti da impianti di aria condizionata in Cile ha evidenziato una positività ad *Acanthamoeba* in 41 campioni, corrispondenti ai genotipi T3, T4, T11 (Astrorga *et al.*, 2011). Nelle indagini condotte in diversi Paesi è stata messa bene in evidenza la corrispondenza fra la casistica di cheratite da *Acanthamoeba* nei portatori di lenti a contatto e l'uso dell'acqua di rubinetto per sciacquarle

(Bonilla-Lemus *et al.*, 2010) individuando con precisione il rapporto di causa-effetto nello sviluppo dell'infezione (Ibarra-Montes *et al.*, 2010; Jeong & Yu, 2005).

In un'indagine condotta negli Stati Uniti su campioni di acqua di rubinetto prelevata dalle case di 27 pazienti che avevano contratto una cheratite da ameba, 24 abitazioni risultavano contaminate, con differenze significative a seconda della temperatura e dei luoghi della casa: nella stanza da bagno risultava contaminato il 76% dei rubinetti dell'acqua fredda e il 24% di quelli dell'acqua calda, mentre in cucina si passava al 47% per l'acqua fredda e solo al 16% per quella calda (Kilvington *et al.*, 2004). L'importanza del ritrovamento, infine, di amebe nelle reti idriche ospedaliere là dove sono state rinvenute, con elevata corrispondenza, anche specie batteriche patogene di importanza nosocomiale (*Mycobacterium* e *Legionella*) lascia intendere quanto possa risultare indispensabile monitorare la presenza del protozoo in questi ambienti indoor (Thomas *et al.*, 2006, Ovrutsky *et al.*, 2013, Cateau *et al.*, 2011).

Associazione con il biofilm batterico

In letteratura scientifica è ormai appurato che il genere *Acanthamoeba* ha un trofismo attivo nei confronti dei batteri, a causa di numerose glicoproteine mannosio-vincolante disposte sulla membrana, che interagiscono specificamente con i residui di mannosio esclusivi della membrana batterica. Cibandosi di batteri, *Acanthamoeba* mostra maggiore facilità ad aderire alle superfici interessate da biofilm e quindi ad essere presente in questi, dove maggiore è la carica batterica. Un biofilm è prodotto da aggregati di batteri che aderiscono alle irregolarità delle pareti interne di condutture d'acqua ed altre strutture umide, formando delle stratificazioni ben organizzate. I biofilm batterici descritti per i siti umidi sono molti e a causarli sono specie diverse di batteri, con diversa patogenicità. In molti casi è stata rinvenuta anche *Acanthamoeba castellanii*, associata alla presenza dei batteri, per quanto non sia ancora chiaro il suo ruolo nel mantenimento del biofilm. Sono descritte associazioni di questa specie di protozoo con *Vibrio cholerae* (Valeru *et al.*, 2012), *Mycobacterium ulcerans* (Wilson *et al.*, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Micheal *et al.*, 1995), *Francisella phylomiragia* (Verhoeven *et al.*, 2010).

Ben noto è il modello *Acanthamoeba-Legionella pneumoniae* (Hsu *et al.*, 2011; Buse & Ashbolt, 2012), preso come riferimento per comprendere e studiare le interazioni tra questo protozoo e i microorganismi di cui si nutre. Questo batterio Gram-negativo ha una distribuzione in tutti gli ambiente acquatici naturali come fiumi, laghi, stagni, raccolte d'acqua superficiale di qualsiasi entità e suolo umido. In ambiente urbano è stato rinvenuto nei sistemi di condizionamento e negli umidificatori, nelle acque di scarico di impianti igienici, nei sistemi di irrigazione e nelle fontane decorative. La presenza dell'associazione fra *Acanthamoeba* e *Legionella* è stata rilevata anche in ambienti ricreativo-sportivi, come impianti termali, piscine e vasche per idromassaggi, bagni turchi e aree adibite a sauna, nonché di tipo sanitario, quali piscine per riabilitazione motoria. La presenza dei biofilm batterici risulta essere, dunque, un fattore di rischio anche per la contaminazione ambientale da *Acanthamoeba* e a sua volta per la veicolazione da parte di questo protozoo di batteri presenti nel biofilm, come si verifica nel caso delle infezioni di legionellosi.

PROBLEMA DELLE SIMBIOSI DI *ACANTHAMOEBA* CON BATTERI, VIRUS, LIEVITI ED ALTRI PROTOZOI

Acanthamoeba, come tutte le amebe, si nutre di batteri presenti nell'ambiente acquoso in cui vive, ma a tutt'oggi non è noto se le sue interazioni con i batteri siano soltanto di tipo predatorio o esistano casi di simbiosi o di parassitismo da parte dei batteri nei confronti dell'ameba ospite. In effetti tutte le modalità sembrano possibili e probabilmente dipendono dalle specie di batteri e di *Acanthamoeba* implicate nonché dalle condizioni ambientali, che a loro volta possono favorire l'uno o l'altro microrganismo (Greub & Raoult, 2004).

Gli *acanthopoda* sono utilizzati per la cattura di batteri (Weekers *et al.*, 1993), alghe, lieviti (Allen & Dawidowicz, 1990) e altri protisti.

I batteri vengono inglobati attraverso la fagocitosi e poi lisati in fagolisosomi. Anche se *Acanthamoeba* si nutre sia di batteri Gram-positivi che di Gram-negativi, preferisce "pascolare" su batteri Gram-negativi (Bottone *et al.*, 1994). La capacità di *Acanthamoeba* di nutrirsi di batteri dipende dalle condizioni ambientali ma è certo che molti batteri che fagocita sono patogeni per l'uomo e l'animale.

È dunque facile comprendere come sia importante conoscere i meccanismi che intervengono nella fagocitosi amebica e nel destino del batterio all'interno del suo ospite (Sixt *et al.*, 2011).

Recenti studi hanno dimostrato che batteri patogeni per l'uomo quali *Escherichia coli* K1, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, modificati geneticamente attraverso la soppressione di geni codificanti per proteine del sistema di trasporto di tipo 3 (T3SS) che sono fondamentali per la loro virulenza, hanno ridotto la capacità d'invasione delle amebe di circa 10 volte rispetto ai ceppi selvatici dimostrando che la normale virulenza delle amebe è legata alla virulenza dei batteri che ospitano (Siddiqui *et al.*, 2011). Questo suggerisce il fatto che possa esistere un reale rapporto di simbiosi fra protozoo e batteri che interferisce nel fenomeno della virulenza.

Sono stati quindi intrapresi altri approcci per conoscere i meccanismi deputati nell'orientare i simbionti batterici verso la sopravvivenza o la morte dell'ospite. Studi effettuati sul pool genico di vari ceppi di *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. choleraesuis*) hanno evidenziato che tra i 4433 geni del genoma batterico solo 1004 sono soggetti a regolazione post-traduzionale in diversi momenti della vita intracellulare di *Salmonella* e in particolar modo i geni SPI (isole di patogenicità), responsabili della codificazione di proteine che intervengono nella sua patogenicità (Feng *et al.*, 2009).

Infettando le amebe con ceppi mutati di *Salmonella* per i geni SPI, è stato dimostrato che l'espressione di questi, in determinati momenti della vita del procariote, lo rendono capace di sopravvivere all'interno dell'ospite eucariote, di replicare e di avviarlo alla completa lisi, mostrando un comportamento da parassita.

La capacità di *Acanthamoeba* di veicolare batteri patogeni è particolarmente importante proprio perché questi ultimi non solo sopravvivono ma si moltiplicano al suo interno, e provocandone la lisi, promuovono la propria diffusione. Questo può consentire ai batteri anche di eludere le difese dell'ospite e/o i farmaci chemioterapici e rappresenta un punto focale della diffusione di batteri patogeni quali *Mycobacterium* e *Salmonella* e *Acinetobacter* e delle antibiotico-resistenze in ambiente nosocomiale (Thomas *et al.*, 2006; Ovrutsky *et al.*, 2013; Cateau *et al.*, 2011) e può aumentare la patogenicità dell'ameba (Paterson *et al.*, 2011).

Quando i batteri invadono un tessuto dell'ospite, come la mucosa nasale, le cellule epiteliali del polmone o della mucosa intestinale, devono resistere alle difese immunitarie e alle barriere biologiche dell'ospite, e potrebbero avere evoluto il meccanismo di simbiosi con *Acanthamoeba*

per utilizzarla come un ‘Cavallo di Troia’ (Hayashi *et al.*, 2010). La capacità di *Acanthamoeba* di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli durante lo stadio cistico facilita il suo ruolo come vettore di batteri.

Come è evidente dalla Tabella 3 che segue le specie patogene rinvenute a tutt’oggi in isolati di *Acanthamoeba* sono di elevata rilevanza in medicina:

Tabella 3. Elenco dei batteri patogeni per l’uomo fin’ora rinvenuti in *A. castellani* e *A. polyphaga*

Patogeno	Patologia	Ospite	Isolato
<i>Legionella pneumophila</i>	Malattia del Legionario	<i>A.polyphaga</i>	Rowbotham, 1980
<i>Escherichia coli</i> O157	Diarrea	<i>A.castellani</i>	Barker <i>et al.</i> , 1999
<i>Coxiella burnetii</i>	Febbre Q	<i>A.castellani</i>	La Scola & Raoult, 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cheratite	<i>A.castellani</i>	Michel <i>et al.</i> , 1995
<i>Vibrio cholerae</i>	Colera	<i>A.polyphaga</i>	Thom <i>et al.</i> , 1992
<i>Negevensis simkania</i>	Polmonite	<i>A.polyphaga</i>	Kahane <i>et al.</i> , 2001
<i>Listeria monocytogens</i>	Listeriosi	<i>A.castellani</i>	Ly & Muller, 1990
<i>Mycobacterium avium</i>	Malattie respiratorie	<i>A.polyphaga</i>	Krishna-Prasad & Gupta, 1978; Steinert <i>et al.</i> , 1998
<i>Helicobacter pylori</i>	Ulcere gastriche	<i>A.castellani</i>	Winiacka-Krusnell <i>et al.</i> , 2002

Il genere *Acanthamoeba* è, inoltre, noto per ospitare non solo batteri ma anche virus come il più grande conosciuto, *Mimivirus*, (inizialmente scambiato per un batterio) con una dimensione delle particelle di 400 nm e la dimensione del genoma di 1,2 Mbp. La patogenicità di questo virus è stata associata alla sintomatologia della polmonite grave.

In *Acanthamoeba* sono stati rinvenuti anche altri virus patogeni (Colson *et al.*, 2010), come indicato nella tabella seguente:

Tabella 4. Elenco dei virus patogeni per l’uomo finora rinvenuti in *A. castellani* e *A. polyphaga*

Patogeno	Patologia	Ospite	Isolato
<i>Mimivirus</i>	Polmonite virale	<i>A.polyphaga</i>	Colson & Raoult, 2010
<i>Coxsackie</i>	Faringite vescicolare, Congiuntivite, Miocardite	<i>A.castellani</i>	Mattana <i>et al.</i> , 2006
<i>Adenovirus</i>	Congiuntivite, Gastroenterite	<i>A.castellani</i>	Scheid & Schwarzenberger, 2012
<i>Poliovirus</i>	Poliomielite	<i>A.polyphaga</i>	Heaselgrave <i>et al.</i> , 2006

È stato infine dimostrato che *Acanthamoeba* può potenzialmente ospitare anche specie di protozoi. In particolar modo sono stati coltivati diversi ceppi di *Acanthamoeba* (gruppo 2) in presenza di oocisti di *Cryptosporidium parvum* (Couso *et al.*, 2007; Scheid & Schwarzenberger, 2011). Dopo la fagocitosi da parte dell’ameba, le oocisti sono state rinvenute all’interno del citoplasma dei trofozoiti ancora vitali, ma gli AA non descrivono una permanenza

dell'infettività delle oocisti. È stata descritta anche la capacità di *A. castellani* di internalizzare oocisti di *Toxoplasma gondii* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2009) provando anche che gli sporozoitii fagocitati sono ancora capaci di infettare modelli sperimentali e quindi sono patogeni. In entrambi i casi si tratta d'infezioni sperimentali di *Acanthamoeba* che, pur non dando un'evidenza che le amebe siano un veicolo di questi parassiti in natura suggeriscono che esse sono potenzialmente un veicolo per le infezioni parassitarie.

INFEZIONI UMANE DA *ACANTHAMOEBA*

Acanthamoeba penetra nell'ospite tramite le vie aeree superiori per inalazione delle spore trasportate dal vento, attraverso le lesioni cutanee, tramite penetrazione per microlesioni a livello oculare (cheratite) veicolata dall'acqua potabile (lavaggi del viso, bagni in vasca o doccia) e dalle acque superficiali (nuoto in piscina, in fiume, laghi) ma anche dal pulviscolo atmosferico e gli impianti di condizionamento.

Nel caso dell'encefalite cronicizzante, dopo la penetrazione attraverso le vie aeree o le lesioni della pelle, si diffonde per via ematica e si localizza a livello dell'encefalo e del midollo spinale.

Le infezioni umane da *Acanthamoeba* spp. si identificano con due diverse manifestazioni cliniche.

Una modalità d'infezione è rivolta al sistema nervoso centrale, ove l'agente patogeno viene veicolato dal circolo ematico, a partire dalla mucosa polmonare e più raramente dalla cute, dando luogo ad una meningoencefalite sub-acute generalmente fulminante. Questa malattia viene definita encefalite granulomatosa amebica in relazione al frequente riscontro istologico di granulomi formati da polimorfonucleati, plasmacellule e cellule giganti plurinucleate che delimitano i protozoi in forma di trofozoite o di cisti. Il manifestarsi della malattia è subdolo e il decorso prolungato per settimane e mesi. I sintomi clinici sono correlabili a una encefalopatia spazio-occupante che si complica in paralisi di alcuni nervi cranici, stato letargico e coma.

Un'altra modalità d'infezione da *Acanthamoeba* è a carico dell'occhio poiché le amebe infiltrano massivamente lo stroma corneale causando, in fase terminale di malattia, perforazione della cornea e perdita completa del *visus*. La manifestazione clinica è la cheratite con manifesta fotofobia, dolore oculare e calo del *visus*. In un soggetto immunocompetente, tenendo conto del fatto che la cornea non offre barriera immunitaria in quanto è un tessuto non vascolarizzato, in caso d'infezione dell'apparato visivo, le prime linee di difesa sono le palpebre e le lacrime. Il liquido prodotto dal sistema lacrimale e il costante movimento delle palpebre forniscono la prima linea di difesa contro *Acanthamoeba*. Dei tre strati distinguibili nel film lacrimale (strato lipidico, strato acquoso e strato mucoso) lo strato acquoso è la fonte di composti con proprietà anti-microbiche come lisozima, lattoferrina e specifiche piccole immunoglobuline di tipo A (small-IgA). Al contrario della cornea, solo limitatamente protetta da meccanismi immunitari, la congiuntiva è altamente vascolarizzata e protetta da tessuti linfoidei secondari che permettono la produzione di IgA, di linfociti T, di cellule *natural-killer* e di macrofagi, altamente efficienti nel contrastare l'invasione da parte di *Acanthamoeba* grazie all'attività sinergica della risposta immunitaria umorale e cellula-mediata (Van Klink *et al.*, 1996).

In caso d'infezione nel parenchima cerebrale le linee di difesa immunitarie sono rappresentate dalle cellule della microglia corrispondenti al 20% della popolazione totale delle cellule di questo tipo all'interno del cervello. Le microglia si muovono costantemente e analizzano il Sistema Nervoso Centrale in cerca di neuroni danneggiati, placche e agenti infettivi. Il cervello e il midollo spinale sono considerati organi "immuno-privilegiati" in quanto sono separati dal resto del corpo da una serie di cellule endoteliali conosciute come la barriera emato-encefalica. Questa barriera impedisce alla maggior parte delle infezioni di raggiungere il vulnerabile tessuto nervoso. Quando *Acanthamoeba* invade il tessuto cerebrale e riesce ad attraversare la barriera emato-encefalica, le cellule della microglia innescano la risposta di tipo infiammatoria che prolungata nel tempo produce la necrosi del tessuto (Alsam *et al.*, 2005).

La risposta immunitaria contro *Acanthamoeba* è, quindi, di tipo classicamente cellulo-mediata. La barriera encefalica gioca un ruolo fondamentale in quanto impedisce il passaggio di anticorpi. Le microglia riconoscono i corpi estranei, li fagocitano, e fungendo da cellule APC cioè da cellule che presentano gli antigeni ai linfociti T, attivano la risposta del sistema immunitario.

Quadro clinico di encefalite granulomatosa amebica

Il quadro clinico iniziale da encefalite granulomatosa amebica è caratterizzato da febbre, anoressia e vomito, associati a segni meningei e cefalea. L'evoluzione risulta essere drammatica poiché nell'arco di pochi giorni dall'inizio dei sintomi sopraggiunge il coma e successivamente la morte. In circa la metà dei pazienti si associa miocardite, sebbene l'insufficienza cardiaca congestizia e le aritmie siano raramente causa del decesso.

L'encefalite granulomatosa amebica, causata da *Acanthamoeba*, si manifesta solo in soggetti con deficit del sistema immunitario, l'esordio è subdolo, talvolta con segni neurologici focali e segni di incremento della pressione endocranica. La morte sopraggiunge in un periodo variabile da 7 a 120 giorni. Durante il periodo di incubazione, difficilmente quantificabile, possono essere presenti lesioni cutanee di vario tipo (ulcere, noduli, ascessi sottocutanei, o granulomi). Sono possibili altre localizzazioni d'organo che determinano patologie diverse quali polmoniti, osteomieliti, sinusiti.

Quadro clinico di cheratite amebica

La cheratite da *Acanthamoeba* si sviluppa per contatto diretto del parassita con la cornea, che è la porzione trasparente del segmento anteriore dell'occhio, e quindi la struttura più nobile della superficie oculare poiché da essa dipende la funzione visiva.

Quest'infezione è andata ad aumentare in maniera significativa dopo l'avvento dell'uso di lenti a contatto (in particolar modo lenti a contatto rigide, semi-rigide e comunque di tipo non "usa e getta"). Infatti, *Acanthamoeba* di per sé non è in grado di penetrare un epitelio corneale sano, ma le lenti a contatto possono rappresentare un "ponte d'ingresso" andando a creare delle micro-lesioni che permettono il passaggio del patogeno oltre l'epitelio corneale, iniziando così l'infezione vera e propria che può evolvere verso la perforazione corneale. D'altra parte il legame fra la possibile presenza del parassita nell'acqua del rubinetto e la possibile contaminazione delle lenti a contatto, qualora vengano risciacquate con quella, è descritta da molti anni (Shovlin, 1990; Koenig *et al.*, 1987).

Nonostante le lenti a contatto rappresentino un importante fattore di rischio, va ricordato che la cheratite da *Acanthamoeba* non è un'infezione esclusiva dei portatori di lenti a contatto, e che può riscontrarsi in pazienti affetti da altre patologie corneali (come infezione o sovra-infezione), o anche in pazienti senza apparenti fattori di rischio oculari.

Non è ancora chiaro quale sia l'intervallo temporale necessario tra l'acquisizione dell'infezione ed il momento in cui si manifestano i primi segni e sintomi. La fase di esordio della malattia può durare da alcuni giorni a diverse settimane, con una sintomatologia lieve e sfumata e segni aspecifici che possono ricordare altre forme di cheratite. In particolare, uno dei primi segni della cheratite da *Acanthamoeba* è una lesione superficiale (spesso con aspetto pseudo-dendritico che ricorda l'infezione da virus *Herpes simplex*) circondata da un infiltrato subepiteliale. Solo in seguito l'infezione si approfondisce nello stroma corneale fino a causare

perforazione se non tempestivamente ed adeguatamente trattata, con conseguente perdita della funzione visiva.

Il segno caratteristico della cheratite da *Acanthamoeba* conclamata è un infiltrato corneale di forma anulare nella periferia di un'ulcera corneale come mostrato in Figura 3.

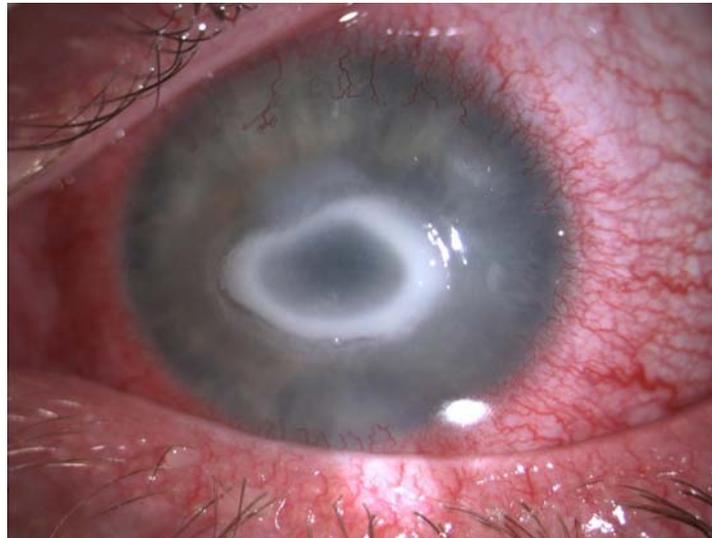


Figura 3. Cheratite da *Acanthamoeba* con caratteristica forma “ad anello”

Altri segni caratteristici dell'infezione sono l'intensa iperemia congiuntivale, più marcata attorno alla cornea (iperemia pericheratica) e la presenza di piccoli infiltrati attorno ai nervi corneali (cosiddetti infiltrati perineurali), e non è infrequente riscontrare anche la contemporanea presenza di un'uveite (infiammazione intraoculare) secondaria.

I sintomi caratteristici dell'infezione sono la fotofobia, la lacrimazione e il dolore intenso, che nelle fasi iniziali sembra addirittura sproporzionato rispetto al quadro clinico.

Per porre diagnosi di cheratite da *Acanthamoeba*, oltre ad un'attenta anamnesi volta ad identificare i fattori di rischio tipici (lenti a contatto, nuoto in acque stagnanti, e quant'altro), e all'identificazione dei suddetti segni e sintomi, sono disponibili metodiche di laboratorio e di diagnostica per immagini. Nello specifico, può risultare di fondamentale importanza lo studio microscopico delle lenti a contatto e/o l'analisi del liquido delle lenti a contatto, ovvero l'esame del raschiato epiteliale corneale. Quest'ultimo si basa sull'identificazione microscopica diretta e/o colturale, che può porre diagnosi di certezza di infezione grazie all'identificazione diretta dei trofozoiti o delle cisti del parassita come mostrato dalla Figura 4.

Un'altra metodica estremamente utile per porre diagnosi di infezione corneale da *Acanthamoeba* è la microscopia confocale in vivo della cornea. Questa metodica di *imaging* ad alta risoluzione permette di evidenziare le cisti direttamente nella cornea del paziente e, rispetto al suddetto raschiato corneale presenta il vantaggio di poter valutare tutti gli strati della cornea e quindi di identificare fino a che livello si sono spinte le cisti. Inoltre, non trattandosi di una metodica invasiva, la microscopia confocale può anche essere utilizzata per seguire l'evoluzione della malattia nel tempo e valutare l'efficacia della terapia.

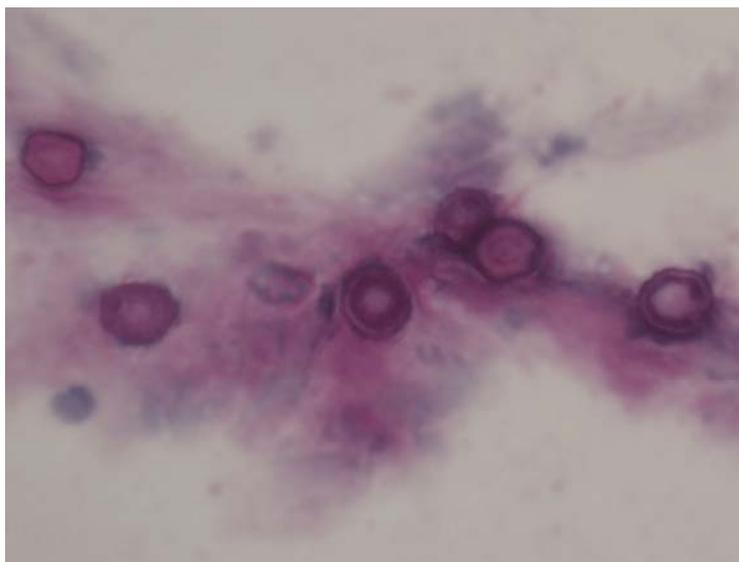


Figura 4. Cisti di *Acanthamoeba* poste in evidenza dalla microscopia confocale in sede oculare

DIAGNOSI DI *ACANTHAMOEBA* IN CAMPIONI BIOLOGICI

La diagnosi di malattia causata da amebe a vita libera è complessa per la difficoltà di identificare l'agente eziologico, benché la diagnosi precoce sia indispensabile ai fini terapeutici.

La cheratite amebica, in particolare, non è di facile determinazione a causa delle superinfezioni batteriche e alla necessità di una diagnosi differenziale con le infezioni erpetiche e in alcuni Paesi la possibilità di identificare la malattia è un'acquisizione recente (Ondriska *et al.*, 2004). Inoltre una terapia antibatterica, antivirale, antimicotica o trattamenti con corticosteroidi possono falsare la diagnosi perché spesso si può osservare un iniziale miglioramento a cui tuttavia segue immediatamente un aggravamento della malattia. Diagnosi precoci sia cliniche che di laboratorio sono importanti per iniziare al più presto il trattamento, visto che le cisti amebiche che si formano nei tessuti sono resistenti ai farmaci. Si può fare una diagnosi clinica di cheratite amebica quando si riscontrano ulcere corneali che non rispondono a una terapia antibiotica. La diagnosi di laboratorio di cheratite da *Acanthamoeba* si basa sull'identificazione microscopica diretta e/o colturale delle cisti e dei trofozoiti dopo prelievo mediante spatola dello strato superficiale della cornea.

Premesso che il prelievo di campione biologico deve necessariamente essere inviato nel più breve tempo possibile senza refrigerare e in ogni caso entro le 24 ore il protocollo di diagnosi per un'infezione da *Acanthamoeba* può prevedere diversi livelli d'indagine. Il primo livello diagnostico è l'esame al microscopio ottico di un vetrino allestito con il prelievo di "scraping" corneale, dopo colorazione con Giemsa, che permette di identificare le cisti e i trofozoiti di *Acanthamoeba*. Per questo tipo d'indagine è, però, necessaria l'esperienza del parassitologo o di personale con elevata esperienza nel riconoscimento microscopico delle cisti.

Il secondo livello diagnostico è costituito dall'esame colturale che si allestisce su piastra di agar non nutrient (NN-agar) dopo processo di batterizzazione con un ceppo di *Escherichia coli*.

Certamente la coltura ha il pregio di far valutare la vitalità del parassita infettante e consente la determinazione del gruppo tassonomico ma impegna molto tempo a discapito della pronta somministrazione terapeutica.

Il terzo livello diagnostico è quello delle indagini specialistiche di tipo molecolare (PCR, sequenziamento) che permettono una diagnosi altamente specifica con l'evidenziazione delle cisti in loco e l'individuazione del genotipo dell'agente eziologico, rispettivamente, indirizzando in modo più adeguato e solerte l'indicazione terapeutica.

Diagnosi morfologica: esame al microscopico

L'esame al microscopio ottico (a contrasto di fase) viene usato per una identificazione rapida di *Acanthamoeba*. I campioni possono essere utilizzati per allestire preparati colorati con colorazioni permanenti classiche quali Giemsa e PAS (*Periodic Acid-Schiff*). Inoltre si possono effettuare colorazioni di sezioni istologiche con E-E e PAS. Con il microscopio a fluorescenza è possibile evidenziare le cisti e i trofozoiti dopo colorazione del campione con fluorocromi (Calcofluor White). Le cisti di *Acanthamoeba* assumono la fluorescenza verde-mela, mentre le altre cellule presenti, compresi eventuali trofozoiti si colorano di rosso-bruno. Una metodica non invasiva utilizzata in oculistica in questi ultimi anni è la microscopia confocale che consente di mettere in evidenza cisti e trofozoiti nel tessuto corneale del paziente come strutture

iper-riflettenti (Mathers *et al.*, 1996). L'esame richiede tuttavia una buona collaborazione del paziente e, spesso, l'intensa fotofobia e il dolore ne possono rendere problematica l'esecuzione. La diagnosi di laboratorio di cheratite da *Acanthamoeba* si basa sull'identificazione microscopica diretta e/o colturale delle cisti e dei trofozoiti dopo prelievo mediante spatola dello strato superficiale della cornea.

Diagnosi parassitologica: esame colturale

I metodi di coltura di *Acanthamoeba* rimangono a tutt'oggi i più validi, semplici e ampiamente usati nella diagnosi, oltre al fatto che in coltura si può ottenere una grande quantità di amebe che possono essere utilizzate per ulteriori studi.

Il metodo di coltura utilizzato di regola è costituito dalla semina su piastra agar non-nutrient (NN-agar) batterizzato con batteri Gram-negativi. Alla base del metodo vi è l'uso di batteri Gram-negativi (*Escherichia coli* oppure *Klebsiella aerogenes*) che vengono seminati su agar non-nutrient, come fonte di nutrimento per *Acanthamoeba*. L'agar non-nutrient contiene una quantità minima di nutrienti tale da non permettere la crescita di altri organismi.

Brevemente vengono poste poche gocce di sospensione in soluzione di Page di cellule di *E.coli* ottenute da coltura cresciuta per 24 ore, al centro di una piastra da spargere omogeneamente con spatola o tampone.

Sulla piastra viene poi seminato il materiale biologico prelevato con tampone o in liquido e si lascia per 2-4 ore in incubazione a temperatura ambiente. Dopo una notte a 30-37 gradi le piastre vengono girate e conservate, sempre in termostato, chiuse in una busta di polietilene, per un periodo da 7 a 10 giorni durante il quale verranno osservate al microscopio invertito per la ricerca di trofozoiti nelle aree di lisi del monostrato batterico. Non si può definire la negatività se l'osservazione non è condotta per 10 giorni consecutivi.

Questo rappresenta un protocollo consolidato ed ampiamente usato nella diagnosi (Health Protection Agency, 2004). L'approccio consente anche di valutare la vitalità del parassita che in coltura ex-cista e, trasformandosi nella forma di trofozoita, si replica sulla piastra di agar nutrendosi dei batteri che la supplementano. Una volta inoculata, la piastra viene incubata a 30°C e osservata giornalmente per evidenziare l'eventuale presenza di trofozoiti, che in alcuni casi sono già osservabili nel giro di poche ore. Le piastre, in assenza di crescita di amebe, vanno monitorate per almeno 7-10 giorni.

È possibile fare la semina del materiale biologico anche in terreni axenici liquidi, di cui ne esistono diverse formulazioni e da entrambe le colture "xeniche" o "axeniche" sono stati sviluppati diversi metodi per "stoccare" il protozoo ovvero mantenerlo per tempi brevi (qualche mese) o indefinitivamente a seconda della procedura di conservazione.

Diagnosi molecolare: PCR

La metodica è stata messa a punto su cisti e/o trofozoiti mantenute in coltura su piastra N-N agar. Il materiale biologico prelevato dal paziente viene processato direttamente per l'estrazione del DNA totale, oppure viene prima coltivato su piastra N-N agar e poi, qualora la coltura risulti positiva, viene prelevato per fare la conferma di positività e la tipizzazione genetica con la diagnosi molecolare. In questo caso si opera un raschiamento della superficie della piastra tramite ansetta sterile da batteriologia e il materiale così prelevato viene messo in una provetta da 1,5 mL contenente 100 µL di soluzione fisiologica. La coltura viene, quindi, centrifugata per

10 minuti a 1000 rpm e dal sedimento ottenuto si prelevano 100 µL che vengono posti in una provetta da 1,5 mL.

Per l'estrazione del DNA genomico dalla cultura si può seguire un protocollo da kit d'estrazione con l'utilizzo di colonnine di affinità ed eluizione del DNA totale. La diagnosi e l'identificazione genetica degli isolati di *Acanthamoeba* è basata sull'amplificazione di diversi geni target ma in particolare del gene codificante per la regione 18S rDNA (Rns) che permette di fare anche l'analisi genotipica dei ceppi grazie alla presenza di regioni costanti e variabili nella sua sequenza nucleotidica. La coppia di *primer Acanthamoeba*-specifici costruiti per l'amplificazione di questa regione sono il *primer forward* JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') e il *primer reverse* JDP2 (5'-TCTACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3') (Schroeder *et al.*, 2001). Questi *primer* amplificano, nell'ambito della regione Rns, un segmento definito anche ASA.S1, che presenta una lunghezza variabile (da 423 bp a 551 bp) in base al genotipo. In questo modo è possibile operare contemporaneamente alla diagnosi di infezione anche una diagnosi di genotipo dell'agente eziologico, tipizzando il ceppo infettante ovvero definendone il potenziale patogeno e quindi indirizzando appropriatamente l'indicazione terapeutica. Questo passaggio è fondamentale per l'approccio medico alla patologia in questione.

Le condizioni di amplificazione sono: un primo ciclo di attivazione iniziale della Taq a 96°C per 2 min, seguito da 35 cicli di amplificazione comprendenti: uno step di denaturazione a 96°C per 1 min, uno step di annealing di 1 min a 60°C ed uno step di estensione di 1 min. a 72°C, ed un'estensione finale a 72°C di 7 min.

In tutte le reazioni di amplificazione deve essere inserito un controllo negativo (assenza di DNA), per escludere possibili contaminazioni e un controllo positivo (DNA purificato di *Acanthamoeba*) per verificare la correttezza della procedura.

Il controllo positivo d'eccellenza resta sempre il cosiddetto "spike" ovvero l'aggiunta voluta di DNA del parassita in una matrice biologica più simile possibile al campione da esaminare per simulare un reale campione biologico positivo.

Gli amplicon ottenuti mediante PCR devono essere preparati per il sequenziamento mediante purificazione su colonna usando un kit commerciale e per ciascun isolato è necessario ottenere la sequenza *consensus* mediante l'allineamento delle rispettive sequenze forward e reverse, eseguito con un programma tipo ClustalW 1.8 Multiple Sequence Alignments.

A parte l'uso di questi *primer* che rispondono a criteri di elevata specificità e sensibilità è possibile seguire altri protocolli di PCR pubblicati in letteratura che utilizzano porzioni della sequenza per il gene codificante per la *small subunit* dell'rRNA come gene target che consente anche l'applicazione di analisi di restrizione degli amplicon ottenuti per consentire la genotipizzazione degli isolati (Kilvington *et al.*, 1991; Magliano *et al.*, 2009) e la recente applicazione di Real time PCR che consente la quantizzazione dei genomi parassitari e quindi la carica infettiva (Goldschmidt *et al.*, 2012; Magnet *et al.*, 2012). I *primer* JDP1 e JDP2 per la PCR qualitativa sulla porzione ipervariabile ASA.S1 della regione Rns restano di grande validità in quanto consentono di valutare in un solo evento anche il genotipo dell'isolato di *Acanthamoeba* che rappresenta un passaggio obbligato dalla diversa virulenza dei genotipi stessi.

DIAGNOSI DI *ACANTHAMOEBA* IN CAMPIONI IDRICI

Per quanto riguarda la ricerca di *Acanthamoeba* su matrici acquose la procedura sperimentale sia per la coltura che per l'amplificazione genica è uguale a quella descritta su campioni biologici, solo dopo che si sia trattato appropriatamente il campione da esaminare. Anche in questo caso è molto importante che il campione arrivi nell'arco delle 24 ore e che il prelievo riguardi un elevato quantitativo d'acqua e sedimento. I campioni devono essere ricevuti nel minor tempo possibile, trasportati e conservati a temperatura ambiente e una conservazione delle 24 ore richiede una temperatura compresa fra 2°C e 10°C. Il campione di partenza può essere acqua, fango, sedimento, terreno secco o umido, piante acquatiche e sedimenti dei filtri di piscine e deve essere raccolto in contenitori sterili di vetro o di polipropilene. Le procedure di processamento di campioni d'acqua sono descritte in Health Protection Agency, 2004 e vengono qui sintetizzate.

I campioni idrici possono essere analizzati con filtrazione, centrifugazione o semina diretta sul terreno di isolamento. Il volume di acqua da processare sarà diversificato a seconda della tipologia del sito ma generalmente per le procedure standard di ricerca di parassiti nelle acque con metodiche molecolari è richiesto almeno 1 litro d'acqua per sito di campionamento. I campioni di materiali solidi, come il fango, sono sottoposti ad esame colturale diretto e quindi tramite piastratura su agar batterizzato di aliquote del campione stesso senza previo trattamento o al massimo stemperati in soluzione di Page o acqua distillata.

La filtrazione deve procedere a circa 30 secondi per 100 mL con filtri da almeno 8 µm in considerazione del fatto che le cisti misurano minimo 10 µm, previa risospensione omogenea del campione per evitare il deposito e senza mai lasciare asciugare la membrana e fermando la filtrazione a circa 5 mL di volume residuo.

Il filtro sarà lavato da tale volume residuo ed il filtrato raccolto in un contenitore sterile ed agitato con vortex per 5 secondi.

La raccolta dei parassiti può essere condotta anche con centrifugazione a 750 x g per 20 min con rotore a cestelli mobili, ma con un'efficienza inferiore rispetto a quella ottenuta con la filtrazione. Il sovrantante sarà eliminato lasciando circa 1 mL di acqua residua del sovrantante con la quale il sedimento sarà risospeso e recuperato dalla provetta.

Dopo agitazione con vortex per 5 secondi il materiale potrà essere piastrato direttamente per la coltura oppure processato per l'estrazione del DNA e sottoposto ad amplificazione genica con i *primer* specifici.

L'esame colturale diretto è sempre consigliato per campioni concentrati o semi solidi.

Il campione centrifugato o il campione naturale concentrato va piastrato su agar batterizzato come descritto sopra con 5 semine puntiformi o tre linee. Se il sedimento non è visibile, il concentrato deve essere delicatamente diffuso su tutta la superficie della piastra e lasciato assorbire per essiccamento.

La stessa membrana di filtrazione può essere adagiata sulla superficie di agar della piastra per consentire alle amebe di invadere l'agar. La coltura proseguirà con le temperature ed i tempi già descritti ricordando che, nel caso di campioni ambientali, in particolare di campioni d'acqua, un mancato isolamento di amebe può essere dovuto anche all'eccessiva quantità di protozoi piastrati per cui è consigliabile non utilizzare mai grandi volumi per l'isolamento su piastra.

TERAPIA DELL'ACANTAMEBIASI

Per quanto concerne il trattamento nell'encefalite granulomatosa amebica non vi è alcun protocollo raccomandato e la maggior parte dei casi sono diagnosticati in fase *post-mortem*. La mancanza di composti antiamebici insieme alla selettività della barriera emato-encefalica, ha innalzato ad oltre il 90% il tasso di mortalità. L'utilizzo di ketoconazolo, fluconazolo, sulfadiazina, pentamidina isetionato, azitromicina, itraconazolo, o rifampicina ha comportato pochi casi di successo. Attualmente l'amfotericina B è l'unico farmaco che abbia dimostrato una certa efficacia, se somministrato per via intratecale in corso di meningoencefalite amebica primaria (Mito *et al.*, 2012)

Per quanto riguarda il trattamento terapeutico della cheratite amebica, qualunque sia la metodica con cui si riesce a giungere alla sua diagnosi di certezza, è di fondamentale importanza iniziare tempestivamente la terapia medica necessaria ad eradicare l'infezione, poiché i risultati migliori si ottengono quando l'ulcera non ha raggiunto la porzione profonda dello stroma. Nelle infezioni superficiali infatti, la sola terapia topica con colliri antisettici/disinfettanti può risolvere completamente il quadro clinico e portare ad una completa *restitutio ad integrum*. Al contrario, nei casi di cheratite profonda, anche se la terapia (che può durare svariati mesi) può comunque comportare una risoluzione dell'infezione attiva e l'eradicazione di tutte le cisti, esitano spesso delle importanti opacità corneali (leucomi) che compromettono la funzione visiva e rendono necessario un trapianto di cornea.

Sfortunatamente, essendo la forma cistica estremamente resistente, la terapia con normali farmaci antibiotici o antiparassitari non è sufficiente e si rende necessario l'utilizzo di colliri a base di disinfettanti quali agenti antisettici (poliesametilenebiguanide e clorexidina allo 0,02%), derivati della diamina e derivati azolici, o anche il comune povidone iodato (Betadine[®]) allo 0,5%. Anche con questo tipo di terapia l'eradicazione completa delle cisti è estremamente difficile da perseguire e può richiedere diversi mesi, con una grave compromissione della qualità della vita dei pazienti, che sono sottoposti ad un notevole stress per il dolore causato dall'infezione e dalla terapia stessa. A tal proposito va sempre tenuto a mente che non è infrequente una scarsa *compliance* dei pazienti alla terapia, poiché l'instillazione dei colliri può comportare intenso bruciore e peggiorare il dolore causato dall'infezione stessa.

In conclusione, la cheratite da *Acanthamoeba* è una patologia che rappresenta per l'oculista una doppia sfida, diagnostica e terapeutica: dopo aver superato le difficoltà diagnostiche legate alla somiglianza del quadro clinico che nelle fasi iniziali può ricordare altre forme di cheratite (quali la cheratite da *Herpes simplex*), è necessario affrontare notevoli difficoltà terapeutiche per poter giungere ad un'efficace eradicazione delle cisti. Non è infrequente infine, anche dopo aver risolto l'infezione, dover sottoporre i pazienti ad un trapianto corneale per ovviare alle opacità corneali che possono residuare, e restituire quindi una qualità visiva adeguata.

Per tutti questi motivi è importante attuare un'adeguata prevenzione dell'infezione, informando quantomeno i portatori di lenti a contatto che è di fondamentale importanza curarsi dell'igiene delle lenti ed evitare il contatto delle lenti con acqua potenzialmente contaminata. Poiché *Acanthamoeba* ha una diffusione ubiquitaria, ciò vuol dire innanzitutto evitare l'uso di lenti a contatto in piscina o sotto la doccia, evitare di lavarle sotto l'acqua del rubinetto, e ricordarsi di pulire o sostituire frequentemente il loro contenitore.

EPIDEMIOLOGIA E PROBLEMA SANITARIO

A tutt'oggi disponiamo di dati epidemiologici sulla acantamoebiasi riguardanti soprattutto la patogenesi oculare. L'incidenza delle encefaliti granulomatose amebiche da *Acanthamoeba* è, infatti, fortunatamente molto bassa ma alcuni casi autoctoni sono stati descritti in Italia anche se sporadicamente ed occasionali (Scaglia *et al.*, 1987). La localizzazione diversa dall'occhio è, comunque, un fatto correlato con l'immunodeficienza o con caratteristiche predisponenti alla manifestazione di patologie da amebe, come coloro che attraverso lesioni di varia natura (meccanica, chimica o biologica), favoriscono l'entrata del protozoo che di per sé non è capace di invasività attiva (Khan, 2006). Per quanto riguarda, invece, le infezioni cheratiniche causate da *Acanthamoeba*, benché prima si ritenesse che nell'uomo fossero molto rare, oggi è più possibile identificarle e ci si è resi conto che costituiscono un problema di sanità pubblica emergente. Dalla revisione della letteratura scientifica sull'argomento pubblicata da Schaumberg *et al.*, nel 1998, sull'andamento epidemiologico delle cheratiti amebiche dal 1973 al 1998, emerge la forte correlazione fra queste e la diffusione delle lenti morbide all'inizio degli anni '80, con un'impennata a partire dal 1984. La casistica del 1985 dimostra con certezza questa associazione. Nel 1987, è stata individuata una frequenza maggiore di casi fra portatori di lenti a contatto che non trattano l'igiene delle lenti secondo le raccomandazioni e che le indossano in corso di balneazione.

L'incidenza delle amebiasi oculari risulta fra 1,65 e 2,01 casi per milione di portatori nel periodo dal 1985 al 1987 mentre da uno studio di Seal *et al.*, del 1999, risulta la frequenza di un caso ogni 30.000 portatori di lenti a contatto. La reale incidenza annuale delle cheratiti da *Acanthamoeba* non è ancora esattamente conosciuta probabilmente perché sono ancora sconosciuti molti fattori di rischio specialmente di origine ambientale. Le specie del genere *Acanthamoeba* infatti, sono amebe a vita libera ubiquitarie ed eurieche e per questo, come già detto, si possono trovare nei più disparati ambienti, a differenti condizioni di temperatura, di salinità, di pH e di osmolarità. Il passaggio dalla fase di trofozoite a quella cistica, inoltre, rende queste amebe capaci di persistere nell'ambiente e di diffondersi con facilità. L'implementazione dei metodi diagnostici di tipo molecolare, inoltre, consente di migliorare le conoscenze tassonomiche sul genere *Acanthamoeba* e sull'epidemiologia dell'acantamebiasi (Khan & Paget, 2002).

Rimane notevole senz'altro il fatto che l'85% di casi di cheratite causate da *Acanthamoeba* si verificano nei portatori di lenti a contatto e che è significativamente correlata la giovane età ed il sesso maschile, probabilmente in relazione ad una minore attenzione all'igiene personale, alla mancanza di un'adeguata cura delle lenti a contatto, a procedure di disinfezione non conformi. Per questo nella diagnostica della cheratite amebica è necessario tener conto dei fattori di rischio ed indagare non solo sul campione biologico di origine oculare ma anche sulle lenti a contatto e sui liquidi di lavaggio stessi, utilizzati dal paziente in osservazione (Boost *et al.*, 2008).

Solo operando questa correlazione è possibile codificare l'entità dei diversi fattori di rischio sia comportamentali che ambientali con particolare attenzione a questi ultimi con cui il paziente può essere entrato in contatto.

In ambiente ospedaliero riveste importanza il fatto che sia opportunistica in pazienti immunodeficienti e compromessi e che sia veicolo di infezioni batteriche gravi d'interesse nosocomiale, eppure è stata identificata nelle strutture ospedaliere e piscine fisioterapiche, nonché da unità di dialisi e stazioni di lavaggio occhi (sia mobili che fisse). Questo accade probabilmente in quanto *Acanthamoeba* è legata ai biofilm ove si nutre di batteri la cui

formazione dipende dalla presenza di umidità e di contagio ambientale da molte diverse fonti di crescita batterica. Per quanto riguarda i campioni clinici, *Acanthamoeba* è stata isolata da svariati distretti quali da cavità nasali, gola, tamponi faringei, tessuti polmonari, lesioni cutanee, feci umane, biopsie corneali, fluidi cerebrospinale e da autopsie di tessuto cerebrale.

I dati epidemiologici riportati lasciano riflettere sulla necessità di articolare progettualità specifica per questa infezione emergente allo scopo di poterne valutare il reale grado di incidenza e di rischio per la popolazione sicuramente per la patologia oculare ma, probabilmente anche per quella cerebrale per la quale esiste una forte sovrapponibilità della sintomatologia e degli aspetti patogenomici con le infezioni cerebrali di tipo batterico. In questi casi è necessario porre una diagnosi differenziale per evitare un errore terapeutico ed intercorrere in una sottostima della casistica.

L'acantamebiasi in Italia

Già nel 1971 Pennisi *et al.* riportano un'indicazione di contatto della popolazione italiana, proveniente da diverse regioni, con questo protozoo. Nel corso di uno studio sierologico indicano una percentuale intorno al 4% di presenza di anticorpi nella popolazione. Nel 1987 Scaglia *et al.* riportano l'isolamento di *Acanthamoeba* sp. e *Naegleria* sp. in acque ad utilizzo umano ponendo l'attenzione al rischio patogenico di queste presenze e negli anni 90 vengono diagnosticati sia un caso di grave meningoencefalite da *Acanthamoeba* in un paziente HIV+ (Di Gregorio *et al.*, 1992) che due casi di cheratite bilaterale (Manso *et al.*, 1993; Giovannini *et al.*, 1994) anche associata all'uso di lenti a contatto (Mancino *et al.*, 1997).

Recentemente nel nostro Paese sono stati rinvenuti casi di acantamebiasi in pazienti con infezioni corneali e portatori di lenti a contatto. Per i casi studiati è stata operata la diagnosi molecolare e quindi la caratterizzazione genetica (Di Cave *et al.*, 2009; Gatti *et al.*, 2010) con l'utilizzo dei *primer* per la regione del 18S rRNA (Rns) descritti da Schroeder *et al.* nel 2001.

In entrambi gli studi condotti su pazienti italiani si è partiti da campioni biologici ottenuti direttamente da "scraping" corneali e biopsie corneali ed in qualche caso dall'analisi della stessa lente a contatto. La diagnosi specifica di acantamebiasi è stata condotta prima con l'analisi microscopica e successivamente con quella colturale, confermata poi dalla diagnosi molecolare con PCR e il lavoro di Gatti *et al.*, condotto su 16 casi di cheratite amebica riporta il genotipo T4 come l'unico agente eziologico responsabile delle infezioni oculari studiate. Le sequenze degli ampliconi ottenuti, infatti, sono state confrontate con quelle relative a ceppi di riferimento per il genotipo T4 di *Acanthamoeba*, quello più frequente nelle infezioni conclamate e più virulento, ottenendo una percentuale di similarità genetica maggiore del 98%. In questo studio è stato anche possibile ricondurre i protozoi isolati e caratterizzati come T4 al gruppo morfologico II di Pussard-Pons (Gatti *et al.*, 2010).

Lo studio condotto da Di Cave *et al.* su 140 casi di infezioni oculari provenienti dal distretto ospedaliero oftalmico di Bari riporta che il 13,6% dei casi studiati era effettivamente dovuto ad *Acanthamoeba* spp appartenenti sia al genotipo T4 che al genotipo T15. Questo dato è particolarmente importante se si pensa che è ritracciato per la prima volta in Italia e che tale genotipo corrisponde alla specie *A. jacobsi* fino ad ora isolata soltanto in campioni ambientali (Hewett *et al.*, 2003).

Nonostante i dati sulla casistica in Italia non siano ancora relativi ad un elevato numero di casi, essi sono indicativi di una forte associazione della patologia oculare con il genotipo T4, ritenuto il più patogeno, in accordo con quanto già descritto in letteratura (Ledee *et al.*, 2009) oppure il più diffuso nell'ambiente. In base a questi studi ed altri ancora in corso, si vede come un'indagine condotta in modo mirato, con l'applicazione di protocolli utili alla diagnosi

differenziata con altri agenti quali virus e batteri causa di affezioni oculari, sia in grado di evidenziare la presenza di cheratiti ad eziologia protozoaria.

CONCLUSIONI

Riassumendo, le infezioni umane da *Acanthamoeba* spp. sono distinguibili in due diverse manifestazioni cliniche. Le specie possono raggiungere il sistema nervoso centrale dando luogo ad una meningoencefalite sub-acute encefalite granulomatoso amebica. L'altra infezione dà luogo a cheratite AK (amebic keratitis) in cui si riscontra fotofobia, dolore e calo del *visus*.

La trasmissione dipende principalmente da due fattori: la virulenza del parassita e lo stato immunitario del soggetto. La sopravvivenza di queste amebe a vita libera è legata agli ecosistemi acquatici ed è ormai appurato che, in tal modo, possa raggiungere facilmente le acque di uso comune per la popolazione ed entrare in contatto con l'uomo. Anche la presenza di trofozoiti e cisti di *Acanthamoeba* nel suolo è da correlare con la presenza nelle acque a causa del dilavamento e del corso delle acque, senza trascurare la possibile dispersione delle cisti, particolarmente leggere, nell'ambiente aereo.

Le amebe in generale si nutrono di batteri e per *Acanthamoeba*, in particolare, è stata ampiamente dimostrata la capacità di veicolare, in tal modo, specie patogene batteriche quali *Legionella*, di grande importanza sanitaria per l'uomo. Le specie batteriche e virali per le quali si sta via via dimostrando la capacità vettoriale da parte di *Acanthamoeba* sono, in realtà, molte e con patogenicità diversificata. La potenzialità di veicolare altri protozoi patogeni causa di infezioni "water-borne" è ancora da valutare.

Anche nel caso di virus di particolare interesse sanitario nell'ambiente acquatico, come *Norovirus* e *Rotavirus*, sarebbe opportuno valutarne l'implicazione. È dunque inevitabile sottolineare che non si deve sottovalutare il problema sanitario causato direttamente o indotto da questa ameba a vita libera il cui ruolo patogeno si sta dimostrando emergente. È chiaro inoltre che un intervento diagnostico debba prevedere la caratterizzazione molecolare a livello specifico diagnosticando caso per caso la specie e il genotipo infettante e la sua eventuale patogenicità, dal momento che non tutte le specie e i genotipi descritti sono patogeni.

Resta, quindi, un elevato interesse sanitario relativo alla presenza di *Acanthamoeba* nelle acque per utilizzo antropico, in particolare per la balneazione e per scopi medici.

È opportuno, infatti, ricordare che la contaminazione di acque per uso potabile da parte di questo protozoo non rappresenta un problema sanitario collegato con l'ingestione, ma solo con il contatto come succede quando l'acqua di acquedotto viene utilizzata per scopi diversi dal potabile o nella balneazione.

Pertanto, la presenza di *Acanthamoeba* dovrebbe essere considerata una minaccia potenziale per la salute associata con le attività umane in bacini idrografici di superficie, in particolare per il contatto con l'acqua e quindi per la balneazione. La sua presenza nel bacino idrografico di superficie dovrebbe essere seriamente considerata una minaccia potenziale per la salute pubblica se le sue acque vengono utilizzate per attività di balneazione. La sua presenza è a tutt'ora descritta in apparecchiature di climatizzazione e nei condizionatori d'aria sia per l'impianto di raffreddamento ad acqua che ad aria (a causa della volatilità delle cisti, molto leggere) e quindi sia in entrata che in uscita. A tutt'oggi non è stata ancora ben indagata la sua implicazione nelle infezioni nosocomiali, anche se esistono alcune evidenze riguardanti *Legionella*, ad essa strettamente associata, e non è stato valutato, come per altri protozoi, quale sia il grado di contenimento esercitato dagli attuali protocolli di disinfezione. Risulta dunque fondamentale approfondire le conoscenze al fine di proporre linee-guida per la sorveglianza sugli ecosistemi idrici, il controllo di tale parassita e la prevenzione di esposizioni dannose per la popolazione tramite la progettazione di eventuali dispositivi specifici per evitare il contagio.

È necessario sensibilizzare i ricercatori per implementare studi che permettano di ottenere ulteriori informazioni utili per una conoscenza più ampia del parassita, della sua distribuzione e delle infezioni ad esso associate anche allo scopo di migliorare i metodi di diagnosi dell'infezione e di rilevamento del parassita. Come nel caso di altre parassitosi, la continua applicazione di *marker* genetici nella diagnosi per la determinazione dei genotipi isolati nei casi clinici, consentirà di comprendere meglio i meccanismi di virulenza di questa specie e di poter valutare se è in atto una differenziazione evolutiva di genotipi opportunisti sempre più legati al parassitismo a partire dalla specie caratterizzata da vita libera. Questo processo cognitivo consentirà di mettere a punto terapie sempre più mirate e di sapere se l'ambiente rappresenta effettivamente un reservoir di tutti i genotipi con evidenti rischi per la popolazione.

Riuscire a "quantizzare" i diversi fattori di rischio ambientale consentirà di utilizzare conoscenze consolidate per dare suggerimenti ai cittadini, agli operatori sanitari e ai progettisti d'impianti idraulici e di potabilizzazione delle acque per contenere il problema sanitario con interventi di prevenzione primaria. Fare formazione sul problema nei vari luoghi d'esposizione dall'ambiente domestico a quello ricreativo fino a quello di lavoro consentirà di avviare un intervento di educazione sanitaria primaria a tutela degli individui esposti.

È opportuno che si cominci a sensibilizzare tutti i medici oculistici non solo ad applicare l'indagine anamnestica di routine ma anche a somministrare ai pazienti un questionario per l'analisi dei fattori di rischio che consenta di risalire al possibile contagio attraverso l'acqua del rubinetto di casa o del bacino idrico in cui si può aver nuotato con assiduità (laghi, piscine, idromassaggi terapeutici, ambienti marini) oppure al contagio tramite suolo e polvere. Risulta, inoltre, importantissimo istituire dei protocolli di standardizzazione dei metodi di diagnosi a partire dalle modalità di esecuzione dello "scraping" corneale al processamento dei campioni e al protocollo diagnostico sia molecolare che culturale. La gestione e manipolazione delle lenti a contatto, dei contenitori e dei liquidi di risciacquo rappresenta, come già detto, un punto cardine della prevenzione e su questo aspetto sono state già pubblicate raccomandazioni negli USA (Legarreta *et al.*, 2013; Shovlin *et al.*, 2013; Anger & Lally, 2008) in India (Gupta & Tandon, 2008) e in Giappone (Committee for the Drafting of Guidelines for the Clinical Management of Infectious Keratitis, 2007) ma poco è stato fatto dal punto di vista pratico.

Tali processi di ricerca e standardizzazione permetteranno di definire linee guida per la prevenzione e la sorveglianza delle infezioni da *Acanthamoeba*.

BIBLIOGRAFIA

- Allen PG, Dawidowicz EA. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J Cell Physiol* 1990;145:508-13.
- Alsam S, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Infect* 2005;51:150-6.
- Alves DS, Moraes AS, Nitz N, de Oliveira MG, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R, Cuba CA. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. *Exp Parasitol* 2012;131(2):239-44.
- Anger C, Lally JM. *Acanthamoeba*: a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. *Eye Contact Lens* 2008;34(5):247-53.
- Astorga B, Martin-Navarro CM, Moreno J, Navarrete E. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning Units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol* 2011;58:542-4.
- Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks. *Water Research* 2010;45:6603-14.
- Barker J, Humphrey TJ, Brown MW. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 173:291-5.
- Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Muñoz C, Ibarra-Montes Mdel R, Ramírez-Flores E, Hernández-Martínez MD. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol* 2010;126(1):54-8.
- Boost M, Cho P, Lai S, Sun WM. Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optom Vis Sci* 2008;85(7):526-30.
- Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol* 2004;51(2):192-200.
- Bottone EJ, Perez AA, Gordon RE, Qureshi MN. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J Med Microbiol* 1994;40:148-54.
- Bowers B, Korn ED. Localization of lipophosphoglycan on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. *J Cell Biol* 1974;62:533-40.
- Bowers B, Olszewski TE. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J Cell Biol* 1983;97:317-22.
- Bowers B, Olszewski TE. Pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii*, kinetics and morphology. *J Cell Biol* 1972; 53:681-94.

- Buse HY, Ashbolt NJ. Counting *Legionella* cells within single amoeba host cells. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(6):2070-2.
- Byers TJ, Hugo ER, Stewart VJ. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences. *J Protozool* 1990;37:17S-25S.
- Byers TJ, Kim BG, King LE, Hugo ER. Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991;13:S373-S384.
- Castellani A. *Furunculosis Cryptococcica vel Blastomycetica vel Moniliaca: (Folliculitis decalvans cryptococcica pro parte)*. *Proc R Soc Med* 1930; 23(7):1042-3.
- Cateau E, Verdon J, Fernandez B, Hechard Y, Rodier MH. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2011;319(1):19-25.
- Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 IN swimming-pool waters from southern Brazil. *Acta Trop* 2011;117(3):233-5.
- Chan LL, Mak JW, Low YT, Koh TT, Ithoi I, Mohamed SM. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Trop* 2011;117(1):23-30.
- Chang CW, Kao CH, Liu YF. Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella Pneumophila* released from *Acanthamoeba* And *Hartmannella*. *J Appl Microbiol* 2009;106(1):97-105.
- Colson P, Raoult D. Gene repertoire of amoeba-associated giant viruses. *Intervirology* 2011;53:330-43.
- Committee for the Drafting of Guidelines for the Clinical Management of Infectious Keratitis. Guidelines for the clinical management of infectious keratitis. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 2007;111(10):771-809.
- Couso H, Crespo E, Mazás E. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* 2007;115:1-4.
- Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. *Acanthamoeba*: osservazioni su animali di patogenicità. *Scienza* 1958;127 (3313):1506.
- 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(6):607-12.
- 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.
- Feys J. Rules and regulations concerning contact lens-related infection. *J Fr Ophtalmol* 2004;27(4):420.
- Feng Y, Hsiao YH, Chen HL, Chu C, Tang P, Chiu CH. Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhyodes*. *Genomics* 2009;94(2):132-7.
- Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 1965;2(5464):740-2.
- 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.

- 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.
- Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, Batellier L, Di Cave D, Chaumeil C. Rapid detection and simultaneous molecular profile characterization of *Acanthamoeba* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74(2):137-41.
- Górnik K, Kuźna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med* 2004;11(2):233-6.
- Górnik K. Pathogenic properties of free-living amoebae isolated from natural and man-made bathing sites in the province of Western Pomerania. *Ann Acad Med Stetin* 2005;51(1):127-33.
- Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to freelifving amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413-33.
- Gupta N, Tandon R. Investigative modalities in infectious keratitis. *Indian J Ophthalmol* 2008;56(3):209-13.
- Hayashi Y, Fukumoto T, Mizutani Y, Yao T, Yamaguchi H. Host range of obligate intracellular bacterium *Parachlamydia acanthamoebae*. *Microbiol Immunol* 2010;54:707-13.
- Health Protection Agency. *Isolation and identification of Acanthamoeba species. National Standard Method W 17*. London: HPA; 2004.
- 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. *Microbiol* 2006;43:125-30.
- Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (*Lobosea: Acanthamoebidae*). *Acta Protozool* 2003;42:325-9.
- Hsu BM, Huang CC, Chen JS, Chen NH, Huang JT. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res* 2011;45:5171-83.
- Ibarra-Montes R, Ramírez-Flores E, Hernández-Martínez MD. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol* 2010;126:54-8.
- Jeong H, Yu H. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean J Parasitol* 2005;43(2):47-50.
- 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.
- Kao PM, Hsu BM, Hsiung N. Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. *Environ Monit Assess* 2012;184(7):4335-44.
- Khan NA, Paget T. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 2002;44:444-9.
- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:564-95.

- Khan NA. Novel *in vitro* and *in vivo* models to study central nervous system infections due to *Acanthamoeba* spp. *Exp Parasitol* 2009;126:69-72.
- 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):165.
- Kilvington S, Beeching JR, White DG. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J Clin Microbiol* 1991;29:310-4.
- Koenig SB, Solomon JM, Hyndiuk RA, Sucher RA, Gradus MS. *Acanthamoeba keratitis* associated with gas permeable contact lens wear. *Am J Ophthalmol* 1987;103:832.
- Krishna-Prasad BM, Gupta SK. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci* 1978; 47:245-7.
- La Scola B, Raoult D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:75-9.
- Ledee DR, Iovieno A, Miller D, Mandal N, Diaz M, Fell J, Fini ME, Alfonso EC. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba keratitis* patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47(5):1458-62.
- 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
- Liu H, Ha Yr, Lee St, Hong Yc, Kong Hh, Chung Di. Genetic Diversity Of *Acanthamoeba* Isolated From Ocean Sediments. *Korean J Parasitol* 2006; 44(2):117-25.
- Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med* 2005;12(2):233-6.
- Ly TM, Müller HE. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* 1990;33(1):51-4.
- 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; 54:755-759.
- Magliano ACM, da Silva FM, Teixeira MMG, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol* 2009;123:231-5.
- Magnet A, Galván AL, Fenoy S, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Pérez-Irezábal J, Bandyopadhyay K, Visvesvara GS, da Silva AJ, del Aguila C. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res* 2012;111(1):383-92.
- 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.

- 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.
- Mathers W, Sutphin JE, Folberg R, Meier PA, Wenzel RP, Elgin RG. Outbreak of keratitis presumed to be caused by *Acanthamoeba*. *Am J Ophthalmol* 1996;12(2):129-42.
- 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.
- Michel R, Burghardt H, Bergmann H. *Acanthamoeba* naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1995;196:532-44.
- Mito T, Suzuki T, Kobayashi T, Zheng X, Hayashi Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba* in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(10):6305-13.
- Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974;2(7896):1537-40.
- Neff RJ. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol* 1969; 23:51-81.
- Ondriska F, Mrva M, Lichvár M, Ziak P, Murgasová Z, Nohýnková E. First cases of *Acanthamoeba keratitis* in Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 2004;11(2):335-41.
- Ovrutsky AR, Chan ED, Kartalija M, Bai X, Jackson M, Gibbs S, Falkinham JO 3rd, Iseman MD, Reynolds PR, McDonnell G, Thomas V. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(10):3185-92.
- Paterson GN, Rittig M, Siddiqui R, Khan NA. Is *Acanthamoeba* pathogenicity associated with intracellular bacteria? *Exp Parasitol* 2011;128:207-10.
- Pennisi L, Mento G, Todaro F. Sulla diffusione di anticorpi anti-*Acanthamoeba castellanii* in soggetti provenienti da varie regioni italiane. *Parassitologia* 1971;13:299-308.
- Preston TM, Richard H, Wotton RS. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Letters* 2001;194:143-7.
- Pussard M, Pons R. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977;13:557-610.
- Pussard M. Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931 (Hartmannellidae-Amoebida). *Protistologica* 1966;2:71-93.
- Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980;33:1179-83.
- Scaglia M, Gatti S, Brustia R, Strosselli M, Bernuzzi AM, Cevini C. Pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp.: a new autochthonous isolate from an Italian thermal area. *Microbiologica* 1987;10:171-82.
- Scaglia M. Human pathology caused by free-living amoebae. *Ann Ist Super Sanita* 1997;33:551-66.

- Scheid P, Schwarzenberger R. Free-living amoebae as vectors of *Cryptosporidia*. *Parasitol Res* 2011;109(2):499-504.
- Scheid P, Schwarzenberger R. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of *Adenoviruses*. *Parasitol Res* 2012;111(1):479-85.
- Schroeder JM, Booton GC, 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.
- Seal D, Kirkness C, Bennett H, Peterson M. *Acanthamoeba keratitis* in Scotland: risk factors for contact lens wearers. *Cont Lens Anterior Eye* 1999;22(2):58-68.
- Shovlin J. *Acanthamoeba* keratitis in rigid contact lens wearers: the issue of tap water rinses. *Int Contact Lens Clin* 1990;17:47-9.
- Shovlin JP, Argüeso P, Carnt N, Chalmers RL, Efron N, Fleiszig SM, Nichols JJ, Polse KA, Stapleton F, Wiley L, Willcox M, Bright FV, Efron N, Jones LW, Keir N, Peterson RC, Stapleton F. Ocular surface health with contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye* 2013;36 Suppl 1:S14-21.
- Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 2012;5:1186/1756-3305.
- Siddiqui R, Malik H, Jung SY, Khan NA. The type III secretion system is involved in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Exp Parasitol* 2011;128:409-13.
- Sixt BS, Heinz C, Pichler P, Heinz E, Montanaro J, Ammerer G, Mechtler K, Wagner M, Horn M. Proteomic analysis reveals a virtually complete set of proteins for translation and energy generation in elementary bodies of the amoeba symbiont *Protochlamydia amoebophila*. *Proteomics* 2011;11:1868-92.
- Steinert M, Birkness K, White E, Fields B, Quinn F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(6):2256-61.
- Thom S, Warhurst D, Drasar BS. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* 1992;36:303-6.
- Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(4):2428-38.
- Tomlinson G, Jones EA. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim Biophys Acta* 1962;62:194-200.
- Valeru SP, Wai SN, Saeed A, Sandström G, Abd H. ToxR of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Res Notes* 2012;16:5-33.
- Van Klink F, Taylor WM, Alizadeh H, Jager MJ, Van Rooijen N, Niederkorn JY. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1271-81.
- Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull* 2010;219:178-88.

- Weekers PHH, Bodelier PLE, Wijen JPH, Vogels GD. Effects of grazing by the free-living soil amoebae, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:2317-9.
- Weisman RA. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu Microbiol Rev* 1976;30:189-219.
- Wilson MD, Boakye DA, Mosi L, Asiedu K. In the case of transmission of *Mycobacterium ulcerans* in buruli ulcer disease *Acanthamoeba* species stand accused. *Ghana Med J* 2011;45:31-4.
- Winck MA, Caumo K. Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Marilise Brittes Rott Curr Microbiol* 2011;63:464-9.
- Winiecka-Krusnell J, Della Casa-Lindberg I, Dubay JP, Barragan A. *Toxoplasma gondii*: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae. *Exp Parasitol* 2009;121(2):124-31.
- Winiecka-Krusnell J, Wreiber K, Von Euler A, Engstrand L, Linder E. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* 2002;34:253-6.

*Stampato da Ugo Quintily SpA
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma*

Roma, luglio-settembre 2013 (n. 3) 7° Suppl.