



# RAPPORTI ISTISAN 19|14

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

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

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



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

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

A cura di

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

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

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

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

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

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

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

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

**Rapporti ISTISAN**  
**19/14**

Istituto Superiore di Sanità

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

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

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

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

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

Istituto Superiore di Sanità

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

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

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

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

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

Per informazioni su questo documento scrivere a: [lucia.bonadonna@iss.it](mailto:lucia.bonadonna@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

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

---

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

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

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

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



# INDICE

## **Premessa**

*Lucia Bonadonna* ..... iii

## **Tassonomia delle amebe a vita libera**

*Simona Di Pasquale* ..... 1

## **Ecologia delle amebe a vita libera**

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

## **Epidemiologia delle infezioni da amebe a vita libera**

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

## **Batteri resistenti alle amebe e implicazioni in sanità pubblica**

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

## **Impianti idrici e *governance* della qualità dell'acqua**

*Umberto Moscato, Alice Borghini, Salvatore Ferrara* ..... 37

## **Considerazioni finali**

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

## **Appendice. Determinazione di amebe a vita libera**

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

# BATTERI RESISTENTI ALLE AMEBE E IMPLICAZIONI IN SANITÀ PUBBLICA

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

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

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

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

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

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

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

## Principali famiglie e specie di microrganismi resistenti alle amebe

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

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

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

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

### ***Mycobacteriaceae***

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

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

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

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

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

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

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

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



## Legionellaceae

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Enterobacteriaceae**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Chlamydiales**

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

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

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

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

## **Pseudomonadaceae**

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

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

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

### ***Listeria monocytogenes***

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

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

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

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

### ***Acinetobacter baumannii***

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

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

### ***Burkholderia cepacia* complex**

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

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

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

### ***Helicobacter pylori***

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

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

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

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

## Conclusioni

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

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

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

## Bibliografia

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

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



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

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

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