© Masson, Paris, 1984.

Ann. Parasitol. Hum. Comp.,
1984, t. 59, n° 2, pp. 133-142.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE DEUX NOUVELLES SOUCHES PATHOGÈNES DE *NAEGLERIA AUSTRALIENSIS*

P. PERNIN* et J. F. DE JONCKHEERE**

RÉSUMÉ. Nous rapportons l'isolement de deux souches de *Naegleria* pathogènes qui par l'ensemble de leurs caractères biologiques (thermotolérance, axénisation, pathogénicité), biochimiques (comparaison des zymogrammes) et antigéniques peuvent être identifiées à *N. australiensis* dont un seul exemplaire (souche type PP 397) était jusqu'à présent connu. La pathogénicité au sein de ce genre d'amibes libres ne constitue plus désormais un caractère exclusif de *N. fowleri*.

Isolation and identification of two new pathogenic *Naegleria australiensis* strains.

SUMMARY. We report here the isolation of two pathogenic *Naegleria* strains which by their biological (thermotolerance, axenisation, pathogenicity), biochemical (zymogram patterns), and antigenic characters can be identified as belonging to *N. australiensis* whereas only one strain (type species PP 397) was known until now. The pathogenicity among this genus of free-living amoebas is no more an exclusive feature of *N. fowleri*.

Introduction

Depuis 1970 toutes les souches pathogènes de *Naegleria* quelle que soit l'origine de leur isolement, L. C. R. de malades ou milieu extérieur, appartenaient à une seule espèce *Naegleria fowleri* (Carter, 1970) considérée comme l'unique espèce pathogène du genre. Outre sa pathogénicité cette espèce se définit par un ensemble de critères biologiques (thermotolérance à 45° C, axénisation facile, absence d'agglutination par la Concanavaline A), ainsi que par l'étude de ses caractères antigéniques (Willaert, 1976). Même des souches partageant avec cette espèce de nombreuses propriétés biologiques, telles que *N. lovaniensis* (Stevens et coll., 1980), s'en différencient par l'absence totale de pouvoir pathogène ce qui leur a valu d'être dénommées initiale-

* *Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, 8 avenue Rockefeller, F 69008 Lyon.*

** *Instituut voor Hygiene en Epidemiologie, 14 Juliette Wytsmanstraat, 1050 Brussel, Belgique.*

Accepté le 5 juin 1983.

Article available at http://www.parasite-journal.org or https://doi.org/10.1051/parasite/1984592133

ment « variants non pathogènes » de *N. fowleri* (De Jonckheere et van de Voorde, 1977).

Cette situation différencie le genre *Naegleria* du genre *Acanthamoeba* où la pathogénicité est retrouvée chez de nombreuses souches appartenant à différentes espèces (De Jonckheere, 1980 ; Pernin et Riany, 1980).

Cependant l'exclusivité du pouvoir pathogène de *N. fowleri* qui a prévalu pendant plus de dix ans vient d'être remise en cause depuis la description récente par De Jonckheere (1981) d'une nouvelle espèce pathogène *N. australiensis* qui, bien que différente de *N. fowleri*, manifeste une virulence non négligeable. Mais l'existence de *N. australiensis* ne repose que sur l'étude d'un seul exemplaire connu, la souche PP 397, isolée en Australie (Jamieson, 1975).

Nous rapportons ici l'étude de deux souches, isolées pour la première fois en France, qui, par l'ensemble de leurs caractères, peuvent être rattachées à cette nouvelle espèce pathogène du genre *Naegleria*.

Matériel et méthodes

Souches étudiées

Les deux souches LSR 34 et LSR 49 ont été isolées respectivement le 25/04/79 et le 08/05/79 à partir des eaux de refroidissement d'une centrale thermique E.D.F. (Loire sur Rhône, 69 France), alors que la température de l'eau était seulement de 18° C.

Ces deux souches sont essentiellement comparées à la souche type de *N. australiensis* PP 397 (ATCC 30958) et à des souches de référence de *N. fowleri* (0359, KUL, MO4, Ans IV, E4A2, 76/14/S3) et de *N. lovaniensis* (Aq/9/1/45D).

Conditions de culture

Les souches sont cultivées en routine à 37° C sur gélose simple à 1,5 % recouverte d'*Aerobacter aerogenes* ou de *Klebsiella pneumoniae*. Leur croissance a aussi été testée après incubation à des températures plus élevées : 41 et 45° C.

L'adaptation en culture axénique a pu être obtenue à 37° C sur milieu SCGYEM (De Jonckheere, 1977) réparti à raison de 3 ml par tube (Falcon 3026 F) en ensemençant des carrés de gélose riches en trophozoïtes après addition d'antibiotiques au milieu (Pénicilline 200 UI/ml, Streptomycine 200 µg/ml).

Étude du pouvoir pathogène

Les inoculations se font par instillation nasale d'une suspension amibienne (20 µl) à de jeunes souris Swiss (15-20 g) anesthésiées au Nembutal par voie intrapéritonéale à raison de 40 mg/kg. La suspension amibienne est préparée soit par lavage des cultures monobactériennes sur gélose, soit par centrifugation et élimination

du surnageant des cultures axéniques sur SCGYEM (rétrocultures de cerveaux notamment) ; la richesse est contrôlée par comptage dans une cellule de Thoma.

Le pouvoir pathogène des amibes est vérifié après autopsie des animaux malades soit par examen direct d'une apposition de cerveau sur lame, soit par rétroculture des cerveaux ensemencés sur gélose monobactérienne ou sur milieu axénique (SCGYEM), soit enfin par examen microscopique des coupes histologiques colorées à l'hémalun-éosine.

Effet cytopathogène

L'effet cytopathogène (E. C. P.) est testé vis-à-vis de cellules Vero cultivées à 37° C en boîtes Falcon de 25 cm^2 sur milieu M199 avec sels de Earle en présence de 5 % de sérum de veau foetal et d'antibiotiques (Pénicilline 100 UI/ml ; Streptomycine 100 µg/ml). Après 3 à 5 jours le milieu surnageant est décanté, remplacé par du milieu de survie et les cultures sont infestées par une suspension d'amibes lavées en milieu M199 à raison de 15.10^4 trophozoïtes par boîte.

Les cultures incubées à 37° C sont examinées tous les jours sur microscope inversé pour apprécier le développement des amibes, l'apparition de l'E. C. P. et l'enkystement.

Immunofluorescence indirecte

Des antisérums ont été préparés chez le lapin à partir de cultures axéniques des souches PP 397 et LSR 34 de *N. australiensis*. Les amibes cultivées sur milieu SCGYEM sont recueillies par centrifugation et lavées à 3 reprises en eau distillée stérile. Les trophozoïtes sont remis en suspension dans 0,5 ml de sérum physiologique (4.10^6 pour la souche PP 397 et 2.10^6 pour la souche LSR 34) mélangé avec 0,5 ml d'adjuvant de Freund et injecté par voie sous scapulaire au lapin. Cette injection est répétée à la 5e et 11e semaine. Les sérums utilisés sont recueillis 12 semaines après la première injection. Les antisérums des souches KUL *(N. fowleri)* et Aq/9/1/45D *(N. lovaniensis)* ont été préparés antérieurement par Stevens et coll. (1980).

La technique classique d'immunofluorescence employée a été décrite précédemment (De Jonckheere et coll., 1974).

Zymogrammes

Les cellules récoltées par centrifugation des cultures axéniques sont lavées à 3 reprises dans une solution de NaCl 0,017M-Saccharose 0,25M refroidie à 4° C et remises en suspension dans cette même solution à raison de 5 µl par mg de poids humide d'organismes. La lyse s'effectue par congélation à —60° C suivie d'une décongélation rapide à 37° C et les extraits solubles sont recueillis après centrigufation pendant 50 mn à 40 000 g et 4° C. La focalisation s'effectue à puissance constante (25 Watts), voltage et intensité libres (voltage limitant : 1 200 V) pendant 90 mn pour des gels de polyacrylamide de 2 mm d'épaisseur (Pernin et coll., 1983).

Quatre activités enzymatiques ont été testées : la lactico deshydrogénase (L D H E. C. 1. 1. 1. 27), l'enzyme malique (M E E. C. 1. 1. 1. 40), la leucine aminopeptidase (L A P E. C. 3. 4. 11. 1) et la glucose phosphate isomérase (G P I E. C. 5. 3. 1. 9.) Les conditions de révélation, à l'obscurité et à 37° C. sont indiquées dans le *tableau 1*.

TABLEAU I. — Conditions de révélation des Enzymes
(Concentrations finales pour 100 ml de tampon.)

Enzyme	Substrat	Coenzyme	Enzyme liant	Autres réactifs	Tampon de révélation	Temps de révélation
L D H	D-L-Lactate Li 3 000 mg	N A D 32 mg		N B T : 20 mg P M S : 4 mg	0,1 M Tris HCl pH 7,4	2 heures
M E	L-acide malique (sel sodique) 250 mg	N A D P 30 mg		MgCl2 : 158 mg M T T : 21 mg P M S : 10 mg	0,1 M Tris HCl pH 7,4	30 minutes
L A P	L-leucine-β-naphtyl-amide 40 mg			Black K salt : 50 mg	0,2 M Tris Maléate pH 6	1 heure
G P I	D-Fructose-6-phosphate 80 mg	N A D P 20 mg	Glucose 6 phosphate deshydrogénase 50 Unités	M T T : 16 mg P M S : 6 mg MgCl2, $6H_2O$: 150 mg	0,1 M Tris HCl pH 8	1 heure

Résultats

Culture

De même que la souche type de *N. australiensis* PP 397, les deux souches LSR présentent une thermotolérance réduite en culture monoxénique par rapport à *N. fowleri*. Elles peuvent être cultivées aisément à 37 et 41° C mais ne supportent pas une température supérieure (44-45° C), à laquelle résistent les souches de *N. fowleri*.

De plus, comme pour la souche type 397, l'adaptation des deux souches LSR en culture axénique à 37° C n'a pu être obtenue que très difficilement au prix de nombreuses tentatives et seulement après de nombreux changements du milieu. La concentration des cultures cellulaires n'a pas dépassé 5.10^5 trophozoïtes/ml chiffre comparable à celui obtenu pour la souche PP 397 de *N. australiensis*. Au contraire, les souches de *N. fowleri* ou de *N. lovaniensis* s'adaptent aisément en culture axénique à 37° C et atteignent des concentrations cellulaires plus élevées de l'ordre de 2.10^6 amibes/ml.

Pouvoir pathogène

En raison des difficultés d'axénisation les premiers tests de pathogénicité ont été réalisés avec une suspension d'amibes provenant du lavage des cultures monobactériennes sur gélose. Par la suite les inoculations ont été pratiquées avec des amibes cultivées axéniquement notamment à partir des rétrocultures de cerveaux sur milieu SCGYEM.

La pathogénicité des 2 souches a été découverte à l'occasion d'inoculations systématiques avant même que ne soit connue l'existence de *N. australiensis (tableaux II et III)*.

TABLEAU II. — Pathogénicité de la souche LSR 49.

Souche	Date	Nature inoculum	Voie	Nombre d'amibes	Mortalité	Date du décès en jours
LSR 49	25.05.79	Monoxénique	IN	40.000	2/5	7, 11, S, S, S.
	26.10.79	Monoxénique	IN	17.000	6/8	5, 6, 8, 10, 10, 10, S, S.
	24.04.80	Monoxénique	IN	15.000	0/6	S, S, S, S, S, S.
	12.07.80	Bactéries tuées	IN	30.000	1/3	12, S, S.
	04.03.82	Monoxénique	IN	> 100.000	3/3	7, 8, 10.
	04.03.82	Monoxénique	IN	80.000	2/3	8, 8, S.
	14.04.82	Monoxénique	IN	> 40.000	3/3	6, 6, 6.
	14.04.82	Monoxénique	IN	40.000	3/3	7, 9, 10.
	28.04.82	Monoxénique	IN	25.000	3/5	8, 8, 9, S, S.
	18.05.82	Monoxénique	IN	27.000	6/6	8, 8, 8, 9, 9, 9.
	27.01.83	Monoxénique	IN	> 50.000	0/5	S, S, S, S, S.
	10.02.83	Monoxénique	IN	90.000	1/3	8, S, S,
	10.02.83	Monoxénique	IN	60.000	3/3	6, 7, 11.
	16.02.83	Monoxénique	IN	80.000	7/7	7, 7, 7, 8, 8, 9, 12.
	08.03.83	Monoxénique	IN	60.000	5/5	5, 6, 7, 7, 10.
Témoin Bactérien	19.03.82	Suspension de Klebsiella	IN		0/4	S, S, S, S.
LSR 49	16.03.82	Axénique (rétroculture de cerveaux)	IN	30.000	4/5	7, 8, 9, 9, S.
	26.03.82	Axénique	IN	50.000	1/2	10, S.
	27.03.82	Axénique	IN	25.000	2/3	7, 9, S.
	22.02.83	Axénique	IN	20.000	0/4	S, S, S, S.
	28.02.83	Axénique	IN	30.000	2/2	4, 7.

TABLEAU III. — Pathogénicité de la souche LSR 34.

Souche	Date	Nature inoculum	Voie	Nombres d'amibes	Mortalité	Date du décès en jours
LSR 34	10.05.79	Monoxénique	IN	40.000	3/5	9, 11, 14, S, S.
	04.10.79	Monoxénique	IN	10.000	1/5	10, S*, S, S, S.
	01.08.80	Monoxénique	IN	15.000	0/5	S, S, S, S, S.
	15.10.80	Monoxénique	IN	30.000	0/5	S, S, S, S, S.
	01.04.82	Monoxénique	IN	140.000	0/5	S*, S, S, S, S
	07.04.82	Monoxénique	IN	40.000	3/4	9, 10, 12, S.
LSR 34	20.04.82	Axénique (rétroculture de cerveaux)	IN	25.000	1/5	9, S*, S, S, S.

* Souris malade qui récupère spontanément.

Elle s'est trouvée confirmée trois ans plus tard à l'occasion de multiples essais et quelle que soit la nature de l'inoculum (culture axénique ou monoxénique).

Les résultats obtenus permettent de constater qu'il s'agit d'un pouvoir pathogène qui par comparaison à celui observé pour les souches de *N. fowleri* apparaît atténué à deux points de vue :

— d'une part parce que la mortalité observée est souvent partielle, voire même irrégulière en particulier pour la souche LSR 34. Elle est souvent comprise entre 20 et 80 % alors que le pourcentage de mortalité observé à la suite de l'inoculation de mêmes doses de *N. fowleri* atteint généralement 100 % ;

— d'autre part parce que le délai moyen de survie calculé à 8 jours pour la souche LSR 49, se trouve augmenté par rapport à celui habituellement noté dans les infestations expérimentales à *N. fowleri* où les décès surviennent en général plus rapidement entre le 5e et le 7e jour. Le pouvoir pathogène de deux souches LSR 34 et 49 est confirmé lors de l'autopsie aussi bien par l'examen direct des appositions de cerveaux que par les rétrocultures ou l'examen anatomopathologique qui dans tous les cas permettent d'observer la présence d'amibes. Sur les coupes histologiques, celles-ci apparaissent toutefois moins nombreuses *(fig. 1 et 2)* et donc plus difficiles à retrouver que dans les infestations à *N. fowleri* où l'envahissement cérébral est plus marqué.

Effet cytopathogène

Alors que la souche type de *N. australiensis* PP 397 détruit la couche cellulaire en 48 heures, les souches LSR 34 et LSR 49 mettent 24 heures de plus pour produire

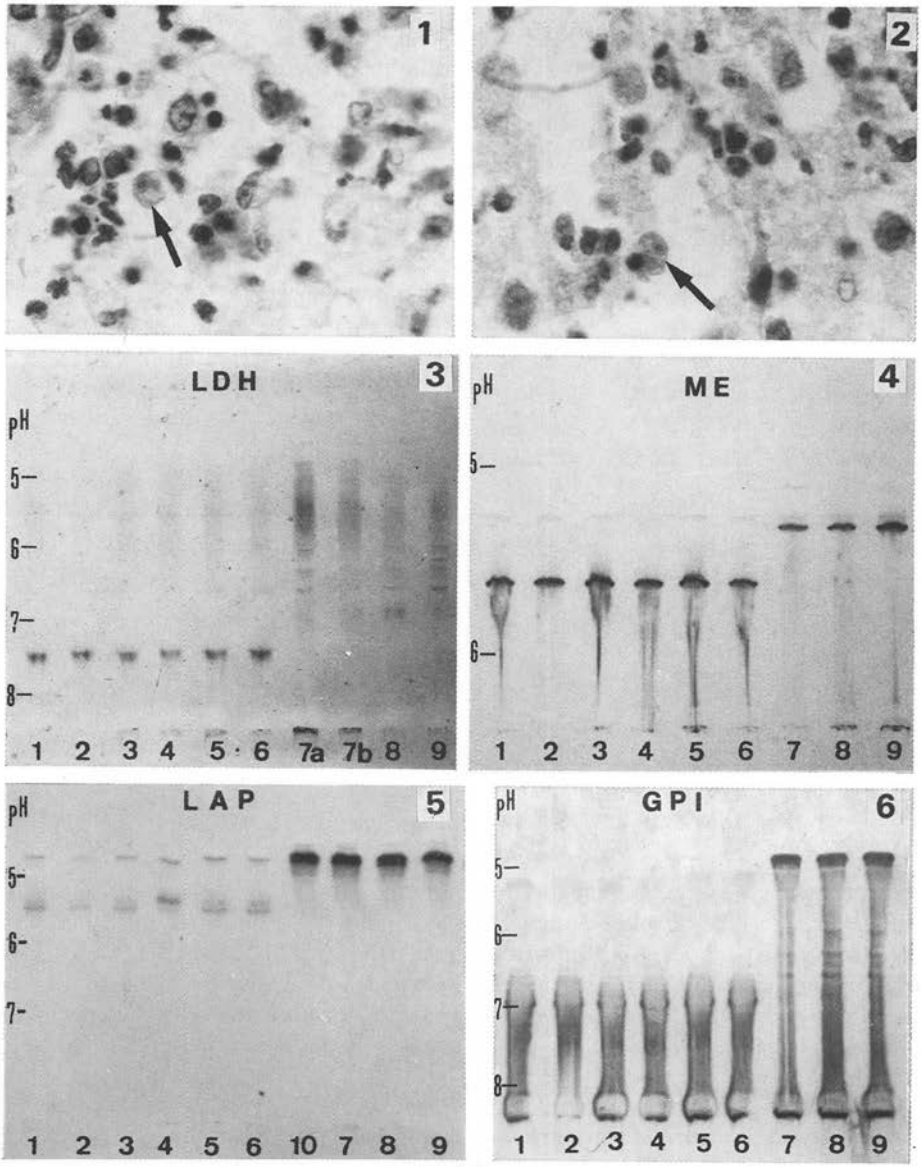

FIG. 1 et 2. — Coupes de cerveaux montrant la présence d'amibes (flèches) dans le parenchyme cérébral après instillation nasale (souche LSR 34). (× 630.)

FIG. 3 à 6. — Zymogrammes sur gel de polyacrylamide des souches de *N. fowleri* et *N. australiensis*. *3.* : Lactico-deshydrogénase *4.* : Enzyme malique. *5.* : Leucine aminopeptidase. *6.* : Glucose phosphate isomérase

Numérotation des souches

— 1 à 6 : souches de *N. fowleri*

1 = 0359 ; 2 = KUL ; 3 = MO_4 ; 4 = AnsIV ; 5 = $76/14/S_3$; 6 = E_1A_2.

— 7 à 10 : souches de *N. australiensis*

7 = PP 397 ; 8 = LSR 49 ; 9 = LSR 34 ; 10 = By 33.

N.B. La souche By 33, dont l'étude est encore en cours, peut être rattachée à *N. australiensis* d'après les résultats des zymogrammes (souche isolée le 7.08.79 sur le canal de rejet de la centrale E.D.F. de Bugey, 01).

un effet cytopathogène identique. Au contraire l'effet cytopathogène des souches de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* s'exerce en 24 heures, tandis que les souches de *N. gruberi* ne manifestent pas d'effet cytopathogène.

Immunofluorescence

Les titres atteints *(tableau IV)* par les souches LSR 34 et LSR 49 vis-à-vis de l'Antisérum de la souche de référence *N. australiensis* PP 397 et vis-à-vis de l'Antisérum de la souche LSR 34 sont nettement plus élevés que ceux obtenus vis-à-vis de l'Antisérum *N. lovaniensis* Aq/9/1/45D ou de l'Antisérum *N. fowleri* KUL, confirmant ainsi les parentés antigéniques entre les souches LSR et *N. australiensis* et au contraire leurs différences avec *N. fowleri* et *N. lovaniensis*.

TABLEAU IV. — Résultats de l'immunofluorescence.
(Inverse des Titres.)

Antigène	PP 397	LSR 34a	LSR 49b	Aq/9/1/45D	KUL
Antisérum					
PP 397	2 560	1 280	2 560	320	320
LSR 34a	640	640	640	80	80
Aq/9/1/45D	80	40	160	1 280	320
KUL	80	80	40	320	640

Zymogrammes

Les zymogrammes des souches LSR 34 et LSR 49 obtenus après isoélectrofocalisation s'avèrent absolument identiques à celui de la souche type PP 397 de *N. lovaniensis* pour les 4 enzymes testées (L. D. H., M. E., L. A. P., G. P. I.) et diffèrent nettement au contraire de celui des souches de *N. fowleri*.

Pour la L. D. H. *(fig. 3)*, les souches de *N. australiensis* se caractérisent par l'absence de bande majeure, alors que les souches de *N. fowleri* présentent une bande à pI 7,53.

Pour l'enzyme malique *(fig. 4)*, les souches LSR 34 et LSR 49 présentent comme *N. australiensis* en gradient 4-6,5 une bande anodique intense de pI 5,40 surmontée d'une deuxième bande d'intensité très faible à pI 5,2. Les souches de *N. fowleri* se différencient par 2 bandes bien distinctes des précédentes : une bande principale à pI 5,55 et une deuxième bande moins intense à pI 5,34.

Pour la L. A. P. *(fig. 5)* les souches de *N. australiensis* présentent une double bande très intense de pI 4,64 et 4,74 à l'exception de la souche LSR 34 qui ne possède que la bande majeure à pI 4,64. Les souches de *N. fowleri* partagent avec *N. australiensis* une bande à pI 4,74 mais se différencient par l'existence de deux autres bandes à pI 5,35 et 5,48.

La G. P. I. *(fig. 6)* permet également de caractériser les souches de *N. australiensis* bien que la révélation présente un effet de traînée du côté cathodique. Les souches de *N. fowleri* présentent une zone principale de révélation qui s'arrête à pHi 6,56 comme valeur la plus acide, alors qu'au contraire les souches de *N. australiensis* se caractérisent par une migration beaucoup plus anodique qui atteint pHi 4,86.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus à la suite des inoculations permet d'affirmer le pouvoir pathogène de ces 2 souches ainsi que son maintien dans le temps.

La nature de l'inoculum utilisé lors de certaines instillations (amibes en présence de bactéries) pose le problème de l'étiologie de la Méningoencéphalite, l'atteinte cérébrale pouvant être à priori d'origine bactérienne ou amibienne. Cependant la vérification de l'agent causal lors de l'autopsie des animaux inoculés dans ces conditions ne laisse persister aucun doute à ce sujet. En effet d'une part tous les cerveaux qui ont fait l'objet d'un examen direct ont permis de retrouver des amibes mobiles, d'autre part aucun des cerveaux prélevés de façon stérile et ensemencés ensuite sur milieu SCGYEM en l'absence totale d'antibiotiques n'a donné lieu à un développement bactérien qui n'aurait pas manqué de se produire sur ce milieu, si la méningoencéphalite était d'origine bactérienne. De plus toutes les rétrocultures de cerveaux ainsi ensemencées, soit sur gélose *Aerobacter*, soit sur milieu axénique SCGYEM se sont révélées positives au point de vue amibien. Enfin, l'instillation d'un témoin bactérien (suspension concentrée de Klebsiella) n'a été suivie d'aucun décès.

Ces constatations permettent donc d'écarter le rôle pathogène éventuel des bactéries pour retenir au contraire celui des amibes.

On peut alors se demander si la présence des bactéries dans l'inoculum n'a pas un effet potentialisateur qui renforcerait la pathogénicité de ces souches en créant localement des conditions favorables à la pénétration à travers la muqueuse olfactive. Les décès résultant de l'instillation des rétrocultures axéniques sur milieu SCGYEM *(tableaux II et III)* apportent sur ce point un élément de réponse définitive, en démontrant que les amibes possèdent bien un pouvoir pathogène propre en dehors de la présence de tout germe. Ces considérations peuvent s'appliquer aux 2 souches étudiées, bien que la souche LSR 34 semble à première vue de virulence plus faible.

L'ensemble des résultats recueillis tant sur le plan biologique (thermotolérance, faculté d'axénisation, pathogénicité, effet cytopathogène), que sur le plan antigénique (immunofluorescence) et surtout biochimique (zymogrammes), démontrent que ces deux souches partagent suffisamment de caractères communs avec la souche type PP 397 de *N. australiensis* pour considérer qu'elles appartiennent à la même espèce.

L'isolement des deux souches LSR 34 et LSR 49 confirme donc la validité de cette nouvelle espèce dont un seul exemplaire (PP 397) isolé sur le continent australien était officiellement connu.

La pathogénicité au sein du genre *Naegleria* ne constitue plus un caractère exclusif de *N. fowleri* et la recherche du pouvoir pathogène expérimental, qui, sur le plan pratique demeure un des critères les plus utilisés se trouve désormais remise en cause comme test de différenciation. L'étude des zymogrammes ou des protéinogrammes par isoélectrofocalisation apparaît de plus en plus comme un complément indispensable pour aboutir à une identification précise des souches de *Naegleria*.

Enfin, la provenance de ces trois souches de pays fort éloignés de même que l'isolement très récent de souches comparables en Allemagne (Michel et De Jonckheere, 1983) ainsi qu'en Italie (Scaglia et coll., 1983) plaident en faveur d'une distribution géographique très large de cette espèce, comme c'est le cas pour *N. fowleri*. La répartition vraisemblablement ubiquitaire et le caractère pathogène de *N. australiensis* laissent craindre qu'elle ne soit un jour incriminée à l'origine de cas de MEAP chez l'homme.

REMERCIEMENTS : Ce travail a reçu un support financier de l'Électricité de France.

BIBLIOGRAPHIE

CARTER R. F. : Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, 1970, *100*, 217-244.

DE JONCKHEERE J., VAN DIJCK P., VAN DE VOORDE H. : Evaluation of the indirect fluorescent antibody technique for identification of *Naegleria species*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1974, *28*, 159-164.

DE JONCKHEERE J. : Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, *33*, 751-757.

DE JONCKHEERE J., VAN DE VOORDE H. : Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *N. fowleri*. *J. Protozool.*, 1977, *24*, 304-309.

DE JONCKHEERE J. : Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba spp. Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, *39*, 681-685.

DE JONCKHEERE J. : *Naegleria australiensis sp. nov.*, another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* 1981 *17*, 423-429.

JAMIESON J. A. : Studies of amoebae of the genus *Naegleria*. *M. S. thesis*. Adelaide Australia, 1975, 1-48.

MICHEL R., DE JONCKHEERE J. : Erster Nachweis einer pathogenen *Naegleria* art (*N. australiensis* De Jonckheere, 1981) in Deutschland. *Z. Parasitenk.*, 1983 (sous presse).

PERNIN P., RIANY A. : Étude comparative du pouvoir pathogène expérimental de souches d'*Acanthamoeba*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, *55*, 1980, 491-502.

PERNIN P., BOUIKHSAIN I., DE JONCKHEERE J., PETAVY A. F. : Comparative protein patterns of three thermophilic nonpathogenic *Naegleria* and two *Naegleria fowleri* strains by isoelectric focusing. *Int. J. Parasitol.*, 1983, *13*, 113-118.

SCAGLIA M., STROSSELLI M., GRAZIOLI V., GATTI S., DE JONCKHEERE J. : Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis (Amoebidae, Vahlkampfiidae)* from a spa in Northern Italy. *Am. Soc. for Microb.*, 1983 (sous presse).

STEVENS A. R., DE JONCKHEERE J., WILLAERT E. : *Naegleria lovaniensis* new species : isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasitol.*, 1980, *10*, 51-64.

WILLAERT E. : Étude immunotaxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida) Acta Zool. Pathol. Antv.*, 1976, *65*, 1-239.